

Paclitaxel Induced Caspase-Independent Mitotic Catastrophe in Rabbit Articular Chondrocyte

Jeong Hee Im and Song Ja Kim*

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Kongju National University, Korea

Received January 6, 2010 / Accepted April 24, 2010

Paclitaxel is known as a potent inhibitor of microtubule depolymerization. It leads to mitotic arrest and cell death by stabilizing the spindle in various cell types. Here, we investigated the effects of paclitaxel on the proliferation and cell death of rabbit articular chondrocytes. Paclitaxel inhibited proliferation in a dose- and time- dependent manner, determined by MTT assay in rabbit articular chondrocytes. We also established paclitaxel-induced G2/M arrest by fluorescent activated cell sorter (FACS) analysis. Paclitaxel increased expression of cyclin B, p53 and p21, while reducing expression of cdc2 and cdc25C in chondrocytes, as detected by Western blot analysis. Interestingly, paclitaxel showed the mitotic catastrophe that leads to abnormal nucleus division and cell death without DNA fragmentation through activation of caspase. Cell death by mitotic catastrophe in cells treated with paclitaxel was suppressed by inhibiting G1/S arrest with 2 mM thymidine. These results demonstrate that paclitaxel induces cell death via mitotic catastrophe without activation of casepase in rabbit articular chondrocytes.

Key words : Caspase-3, chondrocyte, mitotic catastrophe, paclitaxel

서 론

세포고사는 병리적인 상태뿐만 아니라 정상적인 생리과정에 있는 조직에서도 확인되고 있다. 세포고사는 세포괴사와 함께 세포죽음의 한 방식이지만 일시적인 세포손상으로 발생하는 세포괴사와 구별 된다. 세포고사가 일어나는 세포는 탈수에 의한 세포수축, 세포 내 칼슘이온 농도의 증가, DNA 분절, 염색질 응축, phosphatidylserine이 세포막 밖으로 노출되는 등 다양한 생리적 현상이 동반되며 최종적으로 apoptotic body를 형성하며 죽게 된다. Mitotic catastrophe는 세포죽음의 한 유형으로 유사분열이 진행되는 동안이나 그 후에 발생하는데, 대체로 multiple nuclei를 포함하는 세포를 형성하여 세포죽음이 일어난다[3,37,40]. Mitotic catastrophe는 생체 내에서 세포성장을 억제한다[1,4,17,35]. Mitotic catastrophe는 세포고사의 특성을 가진 죽음의 유형으로 고응축된 염색질과 caspase 활성화의 특징을 보인다[4,24,35]. 그러나 mitotic catastrophe에 의한 세포죽음은 caspase-의존적인 것과 비의존적인 두 가지 신호전달을 통해 일어날 수 있다고 보고되어지고 있다. 이는 전형적인 세포고사와 달리 capsase-3 저해제에 의해 세포고사가 억제되지 못하며, caspase-2를 활성화시켜서 일어나기도 한다[26]. 최근의 보고에 의하면 mitotic catastrophe는 세포고사 또는 괴사의 선행단계에서 일어나는 현상으로 보기도 한다[17]. 그러나, 현재까지 mitotic catastrophe에 대한

널리 받아 들여진 정의는 없는 상태이다[3,4].

Paclitaxel은 1963년 주목나무(*Yew, Taxus brevifolia*)의 껍질에서 분리되어 1971년에 화학구조가 규명되었고 탁월한 항암효과를 나타내는 시약 중 의 하나로 B16 melanoma, L1210 [38]과 p388 leukemia, human MX-1 mammary, CX-1 colon과 LX-1 lung tumor [39] 세포 등에서 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. Paclitaxel은 β -tubulin과 결합하여 미세소관을 중합체 상태로 안정화시킴으로써 세포를 후기 G2/M기에 머물게 하여 세포분열을 억제한다[28,38]. 이는 유사분열의 억제 기능을 통해 항암제로서의 기능을 하는 것으로 사료된다 [12]. 그러나 paclitaxel이 유도하는 세포고사가 tubulin의 탈중합 억제와는 상관없는 다른 메커니즘을 통해 일어나기도 한다 [5,17]. 현재 paclitaxel에 의한 세포죽음의 정확한 메커니즘은 잘 알려져 있지 않지만, 여러 논문에서 p34^{cdc2} kinase의 인산화 조절 억제를 포함한 몇 가지 메커니즘이 알려져 있다[1,6].

Paclitaxel에 의해 세포 내에서 다핵 형성이 유도되는 것을 여러 세포에서 볼 수 있는데, 인간자궁내막암세포에 저농도의 paclitaxel을 처리하였을 때 비정상적인 핵과 핵공의 배열이 핵 라민 네트워크에 다수의 공간을 형성하였으며 대부분의 다핵세포는 최소한 24시간까지 살아있지만 72시간 이후부터는 세포고사가 일어났다[35]. 세포가 완전한 세포질 분열을 하지 못했을 경우와 DNA나 방추사에 손상을 입어 mitotic arrest가 발생하는 경우에 다핵을 형성하게 되고 non-apoptotic형상의 세포죽음 즉, mitotic catastrophe가 일어나게 된다[7].

이전 연구에서 paclitaxel이 토끼관절연골세포의 분화를 촉진하고, 염증성 물질인 Cyclooxygenase-2의 발현을 증가시킨

*Corresponding author

Tel : +82-41-850-8507, Fax : +82-41-850-0927

E-mail : ksj85@kongju.ac.kr

것을 보고하였다[14,15]. 여러 세포 유형에서 paclitaxel이 유도하는 세포고사와 mitotic catastrophe 현상에 대해 많은 연구가 되었으나[16,38,39], 관절 연골세포의 paclitaxel에 대한 연구는 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 관절연골세포에 paclitaxel을 처리하여 유도되는 세포죽음을 연구한 결과, paclitaxel은 세포주기 중 G2/M에 세포를 정지 시키며 세포증식을 억제하고, caspase-3의존적 메카니즘을 통해 다핵을 형성하는 mitotic catastrophe를 일으킨다는 것을 알아냈다. 또한, 연골세포에 G1/S기에 세포를 정지시키는 것으로 알려진 thymidine을 처리하여 세포주기를 초기 S기에 정지시켜 다핵형성을 억제시킬 수 있었다. 이는 paclitaxel에 의한 연골세포의 세포죽음이 세포주기에 의해 조절될 수 있음을 보여주는 최초의 보고라 사료된다. 본 연구결과는 향후 세포 주기 조절을 통한 관절염치료제 개발에 중요한 학문적 기초가 될 것이다.

