http://dx.doi.org/10.5392/JKCA.2012.12.02.339

*Listeria monocytogenes*에 의해 HL-60 cell의 세포고사 유도 효과 규명

Extract of *Listeria monocytogenes* Induces the Apoptosis on the Human Promyelocytic Leukemia Cells, HL-60 Cells

양은주*, 김동현**, 장정현*
대구한의대학교 보건치료대학 임상병리학과*, 부산가톨릭대학교 보건과학대학 방사선학과**

Eun-Ju Yang(ejyang@dhu.ac.kr)*, Dong-Hyun Kim(dhkim@cup.ac.kr)**,
Jeong-Hyun Chang(jhchang@dhu.ac.kr)*

요약

급성 전골수구성 백혈병(acute promyelocytic leukemia, APL)은 치료제가 한정적이고 그 또한 다양한 부작용을 초래한다. 최근 암세포 형성 억제에 세균 추출물을 사용하는 경우가 증가하는데 이를 이용하여 기존의 약제보다 효과적이면서 부작용이 적은 치료제 개발이 필요하다. 본 연구에서는 *L. monocytogenes* 에서 분비되는 물질(LmSup)과 세균 자체가 함유하고 있는 물질(LmE)을 추출하여 HL-60 세포에 처리한 다음 세포증식 억제 효과를 보고자 하였다. 세포 생존율 및 세포고사를 확인하여 세포를 죽음으로 유도하는 지 파악한 다음 작용기전을 규명하고자 세포주기의 변화 및 ROS 생성을 관찰하였다. 그 결과, LmSup와 LmE가 급성 전골수구성 백혈병(APL) 세포인 HL-60의 세포고사를 유도하고, sub G0/G1기 증가로 세포주기를 비정상적으로 차단함으로써 세포고사를 유도함을 확인하였다. 이때, ROS가 관여함을 관찰하였다. 이를 통해, LmSup 또는 LmE의 구체적인 항암효과 및 기전 분석을 통해 난치병인 APL의 치료 방법 및 치료제 개발에 기여하고자 한다.

■ 중심어 : | *Listeria monocytogenes* | HL-60 cells | Apoptosis | ROS | Anti-cancer Effect |

Abstract

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a cancer of the blood and bone marrow. Although all-trans retionic acid (ATRA) is the agents for ALP therapy, there are various side effects. For overcome this problem, we need the development of new therapeutic agents for APL. A number of bacteria produce various virulence factors with cytotoxic effects on human cancer cells. To understand the anti-cancer effect of *Listeria monocytogenes* on APL, we examined alteration of the cell viability, apoptosis and cell cycle arrest of the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60 cells. The cell supernatant (LmSup) and the extract of *L. monocytogenes* (LmE) inhibited the cell viability and induced apoptosis of HL-60 cells. These cytotoxic effect of LmSup and LmE mediated by modulation of cell cycle and ROS production. These results indicate that released or included bacterial molecules from *L. monocytogenes* have a cytotoxicity in HL-60 cells. Therefore, LmSup and LmE may be used as the potential target for the treatment of cancer induced by HL-60 cells

■ keyword : | *Listeria monocytogenes* | HL-60 cells | Apoptosis | ROS | Anti-cancer Effect |

접수번호 : #111028-002
접수일자 : 2011년 10월 28일
심사완료일 : 2011년 11월 24일
교신저자 : 장정현, e-mail : jhchang@dhu.ac.kr

I. 서 론

최근 암 발병율이 꾸준히 증가하고 이에 대한 약물치료 및 방사선 치료가 지속적으로 개발되고 있다[1]. 그러나 다양한 부작용으로 인해 새로운 치료제 개발에 세균을 사용하는 경우가 증가하고 있다. 다만, 다양한 세균의 종류에 따라, 암세포의 종류에 따라 항암효과를 보이거나 오히려 사람에게 독성을 보이는 경우가 있다. 이렇게 세균 사용에 따른 부작용을 없애고 세균들이 가지고 있거나 외부로 분비하는 물질 중에 항암효과를 보이는 물질을 개발하는 연구에 많은 관심이 집중되고 있다[2]. 그 중, *Pseudomonas aeruginosa*는 세균 외로 분비하는 exotoxin A가 breast cancer 세포의 세포고사를 유도하였고[3], *Clostridium hystolyticum*에서 추출한 물질을 암세포에 처리하였더니 추출물 중 효소성분이 암세포의 성장을 억제함을 관찰하였다[4]. 그러나 혈액암의 일종인 급성 전골수구성 백혈병(acute promyelocytic leukemia, APL)에 대한 보고는 미약한 실정이다. APL은 급성 골수구성 백혈병(acute myelogenous leukemia, AML)의 subtype으로 혈액과 골수에서 발생되는 암이다. APL에서는 미성숙 과립구인 전골수구가 축적되어 나타나는 질환으로 치료에는 외과적 수술이 어려워 주로 비타민 A의 파생물인 all-trans retionic acid (ATRA)를 이용한다[5][6]. 그런 ATRA를 이용한 치료는 일부 호흡곤란, 발열, 저혈압 등을 동반하는 retinoic acid syndrome (RAS)를 유발한다[7]. 이에 본 연구에서도 human promyelocytic leukemia cell line인 HL-60 세포를 이용하여 부작용이 적은 새로운 치료제의 개발에 중점을 두고자 하였다.

