

인체혈구암세포 U937의 D-Ala2-Leu5-enkephalin 처리에 의한 세포 주기 억제 효과

이준혁 · 최우영¹ · 최영현² · 최병태^{1*}

특허청 화학생명공학심사국, ¹부산대학교 한의학전문대학원 경락구조의학부, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실

Received January 19, 2009 / Accepted February 16, 2009

Cell Cycle Arrest by Treatment of D-Ala2-Leu5-enkephalin in Human Leukemia Cancer U937 Cell.

Jun Hyuk Lee, Woo Young Choi¹, Yung Hyun Choi² and Byung Tae Choi^{1*}. *Chemistry and Biotechnology Examination Bureau, Korean Intellectual Property Office, Daejeon 302-701, Korea, ¹Division of Meridian and Structural Medicine, School of Oriental Medicine, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, ²Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongeui University, Busan 614-052, Korea* - D-Ala2-Leu5-enkephalin (DADLE), a hibernation inducer, can induce hibernation-like state *in vivo* and *in vitro*. We treated U937 human leukemia cancer cells with DADLE and investigated its possible effect on transcription and proliferation. Treatment of U937 cells with DADLE resulted in growth inhibition and induction of apoptotic cell death on high-dose as measured by MTT assay and DNA flow cytometer analysis. Bcl-X_L, c-IAP-2 and survivin genes especially showed decreases in mRNA levels. DADLE treatment also inhibited the levels of cyclooxygenase (COX)-2 mRNA without alteration of COX-1 expression. DNA flow cytometer analysis revealed that DADLE caused arrest of the cell cycle on low-dose, which was associated with a down-regulation of cyclin E at the transcriptional level. DADLE treatment induced a marked down-regulation of cyclin-dependent kinase (Cdk)-2, -4 and -6. In addition, treatment with DADLE decreased telomere associated genes such as, c-myc and TERT, and increased TEP-1 in U937 cells. These results suggest that DADLE can be an inhibition agent in the cell cycle of the human leukemia cancer U937 cell.

Key words : DADLE, U937 cell, cell cycle

서 론

암은 여러 다양한 치료 기술의 진보에도 불구하고 완전히 정복되지 못하고 있는 치사율 높은 질병 중의 하나로 우리나라에서도 높은 사망률을 가진 질병이다. 다양한 방법으로 암의 치료와 예방에 많은 연구자들이 노력을 쏟고 있으며, 이중 세포 사멸은 중요한 접근방법으로 널리 연구되고 있다 [13]. 세포 사멸은 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 방어기전이며, 개체보존의 수준에서 손상된 세포들의 제거 수단이기도 하다. 세포 사멸의 유발에는 Bcl-2 family, IAP family 등 여러 중요한 인자들이 존재하며, 이들은 여러 신호들에 의해 활성화되고 또한 그 신호를 표적 단백질의 분해가 이루어지는 신호전달체계를 전달하는 것에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다 [5,12,15].

암의 증식과 발생 측면에서 세포 주기 조절의 교란은 중요한 치료 및 예방의 한 기법으로 각광받고 있다. 세포 주기에 대한 개념은 Swift 및 Howard에 의해 G1, S, G2/M기에 대한 정의가 내려지면서 성립되었으며, 그 후 진보된 실험방법에 의해 cyclin과 cdk가 동정 되었고, 이들이 세포주기에 다양하게 존재하고 여러 복합체를 이루는 것을 발견하였

다 [11,19,22]. 또한, cdk들은 cdk inhibitor에 의해 활성이 억제되며 이들 inhibitor는 선택적으로 세포주기의 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다 [16]. 따라서 세포주기의 조절은 특정 물질의 항암성 기전 해석의 기초적인 과정으로 인식되고 있다.

