

Induction of Apoptosis and Antitumor Activity by Stichoposide D through the Generation of Ceramide in Human Leukemia Cells

Eun-Seon Park[†], Seung-Hoon Yun[†], Sung-Won Shin, Jong-Young Kwak and Joo-In Park*

Department of Biochemistry, Dong-A University College of Medicine, Busan 60-714, Korea

Received March 6, 2012 / Revised June 14, 2012 / Accepted June 17, 2012

Marine triterpene glycosides are physiologically active natural compounds isolated from sea cucumbers (*holothurians*). It was demonstrated that they have a wide range of biological activities, including antifungal, cytotoxic, and antitumor effects. A previous study showed that stichoposide C (STC) isolated from *Thelenota anax* induces apoptosis through generation of ceramide by activation of acid sphingomyelinase (SMase) and neutral SMase in human leukemia cells. In this study, we investigated whether STD, a structural analog of STC, can induce apoptosis and examined the molecular mechanisms for its activity. It was found that STC and STD induce apoptosis in a dose- and time-dependent manner and lead to the activation of caspase-8, mitochondrial damage, activation of caspase-9, and activation of caspase-3 in K562 and HL-60 cells. STC activates acid SMase and neutral SMase, which results in the generation of ceramide. Specific inhibition of acid SMase or neutral SMase partially blocked STC-induced apoptosis, but not STD-induced apoptosis. In contrast, STD generates ceramide through the activation of ceramide synthase. Specific inhibition of ceramide synthase partially blocked STD-induced apoptosis, but not STC-induced apoptosis. Moreover, STC and STD markedly reduced tumor growth of HL-60 xenograft tumors and increased ceramide generation *in vivo*. These results indicate that STC and STD can induce apoptosis and have antitumor activity through the different molecular mechanisms, because they have a different sugar residue attached to aglycones. Thus, these results suggest that their actions are affected by a sugar residue attached to aglycones and they can be used as anticancer agents in the treatment of leukemia.

Key words : Stichoposide D, ceramide, ceramide synthase, apoptosis, antitumor activity

서 론

만성 골수성 백혈병(Chronic myelogenous leukemia)은 조혈 모세포에 영향을 미치는 돌연변이의 결과로 발생하는 척수 증식성의 장애(myeloproliferative disorder)이며, 이러한 돌연변이에 의해 9번 염색체와 22번 염색체 사이에 균형적인 전위(balanced translocation)가 발생하는데 이 염색체를 필라델피아(Ph) 염색체라고 한다[18]. 만성 골수성 백혈병은 모든 백혈병의 약 15~20%를 차지하고 100,000명에 1~1.5명의 빈도로 발생한다고 보고되었다[4]. 만성 골수성 백혈병은 무기력, 체중 감소, 출혈, 식은 땀, 빈혈, 및 비장 비대증(splenomegaly)을 포함하는 증상이 있음에도 불구하고, 환자의 약 50%는 증상이 없어 혈액 검사로 진단되는 경우가 많다[15]. 만성 골수성 백혈병은 bcr/abl 전위에 의한 티로신 키나제(tyrosine kinase)의 활성화 때문에 발생하므로 만성 골수성 백혈병에 대한 표적 치료제인 이마티닙(imatinib) 치료는 이전의 치료법과 비교하면

우수한 반응률과 생존율을 가지지만 약물을 복용하는 환자 20%는 완전한 세포 유전적 반응이 나타나지 않고, 일부 환자들은 시간이 흐르면서 견딜 수 없는 부작용이나 약물 내성을 나타내게 된다[17]. 따라서 부작용이 적고 항암작용이 뛰어난 물질의 발굴이 절실히 필요한 실정이다.

해양 트리테르펜 글리코사이드(marine triterpene glycosides)는 해삼 (Holothurians)이나 일부 해면류(sponges)에서 분리한 천연물질로서 항 진균 작용, 세포독성, 용혈작용과 세포증식을 억제하는 효과 등 여러 가지 생물학적 활성들을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[21,22]. 특히, 이전의 연구 결과 *Thelenota anax*에서 추출한 stichoposide C (STC) (quinovose를 함유하는 hexaoside, Fig. 1A)는 HL-60 및 K562 세포와 같은 백혈병 세포에서 산성 스펅고마이엘리나제(acid sphingomyelinase; acid SMase)와 중성 스펅고마이엘리나제(neutral sphingomyelinase; neutral SMase)를 활성화시켜 세라마이드(ceramide)를 생성하고 이러한 세라마이드가 STC에 의한 세포사멸 유도과 항암 작용에 중요하다는 것을 알 수 있었다. 또한 STC에 의한 산성 SMase 활성화는 세포사멸 수용체인 Fas 활성화에 의해 caspase-8이 활성화되어 나타났으며 중성 SMase 활성화는 glutathione 고갈에 의해 활성화된다는 것을 알 수 있었다[25].

[†]Eun-Seon Park and Seung-Hoon Yun have equally contributed to this work.

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-2881, Fax : +82-51-241-6940