암세포에 대한 항암효과를 보고자 한다면 우선 치료후보물질을 처리한 다음 세포 죽음이 유발되는지 관찰하면 암세포에 대한 특이적인 세포독성이 있음을 알 수 있다[8-10]. 세포는 수명이 다하면 세포고사를 거쳐 제거되는데, 이 때 다양한 세포내 신호전달 단백질이 관여한다. 여러 세포고사 유도 물질에 의해 intrinsic pathway가 활성화되면 미토콘드리아에서 세포고사를 진행하기 위한 일련의 과정들이 진행된다[11]. 미토콘드리아 막의 integrity를 조절하여 세포 생존 및 죽음에 작용하는 Bcl-2 family 단백질들의 발현 및 활성이 달라진다[12]. 또한 미토콘드리아 내 Ca^{2+}가 급격히 유입되면서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 발생이 증가한다. ROS는 DNA 손상 및 caspase (cystinyl aspartate-specific protease) pathway의 활성을 유도하여 세포고사를 일으킨다[13][14]. Caspase는 전구체로 존재하다가 세포고사가 유도되면 분해되어 활성을 가진 형태로 바뀌게 된다[15]. 이러한 caspase 분자들이 암세포에서 발현이 증가하게 되면 다른 세포고사를 유도하여 암세포를 제거함으로써 암 치료효과를 기대할 수 있다.

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*)는 단구성 리스테리아균으로 불리워지고, 토양미생물로서 식물, 토양, 지표수 등 자연계에 널리 분포한다. *L. monocytogenes*는 그람양성막대균으로 독성인자인 listeolysin을 분비하고 사람에게 감염 시 패혈증, 수막염, 뇌염 등의 질병을 유발한다[16][17]. 반면, cervical carcinoma의 치료에 효과가 있는 cancer vaccine으로도 사용되고[18], hepatocarcinoma가 있는 guinea pig에 *L. monocytogenes*의 사균을 주입한 결과 암을 억제하여 암에 의한 치사율을 감소시켰다[19]. 기존의 연구를 바탕으로 *L. monocytogenes*가 암의 성장을 억제함으로써 항암효과가 있음을 보였는데 이는 암의 증식 및 세포고사의 조절과 밀접한 관련이 있다. *L. monocytogenes*이 분비하는 물질 중 listeriolysin O (LLO)는 용혈소로써 *L. monocytogenes*가 대식세포에게 포식되면 대식세포의 리소좀(lysosome) 및 세포막을 파괴하여 세포를 죽이고 빠져나오게 작용한다[16][17]. 그러나 대부분의 기존 연구들은 *L. monocytogenes*이 유발하는 병변기전에 초점을 맞추어 *L. monocytogenes* 감염증에 대한 치료 및 예방에 대한 것이 많고 *L. monocytogenes*이 가지고 있는 이러한 작용기전을 이용하여 암세포에서의 치료 효과 및 기전에 대해 확인하는 연구가 부족한 실정이다. 이를 이용하여 본 연구에서는 *L. monocytogenes*가 분비하는 물질의 세포독성효과를 관찰하여 항암작용을 하는지 파악하고자 하였다. 또한 세포 내에도 세포의 생존 및 적응에 필요한 다양한 물질들이 존재하므로 *L. monocytogenes*의 세포내 물질의 세포독성효과를 보고자하였다. 특히, *L. monocytogenes*는 백혈병 환자에게서 가장 활발한 작

용을 하여 감염증을 일으키는 균으로 백혈병 환자의 세포에 민감하게 작용할 것으로 예상된다.

본 연구에서는 *L. monocytogenes*가 분비하는 물질과 세균의 세포 내에 존재하는 물질을 백혈병세포인 HL-60 세포에 처리하여 세포증식 억제 및 세포독성 효과를 보고자 하였다. 세포억제 효과는 *L. monocytogenes*의 세포 외내 물질을 각각 시간별로 처리하여 세포 생존율 및 세포고사를 확인하였고 동시에 세포주기의 변화를 관찰하였다. 또한 ROS 생성여부를 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

사람 대장암 세포주인 HL-60 세포(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml의 penicillin, 100 μg/ml의 streptomycin (Life technologies, Inc., Gaithersburg, MD)이 포함된 RPMI 1640배지(Life technologies, Inc.)에서 배양하였다. 세포는 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다.

2. 세균배양액 및 추출물 획득

*L. monocytogenes*는 trypticase soy broth (BBl microbiology systems, cockeysvile, MD) 5 ml에 접종하여 37℃ 배양기에서 3일 동안 배양하였다. 배양상층액을 얻기 위해 배양이 끝난 다음 pore size가 0.22 μm membrane을 이용한 여과멸균을 통해 세균을 제외한 상층액만을 모아서 실험에 사용하기 전까지 4℃에 보관하였다. 또한 세균이 함유하고 있는 물질들을 얻기 위해 배양된 세균을 모은 다음 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)에 부유시킨 다음 50~60%의 진폭을 설정하여 30초간 sonication한 다음 1분 동안 얼음에서 방치하고, 이 과정을 5번 반복하였다. 그 다음 3000 rpm, 10 min 동안 원심분리하여 상층액을 모아 실험에 사용하기 전까지 4℃에 보관하였다. 상층액 및 추출물은 Lowry assay를 통해 단백질을 정량하였다.