일부 포유류들 즉, 다람쥐, 박쥐, 곰 등은 추운 겨울을 동면이라는 특이한 적응 형태로 생존하고 있다. 동면의 주된 목적은 온도의 감소, 먹이의 부족 등으로 인한 생존의 위협을 받을 때 체내 생리적 조절에 의한 물질대사의 감소 및 에너지 요구량을 줄이는데 목적이 있는 것으로 보인다. Enkephalin family에 속하는 D-Ala2-Leu5-enkephalin (DADLE)라는 peptide는 동면을 유도하는 요소(hibernation induction factor)로 *in vivo*와 *in vitro* 상에서 유사 동면 상태를 야기한다 [2]. 또한 DADLE는 조직, 신경 그리고 세포의 생존율을 증가시키며 [8], 외부 자극으로부터 간을 보호하거나 신경을 세포 죽음으로부터 보호하기도 하는 물질로 알려져 있다 [14,20].

본 연구에서는 동면 개시 인자로 알려진 DADLE의 처리에 의한 U937 인체혈구암세포의 세포 사멸 및 세포 주기에 대한 영향을 MTT assay, DNA flow cytometer 그리고 RT-PCR 등을 이용하여 살펴보았으며 나아가 DADLE가 항암조절 연구에서 유의적인 물질로써 life-time 증가와 연관성을 알아보았다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-7379, Fax : +82-51-510-1020

E-mail : choibt@pusan.ac.kr

재료 및 방법

DADLE 및 세포배양

본 실험에 사용된 DADLE는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 최대 10 μM 의 농도로 세포에 처리하였다. U937 인체 혈구암세포는 한국세포주은행(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 세포의 배양을 위해 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY USA)와 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL)과 1%의 penicillin-streptomycin (Gibco BRL) 등이 포함된 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 배지는 매 48시간마다 교환 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 성장배지에 세포를 부유시킨 다음 적정한 수의 배지를 분주하여 재 배양하였다.

MTT assay를 이용한 세포 증식률의 측정

세포 배양용 6 well plate에 5X10⁵개/ml로 암세포를 분주하고 DADLE를 배지에 희석하여 10 μM 의 농도까지 처리하였다. 72시간 동안 처리한 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml의 농도가 되게 성장 배지로 희석하여 반응시킨 후 MTT 시약을 원심분리기를 이용하여 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 처리하여 생성된 formazan을 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 각각의 흡광도를 측정하였다.

DNA flow cytometer에 의한 세포 주기의 분석

정상 및 DADLE를 처리한 배지에서 72시간 동안 배양시킨 U937 암세포주를 phosphate-buffered saline (PBS)로 씻어 내고 CycleTEST Plus DNA Reagen Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 고정 및 propidium iodide (PI) 염색을 실시하였다. 염색 후 DNA flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 대조군 및 DADLE 처리군을 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) program을 사용하여 각 처리농도별로 분석하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA발현의 분석

정상 및 DADLE가 처리된 U937 인체 혈구암세포를 원심분리한 후 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 μg 의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 house keeping 유전자인 glyceral-

aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR product를 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 ultra violet (UV) 하에서 확인하였다.

결과 및 고찰

DADLE의 처리에 의한 U937 혈구암세포의 증식에 대한 영향

인체혈구암세포인 U937을 5×10⁵개/ml로 6 well에 분주한 후 DADLE를 0~10 μM 의 농도로 처리하였다. 72시간 동안의 배양 후 MTT assay를 이용하여 정상 및 DADLE 처리집단의 증식 억제의 정도를 분석하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 약 6 μM 의 농도까지는 DADLE가 U937 암세포주의 cell viability에 큰 영향성을 가지지 않지만, 8 μM 과 10 μM 처리집단에서는 정상집단과 비교하여 급격한 cell viability의 감소를 보였다. 즉, 농도가 낮은 경우와 농도가 높은 경우에 DADLE의 처리에 따른 영향성에 있어서 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

