



HL60 세포주의 분화유도에 따른 Apoptosis관련 유전자의 발현

Expression of Apoptosis Related Genes During HL60 Cell Differentiation

저자 (Authors)	백원기 Won-Ki Baek
출처 (Source)	The Journal of the Korean Society for Microbiology 34(1) , 1999.2, 85-92 (8 pages)
발행처 (Publisher)	대한미생물학회 The Korean Society For Microbiology
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01491809
APA Style	백원기 (1999). HL60 세포주의 분화유도에 따른 Apoptosis관련 유전자의 발현. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 34(1), 85-92.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 203.247.13.27 2016/01/08 14:23 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

HL60 세포주의 분화유도에 따른 Apoptosis관련 유전자의 발현

계명대학교 의과대학 미생물학교실

백 원 기

=Abstract=

Expression of Apoptosis Related Genes During HL60 Cell Differentiation

Won-Ki Baek

Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine

In hematopoietic tissues, apoptosis is coupled to terminal differentiation of myeloid progenitors. The mechanism of apoptosis associated with differentiation is poorly understood. HL60, promyelocytic leukemia cell line, was used to study expression of apoptosis related genes (*bcl-2*, *bcl-x_{LS}*, *c-iap 2*, and *procaspase 3*) during differentiation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). HL60 cells were differentiated to monocyte/macrophage like cells about 1 day after TPA treatment, and differentiated cells were gradually induced apoptosis from 4 days after TPA treatment. The *bcl-2* mRNA and protein product were rapidly and continuously downregulated but expression of *bcl-x_L* and *c-iap 2* genes were increased in early stage of differentiation and then decreased. Expression of *bcl-x_S*, the alternative splicing form of *bcl-x_L* gene, was slowly and continuously increased. These data suggest that increased expression of *bcl-x_L* and *c-iap 2* genes may provide a mechanism through which apoptosis is blocked in early stage of HL60 cell differentiation.

Key Words: Differentiation, Apoptosis, HL60, *bcl-2*, *bcl-x*, *c-iap 2*, *Procaspase 3*

서 론

세포평형 (cellular homeostasis)은 세포의 성장분열과 세포의 사멸이 잘 조화되고 조절됨으로써 이루어지고 있으며, 개체의 발생이나 성장기에서의 개별적인 세포사멸은 apoptosis라는 기전을 통하여 이루어진다. 특히 조혈기관에서의 apoptosis는 조혈세포분화와 밀접하게 연관되어 있으며, 나아가 노화되거나 염증반응 등으로 과생성된 면역계 세포의 제거에 중요한 역할을 한다고 알려져

고 있다^{16,24)}.

Apoptosis는 정밀한 유전자 발현 조절기전에 의하여 일어나며 이에 관련되는 유전자 중 가장 널리 알려진 것이 *bcl-2* 유전자군이다. *bcl-2* 유전자군은 apoptosis억제에 관여하는 *bcl-2*, *bcl-x* 등과 apoptosis 유도에 관여하는 *bax*, *bak*, *bad* 등이 알려져 있으며^{1,30)}, 최근에는 apoptosis를 억제하는 기능을 가진 *iap* (Inhibitor of apoptosis) 유전자군이 알려지고 있다^{8,15)}. Apoptosis의 실질적인 진행과정에서는 cystein protease인 ICE family protein들이 각종 단백질을 분해하여 세포의 분해에 관여한다고 밝

접수 : 1999년 2월 3일, 게재결정 : 1999년 3월 18일

Reprint request to: 백원기, #700-712 대구직할시 중구 동산동 194 계명의대 미생물학교실 Tel: (053) 250-7443, Fax: (053) 255-1398, E-mail: wonki@dsmc.or.kr

본 연구는 1998년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음

Table 1. Primers used for RT-PCR analysis

GAPDH	sense	5' CGTCTTCACCACCATGGAGA 3'	300 bp*
	antisense	5' CGGCCATCAGCCACAGTTT 3'	
bcl-2	sense	5' GGATTGTGGCCTTCTTTGAG 3'	233 bp
	antisense	5' CCAAAGTGGAGCAGAGTCTTC 3'	
bcl-x	sense	5' CGGGCATTTCAGTGACCTGAC 3'	bcl-x _L 340 bp
	antisense	5' TCAGGAACCAGCGGTTGAAG 3'	bcl-x _S 151 bp
c-iap 2	sense	5' CCGGAAGAATAGAATGGCAC 3'	219 bp
	antisense	5' ACAGCTTCAGCTTCTTGCAG 3'	
procaspase 3	sense	5' ATGGAGAACACTGAAAACCTCA 3'	834 bp
	antisense	5' TTAGTGATAAAAATAGAGTTC 3'	