E-mail : jjpark@dau.ac.kr

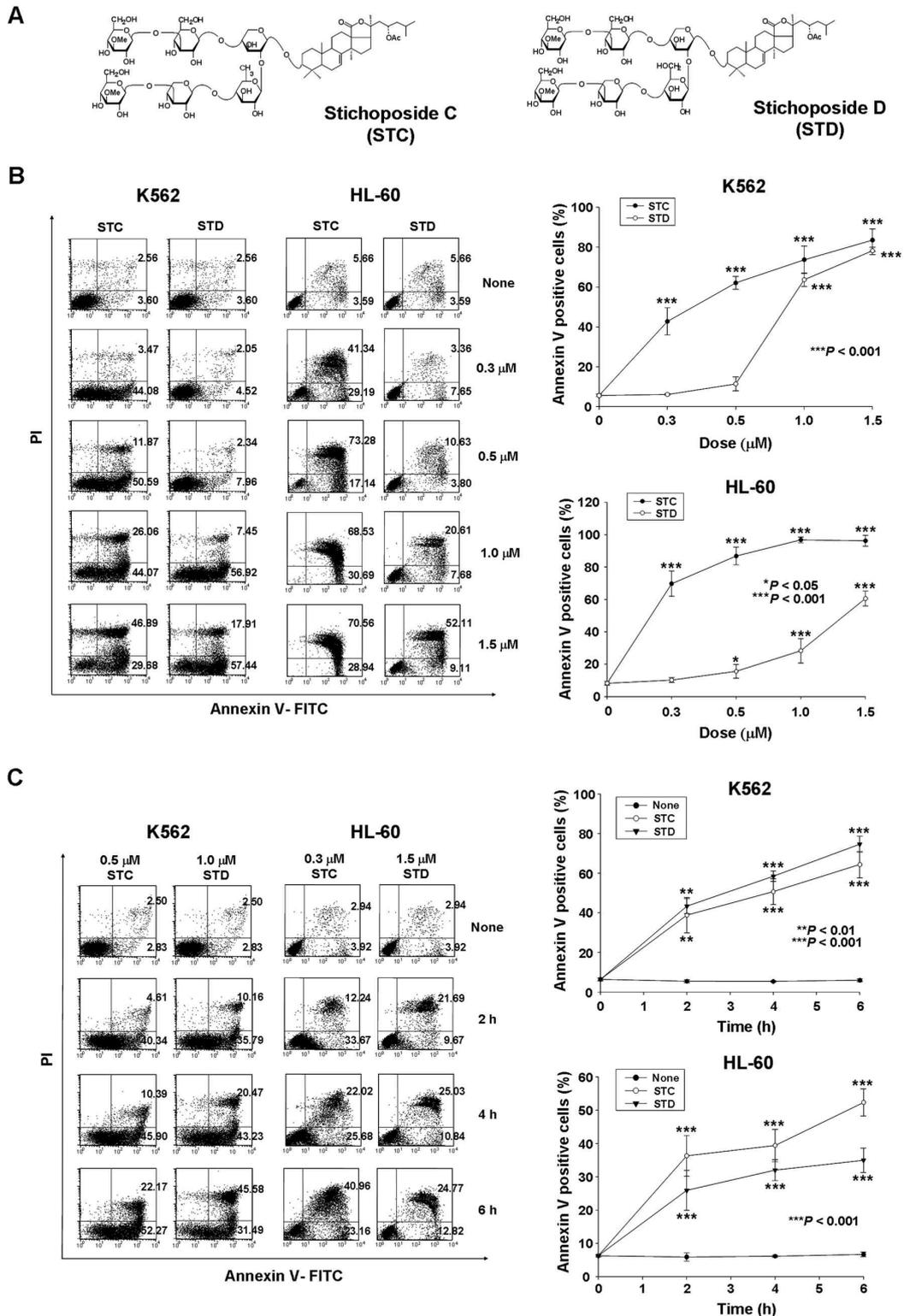


Fig. 1. Stichoposide D (STD) induces apoptosis in human leukemic cells in a dose- and time-dependent manner. (A) Structure of STC and STD. (B) K562 and HL-60 cells were seeded 4 hr before treatment with various concentrations of STC or STD (0, 0.3, 0.5, 1.0, or 1.5 μ M) for 6 hr. (C) K562 and HL-60 cells were seeded 4 hr before treatment with STC (0.5 μ M, 0.3 μ M) or STD (1.0 μ M, 1.5 μ M) for the indicated times, respectively. The percentage of apoptotic cells was determined by annexin V-FITC/PI staining as described in the "Materials and Methods". These data represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. control cells.

세라마이드는 세포 주기 억제, 세포 사멸 및 세포 노화와 스트레스 등을 포함하는 세포 내 다양한 과정을 조절하는 등 종양억제 지질(tumor suppressor lipid)로 알려져 있다[14]. 또한 세라마이드는 serine palmitoyl transferase와 세라마이드 합성 효소(ceramide synthase)가 작용하여 *de novo*로 합성되거나 스핑고마이엘린(sphingomyelin) 가수분해에 의해 생성된다[1,12]. 세포막의 구성 성분인 스핑고마이엘린을 가수분해하여 세라마이드를 생성하는 SMase는 여러 종류가 있으며 효소의 최대 활성을 나타내는 pH에 따라 산성, 중성 및 염기성 SMase로 분류한다[11,14,23]. 세포 사멸을 유도하는 여러 가지 자극에 반응하여 세라마이드가 생성될 때 산성 SMase와 중성 SMase가 관여한다고 보고되었으며[6,9,13] 항암 물질들은 여러 종류의 암세포들에서 세라마이드를 증가시킨다고 알려져 있다[24]. 이러한 면에서 스핑고지질의 대사를 조절하여 암세포의 세라마이드를 증가시킬 수 있는 약물은 항암치료의 새로운 후보가 될 수 있다. 더욱이 항암제에 의한 고전적인 세포사멸경로의 활성이 실패한 경우에 세라마이드가 증가하면 caspase 비의존적 세포사멸경로(caspase-independent cell death pathway)를 활성화시키는 물질로 작용할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 세라마이드 생성을 증가시켜 세포 사멸을 유도하는 STC와 구조가 유사한 STD (glucose를 함유하는 hexaaside, Fig. 1A)를 사용하여 백혈병 세포에서 STC와 같은 세포사멸 유도 및 항암작용이 있는지와 이의 분자적 기전을 규명하여 구조적 차이에 의한 작용이나 기전에 차이가 있는지를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

세포 배양

백혈병 세포주인 HL-60와 K562 세포는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였고, 10% 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum; FBS, GIBCO, Grand Island, NY)과 100 µg/mL의 페니실린과 스트렙토마이신(GIBCO, Grand Island, NY)이 첨가된 RPMI1640 배지(GIBCO, Grand Island, NY)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 완전 습윤 상태의 배양기에서 배양하였다.

시약

STC와 STD는 정제된 가루의 형태로 러시아의 Stonik 교수(Pacific Institute of Bioorganic Chemistry)로부터 받아서 사용하였다[20]. 3, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆)는 Molecular Probes (Eugene, OR)사로부터 구입하였으며, anti-cytochrome c 그리고 anti-β-actin antibodies는 Sigma (St Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였고, anti-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 및 anti-AIF, anti-Smac/DIABLO antibodies는 Cell Signaling사의 제품을 사용하였으며, an-

ti-procaspase 3, anti-COX IV (cytochrome oxidase IV)는 Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사의 제품을 사용하였고, anti-procaspase 8, anti-procaspase-9 antibodies는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)사의 제품을 사용하였으며, anti-ceramide antibody는 Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA)사의 제품을 사용하였다. Caspase-8 저해제인 Z-Ile-Glu-Thr-Asp-fluoromethyl ketone (Z-IETD-FMK), caspase-9 저해제인 Z-Leu-Glu-His-Asp-fluoromethyl ketone (Z-LEHD-FMK), pan-caspase 저해제인 Z-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone (Z-VAD-FMK)와 caspase-3 저해제인 Z-Asp (OCH₃)-Glu (OCH₃)-Val-Asp (OCH₃)-fluoromethyl ketone (Z-DEVD-FMK)는 Sigma (St Louis, MO, USA)사로부터 구입하였으며, Annexin V-FITC apoptosis detection kit는 BD pharmingen (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)사의 제품을 사용하였다. 그 외의 모든 시약은 Sigma (St Louis, MO, USA)사의 제품을 사용하였다.

Apoptosis assay (Annexin V/PI staining)

각 세포를 6 well plates에 세포 수가 3×10⁵/ml이 되도록 분주하여 0.1% DMSO (대조군) 및 다양한 농도의 STC와 STD를 첨가하여 2, 4, 및 6시간 배양하였고 또한 여러 가지 저해제의 영향을 살펴보기 위하여 0.5 µM STC와 1.0 µM STD를 처리하기 1시간 전에 저해제들을 처리하여 배양하였다. 배양 후, 배양된 세포들을 수확하여 200 µl의 annexin V binding buffer를 넣은 후, annexin V-FITC와 PI를 5 µl 첨가하고, 빛을 차단하여 37°C에서 15분간 반응한 후, 유세포 분석기(FACScan, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 세포 10,000개 당 apoptotic cell의 수를 측정하였다[19]. 각 실험은 3회 반복하여 시행하였다.

Mitochondrial Membrane Potential (MMP; Δψ_m) 측정

0.1% DMSO와 0.5 µM STC 및 1.0 µM STD를 첨가하여 반응시킨 세포를 수확하여 PBS 완충용액으로 세척한 후, 50 nM DiOC₆를 처리한 RPMI1640 배지를 1 ml 가하여 빛을 차단하고 30분 동안 37°C에 반응 후 세포를 수확하여 유세포 분석기(FACScan, Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 분석하였다[19]. Δψ_m은 3회에 걸쳐 측정하였다.

세포질과 미토콘드리아 단백질의 분리

0.1% DMSO와 0.5 µM STC 및 1.0 µM STD를 첨가하여 반응시킨 세포를 수확하여 PBS 완충용액으로 세척한 후, 1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄, 100 mM EDTA, 1 M sucrose, 6.15 mg/ml digitonin 그리고 25× cocktail이 포함된 완충용액을 첨가한 다음 잘 섞어주고, 상온에서 30분간 배양하였다. 13,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 상층액(세포질 단백질)을 추출하고, 나머지 세포 pellet에 세포용

해 완충용액을 넣어 미토콘드리아 단백질을 추출하였다[10].

Western blot analysis

0.1% DMSO와 0.5 μ M STC 및 1.0 μ M STD 혹은 다른 시약을 첨가하여 반응시킨 세포를 수확하여 PBS 완충용액으로 세척한 후, 20 mM Tris (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 10 mM EDTA, 100 mM NaF, 1 mM PMSF 그리고 10 mg/ml leupeptin이 포함된 세포용해 완충용액을 첨가한 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 단백질을 추출하고, Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad Lab., Richmond, CA)를 사용하여 단백질 양을 측정한다. 다음 8% 또는 10% SDS-PAGE로 단백질을 분리하고, PVDF membrane (Amersham Life Science, Inc., Piscataway, NJ)에 분리된 단백질을 전사한 후, 5% skim milk가 첨가된 PBS-T로 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 측정하고자 하는 단백질에 대한 일차 항체로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시킨 다음 membrane을 PBS-T로 세 번 세척한 후, 이차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG나 anti-mouse IgG로 2시간 동안 상온에서 반응시키고, 역시 PBS-T로 세 번 세척한 다음 ECL detection kit (Amersham, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 현상하였다. 그리고 anti- β -actin antibody (Sigma, St Louis, MO, USA)를 internal control로 사용하였다.