DNA flow cytometry에 의한 DADLE의 영향성 평가

세포주기에 DADLE가 미치는 영향성을 알아보기 위하여 정상 및 DADLE 처리집단을 72시간동안 배양시킨 후 DNA flow cytometer를 통하여 실험해보았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 0~6 μM 과 같은 낮은 농도의 DADLE 처리집단의 경우 G1기와 G2/M기가 다소 증가하는 arrest 현상을 관찰할 수 있었으며, 세포의 죽음을 의미하는 Sub-G1 집단은 낮은 농도에서는 그다지 큰 유의성을 찾아볼 수 없었으며, 8 μM 과 10 μM 과 같은 비교적 높은 농도인 경우 Sub-G1 집단이 증가하였

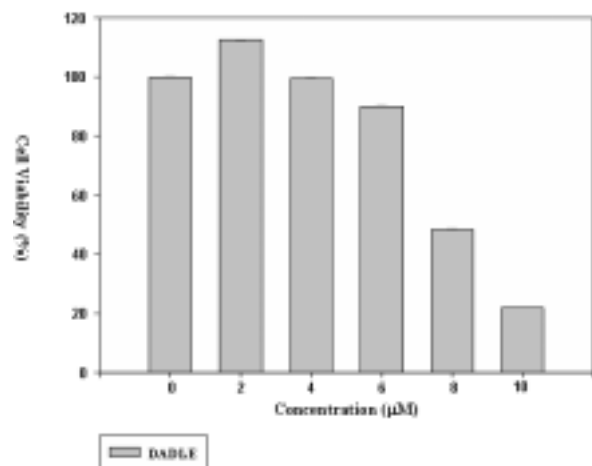


Fig. 1. Anti-proliferative effects of DADLE in U937 human leukemia cell line. Cells were treated with various concentrations of DADLE for 72 hrs and MTT assay was performed. Results are expressed as average from three separate experiments.

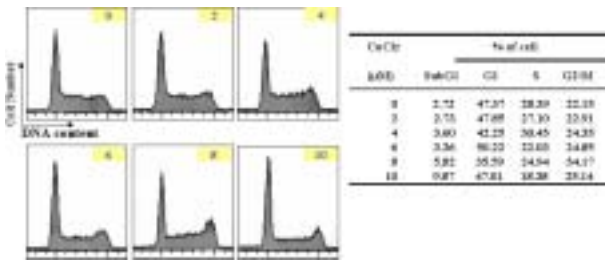


Fig. 2. Fractions of each cell cycle phase of U937 human leukemia cell line cultured in the presence or absence of various concentrations of DADLE. Each phase was analyzed by DNA flow cytometer after 72 hrs treatment with DADLE.

으며, 이는 세포의 죽음이 어느 정도 발생하였다는 사실을 알 수 있었다. 이는 DADLE를 U937 암세포주에 처리하였을 경우 낮은 농도에서는 cell cycle arrest를 야기 시키며 비교적 높은 농도를 처리하였을 경우에는 세포 사멸을 야기시키는 것을 알 수 있다.

DADLE의 처리와 세포 사멸의 연관성

U937 암세포주에서 낮은 농도와 높은 농도의 DADLE처리에 따른 영향성을 검증하고자 세포의 사멸과 관련된 유전자들을 mRNA 수준에서 발현 정도를 관찰하였다. 세포 사멸에 가장 대표적인 Bcl-2 집단에 속하는 유전자에는 anti-apoptotic 유전자로 알려진 Bcl-2와 Bcl-X_L, 그리고 pro-apoptotic 유전자로 알려진 Bax가 있다[1]. Bcl-2 집단의 상대적인 발현량의 차이는 세포 사멸의 유발을 예측하고 검증하는 척도로 사용되어지고 있다. 세포사멸 신호체계를 억제하는 IAP 집단의 발현 변화 역시 세포 사멸 유발의 또 다른 척도로 사용된다[9,12].