재료 및 방법

Cell culture

토끼 무릎 연골세포의 분리는 2주된 New Zealand White종의 토끼로부터 추출하였다. 추출방법은 치사량의 Diethyl ether로 토끼를 마취 시킨 후 뒷다리 관절부분을 포함한 요골과 장골을 적출한다. 적출한 관절로부터 연골을 절편하여 0.2% collagenase (381 U/mg Solid, Sigma)가 함유된 PBS 완충용액에 넣고 37°C에서 7시간 동안 반응하여 단일세포를 조직에서 분리한다. 단일세포와 분리되지 않은 조직은 원심분리를 한 후, 상층액을 수집한다. 상층액에서 수집한 세포는 원심분리를 통해 수집한다. 수집한 세포는 10%의 FBS (fetal bovine serum), 50 µg/ml의 Streptomycin, 50 units/ml의 Penicillin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)에 섞은 후 배양 접시에 5×10^4 /ml의 밀도로 배양을 시작한다. 배양액은 이틀에 한번씩 교체하여 주었으며, 배양접시의 세포밀도가 거의 80%가 되었을 때 본 연구에 사용된 시약을 처리하였다.

Western blot analysis

단백질의 발현양상을 확인하기 위하여 세포를 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% Sodium dodecylsulfate가 함유된 cell lysis buffer에 단백질 분해효소 억제제[10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride]와 인산 분해효소 억제제(1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4)를 첨가하여 세포 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 SDS-polyacrylamide gel에 전기 영동하여 단백질을 크기 별로 분리한 후 니트로셀룰로오스 막으로 이동시켰다. 항체는 Santa Cruz Biotechnology사에서 구입하여 사용하였다(Santa Cruz, CA).

Immunofluorescence staining

연골세포에서 paclitaxel에 의한 핵과 미세소관의 중합 및 세포 내 분포를 관찰하기 위하여 Immunofluorescence를 수행하였다. 배양된 연골세포는 3.5% paraformaldehyde로 10분 동안 상온에서 고정시켰으며, 0.1% Triton X-100을 이용하여 세포막 투과성을 높여주었다. 고정된 세포는 α -tubulin 항체 (Santa Cruz, CA)와 DAPI [4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride]를 사용하여 염색하였으며, 형광현미경으로 관찰하였다.

Cell proliferation assay

연골세포를 96 well plate에 2×10^4 /ml의 농도로 배양한다. 세포 밀도가 80% 이상 되었을 때 시약을 처리하였으며, 처리 시간에 따라 배양세포에 MTT reagent I [2-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]를 최종 농도 10%로 첨가하였다. 4시간 반응 후 formazan 결정이 생겼음을 확인한 후, MTT reagent II (10% SDS, 0.01M HCl, DMSO)를 최종 부피의 2배 첨가하여 formazan 결정을 12시간 동안 용해한 후 ELISA reader에서 595 nm로 값을 측정하였다.

DNA fragmentation

배양된 연골세포는 PBS로 2회 세척 후 lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl)를 사용하여 세포를 용해시켰다. 용해된 세포액은 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 수집하였으며, 이 상등액에 20 µg RNase A를 37°C에서 2시간 동안 반응하였으며, 이후 0.01 mg/ml의 proteinase K를 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 용액에 PCI [Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol]를 사용하여 DNA를 정제하였으며, 3 M sodium acetate와 에탄올을 사용하여 DNA를 침전하였다. 침전된 DNA는 70% 에탄올로 세척하여 상온에서 건조 후 멸균된 3차 증류수를 사용하여 DNA를 녹였다. 용해된 DNA는 2% agarose gel에 전기 영동 하여 DNA 절편을 분리하였다.

Cell cycle analysis

1X PBS로 세척 후 Trypsin-EDTA를 사용하여 부착된 세포를 부유시켜 상등액을 1,000 rpm에서 10분 동안 모아 70% 에탄올로 4°C에서 12시간 고정시켰다. Propidium Iodide (BD bioscience, CA) 염색을 위해 50 µg/ml Propidium Iodide, 0.1% Nonidet P-40, 100µg/ml RNase A (Sigma)을 1X PBS에 녹여 10분 동안 암 배양했다. 염색한 시료는 flow cytometer를 이용하여 nylon mesh filter를 통해 부유하는 것의 세포 주기를 측정하였고 Data 분석은 Cellquest analysis program (Becton Dickinson, Mountain View, CA)을 이용하였다.

Thymidine block

세포주기에 의존적인 세포죽음을 일으키는지 알아 보기 위해 G1/S기 정지를 유도하는 thymidine (Sigma) 2 mM을 세포 배양액에 16시간 전처리 후, paclitaxel 1 μ M과 thymidine 2 mM을 함께 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

Statistics

본 실험의 결과는 여러 차례의 실험 중 평균적인 결과를 사용하였다. 통계적 검증은 Student-t test를 사용하고, 신뢰구간은 5%로 하여 p 값이 0.05보다 낮은 경우를 유의하다 판단하였다.

결 과

Paclitaxel은 토끼 관절연골 세포의 증식을 억제한다.

Paclitaxel은 β -tubulin과 우선적으로 결합하여 미세소관을 중합체 상태로 안정화시킴으로써 세포를 후기 G2/M기에 머물게 하여 세포분열을 억제한다고 보고되었다[12]. 이에, Paclitaxel에 의한 관절연골 세포의 세포형태 및 증식을 알아

보기 위해 paclitaxel 1 μ M을 처리하여 위상차 현미경으로 관찰하였다(Fig. 1A). 대조군에 비해 paclitaxel을 처리한 세포군에서는 연골세포가 둥글고, 수축된 형태로 변화하였다. 또한, paclitaxel을 연골세포에 처리한 결과 세포 증식이 paclitaxel 처리농도와 시간 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B and 1C).

Paclitaxel은 연골세포의 미세소관과 핵의 모양을 변화시킨다.