면역형광염색(Immunofluorescence staining)

0.1% DMSO와 0.5 μ M STC 및 1.0 μ M STD를 첨가하여 반응시킨 세포를 수확하여 PBS 완충용액으로 세척한 후, 슬라이드 유리 위에 도말하고 PBS에 녹인 2% paraformaldehyde를 사용하여 고정하고, PBS 완충용액으로 3회 세척한 후, PBS에 녹인 0.1% Triton X-100을 사용하여 permeabilization한다. 다시 PBS 완충용액으로 3회 세척한 후, 일차 항체를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시키고, PBS 완충용액으로 3회 세척한 후, FITC 또는 PE-conjugated anti-rabbit IgG나 anti-mouse IgG로 1시간 동안 상온에서 반응시키고, PBS 완충용액으로 3회 세척하여 mount 용액을 떨어뜨린 후, 커버 유리로 덮어 Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany)를 사용하여 이미지를 얻었다[2].

면역결핍 생쥐에서 HL-60 세포의 종양 이종이식(xenograft)

In vivo 상에서 STC 및 STD의 항암 효과를 알아보기 위해 2×10^7 개의 HL-60 세포를 100 μ l의 PBS에 부유시켜 6~7주령의 면역결핍 생쥐의 오른쪽 옆구리에 피하 주사하였다[19]. 종양의 크기가 60~100 mm³ 정도 되었을 때, 대조군에는 PBS 완충용액을, 실험군에는 7.19 μ g/kg의 STC와 21.795 μ g/kg의 STD를 생쥐의 꼬리에 3일에 1번씩 주사하였으며, 종양의 크기는 측정 양각기(Caliper)를 사용하여 측정하였다. 일정 시간이

지난 후에 마우스의 종양을 떼어 무게를 측정하고, 구획을 나눠 냉동시키거나 파라핀으로 고정시켜 면역조직화학염색(Immunohistochemistry)을 시행하였다.

면역조직화학염색

파라핀으로 고정시킨 종양 조직을 얇게 썰어 슬라이드 유리 위에 고정시키고 탈 파라핀 과정을 거친 후, 종양 조직을 헤마톡실린과 에오신을 사용하여 염색하고[19] 일차 항체인 anti-ceramide antibody (1:10)를 상온에서 1시간 반응시킨 다음 이차 항체를 반응시키고 PBS 완충용액으로 세척한 다음 mount 용액을 떨어뜨려 커버 유리로 덮어 ScanScope (Aperio Technologies Inc., Park Center Dr. Vista, CA, USA)를 사용하여 이미지를 얻었다.

통계적 분석

데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 대조군 세포와 여러 가지 농도의 STC 및 STD를 처리한 세포 사이의 생존율에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 일원 배치 분산분석(ANOVA test)과 Student's t-test를 사용하여 분석하였다. $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

STD에 의한 백혈병 세포주의 세포 사멸 유도

만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포에 대한 STD의 세포 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 농도별 및 시간별로 STD를 첨가하여 배양시킨 후, annexin V/PI 염색법을 사용하여 세포 사멸 정도를 관찰하였다. STD는 K562 세포의 세포 사멸을 농도 및 시간 의존적으로 유도하였다(Fig. 1B와 1C). 이러한 STD의 세포 사멸 유도 효과가 K562 세포에만 국한되는지를 살펴보기 위하여 다른 백혈병 세포주인 HL-60 세포에 미치는 영향을 관찰한 결과 정도의 차이는 있으나 HL-60 세포에서도 역시 STD에 의한 세포사멸이 관찰되었다(Fig. 1B와 1C). 이러한 STD의 세포사멸 유도 효과를 비교하기 위하여 양성 대조군으로 STC를 사용하였다. Fig. 1B와 1C에서 보는 바와 같이 K562 세포와 HL-60 세포에서 STD의 세포사멸 유도 효과가 STC의 작용보다는 약하게 나타났고 STC와 비슷한 정도의 세포사멸은 약 2-5배 정도 높은 농도에서 관찰되었다(K562 세포인 경우 STC의 IC₅₀는 0.5 μ M, STD의 IC₅₀는 1 μ M; HL-60 세포인 경우 STC의 IC₅₀는 0.3 μ M, STD의 IC₅₀는 1.5 μ M 이었다).

STD에 의한 외인성 경로(extrinsic pathway)와 내인성 경로(intrinsic pathway)의 활성화

세포 사멸에 중요한 caspase를 활성화시키는 경로에는 세포 사멸 수용체(death receptor)의 활성화를 통한 외인성 경로

와 미토콘드리아 손상을 통한 내인성 경로가 존재 한다[5,7,8]. STD가 세포사멸을 유도하는 데 어떠한 경로를 경유하는지를 살펴보기 위하여 K562 세포에 0.5 μ M STC와 1.0 μ M STD를 각각 2, 4, 6시간 처리하고, Western blot을 이용하여 여러 가지 caspase들의 활성을 관찰하였다. 그 결과 STC와 STD 모두 시간 의존적으로 caspase-8, caspase-9, 및 caspase-3가 활성화되며, caspase-3의 기질인 PARP가 분해됨을 관찰하였다(Fig.

2A). 또한 caspase의 활성이 STD에 의한 세포 사멸에 중요한 역할을 하는지 확인하기 위하여 pan-caspase 저해제인 Z-VAD-FMK와 caspase-3 저해제인 Z-DEVD-FMK, caspase-8 저해제인 Z-IETD-FMK, 및 caspase-9 저해제인 Z-LEHD-FMK를 각각 50, 50, 25, 및 25 μ M 농도로 1시간 처리한 후, 0.5 μ M STC와 1.0 μ M STD를 처리하여 6시간 동안 배양하고 세포 사멸 정도를 확인한 결과 Z-VAD-FMK, Z-DEVD-FMK,