*size (bp) of PCR product

혀져 있으며 이들에는 ICE (interleukin 1 beta converting enzyme), procaspase 3 (CPP32) 등이 있다^{12,28)}.

조혈세포분화에서 apoptosis와 관련된 유전자의 발현 양상에 대한 연구는 발생학적 이해에 매우 중요할 뿐 아니라 apoptosis 기전의 이해에도 중요하다. 또한 최근에는 미분화된 암세포의 분화를 유도함으로써 암을 치료하고자 하는 연구들이 이루어지고 있어, 이러한 분화유도 치료의 기전을 이해하고 더 효율적인 방법을 개발하기 위해서는 세포의 분화와 관련된 apoptosis에 대한 더 많은 이해를 필요로 하고 있다.

이 연구에서는 HL60 세포주⁹⁾에 분화유도제인 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)를 처리하여 단구/대식세포 (monocyte/macrophage-like cells) 계열 세포로 분화를 유도하면서 분화유도와 관련되어 나타나는 bcl-2, bcl-x, c-iap 2 유전자들의 발현을 조사하고 ICE family에 속하는 procaspase 3의 발현과 활성도를 알아봄으로써 세포분화와 관련되어 나타나는 apoptosis관련 유전자들의 발현 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 분화유도

HL60 세포는 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37℃에서 5~10×10⁵ cells/ml의 농도를 유지하면서 배양하였다. 세포수가 6×10⁵ cells/ml 때에 분화유도제인 TPA를 32 nM로 처리하여 세포의 분화를 유도하였으며, 이후 3일마다 한번씩 32 nM TPA를 함유

하는 새 배지로 교체하였다. Apoptosis유도를 위한 etoposide 처리는 7×10⁵ cells/ml의 세포에 30 μM etoposide를 6시간 처리하였다.

2. Apoptotic DNA fragmentation assay

배양된 0.5×10⁶ cell을 eppendorf-tube로 옮긴 후 2000 rpm에서 2분간 원심하여 세포를 얻은 후 20 μl의 lysis buffer (20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0, 0.8% (W/V) sodium lauryl sarcosine)와 2 μl의 RNase A (5 mg/ml)를 섞고 37℃에서 1시간 incubation한 후 20 μl의 proteinase K를 넣고 50℃에서 1시간 30분 혹은 overnight incubation하였다. 여기에 GLB 5 μl를 넣고 섞은 후 1.2% agarose gel로 dry gel electrophoresis를 실시하였다.

3. RNA분리와 RT-PCR

배양된 세포에서 RNA의 분리는 RNAzol B (Biotech laboratories, Inc. USA)를 사용하였다. 분리된 RNA 4 μg을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Co.)로 역전사 (reverse transcription)를 시행하였다. PCR은 10X reaction buffer (15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl) 5 μl와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 μl씩, 그리고 30 μM sense 및 antisense primer (Table 1)를 각각 1 μl를 넣은 혼합액에 1 μl의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase (Perkin Elmer Co.)를 넣은 후 증류수로 50 μl로 용량을 맞추고 30 μl의 mineral oil을 증충한 후 DNA thermal cycler (Perkin Elmer Co.)를 사용하여 PCR을 시행하였다. GAP-

DH 유전자 증폭을 위해서는 22 cycle, procaspase 3, bcl-2, bcl-x, c-iap 2 유전자들의 증폭을 위해서는 28 cycle을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물은 agarose gel에 전기영동한 후 분석하였다.

