

HL-60 Leukemia 세포주에서 초음파에 의한 세포자멸사 유도

계명대학교 의과대학 미생물학교실

최문영·서인철·서성일·서민호·백원기

Sonication Induces Apoptosis in HL-60 Cells

Moonyoung Choi, Incheol Seo, M.D., Seong Il Suh, M.D., Min Ho Suh, M.D.,
Won Ki Baek, M.D.

*Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine,
Daegu, Korea*

Abstract

To investigate a specific mechanism of apoptosis induced by sonication, we applied 20 kHz ultrasound to leukemia cell line HL-60 with different intensities (0-60 W/cm²) and time durations (0-100 sec). In accordance with previous reports, ultrasound treatment in HL-60 cells induced immediate cell death and delayed cell death which are associated with cell lysis and apoptosis, respectively. Delayed cell death of HL-60 was also detected 5 hours after sonication in our experiment. Detection of caspase activation by Western blot and sub-G1 accumulation by flow cytometry confirmed that apoptosis plays a role in delayed cell death induced by sonication in HL-60 cells. In addition, we found that decrease in lysosomes of HL-60 cells after sonication suggesting lysosomal rupture is involved in the mechanism of cell death induced by sonication.

Key Words : Apoptosis, Leukemia, Lysosome, Sonication, Ultrasonic therapy

서론

초음파(ultrasound)는 1960년대 의료용으로 도입된 이래로 간, 심장, 연조직 등의 질환의 진단에 광범위하게 사용되고 있다[1-4]. 특히 비침습적인 검사법이므로 합병증 발생이 거의 없으며, 엑스선이나 컴퓨터단층촬영 영과 달리 방사선 피폭으로부터 자유롭기 때문에 초음파는 간질환, 심장기형 및 태아 산전 진단 등에서 최선의 도구로 자리 잡고 있다[5-7]. 최근에는 초음파의 물리적 특성을 고형암 및 혈액암의 치료에 이용하고자 하는 연구가 시도되고 있다[8-15]. 최근 보고에 따르면 초음파는 간암, 유방암, 신경계암 및 혈액암세포의 사멸을 유도할 수 있는 것으로 알려졌다[16,17]. 초음파는 20 kHz 이상의 주파수를 가진 음파로서, 음파의 1초당 진동 횟수를 의미하는 주파수(frequency)와 음파가 단위면적당 가하는 힘의 크기인 강도(intensity)로 그 속성이 결정되는데, 이 주파수와 강도는 자유롭게 조절이 가능하기 때문에 사용 목적에 가장 적합한 초음파를 발생시켜 사용할 수 있다[18]. 현재 진단용으로는 2-18 MHz의 높은 주파수와 낮은 강도를 가진 초음파가 사용되고 있는 반면[18], 치료목적으로는 비교적 낮은 20-1,500 kHz 주파수와 강한 강도를 가진 초음파가 연구에 이용되고 있다[10,13,19].

초음파 처리에 의한 암세포의 사멸기전은 두 가지로 보고되었는데, 첫째는 초음파 노출 직후 일어나는 즉각 암세포 사멸(immediate cell death)이며 둘째는 초음파 노출 몇 시간 후부터 발생하는 지연된 암세포 사멸(delayed cell death)이다. 즉각 암세포 사멸은 초음파의 물리적 힘에 의해 세포막이 파괴되어 세포용해 (cell lysis)가 일어나기 때문인 것으로 알려져 있다[11,19]. 초음파 처리에 의한 지연된 암세포 사멸에서는 세포자멸사(apoptosis), 세포괴사(necrosis), 자식작용(autophagy) 등의 현상이 나타나는 것으로 보고되었다[11,14,20]. 그러나 초음파 처리에 의한 지연된 암세포 사멸에서 세포자멸사, 세포괴사, 자식작용 등의 현상이 유도되는 기전은 구체적으로 알려져 있지 않다.

이 연구는 초음파 처리에 의해 유도되는 지연된

암세포 사멸에서 세포자멸사의 유도기전을 밝히기 위해 진행되었다.

재료 및 방법

1. 세포배양

인간 백혈병 세포인 HL-60는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. 세포 배양을 위하여 Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI1640, WelGENE, Daegu, Korea)에 10% fetal bovine serum (WelGENE, Daegu, Korea)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 배지로 사용하였으며, 습식배양기에서 조건을 5% CO₂, 37℃로 설정하여 배양하였다[21]. 배양한 HL-60를 원심분리하여 세포만을 회수한 후에 1.0×10^6 /mL의 밀도로 인산완충식염수(PBS, pH 7.4) 1 mL에 부유시켜 1.5 mL Eppendorf 시험관(E-tube, Eppendorf, Hamburg, Germany)에 옮겨 담은 후, 실험 조건에 따라 초음파 처리를 하였다. 초음파 처리 후 지연된 세포의 반응을 관찰할 때에는, PBS 대신 새 배지 1 mL에 HL-60를 부유시킨 상태로 초음파를 처리하였고, 초음파 처리가 끝난 HL-60 세포를 배지를 교환하지 않고 35 Φ 배양접시로 옮겨서 이전과 동일한 배양 조건에 5시간 동안 더 배양한 후 분석에 사용하였다.

2. 초음파발생 및 초음파처리

Sonic dismembrator model 300 (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 초음파발생에 이용하였다. 초음파의 주파수는 암세포 사멸효과를 일으키는 것으로 보고된 주파수 영역에 속하는 20 kHz로 고정하였다. 초음파 강도는 암세포 사멸효과를 일으키는 것으로 보고된 0-60 W/cm²사이에서 실험 조건에 따라 다르게 조절하였다. 초음파 처리의 강도와 처리시간을 제외한 다른 모든 조건을 동일하게 통제하기 위하여, 세포가 담긴 E-tube 아랫부분에

직접 제작한 고정기구를 두어 초음파 발생기의 끝부분이 항상 E-tube의 중앙에 동일한 깊이로 위치하도록 하였고 초음파 발생과정에서 생길 수 있는 발열을 방지하였다.

