

HDAC 저해제에 의한 인체 백혈병 U937 세포의 apoptosis 유발에 미치는 Bcl-2의 영향

이준혁¹ · 허만규² · 박동일² · 최병태¹ · 최영현^{3*}

동의대학교 한의학과 ¹해부학교실, ²내과학교실, ³생화학교실 및 동의대학교 대학원 바이오품질제어학과(BK21 program)

Received February 12, 2007 / Accepted March 5, 2007

Effects of Bcl-2 Overexpressing on the Apoptotic Cell Death Induced by HDAC Inhibitors in Human Leukemic U937 Cells. Jun Hyuk Lee¹, Man Gyu Hur², Dong Il Park², Byung Tae Choi¹ and Yung Hyun Choi^{3*}. Departments of ¹Anatomy, ²Internal Medicine and ³Biochemistry, Donggeui University College of Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control (BK21 Program), Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, Korea – Histone deacetylase (HDAC) is overexpressed in a variety of cancers and is closely correlated with oncogenic factors. HDAC inhibitors such as trichostatin A (TSA) and sodium butyrate (Na-B) have been shown to induce apoptosis *in vitro* and *in vivo* in many cancer cells. The anti-apoptotic Bcl-2 protein has the remarkable ability to prevent cell death and Bcl-2 overexpression has been reported to protect against cell death. We previously reported that the apoptotic cell death of human leukemic U937 cells by TSA and Na-B treatment was associated with the down-regulation of Bcl-2 expression and activation of caspases. In the present study, we investigated the effects of Bcl-2 overexpression on the growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induced by TSA and Na-B in U937 cells. TSA-induced growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis were significantly attenuated in Bcl-2 overexpressing U937/Bcl-2 cells however Na-B did not affected. Induction of apoptosis by TSA was accompanied by down-regulation of Bcl-2 expression, activation of caspase-3, -8 and -9, and degradation of DNA fragmentation factor/inhibitor of caspase-activated DNase, which was blocked by the overexpression of Bcl-2. Collectively, these findings suggest that ectopic expression of Bcl-2 appeared to inhibit TSA-induced apoptosis by interfering with inhibition of Bcl-2 and caspase activation.

Key words – HDAC inhibitor, U937, apoptosis, Bcl-2, caspase

서 론

DNA와 복합체를 이루는 histone 단백질의 기능 조절에는 acetylation, methylation, 인산화, ubiquitination 및 ADP-ribosylation 여부 등이 관여하는데[16,26], 그 중 histone 단백질의 N-말단 부위에 존재하는 lysine을 acetylation 시킴으로써 chromatin의 구조를 변화시키는데 관여하는 것이 histone acetyltransferase (HAT) 복합체이다[23]. 특히 HAT에 의하여 histone 복합체를 이루는 4가지 histone의 lysine 잔기가 acetylation 되지만, N-말단 부위는 histone의 상호작용에 의한 nucleosome 구조 유지에 중요한 영향을 미치지 않는 곳이며 그곳이 hyper-acetylation 되어도 nucleosome 구조의 변화에도 큰 영향이 없다. 그러나 histone의 acetylation에 의하여 chromatin의 구조적 folding이 불안정화 되어 DNA에 RNA polymerase II의 접근이 쉽게 될 수 있도록 하여 전사가 활성화될 수 있기 때문에 histone deacetylases (HDACs)에 의한 histone의 deacetylation은 전사활성을 억제한다는 의미가 된다[1]. 따라서 HDAC 억제제의 개발은 항암치료제 개발의 수단으로서 매우 중요한 의미를 가지고 있으며, 현재까지 알려진 HDAC 억제제는 약 20여 가지 이상이고[26],

HDAC 억제제의 대부분은 인체 암세포의 세포주기 교란 및 apoptosis 유발과 동물 모델에서 종양 증식억제 효과가 있는 것으로 보고되어지고 있다.

HDAC 억제제 중, Streptomyces에서 유래된 trichostatin A (TSA)는 항균제로서 처음 개발된 것이었으나 저농도 처리 조건에서 포유동물 세포 histone 단백질의 acetylation 유도 효과가 매우 높았으며, HDAC의 활성 또한 효과적으로 억제하는 것으로 알려진 후 대표적인 HDAC 억제제로 사용되는 물질이다[39]. 선행연구들에서 TSA는 세포의 증식과 생존을 억제하는 유전자들의 전사활성을 유도하여 다양한 암세포의 세포주기 교란 및 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 왔다 [4,6,11,17,20,34,38]. 그리고 TSA 및 TSA의 hydroxamate 유도체들은 현재 임상시험에 사용 중이지만[6], 아직 인체 혈구 암세포에 관한 연구는 상대적으로 매우 미비하게 이루어져 있다.

한편 sodium butyrate (Na-B)는 포유동물 장내 세균에 의하여 생성되는 짧은 지방산으로[13], Kruh에 의하여 특히 대장세포의 비정상적인 증식을 억제할 수 있음이 처음 밝혀진 바 있다[22]. 비록 Na-B의 분자생물학적 기전은 아직까지 정확하지 않으나, HDAC의 활성을 저해할 수 있으며[7], 이로 인한 세포주기[3,12,36], 분화 및 세포의 생존[10,24,25,35] 등과 연관된 유전자들의 활성 변화를 위한 관련 유전자들의 chromatin remodeling과 전사활성을 조절할 수 있음이 밝혀

*Corresponding author

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

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

지고 있다. 특히 Na-B가 처리된 암세포에서는 apoptosis 억제에 관여하는 유전자들의 발현은 일반적으로 감소되고, apoptosis 유도에 관여되는 유전자들의 발현이 증가되는 일반적인 유사성이 많은 종류의 암세포에서 보고되어지고 있다[10,24,25,35]. 이러한 측면에서 Na-B는 정상세포에서는 큰 독성이 없는 범위에서 암세포의 apoptosis를 효율적으로 유도함으로써 암세포의 증식을 제어할 수 있는 물질로 많은 관심을 받고 있다.