위의 결과를 토대로, 관절연골 세포에서도 paclitaxel에 의한 미세소관 중합체의 안정화가 미세소관과 핵의 모양에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 Immunofluorescence staining을 수행하였다(Fig. 2A). Paclitaxel을 처리하지 않은 연골 세포에서는 미세섬유의 긴 섬유가 세포질 전체에 균등한 분포로 잘 뻗어 있는 것을 확인할 수 있는 반면, paclitaxel 1 μ M을 24시간 동안 처리한 결과 핵 및 세포질 주변에 짧고 굵은 섬유들이 밀도 있게 배열된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 흥미롭게도 paclitaxel을 처리하지 않은 연골세포는 세포마다 1개의 핵의 구조를 갖고 있는 반면, paclitaxel을 처리한 실험군에서

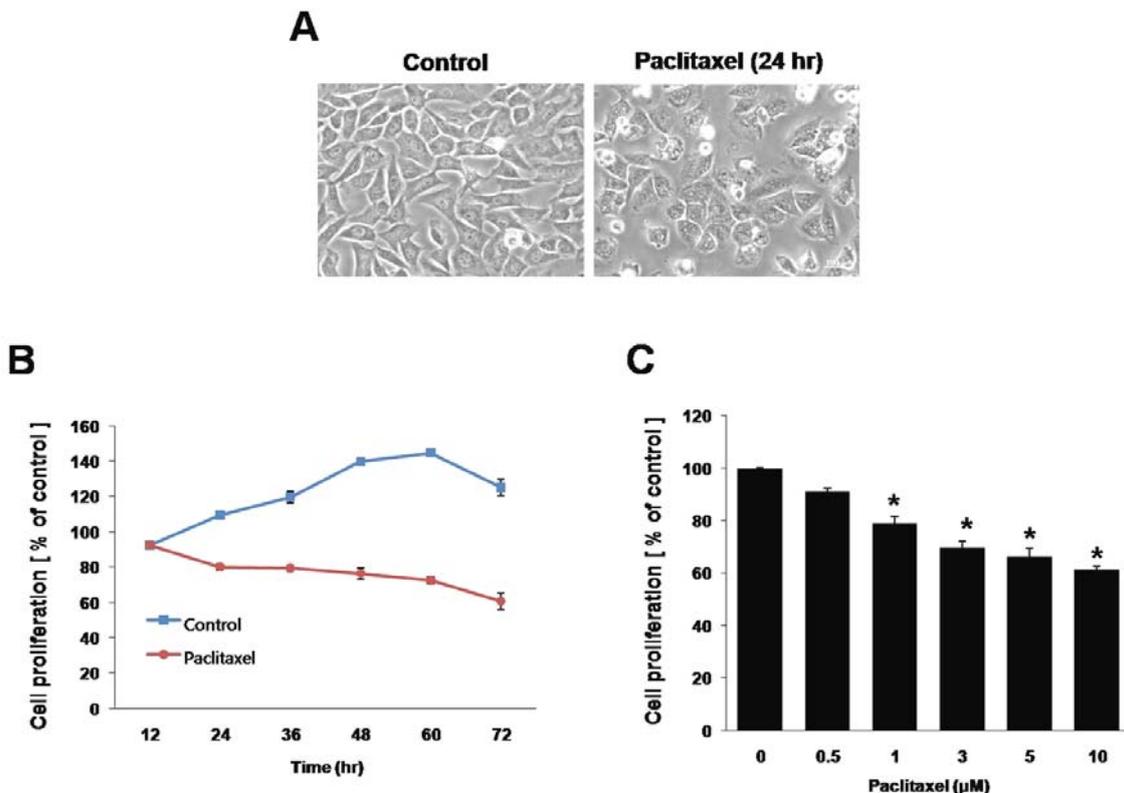


Fig. 1. Paclitaxel inhibits cell proliferation. Articular chondrocytes were treated with or without 1 μ M paclitaxel for 24 hr. Changes in cellular morphology were observed using phase contrast microscopy (Original magnification X200) (A). Primary cultured chondrocytes were treated with 1 μ M paclitaxel for various time periods (B) or indicated concentrations for 24 hr (C). Cell viability was measured by using methyl thiazole tetrazolium (MTT) proliferation assay kit. The data represent the average values with standard deviation (n=4). Asterisks (*) indicate values that are significantly different (student's t test, $p < 0.05$) as compared to cells treated with paclitaxel alone.

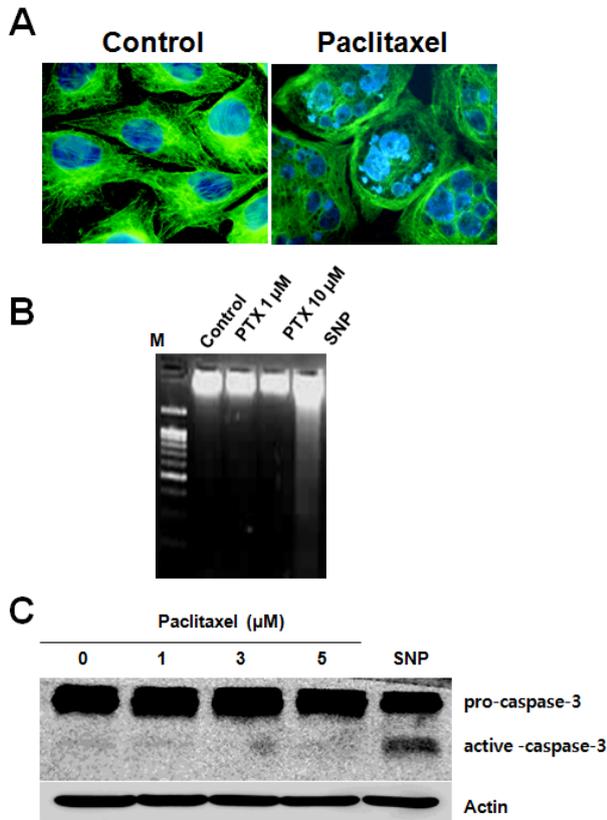


Fig. 2. Alterations cell morphology and cell death of chondrocytes treated with paclitaxel. Chondrocytes were untreated (Control) or treat with 1 μ M paclitaxel for 24 hr. Cells were stained with DAPI (nuclei, blue) and anti-tubulin antibody (green, original magnification X1,000, A). DNA was isolated from cells after 24 hr untreated (Control) or treatment of paclitaxel (PTX) or SNP, a NO donor, and apoptotic cell death was determined by examining DNA fragmentation by electrophoresis (B). Fragmented DNA was visualized staining with ethidium bromide. Line M, 100 bp size markers. Paclitaxel not induced caspase-3 activation (C). Chondrocytes were treated with paclitaxel for various concentrations or SNP for 24 hr. Caspase-3 activation was determined by western blot analysis. Actin was used as loading control. The data represent the results a typical experiments (n=3).

는 다핵이 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이에, 이러한 다핵현상이 세포고사에 의해 일어난 것인지 확인하기 위해 DNA fragmentation을 수행하였다(Fig. 2B). 지난 연구에서 [19-21] 연골세포의 세포고사를 일으키는 것으로 알려진 SNP (nitric oxide donor)를 처리한 결과, 세포 고사의 전형적인 형태로 간주되는 올리고뉴클레오솜 분절화(oligonucleosomal fragmentation)가 관찰된 반면, paclitaxel 처리군에서는 DNA 절편이 관찰되지 않았다. 또한 paclitaxel의 다핵형성에 caspase-3의 활성이 있는지 Western blot 분석을 통해 알아본 결과 앞서 DNA fragmentation 결과를 뒷받침하듯이 caspase-3

의 활성은 나타나지 않았다(Fig. 2C). 이는 paclitaxel에 의한 세포죽음은 SNP에 의해 일어나는 것과는 다른 세포신호전달계 통한 세포죽음을 말해주는 것이라 하겠다.