3. 생존 세포 수 계산

생존 세포 수 계산에는 트리판 블루 색소 배제법을 이용하였다[21]. E-tube 혹은 배양접시로부터 세포를 회수한 후, 2% 트리판 블루로 염색하였다. 생존 세포 계수는 혈구계산기를 이용하였으며, 트리판 블루에 염색되지 않은 세포만을 생존 세포로 계수하였다. 동일한 방법으로 같은 조건의 개별 실험을 3회 실시하여 그 값들의 평균값과 표준편차를 얻어내었다.

4. 세포 외 유출 단백질 정량

초음파 처리된 HL-60 세포를 PBS 1 mL에 부유된 상태로 원심분리(12,000 rpm, 15분)한 후, 세포 침전물은 제거하고 세포용해로 인해 세포 외부로 유출된 단백질이 포함된 상층액을 회수하였다. Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분광광도계로 흡광도를 측정해 초음파 처리에 따른 즉각적인 세포용해의 간접 지표로서 활용하였다.

5. 단백질 발현 분석

초음파 처리된 HL-60 세포를 원심분리기(4,000 rpm, 5분)를 이용하여 회수한 후, PBS로 1회 재부유하여 다시 동일한 조건에서 원심분리하여 세포만을 회수하였다. 여기에 세포용해완충액, 단백질분해효소 억제제 및 인산가수분해효소 억제제 혼합액(20 mM Tris-Cl, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 2 mM EDTA, 200 nM aprotinin, 20 μM leupeptin, 50 mM phenanthroline, 280 mM benzamidin-HCL)을 첨가하였다. 얼음 위에서 15분간 반응시킨 후, 원심분리(12,000 rpm, 15분)하여 침전물을 제외한 상층액만을 회수하였다. 단백질 정량 키트인 Bio-Rad

protein assay kit를 이용하여 분광광도계로 단백질의 흡광도를 측정한 후, 이 값을 이용하여 40 μg 의 단백질을 정량하고 sodium dodecyl sulfate polyarrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분석하였다. 이 후 nitrocellulose paper (Millipore, Bedford, MA, USA)로 단백질이동(protein transfer)을 시행하고 5% skim milk가 함유된 Tris-buffered saline + Tween 20 (TBS-T)에 2시간 동안 두었다. 이 후 4°C에서 18시간 동안 procaspase-3 일차단백항체(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)와 반응시킨 후 TBS-T로 4차례 세척하였고, 이차항체와 2시간 이상 반응시켜 enhanced chemiluminescence kit (Pierce technology, Rockford, IL, USA)를 이용하여 형광감광반응을 통해 procaspase-3 단백질의 발현을 확인하였다[21].

6. 세포주기분석

초음파 처리 후 배양한 HL-60 세포를 E-tube에 옮긴 후, 원심분리(4,000 rpm, 5분)하여 상층액은 제거하고 바닥에 가라앉은 세포만을 회수하였다. 세포를 PBS로 1회 세척한 후, 동일한 조건으로 다시 원심분리하고 바닥에 가라앉은 세포만을 300 μL PBS로 재부유하여 700 μL 에탄올을 한 방울씩 떨어뜨려서 4°C에서 5분 동안 세포를 고정하였다. 다시 동일한 조건으로 원심분리를 시행하여 세포만을 회수한 후, PBS로 세척하는 과정을 2회 반복하고 상층액을 제거하여 PI용액(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide, 0.1 mg/mL RNase A, 0.1% NP40, 0.1% triodium citrate) 1 mL에 재부유하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다[21]. 1시간 뒤 FACSCanto II 유세포분석기(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 HL-60의 세포주기분석을 시행하였다.

7. 용해소체 관찰

HL-60에 20 kHz 초음파를 45 W/cm^2 강도로 처리하고 5시간 동안 배양한 후, acridine orange (AO)를 최종 농도 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가하여 15분 동안

HL-60 세포를 염색하였다. 염색된 세포는 바닥이 유리로 된 96 well 배양 접시 P96-1.5-N (*In Vitro* Scientific, CA, USA)으로 옮긴 후, 수은등이 부착된 HBO 100 W 전원공급장치(Nikon, Tokyo, Japan)와 도립현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 니콘 D7 (Nikon, Tokyo, Japan)으로 형광 사진을 촬영하였다. 형광 사진은 96 well 배양 접시에서 각 well의 중앙에서 획득하였으며, 각 군당 2장 이상의 사진을 개별적인 실험으로부터 얻어서 결과 분석에 사용하였다. 얻어진 사진은 ImageJ 소프트웨어(NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용해 용해소체 내부에 고농도로 축적되어 주황색 빛을 내는 AO와 세포질 및 핵에 염색되어 녹색 빛을 내는 AO의 비율을 분석한 값을 얻었다. 같은 실험을 반복하여 이 비율의 평균과 표준편차를 구해 막대도표로 나타내었다.

8. 통계 분석

통계분석에는 Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)이 사용되었다. 초음파 처리 조건에 따른 HL-60의 생존의 차이에 대한 비교는 양측 Student's *t*-test를 적용하여 분석하였고, *p*값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 정의했다.