3. Morphology test

물질 처리에 따른 세포 형태변화를 관찰하기위해 1×10^6 cells/ml의 농도의 세포에 *L. monocytogenes* 배양상층액(LmSup)과 *L. monocytogenes* 추출물(LmE)을 각각 5 μg/ml로 처리하여 24시간, 48시간 배양하였다. 대조군으로는 아무처리도 하지 않고 HL-60 세포를 각각 24시간, 48시간 배양하였다. 각각의 배양시간이 지난 다음 세포를 모아 5×10^4 cells/200μl의 농도 PBS에 부유시켜 cytospin을 시행하였다. Cytospin이 끝나고 공기건조 시킨 후 Wright's stain 을 통해 세포 형태를 관찰하여 세포 생존율을 측정하기 위해 세포죽음이 일어난 세포수를 측정하였다. 세포고사가 진행된 세포는 cell membrane blebbing과 염색체 응축 및 apoptotic body를 관찰할 수 있다. 전체 세포 수에서 세포고사의 특징을 보이는 세포수의 비율을 세포 생존율로 표현하였다.

4. Trypan blue exclusion test

세포 생존율은 측정하기 위해 trypan blue exclusion test를 실시하였다. 세포는 1×10^5 cells/100 μl의 농도로 배양액에 부유한 하여 96 well plate에 분주한 다음 LmSup과 LmE를 각각 5 μg/ml의 농도로 첨가하여 24시간, 48시간 동안 처리하였다. 대조군으로는 아무처리도 하지 않고 HL-60 세포를 각각 24시간, 48시간 배양하였다. 배양 후 세포를 모아 세포 부유액을 만들고, 세포부유액과 trypan blue 염색액과 동량으로 희석하여 hemocytometer를 이용하여 세포수를 계측하였다. 살아있는 세포는 세포질이 투명하게 보일 것이고, 반면, 죽은 세포는 trypan blue 염색약이 흡수되어 파란색으로 보일 것이다. 세포 생존율을 계산하는 방법은 아래와 같다.; 세포생존율(%)은 전체 세포 중 살아있는 세포를 전체세포수로 나눈 값에 100을 곱하여 계산하였다.

5. MTT assay

세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay kit (Roche, Penzberg, Germany)를 이용하여 HL-60 세포의 생존율을 측정하였다. 세포는 1×10^5 cells/50 μl의 농도로 부유하여 96 well plate에 분주하여 LmSup, LmE를 5 μg/ml

로 첨가하여 24 시간, 48 시간 동안 처리하였다. 대조군으로는 아무처리도 하지 않고 HL-60 세포를 각각 24시간, 48시간 배양하였다. 각각의 배양 시간이 지난 다음, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution을 10 μl 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 4시간을 배양하고 100 μl의 solubilization solution을 추가로 첨가하였다. 37℃, 5% CO_2 배양기에서 하루 동안 방치한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 유세포 분석기를 이용한 세포고사 측정

세포고사를 파악하기 위해 1×10^6 cells/ml의 농도의 세포에 LmSup과 LmE을 각각 5 μg/ml로 처리하여 24시간, 48시간 배양하였다. 대조군으로는 아무처리도 하지 않고 HL-60 세포를 각각 24시간, 48시간 배양하였다. 각각의 배양시간이 지난 후, 세포를 모아 PBS에 세포를 부유시킨 다음, 세포부유액에 annexin V-FITC와 propidium iodide (PI) (BD bioscience, San Diego, CA)를 첨가하여 실온에서 15 분간 방치한 후 염색된 세포는 CellQuest software를 이용하여 유세포 분석기(BD bioscience)를 통해 측정하였다. Annexin V-FITC가 염색된 모든 세포를 세포고사가 일어난 세포로 정의하고 각 샘플 당 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

7. 유세포 분석기를 이용한 세포주기 측정

세포주기의 변화를 관찰하기 위해 1×10^6c ells/ml의 농도의 세포에 LmSup과 LmE을 각각 5 μg/ml로 처리하여 24시간, 48시간 배양하였다. 대조군으로는 아무처리도 하지 않고 HL-60 세포를 각각 24시간, 48시간 배양하였다. 배양시간이 지난 후 각각의 세포를 모아 DPBS에 부유시킨 다음 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 통해 세포를 2번 세척하였다. 세척한 세포는 다시 DPBS에 부유시켜 PI를 처리하여 15분간 염색하였다. 그 후 유세포 분석기를 통해 측정하였다. sub G_0/G_1기의 세포 수를 측정하여 세포주기를 파악하였다. Sub G_0/G_1기의 세포를 세포고사가 진행된 것으로 정의하고 각 샘플 당 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

8. ROS 검출

LmSup 또는 LmE를 처리한 세포를 모아서 미리 37℃로 유지시키고 있던 PBS를 이용하여 5×10^5 cells/100 μl의 농도로 부유시켰다. 그 다음, 5 μM의 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCF -DA) (Sigma, USA)를 처리하여 10분간 실온에서 반응시켰다. DCF-DA(dichlorofluorescein diacetate)가 세포내로 들어가게 되면 가수분해반응에 의해 2′,7′-dihydrodichlorofluorescein (DCF-H)로 전환이 되고, 이 물질은 ROS가 발생하는 곳에서 형광빛을 발하는 DCF (dichlorofluorescein)로 산화반응이 일어난다. 형광세기는 유세포분석기(BD Biosciences)를 이용하여 측정하였다. ROS 생성량의 비교 및 통계처리를 위해 LmSup 또는 LmE를 처리하지 않은 대조군(Con)의 형광세기를 1로 설정하고 각 실험군의 결과는 대조군의 형광세기에 비해 증가하는 형광세기를 나타내기 위해 실험군의 형광세기/대조군의 형광세기 비로 표현하였다.