4. 단백질 분리 및 western blot analysis

배양된 세포들을 Lysis buffer (10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail (0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidine-HCl)을 넣고 ice에서 30분간 둔 후 원심하여 상층액을 취한 후 Biorad protein assay kit로 정량하였다. 얻어진 단백질을 분획은 SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose paper (Millipore제, Immobilon)로 electrotransfer하였다. Transfer된 membrane은 Blotto용액 (5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 3시간 shaking한 후 Blotto용액을 제거하고 primary Ab용액 (실온)에 2시간 두고 TBS-T buffer로 rinse한 다음 secondary Ab용액 (실온)에서 1시간 두었다. 이를 다시 TBS-T buffer로 washing한 후 ECL (Amersham Co., USA)로 detection하였다. 사용한 일차항체는 다음과 같다. Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc. USA), Bcl-x_{L/S} (Santa Cruz Biotechnology Inc. USA), PARP (Poly ADP-ribose polymerase, Enzyme Sys-

tem Products, USA), Procaspase 3 (Transduction Laboratories, USA).

결 과

1. HL60 세포분화유도에 따른 apoptosis

TPA 처리에 따라 처리 1일부터 약 80%의 HL60 세포가 세포배양접시에 부착하면서 단구/대식세포 계열로 분화되었으며, 나머지 일부의 세포는 분화되지 않고 부유상태로 존재하였다. 분화에 따른 apoptosis의 발생유무를 DNA fragmentation assay로 조사한 결과 (Figure 1) TPA 처리 4일부터 시작하여 5일에 이르기까지 apoptotic DNA분절이 관찰되어 apoptosis가 진행됨을 알 수 있었다. 그림은 제시하지 않았지만 분화되지 않고 부유된 세포에서도 DNA fragment가 관찰되어 분화에 실패한 세포들은 apoptosis가 유도됨을 시사하였다.

2. HL60 세포분화에 따른 apoptosis관련 유전자 mRNA 발현

bcl-2 유전자는 분화유도 5일까지 지속적으로 발현이 감소하였으며, bcl-x는 large form과 small form 두가지의 splicing variants의 발현이 분화유도 1일째부터 증가하여 지속되었다. 이 때 large form이 주로 증가하였으며 small form의 증가는 이에 비하여 미약하였다. c-iap 2는 분화유도 3일까지 증가하다가 4일부터 감소하였다. procaspase 3는 분화유도 3일에 가장 증가하였다가 다시 감

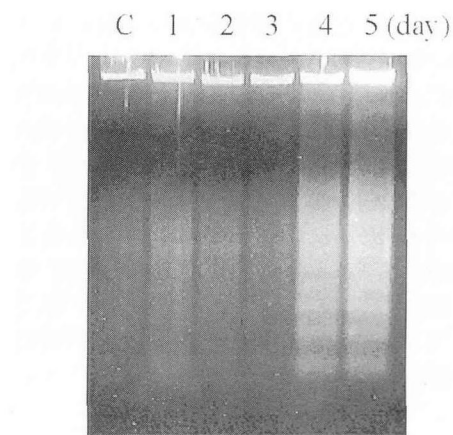


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of apoptotic DNA extracted from TPA treated HL60 cells. HL60 cells were cultured in the presence of 32 nM TPA for 5 days. C; control cells. This experiment was repeated two times.

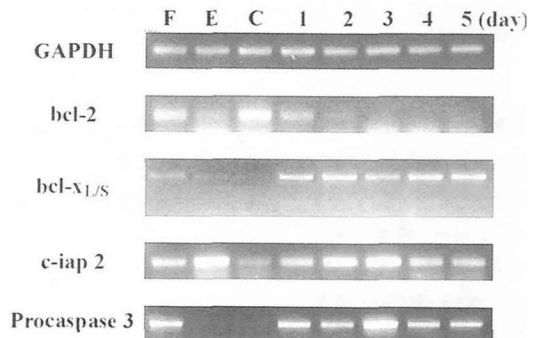


Figure 2. RT-PCR analysis of apoptosis related genes expression in HL60 cells treated with TPA for 5 days. F; floating cells that failed to differentiate after TPA treatment, E; etoposide treated cells, C; control cells. This experiment was repeated three times.