성적

1. 초음파에 의한 즉각 암세포 사멸

인간 백혈병 세포주인 HL-60을 처리시간을 다르게 하여 45 W/cm² 강도의 초음파로 처리하였다. 초음파 처리 후 즉시 트리판 블루로 염색하여 현미경을 통해 생존 세포 수를 산정하였으며, 초음파 처리 직후 즉각적인 세포 사멸이 일어나는 것을 관찰하였다(Fig. 1A). 초음파에 더 오래 노출시킨 군일수록 더 많은 수의 세포가 사멸하여, 같은 강도의 초음파에서도 노출시간에 따라 세포 사멸이 증가하는 것으로 나타났다.

초음파에 의한 즉각 암세포 사멸의 지표로 초음파

처리에 의해 세포질로부터 세포외부로 유리되는 단백질의 양을 측정했다. HL-60를 60 W/cm² 강도의 초음파로 시간별로 처리한 직후 HL-60로부터 용해되어 나온 단백질의 흡광도를 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 분광광도계로 측정했을 때, 초음파 처리 시간의 증가에 따라 PBS의 단백질 흡광도가 증가 하였다(Fig. 1B).

2. 초음파에 의한 지연된 암세포 사멸

HL-60를 처리 시간을 다르게 하여 60 W/cm² 강도의 초음파로 처리하고, 5시간 동안 다시 배양기에 두었다. 5시간 후 트리판 블루 색소 배제법을 이용해 생존한 HL-60 세포 수를 측정하였을 때, 초음파 처리시간이 증가할수록 생존 HL-60 세포 수가 감소하기 때문에 지연된 암세포 사멸이 초음파 처리시간에 의존적으로 발생함을 확인하였다(Fig. 2A).

HL-60를 초음파 강도에 따라 30초 동안 처리하고 다시 5시간 동안 배양기에 두었다. 5시간 후 생존한 세포 수를 트리판 블루를 이용하여 측정하였을 때, 더 높은 강도의 초음파로 처리할수록 생존한 HL-60 세포의 수가 감소하는 결과가 나타나 지연된 암세포 사멸이 초음파 강도에 의존적으로 나타남을 확인하였다 (Fig. 2B). 또한, 45 W/cm² 이상의 강도로 초음파를 처리한 군의 생존세포 수가 대조군에 비하여 15% 미만으로 관찰되어, 급격한 감소 양상을 확인하였다.

3. 세포자멸사 유도

HL-60 세포에서 초음파에 의해 유도된 지연된 암세포 사멸에 세포자멸사가 관여하는지를 확인하기 위하여 유세포분석을 시행하고 caspase의 활성화를 Western Blot으로 확인하였다. 먼저, HL-60 세포를 60 W/cm² 강도 초음파로 80초 동안 처리하여 5시간 동안 더 배양한 후에 형광현미경을 통해 관찰한 결과, 세포자멸체가 생성되는 것을 확인하였다(Fig. 3A).

HL-60 세포를 45 W/cm² 강도로 시간별로 처리한 후 5시간 동안 더 배양한 뒤에 유세포분석기로 세포주기를 분석했을 때, 초음파처리에 의해 HL-60의

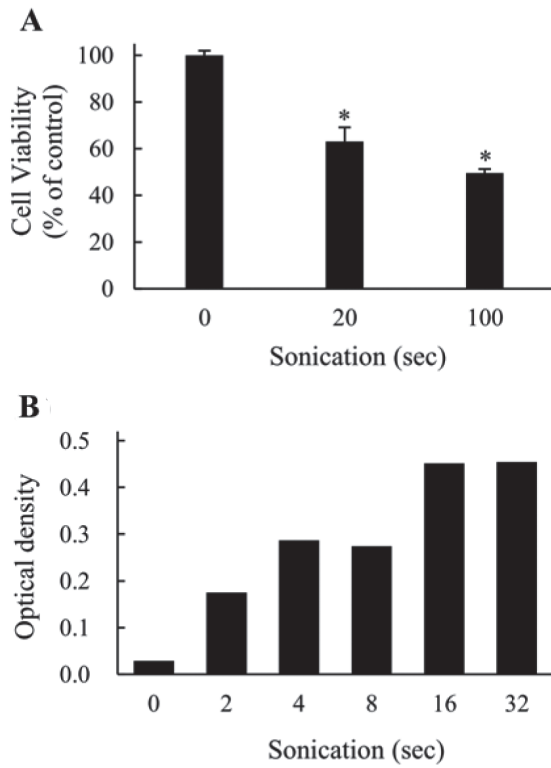


Fig. 1. Immediate cell death induced by sonication. HL-60 cells were sonicated with different time durations. A: Immediate cell viability assay with trypan blue dye exclusion test was done soon after sonication. Bar diagram shows the percentage of average numbers of surviving cells in each group to that of control group. Error bar represents standard deviation from the mean. B: Optical densities of extracellular proteins released from cytoplasm by sonication. * $p < 0.001$.

세포주기가 sub-G1에 축적되는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). 초음파를 더 오래 처리한 군 일수록 더 많은 HL-60의 세포주기가 sub-G1에 축적되었다. 초음파를 80초 이상 처리한 군에서는 전체의 40% 세포가 sub-G1 세포주기에 축적되는 것이 관찰되었다.