Paclitaxel은 G2/M기에서 세포 주기 정지를 유도한다.

Paclitaxel이 유도하는 세포 생장의 억제가 세포 주기와 관련 있는지 알아 보기 위해 flow cytometer를 이용하여 세포주기를 알아보았다(Fig. 3). 대조군과 비교하여 paclitaxel을 처리한 군에서는 24시간이 지나자 G2/M기가 증가하는 것을 볼 수 있고, 이러한 G2/M기 정지는 72시간 까지 지속되었는데, 최고 50% G2/M기 세포가 증가하였다.

Paclitaxel이 유도하는 G2/M기의 세포주기 정지는 p53/p21 pathway를 통해 일어난다.

Paclitaxel 처리에 의한 미세소관의 중합안정화는 세포주기 G2/M기에서 mitotic arrest가 유도되는 것을 확인하였다. 세포내에서 DNA 손상이 일어나게 되면 p53과 p21 단백질의 활성이 높아지며 결국 G2/M기의 mitotic arrest 유도되며 이때 DNA 손상복구가 이루어지게 된다. 그러나 DNA의 손상을 복구하지 못하게 되면 p53 단백질은 Bax 단백질을 유도하여 결과적으로 세포고사가 일어나게 된다[2,23,27,28,30]. 이에, paclitaxel 처리에 의해 유도되는 세포죽음의 신호전달 메커니즘을 조사하고자, paclitaxel을 제시한 농도와 처리시간 동안 연골세포에 처리하여 p53과 p21 단백질의 발현양상을 측정하였다(Fig. 4A and 4B). Paclitaxel에 의한 p53 단백질의 발현량은 12시간부터 현저히 증가하기 시작하였으며, 이의 하위신호전달 물질인 p21단백질의 발현량도 함께 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 또한, paclitaxel 처리에 의해 G2/M기 조절단백질로 알려진 Cdc2와 Cyclin B의 변화양상을 Western blot을 이용해 확인하였다. Paclitaxel을 처리한 실험군에서 cyclin-dependent kinase인 Cdc2 단백질의 발현은 시간의존적으로 감소하는 반면, Cyclin B 단백질은 점점 증가하는 것을 확인하였다. 또한 paclitaxel 처리농도 의존적으로 Cdc25C와 Cdc2의 발현량이 감소하지만 Cyclin B의 발현량은 증가하는 것으로 확인되었다. 이는 paclitaxel이 G2/M기 조절단백질들의 발현에 영향을 미침으로써 mitotic arrest를 일으키는 것으로 Fang 등의 결과와 일치한다[8]. Proapoptotic 단백질인 Bax (data not shown)나 Caspase-3의 발현량에는 변화가 없는 것으로 관찰되었다. 이러한 실험결과를 종합해 볼 때, paclitaxel 처리에 의한 G2/M기의 유사분열 정지 및 세포죽음은 p53/p21 단백질에 의한 Cdc2/CyclinB의 발현 조절과 관련이 있으며, Bax와 Caspase-3 활성과는 관련이 없음을 나타내는 것이라 사료되어진다.

Paclitaxel에 의해 유도되는 mitotic catastrophe는 세포주기 의존적으로 일어난다.

Paclitaxel이 유도하는 mitotic arrest에 의한 mitotic catas-

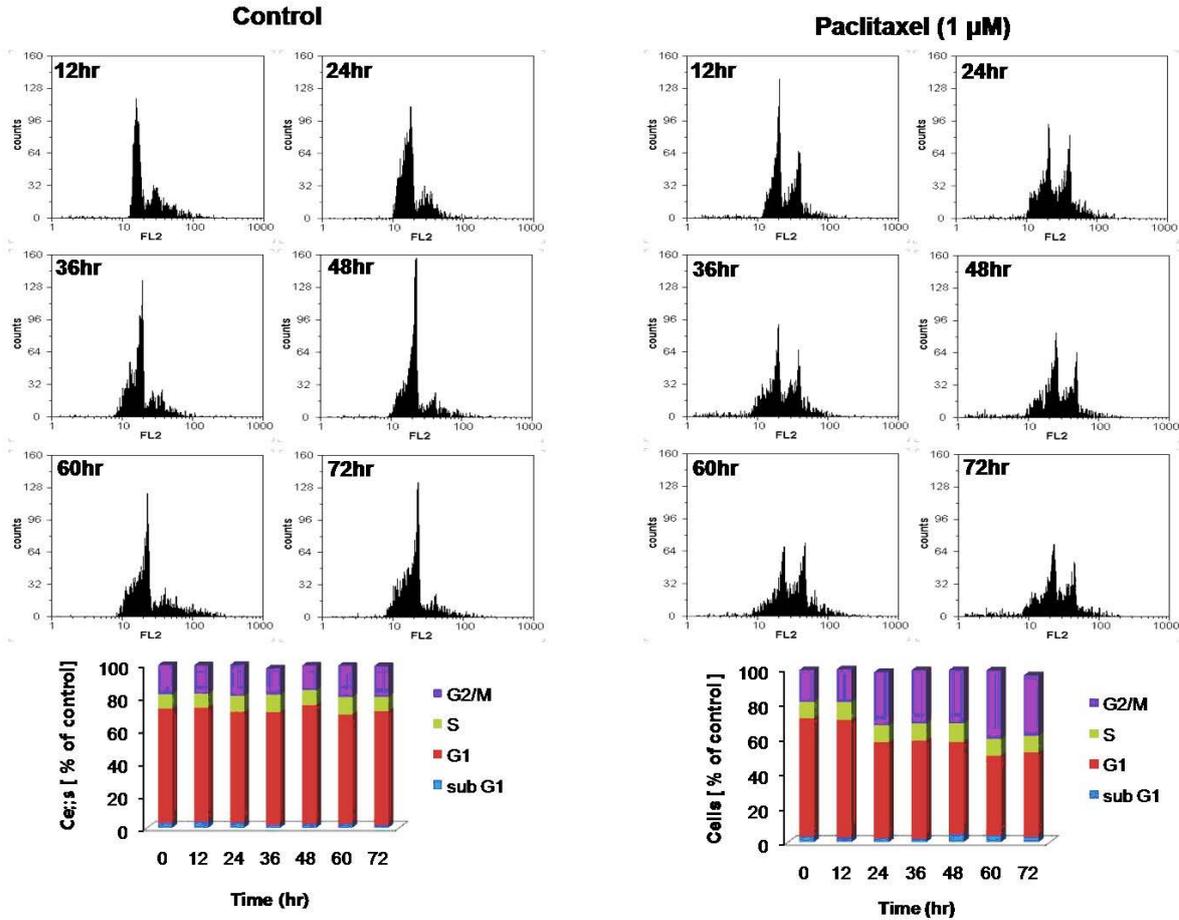


Fig. 3. Paclitaxel causes cell cycle arrest at G2 and M phase. Articular chondrocytes were treated with or without 1 μM paclitaxel and harvested at the indicated times for FACS analysis of cell cycle distribution (upper panel). Each cell cycle was analyzed by flow cytometry (lower panel). A representative experiment is shown.