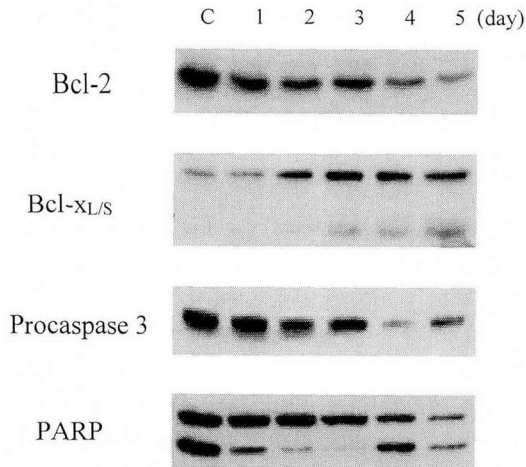


Figure 3. Western blot analysis of apoptosis related genes expression in HL60 cells treated with TPA for 5 days. C; control cells. This experiment was repeated three times.

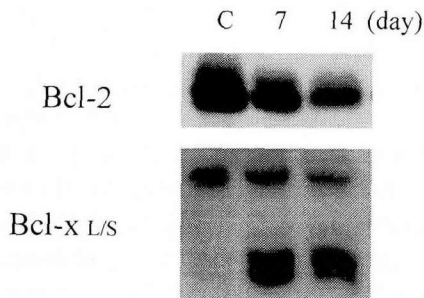


Figure 4. Western blot analysis of Bcl-2 and Bcl-x_{L/S} proteins in differentiated HL60 cells by TPA treatment for 7 and 14 days. C; control cells. This experiment was repeated two times.

소하였다. 분화유도에 실패하여 apoptosis가 유도된 부유세포들은 bcl-x 유전자의 발현 증가가 있었으나 분화세포 보다는 약하였고 c-iap 2의 증가가 있었다. Etoposide로 apoptosis를 유도한 세포에서는 bcl-2의 감소는 있었으나 bcl-x와 procaspase 3의 발현 증가는 없었으며, c-iap 2의 급격한 증가가 있었다 (Figure 2).

3. HL60 세포분화에 따른 apoptosis관련 유전자 단백질 발현

Bcl-2 단백질은 분화유도 1일부터 지속적으로 감소하였으며, Bcl-x 단백질은 분화유도 1일부터

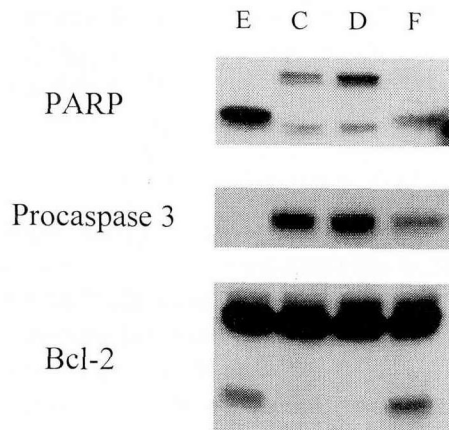


Figure 5. Western blot analysis of PARP, Bcl-2, and CPP32 proteins in HL60 cells. E; cells treated with 30 μ M etoposide for 6 hours, C; control cells, D; differentiated cells by 1 day treatment of 32 nM TPA, F: floating cells that failed to differentiation after TPA treatment for 1 day. This experiment was repeated three times.

증가되었는데 이는 주로 Bcl-x_L 단백질로 이루어졌으며, Bcl-x_S 단백질은 2일부터 소량 증가되었다. Procaspase 3 단백질은 분화유도 후부터 지속적으로 감소하였으며, PARP의 89 kDa 분절이 분화유도제 처리 후 감소하다가 4일부터 증가하였다 (Figure 3). 분화유도 후 7일과 14일 세포에서 Bcl-2 단백질은 계속적인 감소가 보였으며, Bcl-x_L 단백질은 7일과 14일에서 분화유도 전보다 감소하였고 Bcl-x_S 단백질은 많은 증가를 보였다 (Figure 4). 분화유도에 실패하여 apoptosis가 유도된 부유세포들에서는 Bcl-2 단백질의 절단 분절인 23 kDa 분절이 증가되어 있었으며, Procaspase 3 단백질은 많이 감소되어 있었다. 또한 113 kDa의 PARP 단백질은 감소되어 있었으며 89 kDa의 분절 단백질은 증가되어 있었다. Etoposide로 apoptosis를 유도한 세포에서도 Procaspase 3 및 113 kDa PARP 단백질의 검출은 미약하였으며, 89 kDa PARP 분절 단백질 및 23 kDa Bcl-2 분절 단백질은 증가되어 있었다 (Figure 5).