지연된 암세포사멸에서 세포자멸사가 나타나는 것을 재확인하기 위해 Western Blot을 시행하여 초음파 처리에 의한 caspase-3의 활성화를 확인하였다. 먼저 HL-60를 처리 강도에 따라 30초 동안 각각 처리한 후 5시간 동안 더 배양한 뒤 세포 내

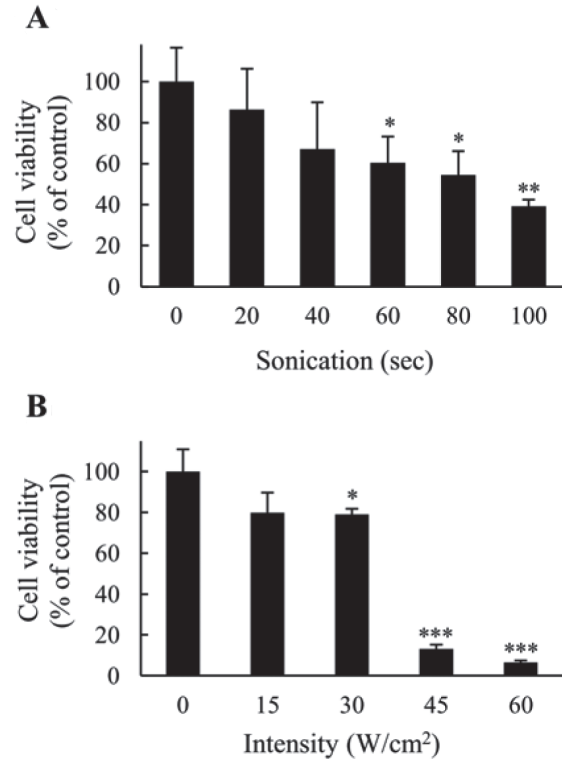


Fig. 2. Delayed cell death induced by sonication. Cells were exposed to 20 kHz ultrasound and incubated for 5 hours. And surviving cells were manually counted by microscopy with trypan blue dye exclusion test. Bar graph shows a ratio of average numbers of surviving cells in each group to that of control group. Error bar represents standard deviation from the mean. A: Viable cell count was done 5 hours after 60 W/cm² sonication with different time durations. B: Viable cell count was done 5 hours after sonication for 30 seconds with different intensities. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

단백질을 회수하여 procaspase-3의 발현을 확인하였을 때, 초음파 처리에 의하여 procaspase-3의 발현양이 감소하는 양상으로 보아 procaspase-3로부터 활성형인 caspase-3로의 전환이 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. 더 높은 강도의 초음파를 처리한 군일수록 procaspase-3의 발현양이 더 많이 감소하여서 caspase-3 활성화가 더 많이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 3C). 특히 45 W/cm²

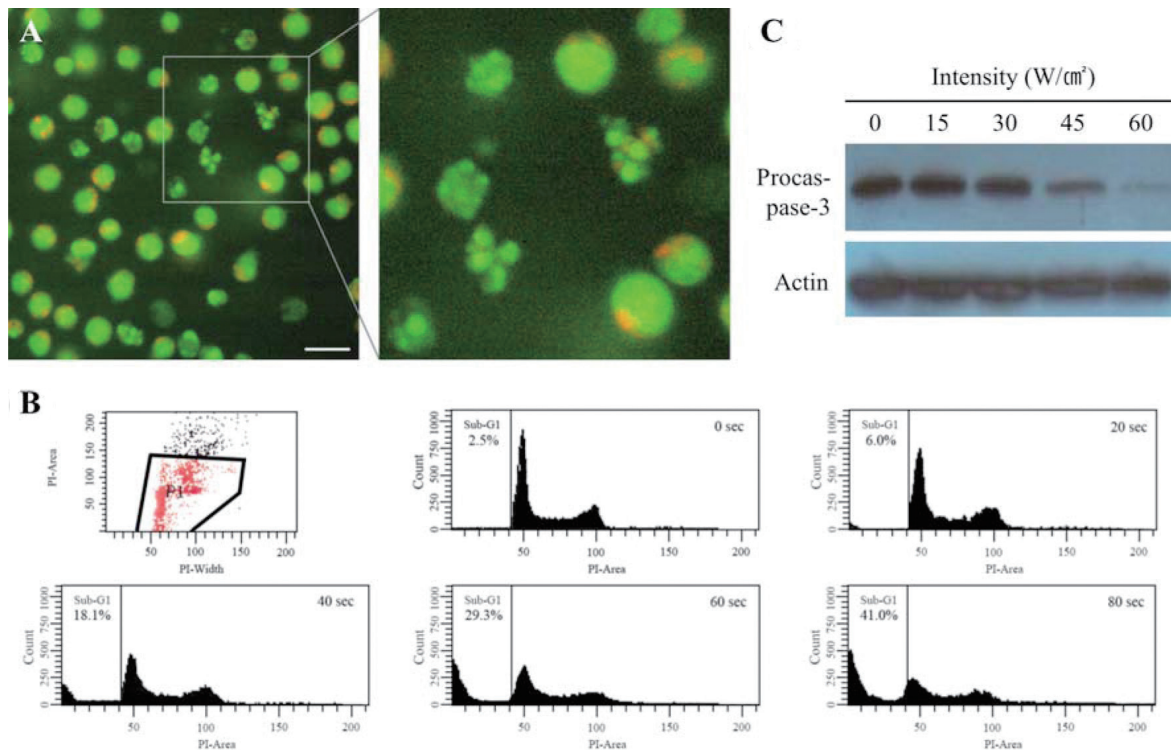


Fig. 3. Apoptosis induced by sonication. Cells were exposed to 20 kHz ultrasound and incubated for 5 hours. A: Apoptotic bodies are observed by fluorescence microscopy with acridine orange. Scale bar = 20 μ m B: Sub-G1 accumulation is detected by flow cytometry. C: Decrease in procaspase-3 (caspase activation) is observed.

이상의 강도로 초음파를 처리한 세포에서 procaspase-3의 양이 현저히 감소하는 결과를 관찰하였다.