9. 통계처리

모든 실험 결과를 mean ± S.D로 표현하였다. 각 대조군과 실험군 사이의 통계학적의 유의성은 SPSS statistical software package (Version 10.0, Chicago, IL)을 이용하여 student's *t*-test로 분석하였고 *p* value가 0.05 이하면 통계학적인 유의성이 있다고 판단하였다.

Ⅲ. 결과

1. *L. monocytogenes* 세포배양액(LmSup) 및 추출물(LmE)에 의한 세포독성 효과

HL-60 세포에 LmSup 및 LmE를 각각 24 시간, 48시간 동안 처리하고 morphology test, trypan blue exclusion test로 세포 생존율을 측정하였다. 세포죽음을 세포의 형태 변화로 관찰한 결과에서 HL-60 세포의 생존율이 LmE에 의해 유의하게 감소하는 것을 보였다. 이때, LmSup에 의한 세포 생존율은 미약하게 감소하는 경향은 보이나 유의성은 보이지 않았다[그림 1A]. [그림

1B]는 trypan blue exclusion test를 이용하여 세포 생존율을 측정한 것으로 LmSup와 LmE에서 모두 유의성 있게 HL-60 세포의 생존율이 감소함을 보였고, 처리 시간이 길어짐에 따라 세포생존율도 더 많이 감소하였다. 그 다음 MTT assay를 이용하여 HL-60 세포의 생존율을 측정한 다음 LmSup 및 LmE 각각의 세포독성 효과를 관찰하였다[그림 1C]. [그림 1A][그림 1B]와 마찬가지로 LmSup와 LmE 물질 처리 후에는 세포 독성효과가 현저히 증가함을 관찰하였다.

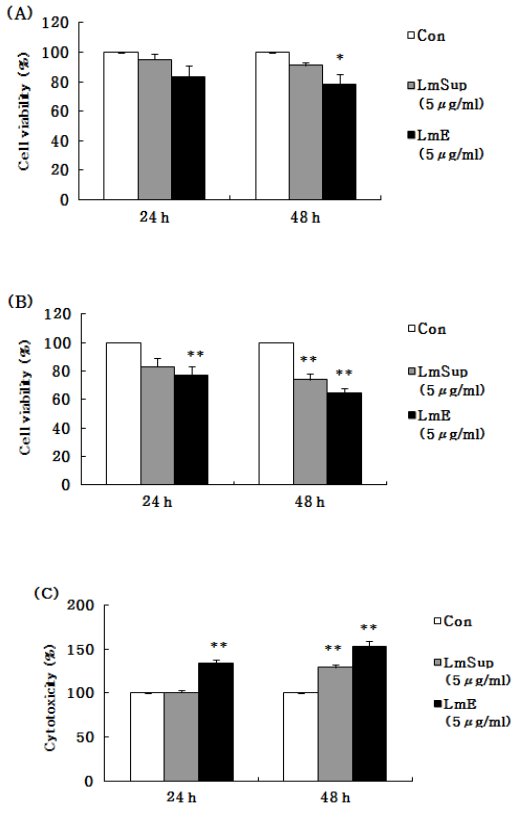

그림 1. *L. monocytogenes*에 의한 HL-60 세포의 생존율 변화 확인.
(A) Morphology test, (B) Trypan blue exclusion test, (C) MTT assay. 대조군(Con)을 100%로 설정하고 처리시간이 동일한 군에서 대조군과 각각의 실험군을 통계처리 한 다음 *p<0.05, **p<0.01로 표현하였다.

2. *L. monocytogenes* 세포배양액(LmSup) 및 추출물(LmE)에 의한 세포고사 유도 효과

HI-60 세포가 LmSup와 LmE에 의한 죽음이 세포고사인지를 파악하기 위해 앞의 방법과 동일하게 HL-60 세포에 LmSup와 LmE를 각각 24 시간, 48시간 동안 처리하고 annexin-V와 PI 염색을 시행하였다. Annexin-V는 phosphatidyl serin (PS)에 결합하는 물질로 PS는 세포고사 초기에 세포막에 발현되는 단백질이다. Annexin-V가 염색된 모든 세포는 세포고사가 진행된 세포로 정의한다. 염색된 세포는 유세포 분석기를 통해 측정하였다. [그림 2]에 나타난 바와 같이 LmSup와 LmE에 의한 HL-60 세포의 죽음은 세포고사에 의한 것으로 확인되었고 세포고사의 초기 및 후기단계에서 모두 영향을 주었다. LmE 처리 시에 24 시간, 48 시간 처리한 결과가 모두 유의성 있게 나타난 반면 LmSup 처리 시에는 48시간까지 방치해야 세포고사의 유도가 유의성 있게 증가함을 관찰할 수 있었다. 본 결과를 통해 LmE의 세포고사 유도 효과가 LmSup보다 증가함을 알 수 있었다.