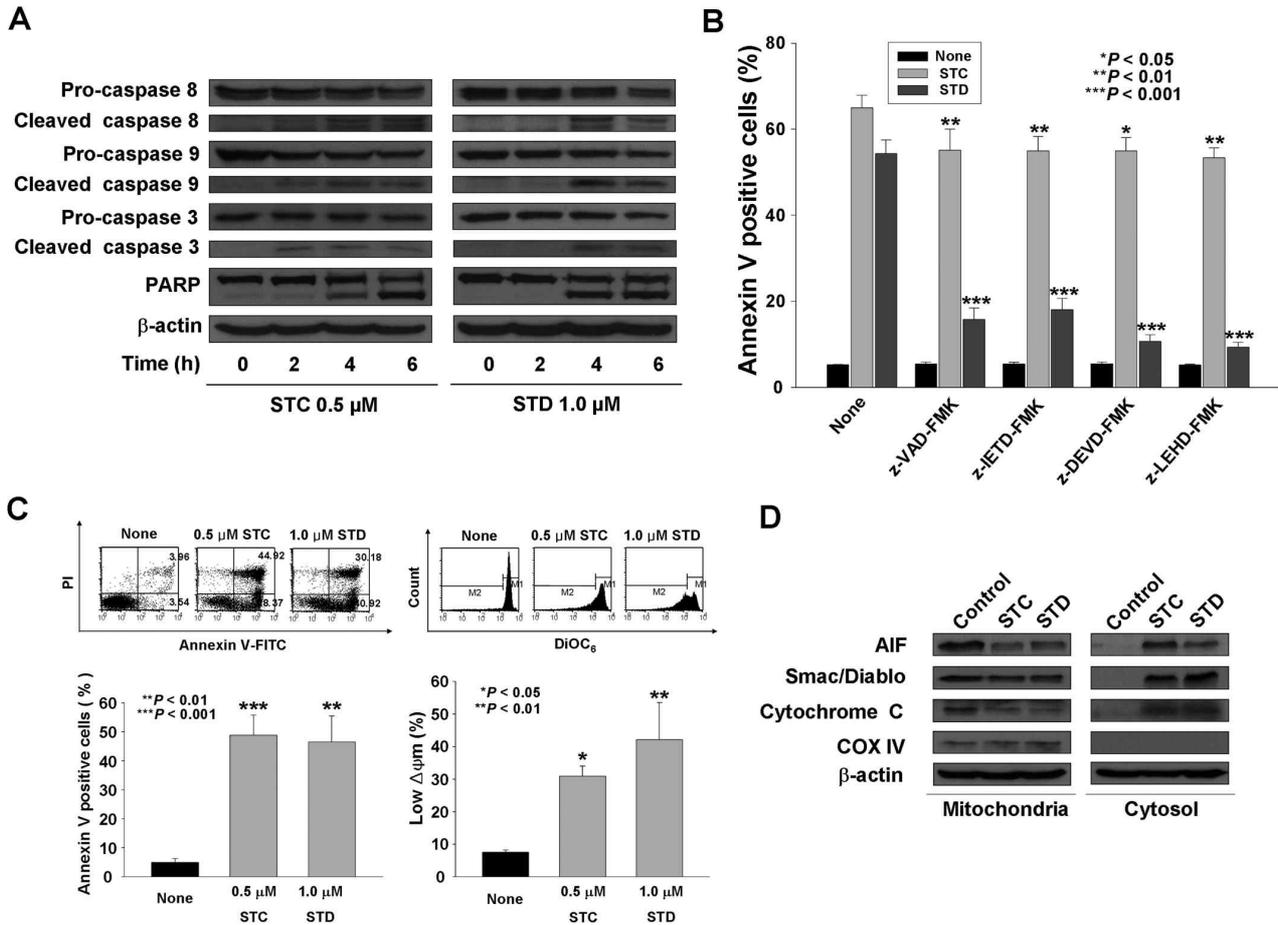


Fig. 2. Treatment of K562 cells with STD leads to activation of extrinsic and intrinsic pathways. (A) K562 cells were treated with 0.5 μ M STC or 1.0 μ M STD for indicated times. Protein lysates were prepared and subjected to Western blot analysis as described in "Materials and Methods" using corresponding antibodies. Equal protein loading was ensured by demonstrating uniform β -actin expression. The blot is representative of 3 separate experiments. (B) Functional involvement of caspases in STD-induced apoptosis of K562 cells. Cells were pretreated with Z-VAD-FMK (pan-caspase inhibitor; 50 μ M), Z-IETD-FMK (inhibitor of caspase-8; 25 μ M), Z-DEVD-FMK (inhibitor of caspase-3; 50 μ M), or Z-LEHD-FMK (inhibitor of caspase-9; 25 μ M) for 1 hr before treatment with 0.5 μ M STC or 1.0 μ M STD for 6 hr. The percentage of apoptosis was determined by flow cytometry after annexin V/PI staining. These data represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; vs. STC or STD-treated cells. (C) K562 cells were treated with 0.5 μ M STC or 1.0 μ M STD for 2 h. The cells were stained with DiOC₆, and reduction in $\Delta\psi_m$ was determined by monitoring the uptake of DiOC₆ using flow cytometry, as described in "Materials and Methods". Low $\Delta\psi_m$ values are expressed as the percentage of cells exhibiting a diminished mitochondrial potential. The values obtained from the DiOC₆ assays represent the mean \pm SD of 3 independent experiments. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; vs. STC or STD-treated cells. (D) Western blot for mitochondrial proteins (AIF, Smac/DIABLO, cytochrome oxidase IV, and cytochrome c). Protein lysates were prepared and subjected to Western blot analysis as described in "Materials and Methods" using corresponding antibodies. Equal protein loading was ensured by demonstrating uniform β -actin expression. The blot is representative of 3 separate experiments.

Z-IETD-FMK 및 Z-LEHD-FMK를 전 처리한 경우 STC와 STD에 의한 세포 사멸이 부분적으로 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 2B). 이러한 결과로부터 STC와 STD에 의한 세포 사멸이 부분적으로는 caspase 의존적으로 일어남을 알 수 있었다. 또한 STC와 STD에 의해 미토콘드리아 경로가 활성화되는지를 확인하기 위하여 MMP ($\Delta\psi_m$)를 측정하고 세포질과 미토콘드리아 분획을 분리하여 단백질 발현을 Western blot을 이용하여 확인하였다. 그 결과 STC와 STD에 의해 MMP가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 더욱이 STC와 비교하여 STD에 의한 MMP의 감소율이 더 높은 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C). 또한, MMP의 감소로 인해 미토콘드리아에서 세포질로 cytochrome c와 Smac/DIABLO 및 AIF가 방출됨을 관찰하였다(Fig. 2D). 이러한 결과로부터 STC와 STD에 의한 K562 세포의 세포 사멸은 미토콘드리아를 경유하는 내인성 경로와 세포 사멸 수용체의 활성화를 통한 외인성 경로를 통하여 일어남을 알 수 있었다.

STD의 세라미이드 합성효소의 활성에 의한 세라미이드 생성 이전의 연구 결과 STC에 의해 세라미이드가 형성되었고 이러한 세라미이드가 STC에 의한 세포사멸 유도에 중요하다는 것을 알 수 있었다[25]. 따라서 본 연구에서는 STC와 구조 유사체인 STD도 세라미이드를 생성하는지를 면역형광염색법으로 살펴보았다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 STD에 의해서도 STC에서처럼 세라미이드가 생성됨을 알 수 있었다. 이러한 STD에 의한 세라미이드 생성이 STD에 의한 세포 사멸에 중요한지와 STC에서처럼 산성 SMase의 활성화와 중성 SMase의 활성화에 의한 것인지를 확인하기 위하여 산성 SMase의 저해제인 desipramine과 중성 SMase의 저해제인 GW4869를 각각 STC와 STD를 처리하기 1시간 전에 첨가하여 배양하였다. STC에 의한 세포 사멸이 desipramine과 GW4869에 의해서 부분적으로 억제되는 것을 관찰하였으나, STD에 의한 세포 사멸은 desipramine과 GW4869에 의해서 억제되지 않음을 알 수 있었다(Fig. 3B, 3C). 이러한 결과를 바탕으로 STC와 STD에 의한 세라미이드의 생성이 산성 및 중성 SMase의 활성화에 의한 것인지를 관찰하기 위하여, 세라미이드 항체에는 FITC를 붙이고, 산성과 중성 SMase 항체에는 각각 PE를 붙여 면역형광염색법으로 확인해 보았다. 그 결과, STC에 의한 산성과 중성 SMase의 활성화를 육안으로 관찰할 수 있었고 또한 세라미이드의 생성도 확인할 수 있었다. 반면에 STD에 의해서는 산성과 중성 SMase 활성화는 관찰되지 않았으나 STC와 마찬가지로 세라미이드의 생성은 확인할 수 있었다(Fig. 3D, 3E). 이러한 결과로부터 STC에 의한 세라미이드 형성은 산성 및 중성 SMase의 활성화에 의해 일어나는 것이고, STD는 그렇지 않다는 것을 알 수 있었다.