4. 용해소체의 감소

HL-60에 60 W/cm² 강도의 초음파를 시간별로 처리한 후 5시간 동안 더 배양한 뒤, AO로 염색하여 세포의 형태와 용해소체의 형태, 용해소체의 양을 형광현미경으로 관찰하였다. 초음파 처리시간에 따른 세포 수의 변화를 관찰한 결과, 초음파를 더 오래 처리한 군일수록 초음파 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 세포의 절대 수가 감소하는 것이 관찰되었으며 (Fig. 4A), 이것은 트리판 블루 색소 배제법을 통한 생존 세포 수 산정 결과와 동일한 양상이었다 (Fig. 2A). 또 사진을 ImageJ를 통해 정량적으로 분석했을 때, 용해소체 내에 고농도로 축적되어 주황색을 띠는

AO가 대조군에 비해 초음파를 처리한 실험군에서 감소하였고 초음파를 오래 처리할수록 용해소체가 더 많이 감소하는 것이 확인되었다 (Fig. 4A). 초음파 처리로 인해 세포의 절대 숫자가 감소한 것이 주황색의 AO 빛의 총량 감소에 미치는 영향을 배제하기 위하여, 형광 사진으로부터 얻어진 개별 사진의 전체 주황색 영역을 전체 녹색의 영역으로 나누어서 초음파 처리에 따른 세포 수 감소를 표준화 하였다. 절대 세포 수의 감소를 배제한 이후에도 주황색을 나타내는 용해소체의 영역이 초음파 처리에 의해서, 처리 시간에 의존적으로 감소하고 있음을 관찰하였다 (Fig. 4B).

고 찰

초음파는 비침습적인 진단 기법이며, 다른 영상

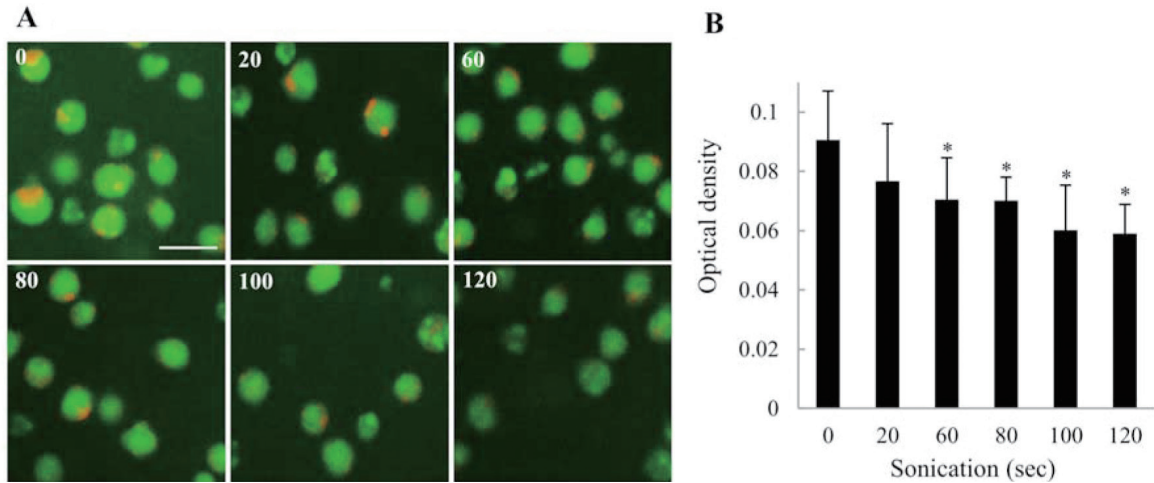


Fig. 4. Lysosomal rupture by sonication. HL-60 cells were exposed to 20 kHz, 60 W/cm² ultrasound and lysosomal ruptures were observed by fluorescence microscope 5 hours after sonication. A: HL-60 cells were stained with acridine orange. The green color represents the cytoplasm and nucleus of HL-60 and the red color represents lysosomes. Number in figure represents sonication duration (sec). Scale bar = 25 μ m. B: The ratio of red color to green color was calculated by ImageJ and the results show that the lysosomes were decreased as the sonication duration increased. Error bar represents standard deviation from the mean. * $p < 0.01$.

진단 기법에서는 얻기 어려운 동적 영상의 획득이 가능하다는 등의 장점 때문에 의료진단 분야에 유용하게 쓰이고 있는 도구이다. 최근에는 비침습적이라는 초음파의 장점을 암 치료에 이용하려는 연구가 이루어지고 있다[8-15]. 연구에 따르면 20-1,500 kHz 주파수의 초음파 처리는 암세포의 사멸을 유발할 수 있으며, 이 세포사멸은 초음파 처리 후 즉각적으로 일어나는 세포사멸과 초음파 처리 몇 시간 후에 일어나는 지연된 세포사멸로 구분된다고 알려져 있다[11]. 그러나 초음파 처리로 인한 지연된 세포사멸의 기전은 구체적으로 밝혀지지 않았다.

초음파를 암세포에 처리하였을 때 유도되는 즉각적인 세포사멸은 초음파의 물리적 충격으로 인한 인지질 이중막인 세포막의 손상 때문에 세포용해가 일어나는 것으로 알려져 있다[11,19]. 이러한 초음파에 의한 즉각적인 세포용해 현상은 실험실 및 검사실에서 세포 내부의 단백질을 추출하는 작업에 활용되고 있다[22]. 이 연구에서는 즉각적인 세포사멸의 기전인 세포용해에서 세포 외부로 유출되는 단백질의 양이