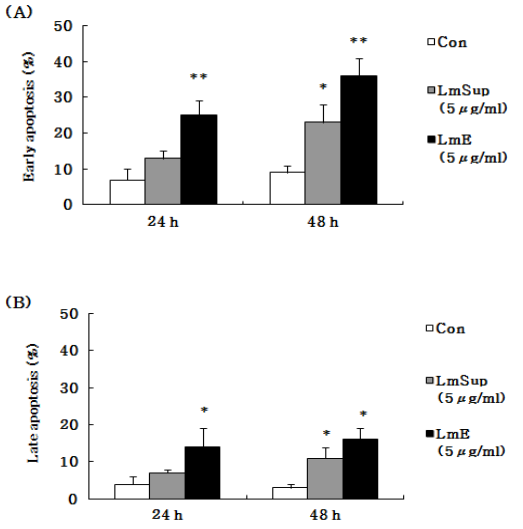

그림 2. *L. monocytogenes*에 의한 세포고사 유도효과 확인.
(A) 세포고사 초기, (B) 세포고사 후기. 대조군(Con)을 100%로 설정하고 처리시간이 동일한 군에서 대조군과 각각의 실험군을 통계처리 한 다음 *p<0.05로 표현하였다.

3. *L. monocytogenes* 세포배양액(LmSup) 및 추출물(LmE)에 의한 세포주기 조절 효과

HL-60 세포가 LmSup 및 LmE에 의해 세포고사가 유도됨을 확인하여 세포주기에도 영향을 미치는 지 확인하였다. M, G1, S, G2기로 구성된 세포주기 중 subG0/G1기가 증가하면 cell cycle arrest가 진행된 것으로 보여지는데 [그림 3]에서 보이는 것과 같이 LmSup와 LmE를 처리하였을 때, subG0/G1기가 급격히 증가함을 관찰하였다.

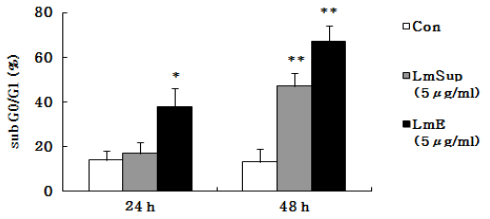

그림 3. *L. monocytogenes*에 의한 subG0/G1 유도 효과. 대조군(Con)을 100%로 설정하고 처리시간이 동일한 군에서 대조군과 각각의 실험군을 통계처리한 다음 *p<0.05, **p<0.01로 표현하였다.

4. *L. monocytogenes* 세포배양액(LmSup) 및 추출물(LmE)에 의한 ROS 생산 여부 확인

LmSup와 LmE에 의해 유도되는 HL-60 세포의 세포고사가 ROS 발생과 관계가 있는지 파악하고자 세포에 각각의 물질을 처리한 다음 DCFDA stain을 실시하여 유세포 분석기로 측정하였다. 그 결과, LmSup와 LmE에 의해 HL-60 세포 내 ROS 생산이 급격히 증가함을 보였다[그림 4].

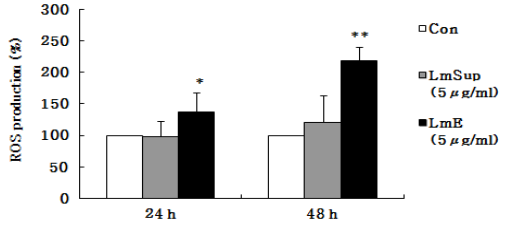

그림 4. *L. monocytogenes*에 의한 ROS 생산 변화 확인. 대조군(Con)을 100%로 설정하고 처리시간이 동일한 군에서 대조군과 각각의 실험군을 통계처리한 다음 *p<0.05, **p<0.01로 표현하였다.

Ⅳ. 고찰

본 연구에서, LmSup와 LmE가 급성 전골수구성 백혈병(APL) 세포인 HL-60 세포의 세포고사를 유도하고 [그림 1][그림 2], 세포주기를 비정상적으로 차단함을 확인하였다[그림 3]. 이때, ROS가 관여함을 관찰하였다[그림 4]. APL은 promyelocyte라고 불리는 미성숙 과립구의 비정상적인 축적으로 발생하는 질환으로 그 원인은 retinoic acid receptor alpha (RARα) 유전자와 promyelocytic leukemia gene (PML)이 관여하는 염색체 translocation으로 인해 발생한다[6]. 그리고 주요 치료제로 사용하는 ATRA는 retinoic acid syndrome이라는 부작용을 유도한다. 이는 과분화된 promyelocyte가 급격히 cytokine들을 분비하면서 발생하는 현상으로 호흡곤란, 고열, 체중 감량 등의 증상을 동반한다[7]. 치료에는 dexamethasone을 사용하지만 이 또한 glucocorticoid 성분으로 구성된 steroid 계열의 약제로 강력한 항염증 및 면역억제 효과를 유도하여 다양한 부작용이 지속적으로 보고되어지고 있다. 또한 약제 내성을 간혹 유발하기도 한다[20]. 이러한 이유로 안전하고 효과적인 새로운 항암제의 개발이 절실한 실정이다.