고 찰

HL60 세포주는 promyelocytic leukemia 세포주로서 TPA, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등의 각종 분화유도제에 의하여 단구/대식세포 계열 또는 과

림구 계열로 분화되는 미분화 암세포주로서 세포 분화의 중요한 모델로 연구되고 있다⁹⁾. 일반적으로 세포의 분화를 위해서는 세포가 G1기의 세포 주기에 정지하고 세포의 apoptosis가 억제되어야 한다고 알려져 있으며³²⁾ 또한 여러 종류의 세포가 최종분화 후 일정시간이 지나면 apoptosis를 통하여 제거되므로 분화와 apoptosis의 사이에는 밀접한 관계가 있다고 생각되고 있다^{16,24)}.

이 실험에서 HL60 세포에 32 nM의 TPA를 처리하였을 때 1일 후 약 80%의 세포가 단구/대식세포 계통으로 분화되고, 분화에 실패한 약 20%의 부유세포는 DNA fragmentation이 나타나 세포 분화과정에서 apoptosis 억제가 성공적인 세포분화에 필수적일 것이라 생각되었다. 이 실험에서 나타난 분화 실패의 원인은 세포주 내에 존재하는 clonal difference 때문일 수도 있으며, 아니면 TPA로 인한 분화유도신호가 주어진 때 특정 세포주기에 있는 세포가 분화에 실패하는 것일 수도 있다고 생각되며 이는 추후 더 조사되어야 할 것으로 생각한다. 한편 성공적으로 분화된 세포도 분화 4일부터는 apoptotic DNA fragmentation을 보여 최종분화된 세포에서도 일정시간이 지나면 apoptosis가 유도됨을 시사하였다.

Apoptosis의 실행단계에서 중요한 기능을 하는 것은 cysteine protease (Caspase) 단백질군으로서 apoptosis의 catalyst로 작용하여 순차적인 세포의 disassembly에 관여한다고 알려져 있다¹¹⁾. 이러한 cysteine protease에는 Interleukin 1 beta converting enzyme (procaspase 1), CPP32 (procaspase 3) 등이 있으며, 이들의 기질로 알려진 것은 PARP (poly ADP-ribose polymerase), lamin A, B 및 C, IL-1 beta, U1 small ribonucleoprotein, alpha-fodrin, topoisomerase I, beta-actin 등으로 특히 PARP는 원래 핵 안에 존재하면서 DNA 손상복구에 관련된 단백질로서 apoptosis과정 중 Caspase에 의해 원래의 116 kDa 정도의 크기가 89 kDa와 27 kDa의 단편으로 절단된다고 알려져 있다^{12,28)}. 이 실험에서 PARP의 절단 정도와 procaspase 3의 발현 정도를 실험한 바, 분화유도 후 Caspase의 활성화 정도를 나타내는 PARP의 절단이 감소하였다가 4일부터 절단된 절편의 양이 증가되었고 procaspase 3의 mRNA는 TPA 처리 후 3일에 가장 증가하였으며 4일에 Caspase의 활성화를 의미하는 Procaspase 3 단백질의 급격한 감소가 나타났다. 이 결과와 apoptotic DNA fragmentation 결과를 종합하여 볼 때 분화

유도 초기에는 apoptosis에 저항이 생기고 세포가 분화된 후에 apoptosis가 유도된다고 유추할 수 있다.