증가될 것으로 예상하고, 초음파 처리 직후 세포 부유액의 단백질 흡광도를 측정하였다. 그 결과 초음파 처리에 따른 단백질의 세포 외 유출이 있음을 확인하고, 세포 부유액의 단백질 흡광도가 초음파 처리시간에 비례하여 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 세포막의 파열이 초음파 처리 시간에 비례하여 일어남을 확인하였고, 이 결과는 초음파 처리 직후의 트리판 블루 색소 배제법을 이용해 생존 세포 수를 측정한 결과와 유사했다. 세포 부유액은 초음파 처리 직전에 세포를 원심분리하여 PBS에 재부유한 것이기 때문에 PBS에 존재하는 단백질은 세포의 능동적인 배출에 의한 것보다는 초음파 처리에 의한 세포용해가 주요한 원인임을 추측할 수 있다. 세포 부유액의 단백질의 양과 트리판 블루를 이용한 세포 수 산정 결과의 유사성은 세포 부유액에 존재하는 단백질의 측정이 초음파에 의해 유도되는 세포사멸의 연구에서 즉각적인 세포사멸의 원인인 세포용해의 정도를 측정하는 지표로 활용 될 수 있음을 의미한다.

보고에 따르면, 초음파 처리된 세포들 중 일부는 초음파에 의해 손상은 입지만 즉각적인 세포사멸에는

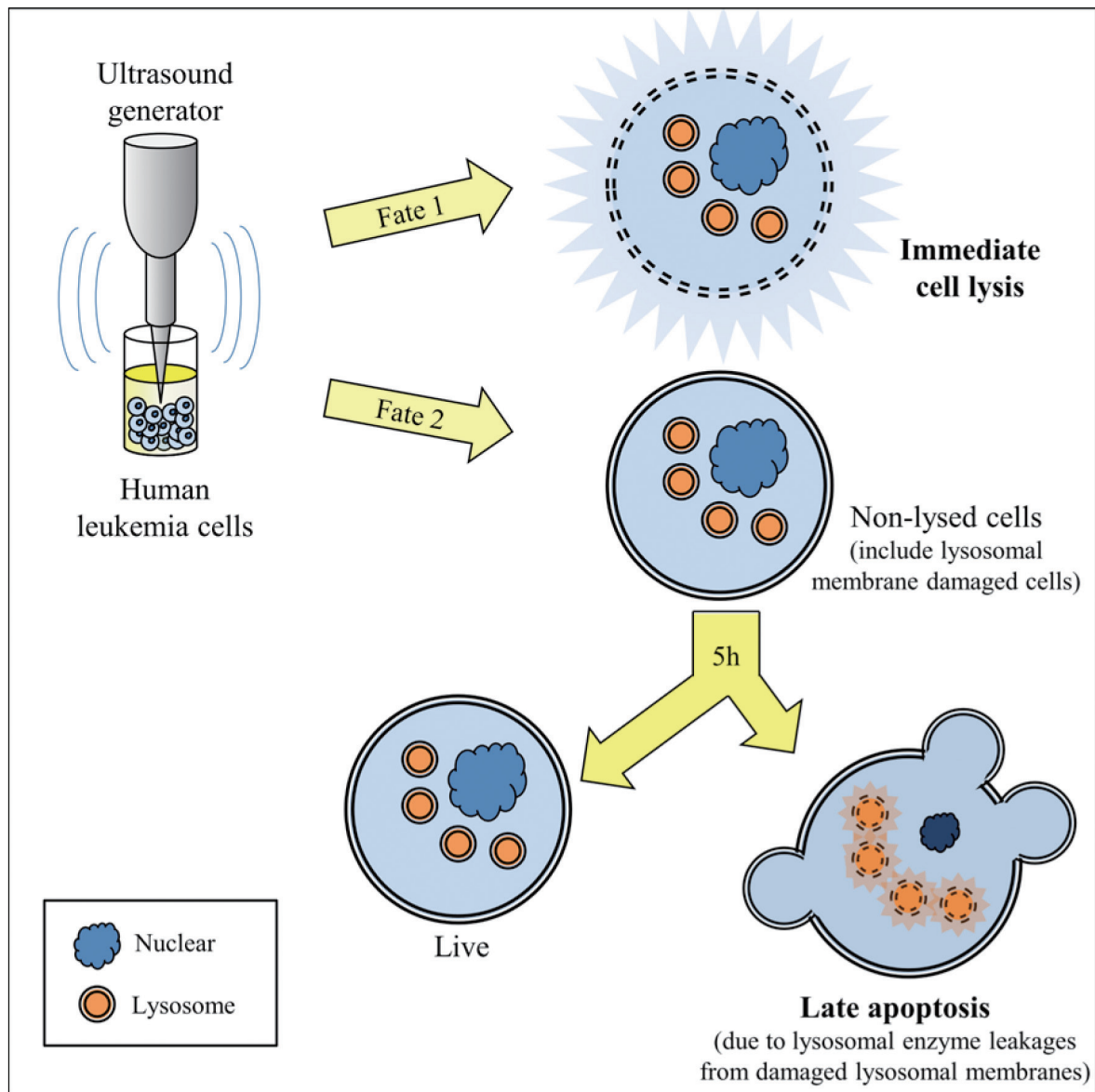


Fig. 5. Schematic diagram of the mechanism of tumor cell death induced by ultrasound in HL-60. Plasma membrane of a tumor cell is damaged by mechanical force of ultrasound. Some cells are highly damaged along with membrane rupture followed by immediate lysis and cell death (fate 1). However, the cells with intact plasma membrane survive at that moment irrespective of lysosomal leakage (fate 2). After several hours, ruptured lysosomes in a damaged tumor cell induce apoptosis and consequently cause delayed cell death.

이르지 않을 수도 있다[11]. 초음파에 의한 물리적 에너지를 전달받은 세포 중에서 즉각 세포사멸에 이르지 않은 세포들은, 일부는 손상을 회복하고 계속 살아남는 반면, 손상의 회복에 실패한 세포들은 결국

지연된 세포사멸에 이른다고 알려져 있다[11]. 이 실험에서도 HL-60에서 초음파에 의해 지연된 암세포 사멸이 유도되는 것을 확인하였다.