또한, STD에 의한 세라미이드 형성이 STD에 의한 세포사멸에 중요한지와 세라미이드 합성효소의 활성에 의한 것인지를

관찰하기 위하여 세라미이드 합성효소 저해제인 fumonisins B1 (FB1)을 STC와 STD를 처리하기 1시간 전에 첨가하여 배양하였다. STC에 의한 세포사멸은 FB1에 의해서 저해되지 않았고 STD에 의한 세포사멸은 FB1에 의해서 부분적으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A, 4B). 그리고, STC에 의한 caspase-9, caspase-3와 caspase-8의 활성화는 FB1에 의해 억제되지 않았으며, STD에 의한 caspase-9와 caspase-3의 활성화는 FB1에 의해 억제되었고, caspase-8의 활성화는 부분적으로 억제되었다(Fig. 4B). 이러한 결과를 바탕으로 STC와 STD에 의한 세라미이드의 생성을 관찰하기 위하여, 세라미이드 항체에는 FITC를 붙이고, 산성과 중성 SMase 항체에는 각각 PE를 붙여 면역형광염색법으로 확인해 보았다. 그 결과, 앞서 확인한 바와 같이 STC에 의한 산성과 중성 SMase의 활성화를 관찰할 수 있었으나 예상한 바와 같이 FB1에 의해서는 이들 활성화에 변함이 없었다. 또한 세라미이드의 생성도 변화가 없었다(Fig. 4C, 4D). 반면에 STD에 의한 산성과 중성 SMase의 활성화는 관찰할 수 없었고, FB1에 의한 영향도 없었다. 그리고 세라미이드의 생성은 FB1에 의해 부분적으로 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4C, 4D). 이러한 결과로부터 STC에 의한 세라미이드의 생성은 산성과 중성 SMase의 활성화에 기인한 것이고 STD에 의한 세라미이드의 생성은 세라미이드 합성 효소의 활성화에 기인한 것임을 확인할 수 있었다. 또한 STC와 STD에 의해 세라미이드가 생성되는 분자적 기전은 다르지만 이들에 의한 세포사멸 유도에는 세라미이드의 생성이 중요하다는 것을 알 수 있었다.

*In vivo*에서 STD에 의한 세라미이드 생성과 항암 효과

*In vivo*에서 STD에 의한 항암 효과를 확인하기 위하여 면역결핍 생쥐에 HL-60 세포를 이종 이식하여 종양 모델을 만들었다. HL-60 세포를 면역결핍 생쥐의 옆구리 피하에 주사하여 종양을 만든 후 종양이 어느 정도 자랐을 때 STC와 STD를 면역결핍 생쥐의 꼬리에 3일 마다 주사하여 종양의 크기를 관찰하였다. STC 또는 STD를 주사하지 않은 대조군에서는 종양의 크기가 빨리 증가하였으나 STC 또는 STD를 주사한 실험군에서는 종양의 성장이 크게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5A). STD의 경우 STC 용량의 3배를 주입하였을 때 종양의 성장이 현저하게 억제되었고(Fig. 5A), STC와 동량의 STD를 주입했을 때는 종양의 성장 억제 효과가 나타나지 않았다(data not shown). 이러한 결과는 정도의 차이는 있지만 *in vitro*에서의 작용과 유사하였다. 따라서 *in vivo*에서도 STC의 항암작용이 STD보다 강하다는 것을 알 수 있었다. 또한 종양을 떼어 낸 후 얇게 썰어 조직을 헤마톡실린과 에오신으로 염색하여 관찰한 결과 종양세포가 있음을 확인할 수 있었으며 STC 또는 STD를 주사한 실험군의 종양인 경우 세포사멸이 일어난 부분을 관찰하였다(Fig. 5B). 그리고 이 종양 조직에서 면역조직화학염색법을 이용하여 세라미이드를 관

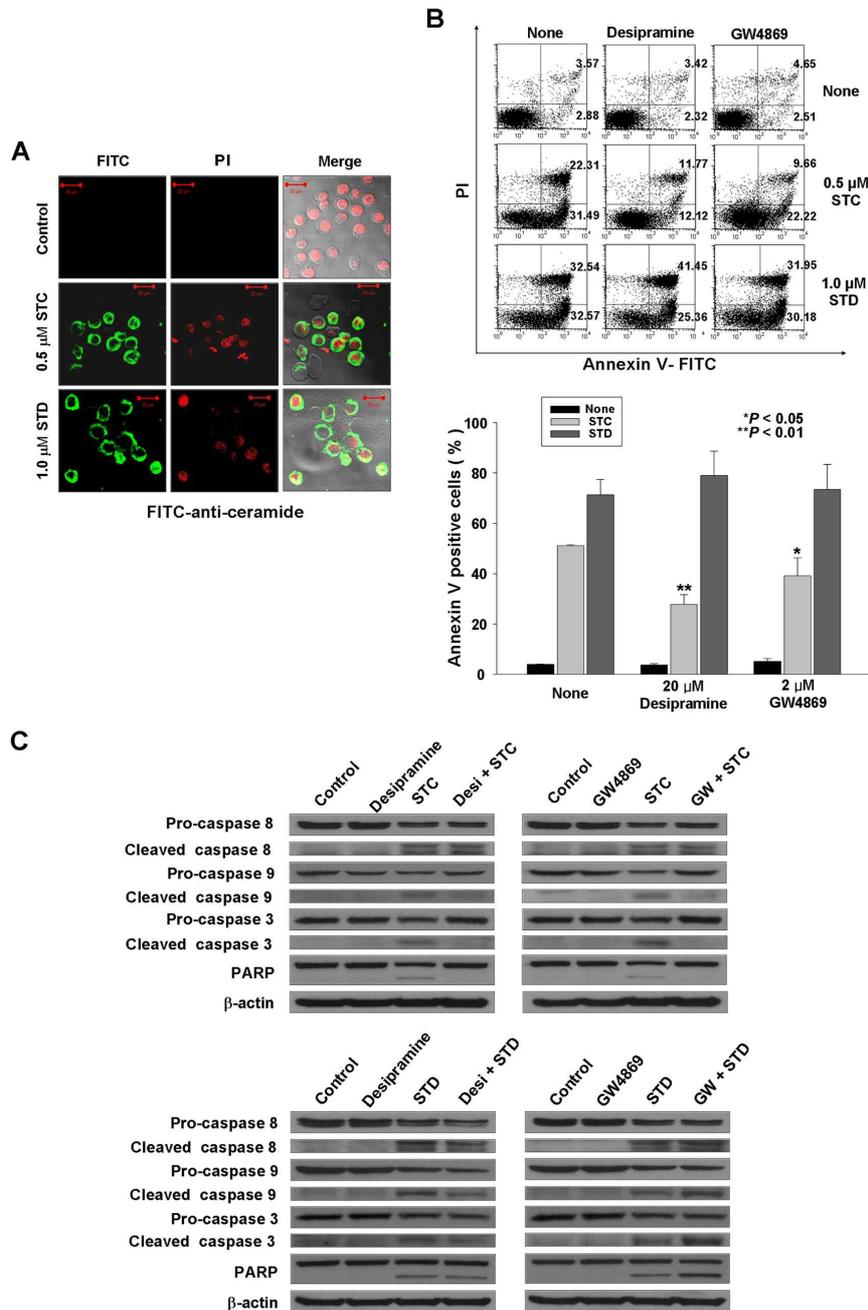


Fig. 3. Treatment of K562 cells with STC leads to generation of ceramide through the activation of acid SMase and neutral SMase. (A) K562 cells were treated with STC (0.5 μ M) or STD (1.0 μ M) for 2 hr and fixed. Following permeabilization, samples were stained with PI and FITC-anti-ceramide antibody. Confocal microscopy analysis indicated STC and STD induce accumulation of ceramide. The results are representative of five experiments. (B) K562 cells (1×10^5 cells/well) were incubated with STC (0.5 μ M), STD (1.0 μ M) in the presence or absence of desipramine or GW4869 for 6 hr. After treatment, the percentage of apoptotic cells was determined by annexin V-FITC/PI staining as described in the "Materials and Methods". The upper panel is representative of five experiments. The lower panel shows the mean \pm SD of 5 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; vs. STC-treated cells. (C) In parallel, whole cell lysates from K562 cells incubated with STC (0.5 μ M), STD (1.0 μ M) for 6 hr in the presence or absence of desipramine or GW4869 were prepared and analyzed by Western blot as described. In each case, 30 μ g of protein was separated by SDS-PAGE, after which blots were probed with the corresponding antibodies. Blots were subsequently stripped and re-probed with antibodies directed against β -actin to ensure equivalent loading and transfer. (D and E) In separate experiments, cells were fixed and permeabilized. Then, samples were stained with FITC-anti-ceramide and (D) PE-anti-acid SMase or (E) PE-anti-neutral SMase antibodies.