최근 세균에서 분리한 추출물이 새롭게 항암제 개발의 target으로 대두되고 있다. *P. aeruginosa*가 일으키는 세포고사 유도 물질 중 *Pseudomonas* exotoxin A (PE)은 fibroblast에서 세포 죽음을 억제하고 생존을 지속시키는데 관여하는 단백질인 Mcl-1의 분해를 촉진시키고, 반대로 세포고사를 유도하는 단백질인 Bak의 발현을 증가시켜서 세포고사를 유도한다고 보고되었다[21][22]. 또한 *Listeria monocytogenes*도 항암치료에 이용하는 cancer vaccine으로써 알려져 있지만[18], 항암효과를 나타내는 물질에 대해 아직 명확한 기전을 기반으로 한 이해가 부족하다. 주로 *L. monocytogenes*가 감염된 동물은 암세포가 많이 발생되어 있어도 말초 혈액 내 림프구의 세포독성 효과를 증가시켜서 항암효과를 보인다는 내용이다[19]. 본 연구에서는 LmSup와 LmE가 HL-60 세포의 세포고사를 유도하여 암세포를 제거하는 효과를 보였다[그림 1-5]. HL-60 세포와 마찬가지로 neuroblastoma 세포주인 Neuro-2a 세포에 *L. monocytogenes* 처리 시 세포

고사를 일으켜 DNA 손상 및 세포 죽음을 유발한다[19]. 암 세포 이외에도 면역세포에 작용하는 경우도 있다. 인체 면역 세포는 외부 항원의 자극의 증식 및 활성이 증가되어 신체 방어기전을 일으키지만 과도하면 오히려 염증반응을 유발하여 질병을 악화시키는 경우가 있다. 그 중 *L. monocytogenes*의 물질 중 listeriolysin이 수지상 세포에 독성인자로 작용하여 세포고사를 유도한다는 보고도 있다[20]. LmSup와 LmE가 HL-60 세포에 처리하면 ROS가 증가하는데[그림 4], ROS는 세포고사를 유도하는 세포 외내 자극에 의해 미토콘드리아가 반응하여 cytochrome c를 분비하고 이로 인해 과잉의 ROS가 발생하게 한다. 발생된 ROS는 핵 내 DNA 손상을 일으키고 apoptosis pathway의 강력한 유도 물질인 caspase cascade를 활성화시킨다[13][14][25]. *L. monocytogenes*의 주요 세포독성인자로는 listeriolysin이 있다.

Listeriolysin은 listeriolysin O (LLO)와 listeriolysin S (LLS)가 있고 *L. monocytogenes*의 세포질과 액포 내에 존재하고 있다. 특히 LLO는 *L. monocytogenes*가 대식세포에 탐식되기 전에는 세포질 및 액포 내에서만 존재하고 있다가 탐식 후 분비되어 대식세포의 막에 결합하여 막 속으로 삽입 된 후 pore를 형성해 결국 세포를 파괴한다[26]. 또한 *L. monocytogenes*가 외부로 분비하는 독성인자인 eoxotoxin으로는 LLO와 phosphatidylinositol -specific phospholipase C (PI-PLC)가 있다. PI-PLC 역시 숙주 세포에 탐식된 이후 세포막을 분해하여 탈출하는데 작용하는 물질이다[27]. 그러나 기존의 연구에는 *L. monocytogenes*의 독성인자를 이용하여 치료물질을 특정 암세포로 전달하여 항암치료 효과를 증가시키는 것에 대한 연구가 주로 이루어질 뿐[28], *L. monocytogenes*의 직접적인 항암효과에 대한 연구는 부족한 실정이다 . *L. monocytogenes*의 물질 전달 효과는 마우스를 이용한 in vivo 실험을 실시하여 자궁암 세포, 림프종 세포 및 유방암 세포(MCF-7 세포)에 치료물질을 효과적으로 전달하기 위한 vaccine vactor로 이용하여 암 발병 마우스의 치사율 감소 및 암세포의 증식을 억제하여 명확한 치료효과를 나타냈다[29-32].

[그림 1-4]에서 보여준 것처럼 LmSup와 LmE의 세포독성 효과도 LLO, LLS, PI-PLC와 같은 세포막 용해인자가 주요하게 작용하여 일어난 것으로 사료된다. 특히 LmE의 성분이 LmSup의 성분보다 HL-60 세포에서 더 강하고 빠르게 작용하였는데, 이는 *L. monocytogenes*의 주요 독성 성분이 세포질 및 액포 내에 존재하다가 숙주의 대식세포에 탐식된 이후 분비하므로, *L. monocytogenes*를 배양하여 증식하는 과정에 분비하는 물질에는 listeriolysin과 같은 독성인자의 양이 *L. monocytogenes* 세포내 보다 적다. 이로 인해 LmSup보다 LmE의 독성효과가 더 강력하게 작용한 것으로 예상된다. APL은 치료제의 빈번한 부작용으로 *L. monocytogenes* 이외에도 다양한 세균을 이용한 치료물질 연구가 진행되어 왔다. 그 중 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)가 세포 외로 분비하는 독성인자인 leukotoxin (LtxA)은 혈액세포의 lymphocyte function antigen-1 (LFA-1)에 결합하여 숙주세포의 세포막의 불안정화를 유발한다. HL-60 세포에서도 LtxA의 항암효과를 보기위해 *A. actinomycetemcomitans*의 배양상층액에서 LtxA 성분을 추출하여 HL-60 세포에 처리한 결과 세포죽음을 유발한 보고가 있다[33]. *Staphylococcus aureus*의 α-toxin은 0.1 μg/ml의 적은 농도에서도, HL-60 세포와 다른 human leukemia 세포주인 K562 세포에서도 세포고사를 유도하여 생존율을 감소시켰다[34]. *Bacillus thuringiensis*에 존재하는 crystal protein은 pore-forming toxin으로 주로 살충제로 사용하고 있는데 HL-60 세포에서 DNA 손상을 유도하여 세포고사를 유발하였다[35]. *B. thuringiensis*와 유사한 기능을 하는 물질들이 *L. monocytogenes*에도 다량 존재하는 데, LLO, LLS, PI-PLC, internalin 등의 다양한 inclusion protein이 포함된다[26][27][36]. 그러나 모든 세균이 함유하고 있는 독소나 단백질이 세포고사에 작용하지는 않는다. 그 중 *Bacillus anthracis*의 letha toxin (LT)는 대식세포에 특이적으로 작용하여 세포 죽음을 유도하지만, HL-60, U-937, THP-1 세포에는 세포고사를 유도하지 않는 것으로 보아 세균 독소들의 cytoxicity는 세포 특이적으로 작용하는 것을 알 수 있다[37].