지연된 세포사멸에 세포자멸사가 관여한다는 여러

보고가 있고[9,10,12], 이 연구에서도 유세포분석을 통한 세포주기의 정체현상과 caspase의 활성화 확인을 통하여[23] 초음파에 의한 HL-60 세포의 지연된 세포사멸에 세포자멸사가 관여함을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 procaspase-3 단백질 발현량 분석에서 45 W/cm^2 이상의 강도의 초음파 처리에서부터 caspase 활성이 현저히 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 3C). 이것은 초음파 처리에 의한 암세포의 지연된 사멸반응을 트리판 블루 색소 배제법으로 확인한 결과에서 45 W/cm^2 이상 강도의 초음파 처리에서부터 지연된 세포사멸이 급격히 증가하는 것과 관련성이 있을 것으로 추측된다(Fig. 2B). 두 결과를 종합하여 볼 때, 초음파 처리로 인한 지연된 세포사멸의 정도에는 특정 강도 이상의 역치(threshold)가 존재할 수 있을 것으로 생각된다. 기존의 보고에 따르면 초음파 처리는 주위의 정상세포보다 암세포에서 더 많은 세포사멸이 유도하기 때문에, 향후 암세포와 정상세포 간에 초음파에 의한 세포사멸에서 초음파 처리 강도의 역치에 차이가 존재하는지에 대한 추가 연구를 진행하는 것이 필요하다. 이것은 초음파를 통한 암 치료에서 정상세포에는 영향을 주지 않고 암세포에만 선택적인 치료 효과를 나타낼 수 있는 초음파 강도 구간(therapeutic intensity window)을 설정하는데 도움을 줄 것이다.

세포자멸사의 유도에 용해소체 파열이 관여한다는 연구결과가 최근 보고되었다[24]. 용해소체는 가수분해효소, 과산화수소분해효소, 지질분해효소 등의 다양한 분해 효소를 내부에 가지고 있는 세포 내 소기관으로 자식작용, 탐식작용 등의 세포 기능에서 중요한 역할을 담당한다[25]. 이 용해소체의 막이 파괴되면, 용해소체 내부의 가수분해 효소들이 세포질로 유출되는데 이러한 효소의 유출은 세포의 자가분해를 일으키며 세포자멸사를 유도한다고 알려져 있다[24]. 용해소체의 막은 세포막과 동일한 인지질 이중막이며, 용해소체의 막은 세부적인 구성 요소가 세포질세망의 막, 핵막 그리고 자가포식소체 등과 같은 다른 세포소기관의 막에 비해서 세포막과 높은 유사도를 갖는 것으로 알려져 있다[26]. 따라서 세포막을 파열시켜 세포용해를 일으키는 초음파의 물리적 힘이 그 구성성분이 세포막과 흡사한

용해소체의 막에도 영향을 줄 수 있는지 알아보고자 HL-60 세포에 초음파 처리 5시간 후 용해소체를 관찰하였다. Fig. 4B의 결과에서 나타난 것과 같이 초음파는 용해소체 막의 파열을 유도할 수 있을 것으로 추측된다. 이러한 용해소체의 파열은 세포자멸사 유도의 원인으로 잘 알려져 있으므로, 초음파 처리에 의한 용해소체 막의 파열이 암세포의 세포자멸사 발생의 원인 중 하나라고 생각해 볼 수 있다. 이것은 향후 초음파 처리에 의해 용해소체 내부의 가수분해 효소가 세포질로 유출되는 현상을 확인하는 추가적인 실험을 통한 검증이 필요하다. 이번 연구에서 얻어진 결과를 종합하여, 초음파 처리에 의해 HL-60에서 일어날 것으로 추측되는 암세포세포사멸 과정을 Fig. 5에 도식화 하였다. 용해소체 파열을 포함한 세포자멸사를 유도하는 초음파 처리의 구체적인 기전에 대한 부분은 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이 연구는 인간 백혈병 HL-60 세포를 대상으로 하였다. 따라서 실제적인 임상 적용에 있어서 백혈병은 초음파가 투과할 수 없는 골수에 병소가 위치하고 있기 때문에 혈액암에 초음파를 치료적으로 적용하는 것이 가능한가에 대한 의문을 가질 수 있다. 이것은 백혈병 세포를 혈관 및 림프절에서 초음파로 처리하거나 혈액을 체외 순환시키며 초음파로 처리하는 등의, 골수 외의 부위에서 치료하는 방법에 대한 동물실험 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다[4]. 또한 초음파를 통한 암세포 사멸효과의 증명이 아직까지 생체 외 실험에서 이루어지고 있기 때문에, 임상 현장에 초음파를 암 치료 목적으로 적용하기 위해서는 많은 연구가 요구되며 동물실험을 통한 초음파 암 치료 효과 검증이 선행되어야 한다. 그럼에도 불구하고 초음파가 갖는 많은 장점으로 인해 정상 세포에 영향을 주지 않는 범위에서의 초음파를 이용한 암 치료 방법은 진단을 위한 영역대의 초음파 주파수와 동시에 사용되어, 치료에 있어서 병소의 정확한 위치 선정을 가능케 하며, 암의 진단과 치료를 한꺼번에 시행할 수 있는 차세대 암 치료 기술로 발전될 가능성이 있다고 생각된다.