trophe, 즉 세포죽음이 세포주기 의존적인 기작을 통하여 일어나는지를 알아보기로 하였다. 우선, G1/S 기 정지를 유도하는 것으로 알려진 thymidine 2 mM을 연골세포에 16시간 전 처리하여 FACS 분석을 한 결과, 대조군보다 2배 이상의 세포가 G1/S 경계에서 정지되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 반면, paclitaxel 1 μM 을 단독처리 하였을 경우 30% 정도의 세포가 G2/M기 정지가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 이에, thymidine 2 mM을 16시간 전처리 후, paclitaxel 1 μM을 연골세포에 처리하였을 경우 paclitaxel이 유도하는 G2/M기 정지를 거의 완벽하게 저해하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). G1/S기 정지가 paclitaxel이 유도하는 미세소관의 분포 및 핵분열에 어떤 영향을 주는지 알아보았다. Thymidine을 16시간 전 처리한 실험군에서는 정상적인 세포핵 및 미세소관의 양상 및 분포를 확인할 수 있었으나(data not shown), thymidine을 전 처리한 후 paclitaxel을 처리한 실험군에서는 paclitaxel에 의해 유도된 다핵양상이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 5B). 또한, thymidine 전처리를 통한 paclitaxel의 세포주기 조절에 의한 mitotic catastrophe 저해가 앞서 조사한 p53/p21과 cdc2/cy-

clin B의 발현양상 조절을 통해 일어나는지를 알아보기로 하였다. Paclitaxel에 의한 p53과 p21 단백질의 발현증가는 thymidine 전처리 후에도 변화가 없었으나, paclitaxel에 의해 유도된 Cyclin B는 발현감소를, 감소한 Cdc2는 오히려 증가하는 양상을 보였다(Fig. 6). 이러한 결과를 종합해 볼 때, 관절연골세포에서 paclitaxel이 유도하는 mitotic catastrophe 즉, 세포죽음은 세포주기에 의존적으로 조절되는 것으로 보여진다.

고 찰

여러 항 미세소관 시약들은 유사분열 중의 미세소관의 기능을 억제하여 결국엔 mitotic arrest와 세포죽음을 유도한다 [12,14]. 미세소관의 손상은 spindle-assembly 체크 포인트를 활성화시키는데, 이는 프로테아좀 의존적인 Cyclin B의 분해를 막아 cdc2/cyclin B kinase의 활성을 지연시켜 mitotic arrest를 유도하기도 한다[11]. 지난 보고에 의하면 G2/M기 mitotic arrest는 p53과 p21 발현에 의존적으로 조절되어 일어난다[39]. 몇 개의 p53의 전사인자들은 cdc2 단백질의 활성을

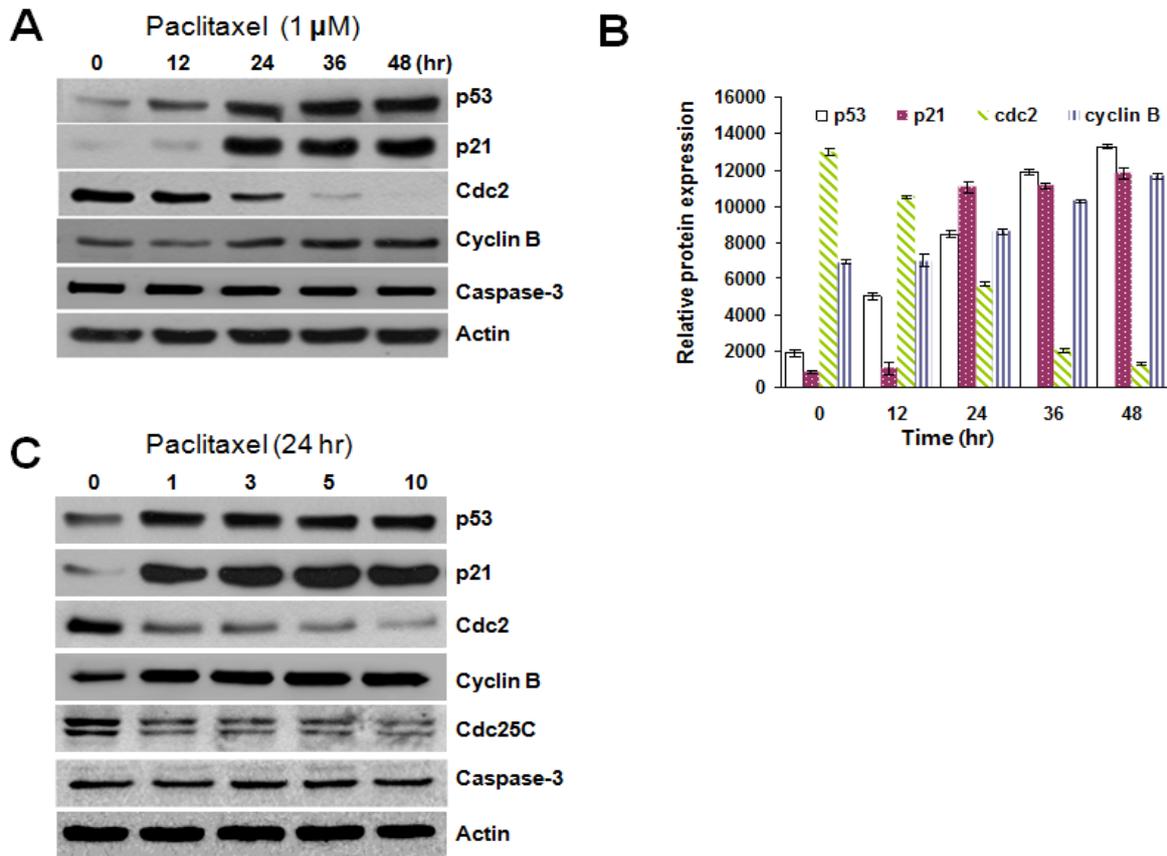


Fig. 4. Paclitaxel blocks Cdc2/Cyclin B via p53/p21 pathway. Chondrocytes were treated with 1 μ M paclitaxel for various time periods (A) and quantification of the protein content of p53, p21, Cdc2 and Cyclin B by densitometry (B). Each value is mean \pm SD of independent experiments done in duplicate. * Significantly different from the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) according to student t-test. Indicated concentration of paclitaxel treatment for 24 hr and expression of p53, p21, Cdc2, Cyclin B, Cdc25C, Caspase-3 and Actin was determined by western blot analysis (C). Actin was used as loading control. The data represent the results a typical experiments (n=3).