본 결과들은 종합하면, *L. monocytogenes*의 분비물 및 추출물이 ROS를 발생시켜 HL-60 세포의 세포주기

를 억제하고 세포고사를 유도하여 암세포 제거 효과를 관찰하였다. 그러나 HL-60 세포에서 보여주는 *L. monocytogenes*의 물질들의 세포고사 기전을 완전히 밝혀 내지는 못했다. 앞으로 LmSup 또는 LmE의 구체적인 항암효과 및 기전 분석을 통해 난치병인 APL의 치료 방법 및 치료제 개발에 기여하고자 한다.

참 고 문 헌

[1] 김휘영, "자궁 재활치료를 위한 울트라-스캔방식의 펄스형 레이저시스템", 한국콘텐츠학회논문지, 제9권, 제6호, pp.256-265, 2009.

[2] N. Bernardes, R. Seruca, A. M. Chakrabarty, and A. M. Fialho, "Microbial-based therapy of cancer, Current progress and future prospects," Bioengineered Bugs, Vol.1, No.3, pp.178-190, 2010.

[3] Y. Andersson, S. Juell, and Q. Fodstad, "Downregulation of the anti-apoptotic MCL-1 protein and apoptosis in MA-11 breast cancer cells induced by an anti-dpidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin A immunotoxin," Int. J. Cancer, Vol.112, pp.475-483, 2004.

[4] A. M. Chakrabarty, "Microorganisms and Cancer: Quest for a therapy," J. Bacteriol, Vol.185, pp.2683-2686, 2003.

[5] M. S. Tallman and J. K. Altman, "Curative strategies in acute promyelocytic leukemia," Hematology, Vol.2008, No.1, pp.391-399, 2008.

[6] L. K. Hillestad, "Acute promyelocytic leukemia," Acta. Med. Scand., Vol.159, No.3, pp.189-194, 1957.

[7] M. S. Tallman, "Retinoic acid syndrome: a problem of the past?," Leukemia, Vol.16, No.2, pp.160-161, 2002.

[8] R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, and S. W. Lowe, "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy," Cell, Vol.108, pp.153-164, 2002.

[9] G. Kroemer and J. Pouyssegur. "Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel," Cancer cell, Vol.13, pp.472-482, 2008.

[10] A. Melet, K. Song, O. Bucur, Z. Jagani, A. R. Grassian, and R. KhosraviFar, "Apoptotic pathways in tumor progression and therapy," Adv. Exp. Med. Biol., Vol.615, pp.47-79, 2008.

[11] D. R. Green and J. D. Reed, "Mitochondria and apopotosis," Science, Vol.281, pp.1309-1312, 1998.

[12] S. Cory and J. M. Adams, "The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch," Mat Rev Cancer, Vol.2, pp.647-656, 2002.

[13] M, Ishihama, T. Toyooka, and Y. Ibuki, "Generation of phosphorylated histone H2AX by benzene metabolites," Toxicol. in Vitro, Vol.22, pp.1861-1868, 2008.

[14] H. Terasaka, Y. Kadoma, H. Sakagami, and S. Fujisawa, "Cytotoxicity and apoptosis- inducing activity of bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells," Anticancer Res., Vol.3B, pp.2241-2247, 2005.

[15] K. P. Wilson, J. A. Black, J. A. Thomson, E. E. Kim, P. G. James, A. N. Manuel, M. A. Murcko, P. S. Chambers, R. A. Aldape, S. A. Raybuck, and D. J. Livingston, "Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme," Nature, Vol.370, No.6497, pp.270-275, 1994.

[16] M. L. Gray and A. H. Killnger, "Listeria monocytogenes and listeric infection," Bacteriol. Rev., Vol.30, pp.309-382, 1966.

[17] R. W. Armstrong and P. C. Fung, "*Brainstem encephalitis* (Rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review," Clin. infect Dis., Vol.16, No.5, pp.689-702, 1993.

[18] F. Lowry, "Live Listeria vaccine proves safe against end-stage cervical cancer in human trial," Ob. Gyn. News, Vol.43, No.10, p.2, 2008.

[19] M. C. Parra, F. Baquero, and J. C. Perez-Diaz, "The role of apoptosis in *Listeria monocytogenes* neural infection: Listeriolysin) interaction with neuroblastoma Neuro-2a cells," Infection, Generics and Evolution, Vol.8, pp.59-67, 2008.