암의 치료를 위한 분자생물학적 표적 중의 하나인 apoptosis 유발에는 p53이나 Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀져 왔다. 그중 Bcl-2 family에 속하는 Bcl-2 member 유전자 산물은 apoptosis를 억제하는 반면, Bax member의 과발현이 이루어졌을 때는 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다[9,15]. 이들은 서로 dimer를 형성하면서 cytochrome c와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다[2]. 또한 caspase protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화되어 직접 또는 간접으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여하게 된다[28,32]. 특히 apoptosis는 암세포의 성장, 증식의 억제와 암세포 파괴의 한 방법으로써 널리 연구되고 있으므로 항암제 개발을 위한 후보물질의 암세포 apoptosis 조절관련 기전해석은 필수적으로 선행되어야 할 분야로 인식되어지고 있다[15].

최근까지 본 연구실에서는 대표적인 HDAC 억제제인 TSA 및 Na-B에 의한 몇 가지 인체암세포의 증식에 미치는 연구를 진행하여 왔으며[4,18,10,11,38], 특히 인체혈구암세포인 U937 세포에서 이들에 의한 apoptosis 유발에 Bcl-2 family에 속하는 유전자들의 발현 변화가 중요하게 작용함을 발표한 바 있다[10,38]. 따라서 본 연구에서는 인체백혈병 세포인 U937 세포에서 제작된 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2 유전자가 과발현된 U937 세포주(U937/Bcl-2)와 정상수준을 유지하고 있는 세포주(U937/vector)를 대상으로 TSA나 Na-B와 같은 HDAC 억제제에 의한 인체백혈병 세포의 증식 억제, 세포주기 교란 및 apoptosis 유도 활성의 차이를 조사하여 Bcl-2의 직접적인 영향을 비교하였다.

재료 및 방법

U937 세포의 배양 및 HDAC 저해제의 처리

본 연구에 사용된 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포는 Moon et al.에 의하여 제시된 것과 같이[27], 90%의 RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD)과 0.7 µg/mL geneticin (G418 sulfate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이 함유된 배지를 사용하여 37°C,

5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. TSA 및 Na-B는 Sigma에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해하여 -20°C에 보관하였고, 매회 처리 전 배지에 희석 후 사용하였다.

Hemocytometer를 이용한 세포 증식율의 측정

세포 배양용 6 well plate에 2 x 10⁴개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 TSA 80 nM을 처리하여 72 시간까지 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 trypan blue (Gibco BRL)로 염색 후 도립 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 살아있는 세포를 계수하여 이에 따른 결과를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존도의 조사

세포 배양용 6 well plate에 2 x 10⁴개/ml 정도로 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 HDAC 저해제를 적정 농도로 처리하였다. 48시간 후 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 DMSO로 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포주기 변화의 분석

HDAC 저해제가 함유된 배지에서 적정시간 동안 배양시킨 세포들을 모아 고정시킨 후 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하여 알칼리, 4°C에서 1시간 동안 염색하였다. 다시 PBS로 세척 과정을 거친 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) program을 사용하여 분석하였다.

DAPI 염색에 의한 핵의 형태 변화 관찰

준비된 세포를 3.7% formaldehyde 용액으로 10분 동안 고정 후, cytospin으로 slide glass 위에 부착시켰다. PBS로 수세 후 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정하였다. 그 후 다시 PBS로 수세하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액으로 암하에서 15분 정도 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 세척하고 absolute alcohol을 이용하여 탈수 및 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

Western blotting 분석

단백질 발현 분석을 위하여 준비된 세포들을 lysis buffer

[25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]로 용해한 후, 정량하고 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 따른 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

In vitro caspase 활성의 측정

준비된 세포들로부터 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유

된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고, caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 3시간동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

HDAC 저해제에 의한 U937 세포의 생존율 억제에 미치는 Bcl-2의 영향

두 가지 종류의 HDAC 저해제인 TSA와 Na-B의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제에 미치는 Bcl-2의 영향을 비교하기 위하여 본 연구에 사용된 U937/Bcl-2 세포주의 Bcl-2 단백질 발현의 정도를 U937/vector 세포주와 먼저 비교하였다. Fig. 1A에 나타난 Western blotting의 결과에서 알 수 있