Fig. 3에서 보는 바와 같이 0~6 μM과 같은 낮은 농도의 DADLE 처리집단에서는 그다지 큰 Bcl-2 집단의 변화가 관찰되지 않았지만, 8~10 μM과 같은 높은 농도의 DADLE 처리집단에서는 다른 유전자에 비해 Bcl-X_L 유전자가 크게 감소하였으며 이는 세포 죽음과 연관성이 높은 것으로 생각된다. 아울러 IAP 집단에서는 높은 농도의 처리집단에서만 c-IAP-1 및 survivin의 발현감소가 관찰되었으며 이것 역시 높은 농도에서의 세포 죽음 유발과 연관성이 큰 결과로 생각된다. 하지만, 낮은 농도의 DADLE 처리집단에서는 그 어떤 변화도 관찰되지 않았는데, 낮은 농도의 DADLE 처리집단은 다른 경로를 통하여 세포에 영향성을 미친다는 것으로 사료된다.

염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin 계열 물질들은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 암과 같은 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 Prostaglandin의 합성에는 두 가지의 COX isoform이 관여하는데, COX-1은 인체의 항상성 유지와 연관된 기능을 수행하며, COX-2는 성장인자, cytokines, 암유발인자 등에 의해 유도되는 isoform으로 알려져 있다. COX-2가 과발

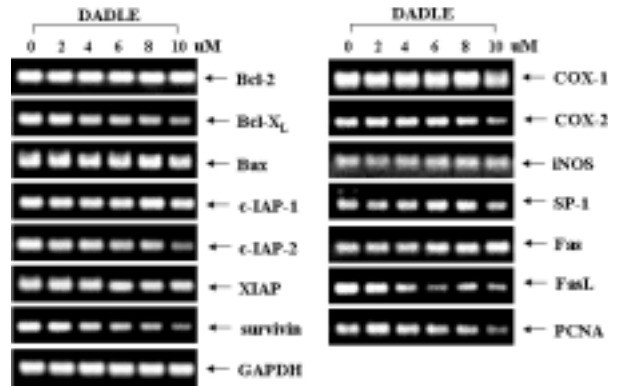


Fig. 3. Effects of DADLE treatment on the levels of Bcl-2 family, IAP family, COX family and Fas/FasL pathway in U937 human leukemia cell line. After 72 hrs incubation with DADLE, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using indicated primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control.

현 될 경우 혈관신생 및 전이능력이 높아지고 세포 사멸을 억제함으로써 암 예방전략에 많이 이용되고 있다[21]. U937 암세포주에서 DADLE의 처리집단에서는 이런 COX-2의 발현이 높은 농도에서 크게 감소하나 0~6 μM과 같은 낮은 농도에서는 별다른 변화가 관찰되지 않았다.

Fas와 FasL는 세포 사멸과 관련된 death receptor 경로의 한 부분으로서, 세포 사멸과 관련된 신호들을 세포 내부로 전달하는 역할을 하며, PCNA의 경우 세포 증식과 관련된 마커 역할을 하고 있다[7,10]. DADLE의 처리에 의한 Fas 유전자 변화는 관찰되지 않았지만, FasL의 경우 높은 농도에서 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 높은 농도에서 세포 사멸이 Fas와 FasL 경로를 어느 정도 경유하는 것으로 유추해 볼 수 있다. 세포 증식과 관련한 PCNA의 발현 역시 높은 농도의 DADLE 처리 집단에서 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 0~6 μM의 DADLE 처리집단의 경우 death receptor 경로와는 별개로 그 영향성을 발휘하는 것으로 사료된다.

DADLE의 처리와 세포 주기의 연관성

DADLE의 처리에 의해 U937 암세포주에서의 세포 주기 변화를 더욱 자세히 알아보하고자 RT-PCR에 의해 세포 주기와 관련된 여러 유전자들의 발현을 알아보았다. 세포주기의 조절 인자는 크게 cyclin과 cdk가 알려져 있으며, cyclin은 각각의 세포주기 조절 단백질이며 cdk는 각각의 세포주기의 cyclin과 결합하여 다양한 조합을 만들어서 각 세포주기 단계를 조절한다[19,22]. Cyclin은 A, B, C, D1, D2, D3, E의 7종이 알려져 있으며, cdk는 2, 3, 4, 5, 6 그리고 cdc2가 알려져 있다[3,17]. Fig. 4에서 보는 바와 같이 cyclin E 또는 cyclin A와 결합하여 세포 주기를 조절하는 것으로 알려진 cdk2의 발현이 감소하였