[20] C. A. Guzman, E. Domann, M. Rohde, D. Bruder, A. Dariji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty, and K. N. Timmis, "Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes,*" Mol Microbiol, Vol.20, pp.119-126, 1996.

[21] M. J. Brunda, H. L. Mathews, H. R. Ferguson, J. K. McClatchy, and P. Minden, "Immunotherapy of the guinea pig line 10 hepatocarcinoma with a variety of nonviable bacteria," Cancer research, Vol.40, pp.3211-3213, 1980.

[22] G. P. Chrousos, S. D. Detera-Wadleigh, and M. Karl, "Syndromes of glucocorticoid resistance," Ann. Intern. Med., Vol.119, No.11, pp.1113-1124, 1993.

[23] K. W. Adams and G. M. Cooper, "Rapid turnover of mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis," J. Biol. Chem., Vol.282, pp.6192-6200, 2007.

[24] X. Du, R. J. Youle, D. J. FitzGerald, and P. Ira, "Pseudomonas Exotoxin A-Mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1," Molecular and Cellular Biology, Vol.30, No.14, pp.3444-3452, 2010.

[25] 남상남, 김종혁, 지민철, "유산소 운동을 병행한 근 저항성 운동이 노인 여성의 혈중 MDA 및 SOD, GPx 활성에 미치는 영향", 한국콘텐츠학회 논문지, 제9권, 제11호, pp.391-398, 2009.

[26] A. L. Decatur and D. A. Portnoy, "A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity," Science, Vol.290, No.5493, pp.992-995, 2000.

[27] Z Wei, L. A. Zenewicz, and H. Goldfine, "*Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C has evolved for virulence by greatly reduced activity on GPI anchors," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol.102, No.36, pp.12927-12931, 2005.

[28] L. M. Wood, P. D. Guirnalda, M. M Seavey and Y. Paterson, "Cancer immunotherapy using *Listeria monocytogenes* and listerial virulence factors," Immunol. Res., Vol.42, pp.233-245, 2008.

[29] R. W. Tindle, "Human popillloma virus vaccines for cervical cancer," Curr. Opin, Immunol., Vol.8, pp.643-650, 1996.

[30] R. Singh and Y. Paterson, "Vaccination strategy determines the emergence and dominance of CD8+ T-cell epitopes in a FVB/N rat HER-2/neu mouse model of breast cancer," Cancer Res., Vol.66, pp.7748-7757, 2006.

[31] R. E. Hqwkins, D. Zhu, M. Ovecka, G. Winter, T. J. Hamblin, A. Long, and F. K. Stevenson, "Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines," Blood, Vol.83, No.11, pp.3279-3288, 1994.

[32] S. Bergelt, S. Frost, and H. Lilie, "Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin," Protein Sci., Vol.18, pp.1210-1220, 2009.

[33] S. C. Kachlanya, A. B. Schwartza, N. V. Balashovaa, C. E. Hioeb, M. Tuenb, A. Lea, M. Kaura, Y. Meia, and J. Raoa, "Anti-leukemia activity of a bacterial toxin with natural specificity for LFA-1 on white blood cells,, Leukemia Res., Vol.34, No.6, pp.777-785, 2010.

[34] O. Choi, K. Yahiro, N. Morinaga, M. Miyazaki and M. Noda, "Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of Staphylococcal alpha-toxin," Microb Pathog, Vol.42, pp.215-224,

2007.

[35] L. Zhu, C. Li, J. Wu, J. Liang, and Y. Shi, "Apoptosis of HL-60 cells induced by crystal proteins from Bacillus thuringiensis Bt9875," Wei Sheng Wu Xue Bao, Vol.44, pp.690-694, 2008.

[36] W. D. Schubert, C. Urbanke, T. Ziehm, V. Beier, M. P. Machner, E. Domann, J. Wehland, T. Chakraborty, and D. W. Heinz, "Structure of internalin, a major invasion protein of Listeria monocytogenes, in complex with its human receptor E-cadheri," Cell, Vol.111, pp.825-836, 2002.

[37] A. Kassam, S. D. Der, and J. Mogridge, "Differentiation of human monocytic cell lines confers susceptibility to Bacillus anthracis lethal toxin," Cell Microbiol, Vol.7, pp.291-292, 2005.

저 자 소 개

양 은 주(Eun-Ju Yang) 정회원

- 2006년 8월 : 연세대학교 임상병리학과(이학석사)
- 2012년 2월 : 연세대학교 임상병리학과(이학박사)
- 2011년 3월 ~ 현재 : 대구한의대학교 임상병리학과(전임강사)

<관심분야> : 미생물, 항암효과, 면역반응

김 동 현(Dong-Hyun Kim) 정회원

- 2009년 2월 : 부산대학교 대학원 의공학과 졸업(공학박사)
- 1994년 ~ 2011 2월 : 부산대학교 병원 영상의학과
- 2011년 ~ 현재 : 부산가톨릭대학교 방사선학과 교수

<관심분야> : 자기공명영상학, 방사선관리학

장 정 현(Jeong-Hyun Chang) 정회원

- 2000년 2월 : 동아대학교 생물학과(이학석사)
- 2003년 8월: 동아대학교 생물학과(이학박사)
- 2008년 ~ 현재 : 대구한의대학교 임상병리학과(조교수)

<관심분야> : 혈액학, 세포유전학