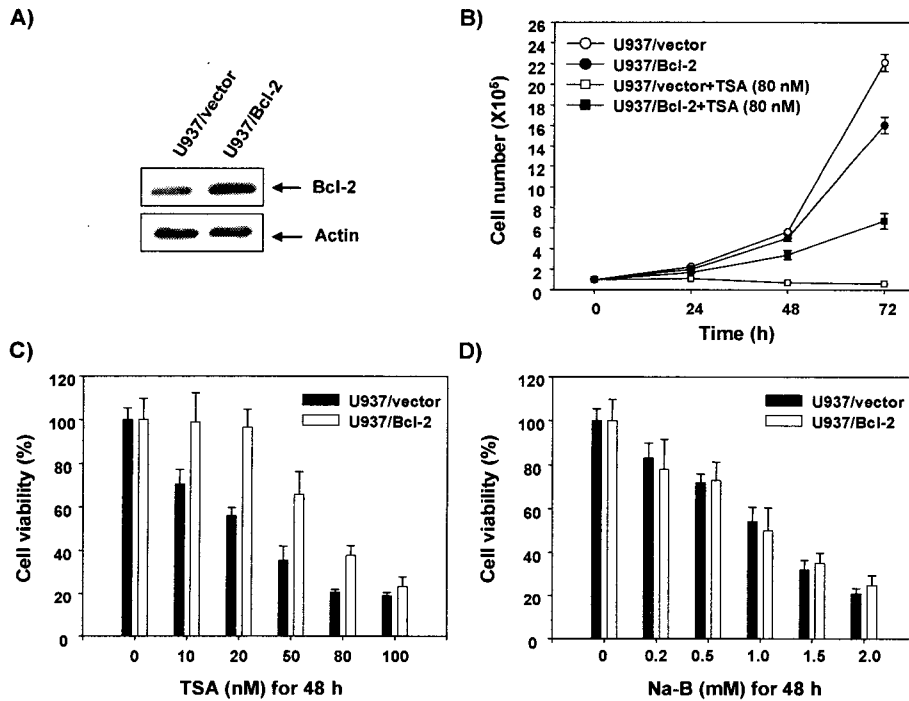


Fig. 1. Effects of Bcl-2 overexpressing on the cell growth inhibition induced by HDAC inhibitors, TSA and Na-B, in U937 cells. (A) Cellular proteins isolated from U937/vector and U937/Bcl-2 cells were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. The membrane was probed with anti-Bcl-2 antibody and visualized using ECL detection system. To confirm equal loading, the same blot was stripped and reprobed with the anti-actin antibody. (B) U937/vector and U937/Bcl-2 cells were treated with TSA for the indicated times and the cell numbers were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. Results are expressed as average ± SD form three separate experiments. (C and D) Cells were treated with TSA and Na-B for 48 h. The growth inhibition was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

듯이 U937/Bcl-2 세포에서의 Bcl-2 단백질의 발현은 U937/vector 세포보다 약 3배 이상 과발현되어 있음을 확인하였다. 다음은 이와 같은 Bcl-2 발현의 차이가 있는 두 세포주에서 HDAC 저해제의 세포증식 억제 정도의 정도를 trypan blue 염색 후 hemocytometer counting 방법으로 비교한 결과, U937/Bcl-2의 성장속도가 U937/vector에 비하여 다소 retardation 되는 경향을 나타내긴 했으나 유의성 있는 값을 나타내지는 않았다(Fig. 1B). 따라서 HDAC 저해제에 의한 apoptosis 연구에 U937/vector와 U937/Bcl-2의 세포 성장률이 영향을 미치지 않을 것으로 추정되었기 때문에 U937/vector와 U937/Bcl-2 세포에서 HDAC 저해제인 TSA와 Na-B를 처리하여 세포증식율에 대한 효과를 조사하였다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이 80의 nM TSA를 24-72 시간 동안 처리한 다음 세포증식율을 측정 한 결과, TSA에 의한 세포증식 억제가 U937/Bcl-2에서 현저히 회복됨을 알 수 있었다. 그러나 Na-B에 의한 세포증식 억제는 U937/Bcl-2에서도 U937/vector와 유사한 정도의 억제를 나타내고 있어 효과가 없는 것으로 사료된다 (data not shown). 한편 U937/vector에서의 TSA 및 Na-B의 감수성은 U937 세포에서 관찰된 선행연구의 결과와도 유사하였다[10,38]. 아울러 TSA와 Na-B의 처리에 의하여 세포증식의 억제뿐만 아니라 membrane blebbing 및 shrinkage와 같은 형태적 변형을 동반하는 등 세포의 죽음이 일어나는 것으로 관찰됨에 따라 MTT assay에 의한 세포 생존도 비교를 실시하였다. 그 결과, Fig. 1C 및 D에서 나타난 바와 같이 TSA에 의한 생존도 감소는 Bcl-2의 과발현에 의하여 어느 정도 차단되는 효과가 있었으나, Na-B에 의한 생존도의 경우 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포간의 큰 차이점은 나타나지 않았다. 이는 선행연구에서 관찰된 경우와 매우 유사한 결과들이며[5,30], TSA에 의한 세포증식 억제는 Bcl-2의 과발현에 의해 극복되어 질 수 있으나, Na-B에 의한 증식 억제는 Bcl-2와 무관하다는 것을 의미한다.