억제하는 것으로 알려져 있는데, cdc2를 직접적으로 억제하는 p21과 세포질에서 cdc2와 cyclin B의 결합을 방해함으로써 세포분열 주기 중 G2/M 진행을 억제하거나 p53의 발현과 활성을 도와 항암작용을 도모하는 14-3-3- σ 와 핵안에서 Cdc2와 Cyclin B를 분리하는 Gadd45가 알려져 있다[39].

Cdc2 kinase의 활성은 G2/M기로의 진행에 있어서 cyclinB의 축적과 cdc2 단백질의 tyr15 잔기의 탈인산화를 필요로 한다[22]. Cdc2 단백질의 tyr15 잔기의 인산화는 Wee1/Mik1 family kinase와 cdc25C 탈인산화효소에 의해 조절된다[18]. Wee1은 cdc2 단백질의 tyr15 잔기를 인산화시킴으로써 cdc2의 활성을 억제한다. Cdc2가 불활성화 상태에서 활성화 상태로 바뀌기 위해서는 탈인산화효소인 cdc25C에 의해 조절된다[25,33]. 본 연구에서 paclitaxel의 처리에 의한 cyclin B의 비정상적인 축적과 cdc25C의 발현 감소를 통해 cdc2의 발현량이 감소하는 것으로 보여진다(Fig. 4C). 인간 백혈병세포주인 K562 세포에 4-(4-Bromopheny1)-2,3-dihydro-N,3-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-oximidmi-dazole-1-carboxamide (MZ3)

을 처리하였을 때, cyclin B의 축적과 Wee1의 활성화에 따른 cdc25C의 감소로 인해 결과적으로 cdc2 단백질의 발현량이 줄어들었다[8]. 이는 탈인산화 효소인 cdc25C 발현 감소에 의한 cdc2/cyclinB 복합체의 불활성화에 의한 유사분열기에서 세포주기 정지와 일치한다[31].

세포고사는 미토콘드리아에서 배출된 cytochrome C에 의해 caspase-3, -9을 활성화시키는 경로와 TNF-alpha와 Fas 리간드 등의 death receptor에 의하여 caspase-8과 10이 활성화되는 경로의 두 가지 경로로 나뉜다. Caspase는 세포 내에 비활성 효소로 존재하지만, 다양한 자극에 의해 DNA가 손상 받으면 종양억제인자인 p53 단백질의 발현량이 증가하고, 그에 따라 세포자가사멸을 일으키는 유전자가 활성화되고 이에 의해 caspase-3가 활성화되어 세포고사가 일어나게 된다[34].

본 연구에서는 토끼관절연골세포에 paclitaxel을 처리하여 연골세포의 세포죽음을 확인할 수 있었으며, 또한, paclitaxel에 의한 G2/M기 mitotic arrest 유도 및 p53과 p21단백질의 발현량 증가와 cdc2의 발현 억제를 확인할 수 있었다.

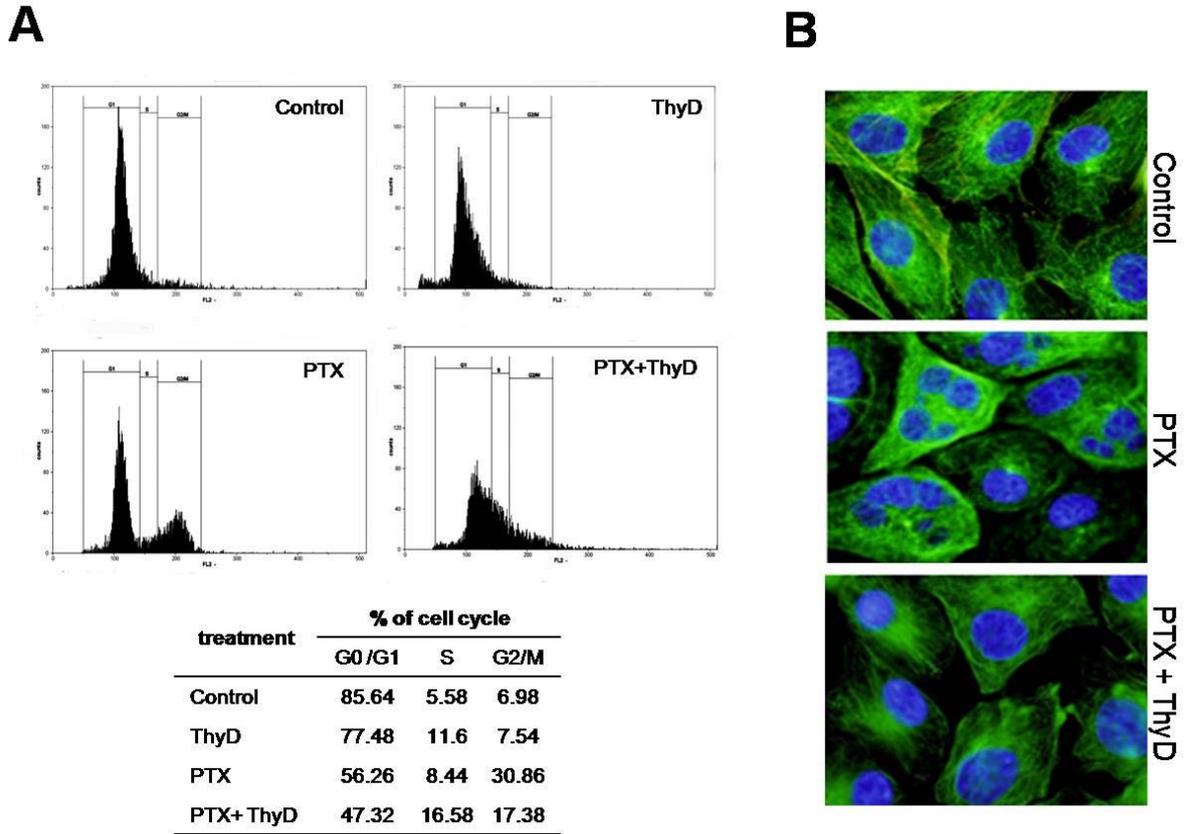


Fig. 5. Thymidine effectively abolish paclitaxel-induced mitotic catastrophe. Chondrocytes were incubated in medium alone or in medium containing 2 mM thymidine (ThyD), 1 μM Paclitaxel (PTX), or pretreated for 16 hr 2 mM thymidine followed by 1 μM paclitaxel for 24 hr. The cells were fixed, stained with propidium iodide (PI), and examined by flow cytometry (upper panel) and cell cycle analysis (lower panel) (A). Cells were fixed in 3.5% paraformaldehyde followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100. Cells were stained with DAPI and anti-tubulin antibody (Original magnification X1,000) (B) Data are presented as results of a typical experiment.