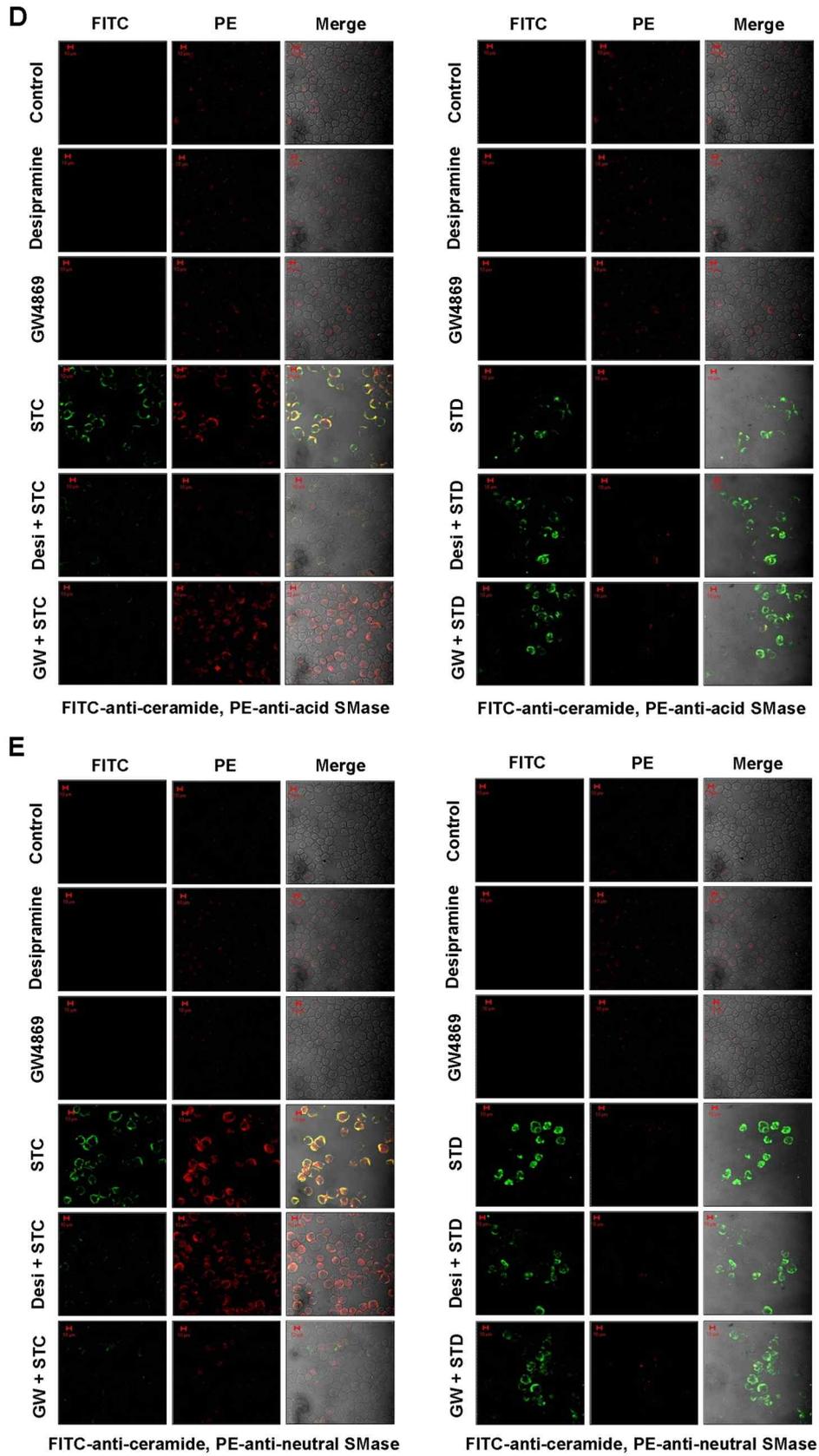


Fig. 3. Continued

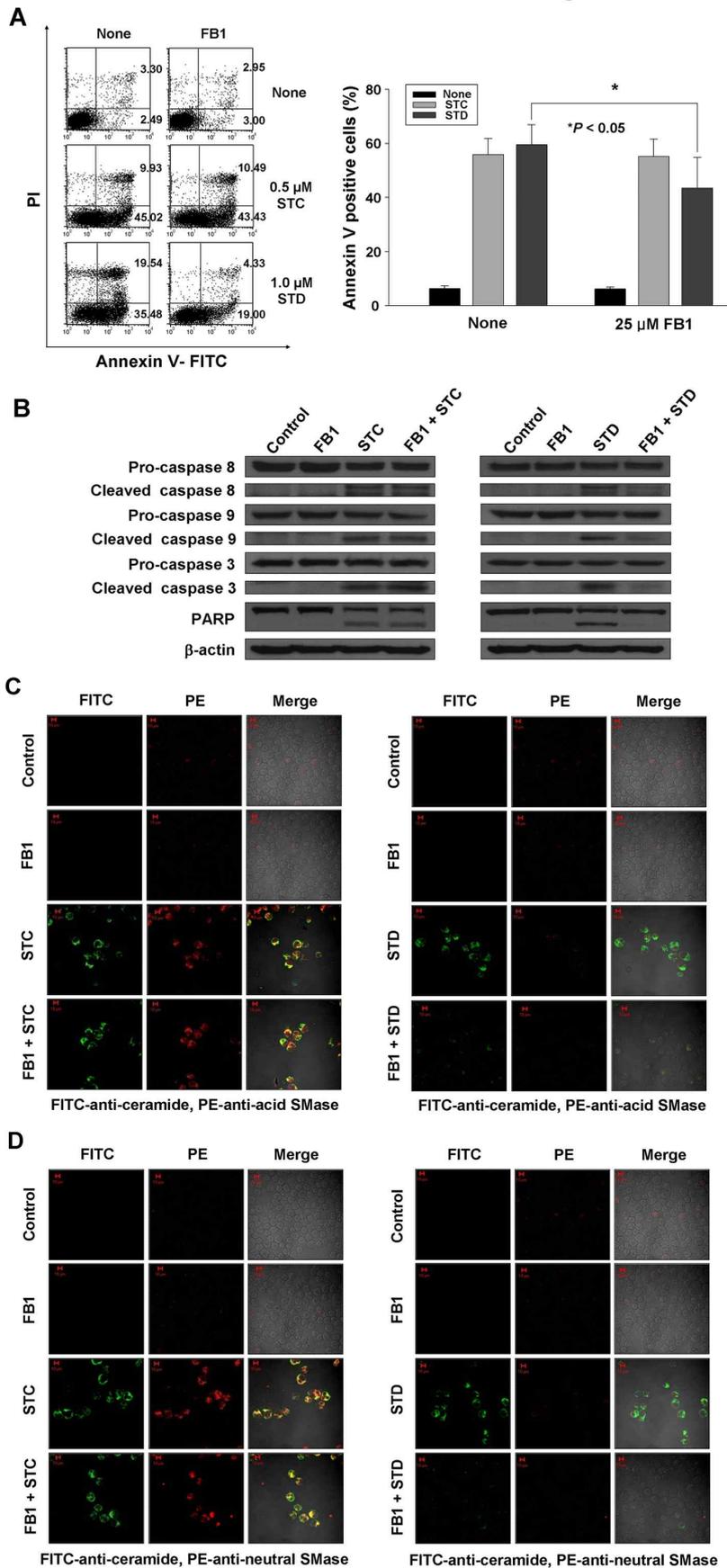


Fig. 4. Treatment of K562 cells with STD leads to generation of ceramide through the activation of ceramide synthase. (A) K562 cells (1×10^5 cells/well) were incubated with STC ($0.5 \mu\text{M}$), STD ($1.0 \mu\text{M}$) in the presence of Fumonisin B1 (FB1) for 6 hr. After treatment, the percentage of apoptotic cells was determined by annexin V-FITC/PI staining as described in the "Materials and Methods". The upper panel is representative of five experiments. The lower panel shows the mean \pm SD of 5 independent experiments. $^*P < 0.05$; vs. STD-treated cells. (B) In parallel, whole cell lysates from K562 cells incubated with STC ($0.5 \mu\text{M}$), STD ($1.0 \mu\text{M}$) in the presence of FB1 for 6 hr were prepared and analyzed by Western blot as described. In each case, $30 \mu\text{g}$ of protein was separated by SDS-PAGE, after which blots were probed with the corresponding antibodies. Blots were subsequently stripped and re-probed with antibodies directed against β -actin to ensure equivalent loading and transfer. (C and D) In separate experiments, cells were fixed and permeabilized. Then, samples were stained with FITC-anti-ceramide and (C) PE-anti-acid SMase or (D) PE-anti-neutral SMase antibodies.