HDAC 저해제에 의한 U937 세포의 세포주기 변화에 미치는 Bcl-2의 영향

HDAC 저해제들에 의한 U937 세포의 증식억제 현상과 동반된 세포주기 교란에 미치는 Bcl-2의 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도의 TSA 및 Na-B를 적정시간 처리한 후 FACS 분석을 실시하였다. Fig. 2 및 Table 1에 나타난 바와 같이, 정상배지에서 배양된 U937/vector 세포의 경우 G1기에 속하는 세포의 빈도는 약 52.2% 정도였고, S기 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 각각 35.6% 및 12.3%로 나타났다. TSA를 처리할 경우 G1기에 해당되는 세포의 빈도뿐만 아니라 G2/M기에 해당되는 빈도 역시 TSA의 농도 증가에 따라 현저하게 감소되어, 상대적으로 S기에 해당되는 세포의 빈도가 증가되었다(200 nM 처리군의 경우 약 68.6%로 대조군에 비하여 약 2배 증가). 즉 Bcl-2가 과발현되지 않은 U937

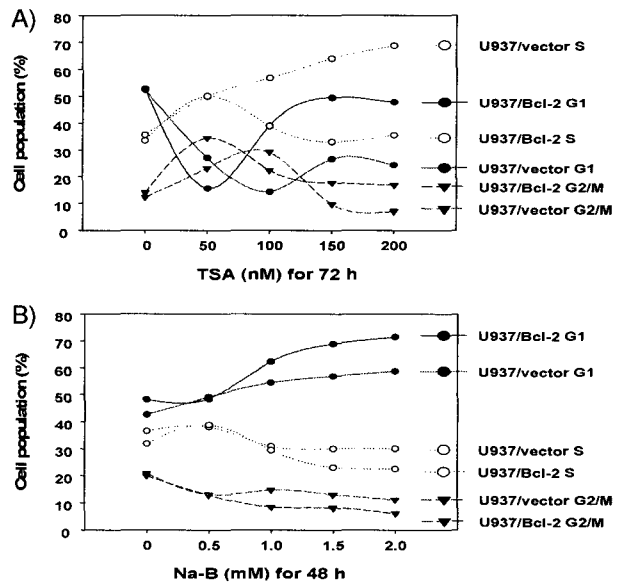


Fig. 2. Effects of HDAC inhibitors, TSA and Na-B, on cell cycle distribution in U937/vector and U937/Bcl-2 cells. Exponentially growing cells were incubated with various concentrations of TSA (A) and Na-B (B) for 72 h and 48 h, respectively. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI. DNA flow cytometric cell cycle analysis was performed.

Table 1. Frequencies of each cell cycle phase of U937/vector and U937/Bcl-2 cells cultured in the presence or absence of various concentrations of TSA and Na-B. Each phase was analyzed by flow cytometry after 48 h treatment with TSA and Na-B

| HDAC inhibitor | U937/Vector | | | U937/Bcl-2 | | | |
|----------------|-------------|------|------|------------|------|------|------|
| | % of cells | | | % of cells | | | |
| | G1 | S | G2/M | G1 | S | G2/M | |
| TSA (nM) | 0 | 52.2 | 35.6 | 12.3 | 52.7 | 33.4 | 13.9 |
| | 50 | 27.0 | 49.9 | 23.1 | 15.6 | 50.0 | 34.4 |
| | 100 | 14.3 | 56.6 | 29.1 | 35.9 | 38.8 | 22.3 |
| | 150 | 26.5 | 63.8 | 9.6 | 49.4 | 32.9 | 17.7 |
| | 200 | 24.3 | 68.6 | 7.0 | 47.7 | 35.5 | 16.8 |
| Na-B (mM) | 0 | 42.7 | 36.5 | 20.8 | 48.2 | 31.9 | 19.9 |
| | 0.5 | 49.0 | 38.0 | 13.0 | 48.4 | 38.8 | 12.8 |
| | 1.0 | 54.4 | 30.9 | 14.7 | 62.1 | 29.5 | 8.4 |
| | 1.5 | 57.0 | 30.0 | 13.0 | 68.6 | 23.1 | 8.1 |
| | 2.0 | 58.9 | 30.1 | 11.1 | 71.4 | 22.5 | 6.0 |

세포에서의 선행연구 결과에서처럼 U937/vector 세포에서 TSA에 의한 세포증식의 억제는 세포주기 S arrest 유발과 직접적인 연관이 있음을 알 수 있었다[10,38]. 그러나 U937/Bcl-2 세포에서 TSA 처리에 의한 세포주기 진행에 미치는 영향을 조사한 결과, TSA를 처리하지 않은 배지에서 배양된 세

포 및 TSA가 처리된 조건에서 배양된 세포 모두에서 세포주기 빈도 변화에 뚜렷한 차이점을 찾아볼 수가 없었다. Na-B 처리군의 경우는 U937/vector 세포에서 S기 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도가 다소 감소했으나, 대조군에 비하여 큰 차이점은 없었으며, U937/Bcl-2 세포에서의 경우는 Na-B 처리 농도가 증가할수록 G1기에 해당되는 세포의 빈도가 다소 증가되는 경향성을 보여 주었다(2.0 mM 처리군에서 약 1.5 정도 증가). 이러한 결과는 선행연구와는 약간의 차이가 있었으나[5,29], TSA와 Na-B 처리군에 따른 차이점은 TSA 처리군에서만 관찰되는 Bcl-2의 과발현에 의한 세포 증식억제 차단 효과에 기인된 결과로 추정되어진다.