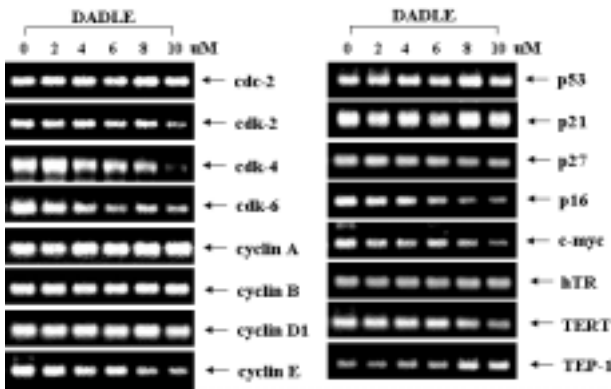


Fig. 4. Effects of DADLE treatment on the levels of cyclin family, cdk family, cdk inhibitor and telomere associated genes in U937 human leukemia cell line. After 72 hrs incubation with DADLE, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using indicated primers, and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control.

으며, cyclin D와 복합체를 이루는 cdk4 역시 발현이 DADLE 처리 농도 의존적으로 크게 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 또한 cyclin D와 복합체를 이루는 cdk6의 발현도 DADLE 처리 농도 의존적으로 감소하였다. 하지만, cyclin 집단은 E외에는 그다지 큰 변화를 보이지 않았으며, 오직 cyclin E만 처리 농도 의존적으로 감소하였다.

뿐만 아니라 p53은 cyclin E/cdk2와 cyclin A/cdk2를 억제하는 p21의 발현에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다. p21과 구조적으로 유사한 p16 및 p27은 기질 단백질들이 cyclin에 결합하지 못하도록 하는 cdk 억제자의 한 종류이다[4,18]. DADLE를 처리한 경우 특히 p27과 p16 유전자의 발현이 크게 감소하였으며, 이 결과 역시 DADLE의 처리에 의한 cell cycle arrest와 어떤 연관성이 있는 것으로 사료된다. 아울러, telomere는 세포의 노화와 수명에 밀접한 연관성을 가지고 있어 [6], 이의 발현에 관련된 c-myc 및 hTR 등의 유전자 발현을 분석해보았다. 그 결과 telomere 재배열과 관련된 c-myc의 감소와 telomerase reverse transcriptase인 TERT의 발현 감소를 관찰하였으며, telomerase associated protein인 TEP-1의 발현이 크게 증가하였다. 이는 U937에 DADLE를 처리한 경우 세포 주기 중 G1기와 G2/M기의 억제뿐만 아니라 세포의 수명에도 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

이상 세포 주기의 억제를 통한 life-time을 증가시킬 가능성에 대한 결과는 DADLE 같은 동면유발물질에 대한 생화학적, 분자생물학적 연구가 부족한 상태에서 단정할 수 없으나 이를 이용한 장기의 장기간 보관 기술 개발, 손상된 장기의 생존 확률 증가 및 저온 수술 기술 개발에 의한 질병 치료 등으로 접근하고 있다. 그리고 궁극적으로 동면 메커니즘의 구명을 통한 수명연장 등에 대한 연구도 진행되고 있어 보다 다양한

접근을 통한 연구가 요구되고 있다.