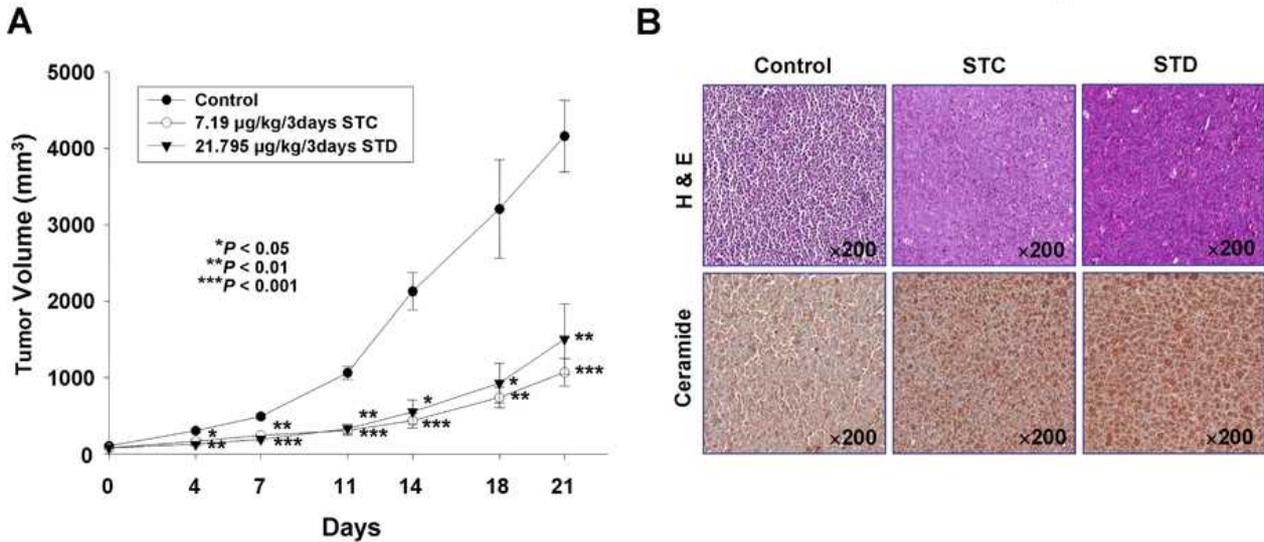


Fig. 5. STD inhibits the growth of HL-60 xenograft tumors and increases the production of ceramide *in vivo* (A) HL-60 cells (2×10^7 cells/100 μ l) were injected subcutaneously into the flank of Balb/c nude mice. After HL-60 cells formed palpable tumors, mice were randomized into 2 groups (n=5), and treatment was initiated. Mice were treated with vehicle control, STC (7.19 μ g/kg), or STD (21.795 μ g/kg) as described in the "Materials and Methods". Tumor size was measured daily with a caliper (calculated volume=shortest diameter² \times longest diameter/2). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, significantly different from respective control. (B) Upper panel: Hematoxylin-eosin staining. Stained sections were examined and photographed with a ScanScope (Aperio Technologies, Inc., USA). HL-60 leukemia xenografts from mice treated with STC or STD showed apoptosis and extensive necrosis with phagocytes ($\times 200$). Lower panel: Tumor tissues obtained from the above experiment on day 14 were subjected to immunohistochemistry using antibodies against ceramide. The sections were lightly counterstained with hematoxylin and photographed with a ScanScope. HL-60 xenograft tumors from mice treated with STC or STD showed a dramatic increase of ceramide ($\times 200$).

찰한 결과 STC 또는 STD를 주사하지 않은 대조군에서는 세라마이드가 약하게 염색된 반면 STC 또는 STD를 주사한 실험군에서는 세라마이드가 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 이러한 결과는 *in vitro*에서의 결과와 유사하였으며 STC와 STD에 의한 세라마이드 생성이 세포 사멸과 종양 억제에 있어 중요하다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

해양 천연물질은 암 치료제의 중요한 원료로 인지되어 왔으며 암의 예방과 치료에 있어 그 역할이 최근에 더욱 명백해지고 있다. 이전의 연구에서 *Stichoposide chloronotus*와 *Thelenota ananas*로부터 분리한 트리테르펜 글리코시드는 백혈병세포인 P388 세포의 성장을 억제한다는 것을 보여 주었다[16]. 또한 이전의 연구에서 *Thelenota anax*로부터 분리한 STC가 Fas 및 caspase-8 활성화에 의한 산성 SMase의 활성화와 glutathione 고갈에 의한 중성 SMase의 활성화를 통해 세라마이드를 형성하여 백혈병 세포의 세포사멸을 유도하며 HL-60 세포의 이중 이식 종양 모델에서도 항암작용을 나타낸다는 것을 알 수 있었다[25]. 따라서 본 연구에서는 STC와 구

조가 유사한 STD를 사용하여 백혈병 세포의 세포사멸 유도 및 이의 분자적 기전을 규명하여 STC와의 작용 및 기전과 비교하여 보다 효과적인 해양 트리테르펜 글리코시드의 구조적 특징을 살펴보고자 하였다. STC와 STD를 K562 세포에 처리하여 세포 사멸을 확인한 결과 시간과 농도 의존적으로 세포사멸이 일어남을 확인할 수 있었다. 그리고 다른 백혈병 세포주인 HL-60 세포에서도 STC와 STD에 의해 세포사멸이 유도된다는 것을 알 수 있었다. 또한 STC에 의한 세포사멸 유도에 Fas 활성화를 통한 외인성 경로와 미토콘드리아 손상을 통한 내인성 경로가 관련한다는 것을 알 수 있었고, STD 역시 외인성 경로와 미토콘드리아 손상을 통한 내인성 경로가 관련한다는 것을 확인하였다.

세라마이드는 여러 종류의 세포들에서 세포 사멸을 유도하는 중요한 이차전령으로 작용한다고 알려져 있고[14] 또한 STC에 의한 세포 사멸에도 세라마이드의 생성이 중요하다는 것을 이전 연구에서 관찰 하였다[25]. STC에 의한 세라마이드의 생성은 TNF- α 에 의한 세포사멸[3]과 유사하게 산성과 중성 SMase의 활성화에 의해 일어남을 알 수 있었다. 그러나 백혈병 세포주에서 STD에 의한 세포사멸 유도에 있어 세라마이드가 중요한지는 밝혀져 있지 않아 본 연구에서 살펴본 결과

STD에 의한 세포 사멸 유도에는 세라마이드의 생성이 중요하지만 생성 기전은 STC와는 다르다는 것을 알 수 있었다. 즉, 세라마이드 합성효소 저해제인 FBI를 전처리하여 STD에 의한 세라마이드의 생성과 세포 사멸이 부분적으로 억제된다는 것을 관찰함으로써 STD에 의한 세라마이드 생성은 세라마이드 합성효소의 활성화에 의해 일어나며 STD에 의한 세포 사멸에 중요하다는 것을 알 수 있었다. 그러나 STD에 의해 세라마이드 합성효소가 활성화되는 기전은 아직 알 수 없었고 향후 이에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