HDAC 저해제에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발에 미치는 Bcl-2의 영향

이상의 결과에서 HDAC 저해제에 의한 U937 세포의 증식 억제 및 세포주기 교란은 Bcl-2의 과발현에 의해 극복되어질 수 있음을 알 수 있었으며, apoptosis 유발 시 전형적으로 나타나는 다양한 형태적 변형(membrane shrinkage, blebbing 등)이 동반된 것으로 관찰되었기 때문에, apoptosis 유발에 관한 추가적인 자료를 얻기 위하여 FACS 분석을 실시하였다. Fig. 3A 및 B에서 보는 바와 같이 U937/vector 세포의 경우, TSA의 처리 농도 의존적으로 sub-G1기에 해당되

는 세포 빈도의 증가, 즉 apoptosis가 현저하게 유발되는 것으로 나타났으나, U937/Bcl-2 세포에서 TSA에 의한 apoptosis 유발은 효과적으로 억제되었다. 그러나 Na-B에 의한 apoptosis 유발은 Bcl-2 과발현에 의하여 억제되지 않아 Fig. 1 및 2에서 관찰된 결과들과 상호 연계성이 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 형태적인 차이로 직접 확인하기 위하여 DAPI 염색 후 각 세포주 핵의 형태변화를 관찰하였다. Fig. 3C에서 보여주는 바와 같이 HDAC 저해제인 TSA나 Na-B에 의해서 U937/vector 세포에서는 전형적인 apoptotic 형태적 변형인 nuclear condensation, fragmentation, apoptotic body formation 등이 관찰되었다. 그리고 TSA에 의하여 일어나는 이러한 현상은 U937/Bcl-2 cell에서는 거의 완벽하게 억제되는 것으로 나타났으나 Na-B에 의한 효과는 U937/vector와 U937/Bcl-2 세포에서 큰 차이가 나타나지 않아 Fig. 3A 및 B의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

HDAC 저해제에 의한 U937 세포의 apoptosis 조절인자들 변화에 미치는 Bcl-2의 영향

이상의 결과에서 U937 세포의 Bcl-2 과발현이 HDAC 저해제 중, Na-B 보다는 TSA 처리에 의한 증식억제 및 세포교란 유도 와 연관된 apoptosis 차단 효과가 더욱 높게 나타났으므로, TSA 처리군을 대상으로 apoptosis 조절에 중요한 유

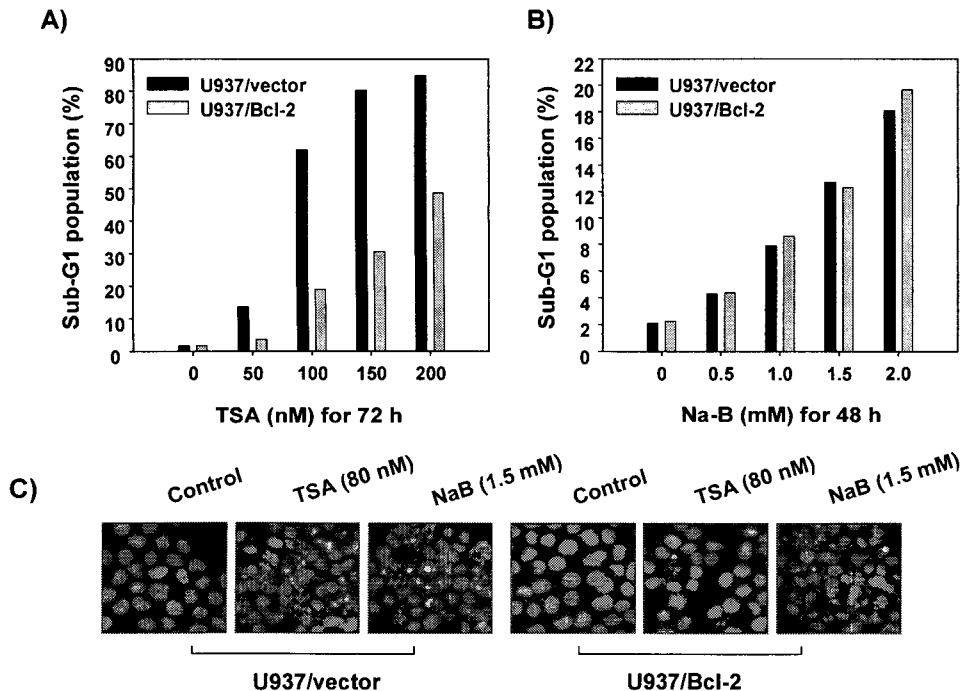


Fig. 3. Effects of Bcl-2 overexpressing on apoptosis induction induced by HDAC inhibitors, TSA and Na-B, in U937 cells. (A and B) Cells were exposed for 72 h and 48 h with increasing concentration of TSA and Na-B, respectively. Then the cells were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The percentages of cells with hypodiploid DNA (sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. (C) Cells were grown under the same conditions as (A and B) and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

전자들의 발현 및 활성의 정도를 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포에서 비교하였다. 이를 위하여 먼저 조사된 유전자는 Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 유전자 산물로서 Western blotting 분석에 의한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 apoptosis 억제에 관여하는 유전자 중 Bcl-xL의 발현은 두 세포주 모두에서 TSA의 처리에 따른 큰 차이점은 관찰되지 않았다. Bcl-2의 경우는 U937/vector 세포에서 50 nM 이상 처리군에서 대조군에 비하여 매우 감소되었음을 알 수 있었으나, U937/Bcl-2 세포에서는 100 nM 처리군에서 다소 감소되는 경향성을 보여 주었다. Apoptosis를 유발하는데 관여하는 Bcl-2 family 중 Bax는 TSA의 처리 유무에 따라 차이점은 없었으나, Bad의 경우 고농도 처리군에서 U937/vector 세포에서만 다소 발현이 증가되었다. 그리고 Bid의 경우 총 단백질 수준에서의 발현 차이도 없었으며, mitochondria로 이동되어 apoptosis 유도에 관여될 것으로 추정되는 tBid의 발현은 두 세포주에서 모두 발현이 되지 않았다. 따라서 Bcl-2 family 중 TSA 처리에 의하여 U937/vector 세포에서 관찰된 Bad 및 Bcl-2의 발현 변화가 U937/Bcl-2 세포에서는 크게 나타나지 않아 TSA에 대한 apoptosis 유발 감수성에 다소 관여되었던 것으로 추정된다.