bcl-2 유전자는 1984년 Tsujimoto 등²⁶⁾이 18번 염색체의 q21에서 분리한 유전자로서 bcl-2의 과발현이 세포의 생존을 증가시키며 여러 가지 조건에서 apoptosis를 억제하고 세포 생존율을 증가시킨다고 알려졌다¹⁹⁾. 이후 Bcl-2 단백질과 결합하는 단백질로 Bax 단백질이 알려지고 이것이 Bcl-2와 sequence homology가 있다고 밝혀지면서 Bcl-2 단백질군의 여러 가지 단백질들이 알려지게 되었다. Bcl-2 단백질군은 크게 2가지로 분류할 수 있는데 하나는 Bcl-2와 같이 apoptosis를 억제하는 단백질들로서 Bcl-2, Bcl-x_L 등이며, 다른 하나는 apoptosis를 유도하는 것들로서 Bax, Bak, Bcl-x_S 등이다³⁰⁾. bcl-2와 bax의 knockout mice를 이용한 실험에서 bcl-2 deficient mice는 신장의 발생 이상이 있으며, B 및 T 림프구의 성숙이 이루어지지 않아 세포의 분화와 Bcl-2 family 단백질간에 관련성이 있음을 시사하고 있다¹⁸⁾. 이 실험에서 HL60 세포주가 32 nM TPA 처리에 의해 단구/대식세포 계통의 세포로 분화되어 나갈 때 Bcl-2 단백질의 발현을 western blot으로 분석한 결과 분화유도 후 지속적인 단백질의 감소가 나타났으며 이는 RT-PCR 결과로 볼 때 mRNA 전사의 감소에 의한 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 DMSO, all-trans-retinoic acid 등으로 과립구 또는 단구/대식세포 계열로 분화를 유도한 다른 실험들^{3,4,10,31)}과 유사한 결과로서 이는 세포의 최종분화 후 나타나는 apoptosis에 수동적으로 관여하는 한 원인이 될 것으로 생각된다. 즉 Bcl-2는 미분화 myeloid progenitor 세포의 apoptosis 억제에는 중요하나 최종분화세포의 apoptosis 억제에는 주 요소로 작용하지는 않을 것이라 생각할 수 있다. 한편 Bcl-2 단백질을 과발현 시킨 HL60 세포에 분화유도제 처리시 분화가 이루어졌다는 보고가 있어²²⁾ Bcl-2 단백질의 감소가 분화기전의 전제조건인 것 같지는 않다.

Bcl-x 단백질은 alternative splicing으로 형성되는 Bcl-x_L과 Bcl-x_S의 두 단백질이 있으며 이 중 Bcl-x_L은 apoptosis 억제기능이 있는 반면 Bcl-x_S는 Bcl-2 또는 Bcl-x_L 단백질과 결합하여 이들의 apoptosis 억제기능을 약화시키는 것으로 알려져 있다^{5,20)}. 이 실험에서 TPA 분화유도시 bcl-x_L 유전자발현은 분화 1일부터 증가되기 시작하여 3일~5일까지 지속되다가 분화 7일 및 14일에는 감

소하였다. 이로 미루어 보아 분화유도시 Bcl-xL 발현 증가가 bcl-2 발현 감소에 의한 apoptosis 억제능의 감소를 보상하는 것으로 생각된다. Homologous recombination으로 이러한 bcl-x 유전자를 결핍시킨 생쥐에서 조혈모세포의 apoptosis가 발생하여 태생 13일 정도에 죽는 것으로 밝혀져 있으며¹⁷⁾ bcl-2 결핍 생쥐에서는 출생 후 myeloid 계통의 세포는 문제가 없고 계속적인 림프구계열 세포의 apoptosis가 관찰된다고²⁷⁾ 알려져 있어 myeloid 계열 세포의 성장 분화에 bcl-xL의 발현이 중요할 것으로 생각된다. bcl-xs 유전자 발현은 분화유도에 따라 미약하게 증가하였으며 분화 후에도 계속 점진적으로 증가하여 분화 후의 apoptosis에 관여할 것을 시사하였다.