요약

최근 연구에 따르면 초음파는 여러 종류의 암세포에서 암세포 사멸을 유도한다고 알려졌다. 그러나 초음파에 의한 정확한 암세포 사멸 기전은 밝혀지지 않은 상황이다. 이에 이번 연구에서는 인간 백혈병 세포주 HL-60에 초음파를 처리할 때 나타나는 세포자멸사의 세부 기전을 연구하였다. HL-60 세포에 20 kHz 초음파를 0-60 W/cm² 강도로 0-100초 동안 처리한 후 5시간 뒤 caspase 활성화, 세포주기의 sub-G1 축적 등이 관찰되어 초음파에 의해 세포자멸사가 유도됨을 확인할 수 있었다. 형광현미경으로 HL-60 세포의 용해소체를 관찰한 결과, 초음파처리에 의해 용해소체의 감소가 일어나는 것을 관찰하였다. 따라서 초음파에 의한 세포자멸사 유도에 있어서 초음파에 의한 용해소체의 파열이 한 가지 가능한 관련 기전으로 제안될 수 있을 것으로 생각된다.

Conflict of Interest

The authors report no conflict of interest in this work.

참고문헌

1. Aube C. Imaging modalities for the diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2014 (in press).
2. Bota S, Peck-Radosavljevic M. Non-invasive evaluation of patients with viral hepatitis. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2014;**60**:39-54.
3. Morbach C, Lin BA, Sugeng L. Clinical application of three-dimensional echocardiography. *Prog Cardiovasc Dis* 2014;**57**:19-31.
4. Wenham CY, Grainger AJ, Conaghan PG. The role of imaging modalities in the diagnosis, differential diagnosis and clinical assessment of peripheral joint osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;**22**:1692-702.
5. Kansagara D, Papak J, Pasha AS, O'Neil M, Freeman M, Relevo R, *et al.* Screening for hepatocellular cancer in chronic liver disease: a systematic review. *Ann Intern Med* 2014;**161**:261-9.
6. Liu H, Zhou J, Feng QL, Gu HT, Wan G, Zhang HM, *et al.* Fetal echocardiography for congenital heart disease diagnosis: a meta-analysis, power analysis and missing data analysis. *Eur J Prev Cardiol* 2014. [Epub ahead of print].
7. Liao J, Romine L, Korty LA, Chao C, White K, Harmon S, *et al.* Simplifying the ultrasound findings of the major fetal chromosomal aneuploidies. *Curr Probl Diagn Radiol* 2014;**43**:300-16.
8. Abdollahi A, Domhan S, Jenne JW, Hallaj M, Dell'Aqua G, Mueckenthaler M, *et al.* Apoptosis signals in lymphoblasts induced by focused ultrasound. *FASEB J* 2004;**18**:1413-4.
9. Ashush H, Rozenszajn LA, Blass M, Barda-Saad M, Azimov D, Radnay J, *et al.* Apoptosis induction of human myeloid leukemic cells by ultrasound exposure. *Cancer Res* 2000;**60**:1014-20.
10. Bai WK, Shen E, Hu B. The induction of the apoptosis of cancer cell by sonodynamic therapy: a review. *Chin J Cancer Res* 2012;**24**:368-73.
11. Feril LB Jr, Kondo T. Biological effects of low intensity ultrasound: the mechanism involved, and its implications on therapy and on biosafety of ultrasound. *J Radiat Res* 2004;**45**:479-89.
12. Feril LB Jr, Kondo T, Cui ZG, Tabuchi Y, Zhao QL, Ando H, *et al.* Apoptosis induced by the sonomechanical effects of low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line. *Cancer Letters* 2005;**221**:145-52.
13. Milowska K. Ultrasound-mechanisms of action and application in sonodynamic therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007;**61**:338-49.
14. Saliev T, Feril LB, Jr., Nabi G, Melzer A. Targeted manipulation of apoptotic pathways by using high intensity focused ultrasound in cancer treatment.

- Cancer Lett* 2013;**338**:204-8.
15. Wang P, Wang X, Liu Q. Cell damage of hepatoma-22 cells exposed to continuous wave ultrasound. *Tumori* 2012;**98**:523-31.
 16. Schuster A, Schwab T, Bischof M, Klotz M, Lemor R, Degel C, *et al.* Cell specific ultrasound effects are dose and frequency dependent. *Ann Anat* 2013;**195**:57-67.
 17. Wang H, Wang X, Wang P, Zhang K, Yang S, Liu Q. Ultrasound enhances the efficacy of chlorin E6-mediated photodynamic therapy in MDA-MB-231 cells. *Ultrasound Med Biol* 2013;**39**:1713-24.
 18. Barnett SB, Ter Haar GR, Ziskin MC, Rott HD, Duck FA, Maeda K. International recommendations and guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound in medicine. *Ultrasound Med Biol* 2000;**26**:355-66.
 19. Dalecki D. Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng* 2004;**6**:229-48.
 20. Zhao P, Liu Q, Wang P, Li T, Wang X, Su S, *et al.* Autophagic and apoptotic response to sonodynamic therapy induced cell damage in leukemia I1210 cells in vitro. *Cancer Biother Radiopharm* 2011;**26**:209-18.
 21. Jung HJ, Baek WK. Silibinin induces apoptosis in HL-60 and K562 leukemia cells. *Keimyung Med J* 2009;**28**:45-52.
 22. Iida Y, Tuziuti T, Yasui K, Kozuka T, Towata A. Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field. *Ultrason Sonochem* 2008;**15**:995-1000.
 23. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;**15**:269-90.
 24. Yuan XM, Li W, Dalen H, Lotem J, Kama R, Sachs L, *et al.* Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:6286-91.
 25. Hurley JH, Schulman BA. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion. *Cell* 2014;**157**:300-11.
 26. Schwake M, Schroder B, Saftig P. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic* 2013;**14**:739-48.