다음은 apoptosis 유발의 초기 및 효과기 모두에서 중요한 역할을 하는 caspase의 발현 및 활성에 미치는 TSA의 영향을 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포에서 비교하였으며, Fig. 5A에 제시한 것과 같이 조사된 3 가지 pro-caspase의 발현이 U937/Bcl-2에서 보다 U937/vector 세포에서 TSA 처리에 의하여 현저하게 감소되었음을 알 수 있었다. 따라서 TSA 처리에 의한 이들 caspase의 활성화 정도를 *in vitro* 활성 조사법으로 비교한 결과, Fig. 5B에 나타낸 바와 같이 caspase-3, -8

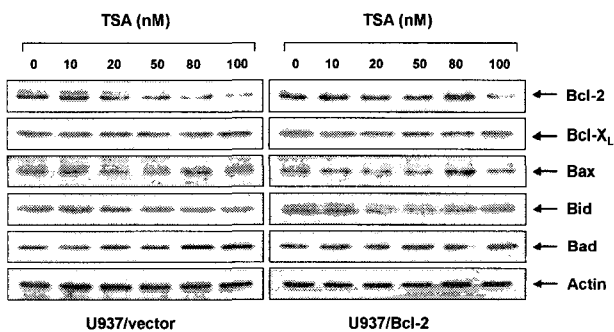


Fig. 4. Effects of HDAC inhibitors, TSA and Na-B, on the levels of Bcl-2 family proteins in U937/vector and U937/Bcl-2 cells. Exponentially growing cells were incubated with various concentrations of TSA and Na-B for 72 h and 48 h, respectively. The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

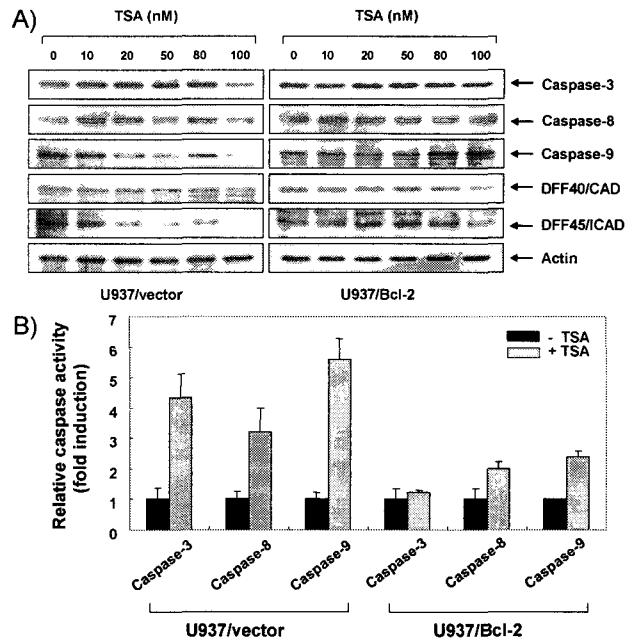


Fig. 5. Effects of HDAC inhibitors, TSA and Na-B, on the levels and activities of caspases in U937/vector and U937/Bcl-2 cells. (A) Cells were incubated with various concentrations of TSA and Na-B for 72 h and 48 h, respectively. The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) After treatment with TSA and Na-B, aliquots were incubated with substrates, DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for *in vitro* caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity, respectively, at 37°C for 1 h. The released fluorescent products were measured. Data are means \pm SD of three independent experiments.

및 -9의 활성이 100 nM TSA가 함유된 배지에서 48시간 배양된 U937/vector 세포에서 각각 4.3배, 3.2배 및 5.6배 증가되었음을 알 수 있었으나, U937/Bcl-2 세포에서는 각각 1.23배, 1.98배 및 2.4 정도로 증가되어 Western blotting에 의한 단백질 발현의 결과에서처럼 TSA에 의하여 U937/Bcl-2 세포에서 크게 활성화 되지 않았음을 알 수 있었다.

Apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 IAP family에 속하는 여러 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지니는데, 이들은 caspase와의 직/간접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀져 있다[8,31]. 그리고 FasL (Fas ligand)은 type II transmembrane 단백질로서 Fas와 결합하여 Fas가 활성화 되면 연관된 caspase의 활성화가 연속적으로 일어나 결국 apoptosis를 유발하게 되는 것으

로 알려져 있다[19,28]. 따라서 TSA에 의한 IAP family 및 Fas/FasL system의 발현변화에 미치는 Bcl-2 과발현의 영향을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 Fas/FasL system에 속하는 두 유전자의 발현은 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포에서 큰 차이점이 없었으나, IAP family에 속하는 유전자들의 경우 발현의 억제 정도가 전반적으로 U937/vector 세포주에서 TSA 처리 농도의존적으로 감소하였음을 알 수 있었다. 이러한 U937/vector 세포에서의 IAP family의 발현 감소는 caspase의 활성화를 유도하여 apoptosis 유발을 촉진시켰을 것으로 생각되지만, Bcl-2의 과발현에 의하여 이러한 작용이 억제됨을 알 수 있었다.