요 약

동면 개시인자로 알려진 DADLE는 여러 연구에 의해 *in vivo*와 *in vitro* 상에서 유사 동면 상태를 야기한다. 본 연구는 인체혈구암세포인 U937 세포주의 세포 사멸과 세포 주기 등에 대한 DADLE의 영향을 살펴보았다. DADLE가 처리된 U937세포는 8~10 μM 의 높은 농도에서 세포 증식이 감소하였으며, 0~6 μM 의 낮은 농도에서 영향이 없었다. DNA flow cytometer를 이용하여 세포 주기를 분석해본 결과 DADLE에 의한 세포 주기 억제가 관찰되었다. DADLE처리에 따른 세포 증식률 감소 및 세포 주기 억제효과를 전사 수준에서 조사한 결과 Bcl-XL, c-IAP-2의 발현 및 survivin의 발현 감소가 관찰되었으며, COX-2의 발현 역시 COX-1의 변화 없이 감소함을 확인하였다. 또한, cyclin E와 cdk-2, -4 그리고 -6의 발현 역시 감소하는 것을 관찰하였다. Telomere 조절 관련 유전자의 경우도 c-myc과 TERT의 감소, 그리고 TEP-1가 증가하는 현상을 관찰하였다. 이상의 결과는 DADLE를 U937 암세포주에 처리했을 때 세포 주기의 억제를 통하여 life-time을 증가시킬 가능성을 시사하며 이에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Antonsson, B. and J. C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**, 50-57.
2. Beatrice, B., V. Lorella, G. B. Maria, M. Giovanni, B. Marco, and M. Manuela. 2006. The effect of the enkephalin DADLE on transcription does not depend on opioid receptors. *Histochem. Cell Bio.* **126**, 189-197.
3. Butt, A. J., C. E. Caldon, C. M. McNeil, A. Swarbrick, E. A. Musgrove, and R. L. Sutherland. 2008. Cell cycle machinery: links with genesis and treatment of breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **630**, 189-205.
4. Caldon, C. E., R. J. Daly, R. L. Sutherland, and E. A. Musgrove. 2006. Cell cycle control in breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* **97**, 261-274.
5. Chiarugi, V., L. Magneli, M. Cinelli, and G. Basi. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol. Biol. Res.* **40**, 603-612.
6. Chung, H. K., C. Cheong, J. Song, and H. W. Lee. 2005. Extratelomeric functions of telomerase. *Curr. Mol. Med.* **5**, 233-241.
7. Genovese, C., D. Trani, M. Caputi, and P. P. Claudio. 2006. Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retino-

- blastoma gene family. *Oncogene* **25**, 5201-5209.
8. Hiroyuki, I., E. Susumu, Y. Katsuhiko, H. Takayuki, Y. Kohsho, O. Sadayuki, and K. Takashi. 2007. Protective effects of a hibernation-inducer on hepatocyte injury induced by hypothermic preservation. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg.* **14**, 509-513.
 9. Holcik, M., H. Gibson, and R. G. Korneluk. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-261.
 10. Houston, A. and J. O'Connell. 2004. The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 321-326.
 11. Howard, A. and S. R. Pelc. 1953. Synthesis of deoxy-ribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* **6**, 261.
 12. Hussein, M. R., A. K. Haemel, and G. S. Wood. 2003. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J. Pathol.* **199**, 275-288.
 13. Khalil, M. L. 2006. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **7**, 22-31.
 14. Kousyou, Y., Y. Katsuhiko, O. Sadayuki, E. Susumu, F. Junichiro, and K. Takashi. 2003. DADLE protects liver against Ischemia-reperfusion injury in the rat. *J. Surgical Res.* **114**, 72-77.
 15. Lieberthal, W., J. S. Koh, and J. S. Levine. 1998. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol.* **18**, 505-518.
 16. Morgan, D. O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
 17. Schwartz, G. K. 2005. Development of cell cycle active drugs for the treatment of gastrointestinal cancers: a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **23**, 4499-4508.
 18. Schwartz, G. K. and M. A. Shah. 2005. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **23**, 9408-9421.
 19. Sherr, C. J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3689-3695.
 20. Thomas, S. M. 2003. Squirreling away at parkinson's. *Drug discovery today* **8**, 51-52.
 21. Wang, D. and R. N. Dubois. 2004. Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin. Oncol.* **31**, 64-73.
 22. Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.