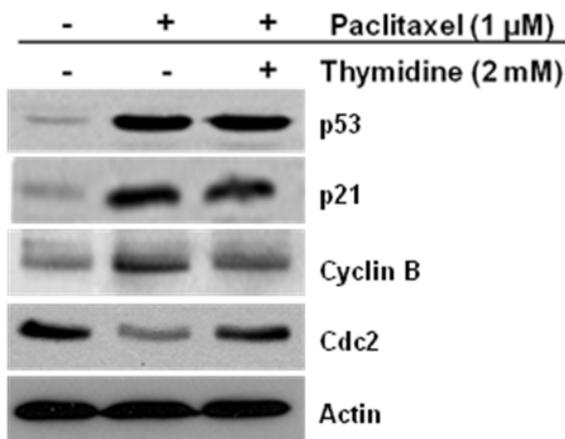


Fig. 6. Expression of p53, p21, Cdc2, Cyclin B, and actin was determined by western blot analysis. Chondrocyte were pretreated with 2 mM thymidine for 16 hr then paclitaxel was added for an additional 24 hr. Actin was used as loading control. The data represent the results a typical experiment.

Paclitaxel에 의한 미세소관의 손상은 cyclin B의 분해를 저해하여 발현량이 시간의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). Paclitaxel을 처리한 관절 연골세포에서는 고전적인 세포고사와는 다른 mitotic arrest에 의한 비정상적인 유사분열로 다핵을 형성하여 염색체 응축을 나타내는 mitotic catastrophe 현상이 일어났다. 세포고사와 같은 형태적인 변화가 있음에도 불구하고 뉴클레오솜 내의 DNA 분절은 paclitaxel을 처리한 관절연골세포에서 나타나지 않았다(Fig. 2B). 이에, Caspase-3의 활성을 조사해 본 결과, paclitaxel을 처리한 연골세포에서는 caspase-3의 활성화에 아무런 변화가 없음을 확인하였다(Fig. 2C, 4A and 4C). HL-60세포와 KG1 세포에서 paclitaxel을 처리하였을 때 200 bp 이하의 internucleosomal DNA 분절을 유도하는 것은 각 세포 유형의 내재적 성질을 나타내는 것으로 생각된다[1]. 예를 들어, 정상 synovocyte에 paclitaxel을 처리하였을 때 DNA 분절현상은 나타나지 않았지만[13], 관절염을 가진 환자의 활액조직에서는 나타났다[9].

Paclitaxel이 유도하는 mitotic catastrophe 현상이 세포주기

에 의존적으로 조절되는 가를 확인하기 위해, G1/S기 정지시키는 것으로 알려진 thymidine을 처리하였다. 연골세포에 2 mM thymidine을 16시간 전 처리한 후 paclitaxel을 처리한 결과, thymidine에 의한 G1/S기 정지는 paclitaxel이 유도하는 거대 다핵형성을 막고, 세포주기 또한 G2/M기 정지를 저해하였다. 또한, G2/M 체크 포인트 조절 단백질인 Cyclin B와 Cdc2의 발현량도 각 각 억제 또는 회복 시켰다(Fig. 6). 그러나, paclitaxel에 의한 미세소관의 손상으로 인한 p53과 p21 단백질 발현량의 증가는 G1/S기 정지에 의한 체크 포인트의 작용으로 인해 발현량에 변화가 없었다(Fig. 6). 이는 Shenberger의 보고와 일치하는 연구결과라 하겠다[32].

본 연구에서는 토끼관절연골세포에 항 미세소관 시약인 paclitaxel을 처리하여, paclitaxel이 세포 주기를 G2/M에서 mitotic arrest하여 세포증식을 억제하고, caspase-3의존적인 신호전달계를 통해 다핵 형성을 유도하는 mitotic catastrophe를 일으킨다는 것을 알아냈다. 또한, paclitaxel에 의한 mitotic catastrophe는 G1/S기 정지를 통해 다핵 형성이 억제된다는 것도 알아내었다. 이는, paclitaxel에 의한 mitotic catastrophe는 세포주기에 의존적으로 조절된다는 것을 알 수 있으며, 더 나아가 paclitaxel이 유도하는 mitotic catastrophe에는 세포 주기의 진행이 반드시 필요로 하다는 것을 말해주는 결과라 사료된다.

감사의 글

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea Government (MEST) (2009-0071662 & 2009-0084569).