한편 apoptosis의 가장 중요한 현상 중 하나가 DNA의 단편화 유도이며 여기에 관여하는 인자가 DNA fragmentation factor (DFF)이다. DFF family는 caspase-activated DNase인 DFF40/CAD와 inhibitor of caspase-activated DNase인 DFF45/ICAD로 구성되어 있다. DFF40/CAD와 DFF45/ICAD는 서로 complex를 형성하고 있으며, apoptosis가 유발되면 caspase-3과 같은 효소가 caspase에 의하여 ICAD의 두 군데 Asp 잔기에서 단편화가 일어나는 것으로 알려져 있다 [14,33,37]. 따라서 DFF40/CAD 및 DFF45/ICAD의 발현이 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포에서 TSA 처리에 의하여 발현의 차이를 유도하는지를 Western blotting으로 조사해본 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 U937/vector 세포에서 DFF40/CAD의 경우는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 그리고 DFF45/ICAD의 경우, TSA 처리농도 의존적으로 단편화 현상이 관찰되었으나, U937/Bcl-2 세포에서는 큰 차이가 없었다. 즉 U937/Bcl-2 세포에 비하여 U937/vector 세포에서

TSA의 처리에 의한 apoptosis 유발은 caspase의 활성화와 연관된 DFF45/ICAD의 활성화가 관여할 것으로 생각되며, DFF45/ICAD의 활성화로 핵 내 DNA의 단편화 현상이 초래될 것으로 추정된다.

요 약

본 연구에서는 인체백혈병세포 U937에서 HDAC 저해제에 의한 증식억제, 세포주기 교란 및 apoptosis 유도에 미치는 Bcl-2 유전자의 영향에 관하여 조사하였다. 이를 위하여 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포주를 대상으로 대표적인 HDAC 저해제인 TSA 및 Na-B 처리에 의한 세포 증식 및 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과, TSA에 의한 U937 세포의 증식억제 및 생존율의 감소는 Bcl-2의 과발현에 의하여 차단되는 효과를 보였으나, Na-B는 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포 사이에 큰 변화를 보이지는 않았다. 세포주기 교란 효과에서 Na-B는 TSA에 비하여 유의적인 차이를 보이지 못하였으며, 이는 TSA에 의한 apoptosis가 U937/Bcl-2 세포에서는 억제되었으나, Na-B에 의한 apoptosis는 Bcl-2의 과발현에 의하여 차단되지 못한 것과 연관성이 있는 결과였다. 또한 TSA에 의한 apoptosis 유발의 Bcl-2에 의한 차단 효과는 TSA에 의하여 활성화된 caspase의 활성 억제, Bcl-2 발현 자체의 완화 등 apoptosis 조절 인자들의 발현 및 활성 변화에 기인 된 것임을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구의 일부임(R05-2004-000-10672-0).

참 고 문 헌

1. Aksan, I. 2002. Chromatin goes global. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 7-8.
2. Antonsson, B. and J. C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.*, **256**, 50-57.
3. Archer, S. Y., J. Johnson, H. J. Kim, Q. Ma, H. Mou, V. Daesety, S. Meng and R. A. Hodin. 2005. The histone deacetylase inhibitor butyrate downregulates cyclin B1 gene expression via a p21/WAF-1-dependent mechanism in human colon cancer cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G696-703.
4. Baek, S. Y., S. R. Kim, M. K. Bae, J. W. Hwang, J. S. Kim, Y. H. Choi, H. J. Wee, B. S. Kim, J. B. Kim, S. Yoon and S. K. Bae. 2006. Trichostatin A increases the thermosensitivity of human glioblastoma A172 cells. *Neurosci. Lett.* **396**, 230-234.
5. Bernhard, D., M. J. Ausserlechner, M. Tonko, M. Loffler,

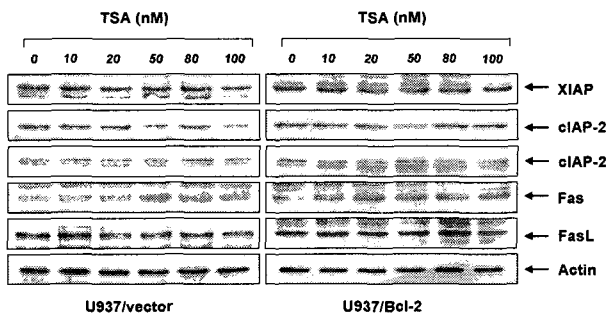


Fig. 6. Effects of HDAC inhibitors, TSA and Na-B, on the levels of IAP family and Fas/FasL system proteins in U937/vector and U937/Bcl-2 cells. Exponentially growing cells were incubated with various concentrations of TSA and Na-B for 72 h and 48 h, respectively. The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