iap 유전자군은 Baculovirus에서 처음 발견된 유전자로서 단백질의 c-말단에는 RING finger motif를 가지며, N 말단에는 BIR (baculovirus IAP repeats) motif를 가지고 있다. IAP 단백질군에 속하는 것들로는 Baculovirus의 Cp-IAP, Op-IAP, AC-IAP, 초파리의 D-IAP1, DIAP2, 사람의 c-IAP 1 (h-IAP2, MIHB), c-IAP 2 (h-IAP 1, MIHC), NAIP (neuronal apoptosis inhibitory peptide), x-IAP (h-ILP, MIHA)와 최근에 보고된 Survivin 등이 있다^{28,15)}. IAP 단백질의 작용기전은 아직까지 정확히 밝혀져 있지는 않지만 apoptosis 억제에 관여하는 것으로 알려져 있다. 가장 잘 알려진 IAP 단백질의 작용기전은 TNFR (tumor necrosis factor receptor)과 관련된 것으로 TNF- α 가 TNFR에 결합하였을 때 c-IAP 1과 c-IAP 2가 TRAF2 (TNFR associated factor 2)와 결합함으로써 NF- κ B를 활성화시켜 apoptosis를 억제하는 것이다^{23,25,29)}. NF- κ B는 또한 c-IAP 1과 2의 유전자전사를 증가시키는 것으로 알려져 positive feedback이 형성되는 것으로 생각되고 있다⁷⁾. 이 실험에서 TPA로 분화를 유도했을 때 c-iap 2의 mRNA 발현이 분화유도 3일까지 증가하다가 4일부터 다시 감소함을 나타내어 TPA 처리 초기의 c-iap 2 발현 증가가 세포분화에 따른 apoptosis의 발생을 억제하는 기능을 하였을 가능성을 시사하고 있다. 그러나 HL60 세포주를 포함한 여러 가지 세포에 TPA를 처리했을 때 NF- κ B의 활성이 증가한다는 보고들^{13,14)}과 이 실험에서 분화에 실패한 부유세포들에서도 c-iap 2의 발현이 증가된 것으로 보아 c-iap 2의 발현 증가는 TPA 처리로 유도된 NF- κ B의 활성증가에 의한 c-iap 2의 전사활성화에 의한 수동적인 발현 증가

일 수도 있어 차후 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

분화유도에 실패하여 apoptosis가 유도된 부유세포들은 Procaspase 3 및 113 kDa PARP 단백질의 많은 감소, 89 kDa PARP 분절 단백질 및 23 kDa Bcl-2 분절 단백질의 증가 등, DNA 독성물질인 etoposide처리와 비슷한 양상을 보여 TPA 처리시 분화에 실패한 세포들은 급격히 apoptosis되는 것을 알 수 있었다. 최근에는 Bcl-2 단백질이 caspase 3의 기질이며 Caspase 3에 의해 절단된 23 kDa의 amino terminal fragment가 apoptosis를 증가시킨다는 보고가⁶⁾ 있어 분화에 실패한 세포의 급격한 apoptosis에 Bcl-2의 절단과 그 분절의 출현이 관여할 것으로 생각되며, 또한 bcl-x mRNA의 발현이 분화가 성공적으로 유도된 세포보다 미약하여 충분한 bcl-x 유전자 발현유도 실패가 분화 실패의 원인 중 하나일 가능성이 있을 것으로 생각된다.

이상을 종합하여 볼 때 promyelocytic leukemia 세포주인 HL-60 세포주에서 분화유도제 TPA 처리에 의한 단구/대식세포 계열로의 세포분화시에는 분화초기에 apoptosis 억제가 일어나고 분화 후에는 최종분화에 따른 apoptosis가 일어나며, 분화초기의 apoptosis 억제에는 증가된 bcl-xL, c-iap 2 등의 유전자 발현이, 그리고 최종분화에 따른 apoptosis에는 bcl-2 및 bcl-xL의 발현 감소와 bcl-xs의 발현 증가가 관여될 것으로 생각된다.

결 론

세포분화와 apoptosis의 연관 관계를 이해하기 위하여 HL-60 세포주를 사용하여 분화유도제인 TPA로 분화를 유도하면서 분화유도와 관련되어 나타나는 apoptosis양상과 bcl-2, bcl-x, c-iap 2 등 apoptosis관련 유전자들의 발현을 조사하였다.

1. TPA 처리에 따라 처리 1일부터 약 80%의 HL60 세포가 세포배양접시에 부착하면서 단구/대식세포 계열로 분화되었으며, 분화 4일부터 시작하여 apoptosis가 진행되었다. 세포분화에 실패한 약 20%의 세포들은 apoptosis가 유도되었다.