또한 STD에 의한 항암 효과를 *in vivo*에서 확인하기 위해 면역결핍 생쥐에 HL-60 세포를 이종 이식하여 종양을 만든 후 STC 또는 STD를 주사하여 종양 크기를 측정하였다. STC와 STD를 주사하지 않은 대조군에 비해 STC 또는 STD를 주사한 실험군에서는 종양의 성장이 크게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 STC 또는 STD를 주사한 실험군의 종양을 떼어 조직을 확인한 결과 세포사멸 및 염증세포의 침윤을 관찰할 수 있었고 세라마이드 역시 증가해 있음을 알 수 있었다(Fig. 5B). 이러한 *in vivo* 효과는 *in vitro*에서의 결과와 유사함을 알 수 있었고, 본 연구에 사용된 STC와 STD는 간독성을 비롯한 약물의 독성이 없는 안전한 약물임을 알 수 있었다(data not shown). 이러한 결과들로부터 해삼 독소로부터 추출한 STC와 STD는 세포사멸을 유도하는 정도와 분자적 기전은 다소 차이가 나지만 모두 백혈병의 치료물질로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 또한 STC와 STD의 분자 내에 있는 aglycone의 구조는 동일하나 여기에 결합하고 있는 당 사슬의 당이 다르므로 인해 이들 작용의 강도와 분자적 기전이 차이가 있다는 것을 알 수 있었다. 본 연구 결과 산성 SMase나 중성 SMase가 결핍된 백혈병 세포에는 STC 보다는 STD가 더 효율적인 항암제로 사용될 수 있을 것이며 세라마이드 합성효소가 결핍된 백혈병 세포에는 STC가 더 효과적인 항암제로 사용될 수 있을 가능성을 제시하였다. 향후 이들 작용의 차이에 대한 더 자세한 분자적 기전을 규명한다면 암세포에 존재하는 효소의 특성에 따라 보다 효과적인 항암제 개발에 필요한 정보를 제공할 수 있을 것이라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 선도연구센터 지원사업임(R13-2002-044-05002-0).

References

- Brown, D. A. and London, E. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**, 111-136.
- Charruyer, A., Grazide, S., Bezombes, C., Müller, S., Laurent, G. and Jaffre'zou, J. P. 2005. UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J. Biol. Chem.* **280**, 19196-19204.
- Dbaiibo, G. S., El-Assaad, W., Krikorian, A., Liu, B., Diab, K., Idriss, N. Z., El-Sabban, M., Driscoll, T. A., Perry, D. K. and Hannun, Y. A. 2001. Ceramide generation by two distinct pathways in tumor necrosis factor α -induced cell death. *FEBS Lett.* **503**, 7-12.
- Della Peruta, M., Martinelli, G., Moratti, E., Pintani, D., Vezzalini, M., Mafficini, A., Grafone, T., Iacobucci, I., Soverini, S., Murineddu, M., Vinante, F., Tecchio, C., Piras, G., Gabbas, A., Monne, M. and Sorio, C. 2010. Protein tyrosine phosphatase receptor type γ is a functional tumor suppressor gene specifically downregulated in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* **70**, 8896-8906.
- Fulda, S. and Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4798-4811.
- Goni, F. M. and Alonso, A. 2002. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* **531**, 38-46.
- Green, D. R. and Reed, J. C. 1976. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Green, D. R. and Kroemer, G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* **8**, 267-271.
- Gulbins, E. and Kolesnick, R. 2002. Acid sphingomyelinase-derived ceramide signaling in apoptosis. *Subcell. Biochem.* **36**, 229-244.
- Han, H., Shin, S. W., Seo, C. Y., Kwon, H. C., Han, J. Y., Kim, I. H., Kwak, J. Y. and Park, J. I. 2007. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) sensitizes human leukemic HL-60 cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through Akt downregulation. *Apoptosis* **12**, 2101-2114.
- Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. 2008. Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 139-150.
- Kolesnick, R. N., Goni, F. M. and Alonso, A. 2000. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J. Cell Physiol.* **184**, 285-300.
- Levade, T. and Jaffrezou, J. P. 1999. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim. Biophys. Acta* **1438**, 1-17.
- Ogretmen, B. and Hannun, Y. A. 2004. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 604-616.
- Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J. and Skorski, T. 2010. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J. Clin. Invest.* **120**, 2254-2264.
- Pettit, G. R., Herald, C. L. and Herald, D. L. 1976. Antineoplastic agents XLV: sea cucumber cytotoxic saponins. *J. Pharm. Sci.* **65**, 1558-1559.
- Saglio, G., Kim, D. W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R. E., Hochhaus, A., Hughes, T. P., Gallagher, N., Hoenekopp, A., Dong, M.,

- Haque, A., Larson, R. A., Kantarjian, H. M.; ENESTnd Investigators. 2010. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2251-2259.
18. Schiffer, C. A. 2007. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* **357**, 258-265.
19. Shin, S. W., Seo, C. Y., Han, H., Han, J. Y., Jeong, J. S., Kwak, J. Y. and Park, J. I. 2009. 15d-PGJ₂ induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in leukemia and colorectal cancer cells and shows *in vivo* antitumor activity. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5414-5425.
20. Stonik, V. A., Maltsev, I. I., Kalinovsky, A. I., Conde, K. and Elyakov, G. B. 1982. Glycosides of marine-invertebrates. XI. The two novel triterpene glycosides from holothurian of Stichopodidae family. *Chem Nat. Prod.* 194-199.
21. Stonik, V. A. 1986. Some terpenoid and steroid derivatives from echinoderms and sponges. *Pure Appl. Chem.* **58**, 423-436.
22. Stonik, V. A., Kalinin, V. I. and Avilov, S. A. 1999. Toxins from sea cucumbers (holothuroids): Chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. *J. Nat. Toxins* **8**, 235-248.
23. Strum, J. C., Ghosh, S. and Bell, R. M. 1997. Lipid second messengers. A role in cell growth regulation and cell cycle regulation. *Adv. Exp. Mol. Biol.* **407**, 421-431.
24. Taha, T. A., Mullen, T. D. and Obeid, L. M. 2006. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys. Acta* **1758**, 2027-2036.
25. Yun, S. H. 2010. Clarification of molecular mechanism for stichoposide C (STC)-induced apoptosis of human leukemia cells. MS. Thesis, Dong-A University, Busan, Korea.

초록 : Stichoposide D의 백혈병 세포주에서 세라마이드 생성을 통한 세포 사멸 유도 및 항암 작용

박은선 · 윤성훈 · 신성원 · 곽종영 · 박주인*
(동아대학교 의과대학 생화학교실)

해양 트리테르펜 글리코시드(marine triterpene glycosides)는 해삼(Holothurians)으로부터 분리된 천연물질로서 항 진균작용, 항암작용 및 용혈 작용 등 여러 가지 생물학적 활성들을 가지고 있다고 보고되었다. 또한 이전의 연구 결과 *Thelenota anax*로부터 분리한 stichoposide C (STC)는 산성 스펅고마이엘리나제와 중성 스펅고마이엘리나제의 활성화에 의한 세라마이드의 생성을 통하여 백혈병 세포주에서 세포사멸을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 STC와 구조 유사체인 STD가 백혈병 세포에서 세포사멸을 유도하는지와 이에 대한 분자적 기전을 살펴보았다. STC와 STD는 K562 세포와 HL-60 세포에서 농도와 시간 의존적으로 세포 사멸을 일으키고 이러한 세포 사멸은 caspase-8의 활성화, 미토콘드리아 손상, caspase-9의 활성화, 그리고 caspase-3의 활성화에 의해 유도된다. 이러한 결과는 STC와 STD가 외인성 경로와 내인성 경로의 활성화를 통해 세포 사멸을 유도함을 시사한다. 그리고 STC는 산성 SMase와 중성 SMase를 활성화시키고 이 결과로 세라마이드를 생성시킨다. 산성과 중성 SMase의 특이적인 저해제를 이용하여 STC에 의한 세포 사멸이 부분적으로 억제됨을 알 수 있었다. 반면에, STD는 세라마이드 합성 효소의 활성화에 의해서 세라마이드를 생성시킨다. 세라마이드 합성 효소 저해제를 이용하여 STD에 의한 세포 사멸이 부분적으로 억제되는 것을 확인하였다. 더욱이 STC와 STD는 HL-60 세포의 이중 이식 종양 모델에서 종양의 성장을 현저하게 억제하였고 세라마이드의 생성도 증가시켰다. 이러한 결과는 STC와 STD가 aglycone에 부착된 당이 다르므로 서로 다른 경로를 통해 세포 사멸과 항암 활성을 유도한다는 것을 암시하였다. 따라서 이러한 결과는 이들의 작용은 aglycone에 부착된 당에 의해 영향을 받을 수 있고 이들은 향후 백혈병의 치료제로 사용될 수 있다는 것을 제시하였다.