- B. L. Hartmann, A. Csordas and R. Kofler. 1999. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *FASEB J.* **13**, 1991-2001.
6. Bouchain, G. and D. Delorme. 2003. Novel hydroxamate and anilide derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: synthesis and antiproliferative evaluation. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2359-2372.
 7. Candido, E. P., R. Reeves and J. R. Davie. 1978. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* **14**, 105-113.
 8. Cheng, J. Q., X. Jiang, M. Fraser, M. Li, H. C. Dan, M. Sun and B. K. Tsang. 2002. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway, *Drug Resist. Update* **5**, 131-46.
 9. Chiarugi, V., L. Magneli, M. Cinelli and G. Basi, 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol. Biol. Res.* **40**, 603-612.
 10. Choi, Y. H. 2006. Apoptosis of U937 human leukemic cells by sodium butyrate is associated with inhibition of telomerase activity. *Int. J. Oncol.* **29**: 1207-1213.
 11. Choi, Y. H. 2005. Induction of apoptosis by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, is associated with inhibition of cyclooxygenase-2 activity in human non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* **27**, 473-479.
 12. Chopin, V., R. A. Toillon, N. Jouy and X. Le Bourhis. 2004. P21(WAF1/CIP1) is dispensable for G1 arrest, but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* **23**, 21-29.
 13. Cummings, J. H. 1981. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* **22**, 763-779.
 14. Ding, H., S. Qiu, S. Li, J. Symersky, T. J. Green and M. Luo. 2003. Expression, purification, crystallization of fragments from the C-terminal region of DFF45/ICAD. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**, 1323-1326.
 15. Evans, V. G. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.*, **17**, 461-476.
 16. Gerber, M. and A. Shilatifard. 2003. Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 26303-26306.
 17. Herold, C., M. Gansmayer, M. Ocker, M. Hermann, A. Geerts, E. G. Hahn and D. Schuppan. 2002. The histone-deacetylase inhibitor trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J. Hepatol.* **36**, 233-240.
 18. Hwang, J. W., Y. M. Kim, S. H. Hong, B. T. Choi, W. H. Lee and Y. H. Choi. 2005. Modulation of cell cycle control by histone deacetylase inhibitor trichostatin A in A549 human non-small cell lung cancer cells, *J. Life Sci.* **15** 726-733.
 19. Jiang, C., Y. F. Yang and S. H. Cheng. 2004. Fas ligand gene therapy for vascular intimal hyperplasia. *Curr. Gene Ther.* **4**, 33-39.
 20. Kim, Y. B., S. W. Ki, M. Yoshida and S. Horinouchi. 2000. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**, 1191-200.
 22. Kruh, J. 1982. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell. Biochem.* **42**, 65-82.
 23. Kuo, M. H. and C. D. Allis. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615-626.
 24. Litvak, D. A., K. O. Hwang, B. M. Evers and C. M. Townsend. 2000. Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate. *Anticancer Res.* **20**, 779-784.
 25. Madigan, M. C., G. Chaudhri, P. L. Penfold and R. M. Conway. 1999. Sodium butyrate modulates p53 and Bcl-2 expression in human retinoblastoma cell lines. *Oncol. Rep.* **7**, 331-337.
 26. Marks, P. A., V. M. Richon, T. Miller and W. K. Kelly. 2004. Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.* **91**, 137-168.
 27. Moon, D. O., S. Y. Park, M. S. Heo, K. C. Kim, C. Park, W. S. Ko, Y. H. Choi and G. Y. Kim. 2006. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through downregulation of ERK and Akt. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 1796-1807.
 28. Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
 29. Peart, M. J., K. M. Tainton, A. A. Ruefli, A. E. Dear, K. A. Sedelies, L. A. O'Reilly, N. J. Waterhouse, J. A. Trapani and R. W. Johnstone. 2003. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.* **63**, 4460-4471.
 30. Ruefli, A. A., M. J. Ausserlechner, D. Bernhard, V. R. Sutton, K. M. Tainton, R. Kofler, M. J. Smyth and R. W. Johnstone. 2001. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10833-10838.
 31. Salvesen, G. S. and C. S. Duckett. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 401-410.
 32. Schultz, D. R. and W. J. Harrington Jr. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.*, **32**, 345-369.
 33. Semenov, D. V., P. A. Aronov, E. V. Kuligina, M. O. Potapenko and V. A. Richter. 2003. Oligonucleosomal DNA fragmentation in MCF-7 cells undergoing palmitate-induced apoptosis. *Biochemistry (Mosc)* **68**, 1335-1341.
 34. Sowa, Y., T. Orita, S. Minamikawa, K. Nakano, T. Mizuno, H. Nomura and T. Sakai. 1997. Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 142-150.
 35. Tsai, L. C., M. W. Hung, G. G. Chang and T. C. Chang. 2000. Apoptosis induced by the sodium butyrate in human gastric cancer TMK-1 cells. *Anticancer Res.* **20**, 2441-2448.
 36. Wang, Y. F., N. S. Chen, Y. P. Chung, L. H. Chang, Y.

- H. Chiou and C. Y. Chen. 2006. Sodium butyrate induces apoptosis and cell cycle arrest in primary effusion lymphoma cells independently of oxidative stress and p21 (CIP1/WAF1) induction. *Mol. Cell. Biochem.* **14**, 1-9.
37. Widlak, P. and W. T. Garrard. 2005. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J. Cell. Biochem.* **94**, 1078-1087.
38. Woo, H. J., S. J. Lee, B. T. Choi, Y. M. Park and Y. H. Choi. 2007. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells. *Exp. Mol. Pathol.* **82**, 77-84.
39. Yoshida, M., M. Kijima, M. Akita and T. Beppu. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174-17179.