References

- Bhalla, K., A. M. Ibrado, E. Tourkina, C. Tang, M. E. Mahoney, and Y. Huang. 1993. Paclitaxel induced internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. *Leukemia* **7**, 563-568.
- Blagosklonny, M. V. 2002. p53: an ubiquitous target of anti-cancer drugs. *Int. J. Cancer* **98**, 161-166.
- Casenghi, M., P. Meraldi, U. Weinhart, P. I. Duncan, R. Korner, and E. A. Nigg. 2003. Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev. Cell* **5**, 113-125.
- Castedo, M., J. L. Perfettini, T. Roumier, K. Andreau, R. Medema, and G. Kroemer. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825-2837.
- Danesi, R., W. D. Figg, E. Reed, and C. E. Myers. 1995. Paclitaxel inhibits isoprenylation and induces apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **47**, 1106-1111.
- Donaldson, K. L., G. Goolsby, P. A. Kiener, and A. F. Wahl. 1994. Activation of p34cdc2 coincident with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth Differ.* **5**, 1041-1050.
- Erenpreisa, J. E., A. Ivanov, G. Dekena, A. Vitina, R. Krampe, T. Freivalds, G. Selivanova, and H. I. Roach. 2000. Arrest in metaphase and anatomy of mitotic catastrophe: mild heat shock in two human osteosarcoma cell lines. *Cell Biol. Int.* **24**, 61-70.
- Fang, L., L. Shen, Y. Fang, Y. Hu, Q. He, and B. Yang. 2008. MZ3 can induce G2/M-phase arrest and apoptosis in human leukemia cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 1337-1345.
- Firestein, G. S., M. Yeo, and N. J. Zvaifler. 1995. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J. Clin. Invest.* **96**, 1631-1638.
- Hagting, A., C. Karlsson, P. Clute, M. Jackman, and J. Pines. 1998. MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J.* **17**, 4127-4138.
- Henley, D., M. Isbill, R. Fernando, J. S. Foster, and J. Wimalasena. 2007. Paclitaxel induced apoptosis in breast cancer cells requires cell cycle transit but not Cdc2 activity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 235-249.
- Horwitz, S. B. 1992. Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 134-136.
- Hui, A., G. V. Kulkarni, W. L. Hunter, C. A. McCulloch, and T. F. Cruz. 1997. Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes. *Arthritis Rheum.* **40**, 1073-1084.
- Im, J. H. and S. J. Kim. 2009. Paclitaxel suppress dedifferentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in rabbit articular chondrocyte. *Korean J. Biomed. Lab. Sci.* **15**, 67-72.
- Im, J. H. and S. J. Kim. 2009. Paclitaxel stimulate cyclooxygenase-2 expression via MAP kinase pathway in rabbit articular chondrocyte. *Korean J. Biomed. Lab. Sci.* **15**, 141-146.
- Ireland, C. M. and S. M. Pitman. 1995. Tubulin alteration in taxol-induced apoptosis parallel those observed with other drugs. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 1491-1499.
- Jackson, J. R., D. R. Patrick, M. M. Dar, and P. S. Huang. 2007. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 107-117.
- Kawabe, T. 2004. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 513-519.
- Kim, S. J., H. G. Kim, C. D. Oh, S. G. Hwang, W. K. Song, Y. J. Yoo, S. S. Kang, and J. S. Chun. 2002. p38 kinase-dependent and -independent inhibition of protein kinase C zeta and -alpha regulates nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 30375-30381.
- Kim, S. J., S. G. Hwang, D. Y. Shinm, S. S. Kang, and J. S. Chun. 2002. p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NF kappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 33501-33508.
- Kim, S. J., S. G. Hwang, I. C. Kim, and J. S. Chun. 2003. Actin cytoskeletal architecture regulates nitric oxide-induced apoptosis, dedifferentiation, and cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes via mitogen-activated protein kinase and protein kinase C pathways. *J. Biol. Chem.*

- 278, 42448-42456.
22. King, K. L. and J. A. Cidlowski. 1995. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J. Cell Biochem.* **58**, 175-180.
 23. Knippschild, U., M. Oren, and W. Deppert. 1996. Abrogation of wild-type p53 mediated growth-inhibition by nuclear exclusion. *Oncogene* **12**, 1755-1765.
 24. Krysko, D. V., T. Vanden Berghe, K. D'Herde, and P. Vandenabeele. 2008. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* **44**, 205-221.
 25. Kumagai, A. and W. G. Dunphy. 1991. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**, 903-914.
 26. Mansilla, S., W. Priebe, and J. Portugal. 2006. Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Cell Cycle* **5**, 53-60.
 27. Miyashita, T. and J. C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299.
 28. Moll, U. M., G. Riou, and A. J. Levine. 1992. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Natl. Acad. Sci.* **89**, 7262-7266.
 29. Nogales, E., F. J. Medrano, G. P. Diakun, G. R. Mant, E. Towns-Andrews, and J. Bordas. 1995. The effect of temperature on the structure of vinblastine-induced polymers of purified tubulin: detection of a reversible conformational change. *J. Mol. Biol.* **254**, 416-430.
 30. Polyak, K., Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler, and B. A. Vogelstein. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300-305.
 31. Scatena, C. D., Z. A. Stewart, D. Mays, L. J. Tang, C. J. Keefer, S. D. Leach, and J. A. Pietsenpol. 1998. Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and Taxol-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.* **273**, 30777-30784.
 32. Shenberger, J. S. and P. S. Dixon. 1999. Oxygen induces S-phase growth arrest and increases p53 and p21(WAF1/CIP1) expression in human bronchial smooth-muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 395-402.
 33. Strausfeld, U., J. C. Labbé, D. Fesquet, J. C. Cavadore, A. Picard, K. Sadhu, P. Russell, and M. Dorée. 1991. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex *in vitro* by human CDC25 protein. *Nature* **351**, 242-245.
 34. Taylor, W. R. and G. R. Stark. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**, 1803-1815.
 35. Tesniere, A., T. Panaretakis, O. Kepp, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2008. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* **15**, 3-12.
 36. Theodoropoulos, P. A., H. Polioudaki, O. Kostaki, S. P. Derdas, V. Georgoulas, C. Dargemont, and S. D. Georgatos. 1999. Taxol affects nuclear lamina and pore complex organization and inhibits import of karyophilic proteins into the cell nucleus. *Cancer Res.* **59**, 4625-4633.
 37. Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, and B. Zhivotovsky. 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* **15**, 1153-1162.
 38. Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-2327.
 39. Wiernik, P. H., E.L. Schwartz, J. J. Strauman, J. P. Dutcher, R. B. Lipton, and E. Paietta. 1987. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer. Res.* **47**, 2486-2493.
 40. Wood, K., W. D. Cornwell, and J. R. Jackson. 2001. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 370-377.

초록 : Paclitaxel에 의한 관절연골 세포의 caspase-3 비의존적 mitotic catastrophe 유도

임정희 · 김승자*

(국립공주대학교 자연과학대학 생명과학과)

Paclitaxel은 미세소관의 탈중합을 억제하는 시약으로 알려져 있다. Paclitaxel은 다양한 세포에서 세포 내 방추체를 안정화시킴으로써 유사분열 억제 및 세포사멸을 유도한다. 본 실험에서는 토끼 관절 연골세포에서 paclitaxel이 연골세포의 증식과 사멸에 미치는 효과에 대한 연구를 수행하였다. MTT assay를 수행한 결과 paclitaxel은 연골세포에서 농도의존적으로 세포 증식을 억제한다는 것을 확인 할 수 있었으며, FACS analysis와 Western blot analysis를 수행한 결과, paclitaxel이 G2/M 정지를 유도하는 것을 확인하였다. 또한, paclitaxel이 비정상적인 세포 분열유도와 핵 단편분열 유도 없이 일어나는 mitotic catastrophe 즉, caspase-3 비의존적인 세포사멸을 유도하였다. Paclitaxel을 처리한 세포에서 일어나는 이러한 mitotic catastrophe에 의한 세포 죽음은 G1/S기의 진행을 억제하는 시약인 thymidine을 처리하는 것에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, paclitaxel에 의한 토끼 관절 연골 세포에서의 세포 죽음은 caspase-3 비의존적인 mitotic catastrophe에 의해 일어나는 것으로 사료되어진다.