2. HL60 세포분화에 따른 apoptosis관련 유전자 mRNA 발현: bcl-2 유전자는 분화유도에 따라 관찰한 5일까지 지속적으로 발현이 감소하였으며, bcl-x는 발현이 분화유도 1일부터 증가하여 지속되었다. 이 때 bcl-xL이주로 증가하였으며 bcl-xs의 증가는 이에 비하여 미약하였다. c-iap 2는 분화

유도 3일까지 증가하다가 4일부터 감소하였다. procaspase 3는 분화유도 3일에 가장 증가하였다가 다시 감소하였다. 분화유도에 실패하여 apoptosis가 유도된 부유세포들은 bcl-x 유전자의 발현 증가가 있었으나 분화세포 보다는 약하였다.

3. HL60 세포분화에 따른 apoptosis관련 유전자 단백질 발현: Bcl-2 단백질은 분화유도 1일부터 지속적으로 감소하였으며, Bcl-x_L 단백질은 분화유도 1일부터 증가가 있었으나 Bcl-x_S 단백질은 2일부터 소량씩 증가되어 7일과 14일에서 많은 증가를 보였다.

이상의 실험결과들로 볼 때 promyelocytic leukemia 세포주인 HL-60 세포주에서 분화유도제 TPA 처리에 의한 단구/대식세포 계열로의 세포분화시에는 분화초기에 apoptosis 억제가 일어나고 분화 후에는 최종분화에 따른 apoptosis가 일어나며, 분화초기의 apoptosis 억제에는 증가된 bcl-x_L, c-iap 2 등의 유전자 발현이, 그리고 최종분화에 따른 apoptosis에는 bcl-2 및 bcl-x_L의 발현 감소와 bcl-x_S의 발현 증가가 관여될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Adams JM, Cory S: The bcl-2 protein family arbiters of cell survival. *Science* **281**: 1322-1326, 1998.
- 2) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med* **3**: 917-921, 1997.
- 3) Benito A, Grillot D, Nunez G, Fernandez-Luna JL: Regulation and function of bcl-2 during differentiation-induced cell death in HL-60 promyelocytic cells. *Am J Pathol* **146**: 481-490, 1995.
- 4) Blagosklonny M, Alvarez M, Fojo A, Neckers LM: Bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug resistant HL60 leukemia cells. *Leuk Res* **20**: 101-107, 1996.
- 5) Boise L, Gonzalez-Garcia M, Postema C, Ding L, Lindstein T, Turka L, Mao X, Nunez G, Thompson C: Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**: 597-608, 1993.
- 6) Cheng EHY, Kirsh DG, Clem RJ, Ravi R, Katan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM: Conversion of bcl-2 to a bax-like death effector by caspases. *Science* **278**: 1966-1968, 1997.
- 7) Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW: Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10057-10062, 1997.
- 8) Clem RJ, Duckett CS: The iap genes: unique arbiters of cell death. *Cell Biology* **7**: 337-339, 1997.
- 9) Collins SJ: The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **70**: 1233-1244, 1987.
- 10) Delia D, Aiello A, Soligo D, Fontanella E, Melani C, Pezella F, Pierotti MA, Porta GD: bcl-2 protooncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood* **5**: 1291-1298, 1992.
- 11) Fraser A, Evan G: A license to Kill. *Cell* **85**: 781-784, 1996.
- 12) Green D, Kroemer G: The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* **8**: 267-271, 1998.
- 13) Hohmann HP, Remy R, Aigner L, Brockhaus M, van Loon AP: Protein kinases negatively affect nuclear factor-kappa B activation by tumor necrosis factor-alpha at two different stages in promyelocytic HL60 cells. *J Biol Chem* **267**: 2065-2072, 1992.
- 14) Korner M, Tarantino N, Pleskoff O, Lee LM, Debre P: Activation of nuclear factor kappa B in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* **62**: 1716-1726, 1994.
- 15) Liston P, Young SS, Mackenzie AE, Korneluk RG: Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis* **2**: 423-441, 1997.
- 16) Martin SJ, Bradley JG, Cotter TG: HL-60 cells induced to differentiate toward neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol* **79**: 448-453, 1990.
- 17) Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama KI, Nakayama K, Negishi I, Senju S,

- Zhang Q, Fujii S, Loh DY: Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* **267**: 1506, 1995.
- 18) Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H, Loh DY: Targeted disruption of bcl-2 alpha beta in mice-occurrence of grey hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3700-3704, 1994.
- 19) Nuez G, London L, Hockenbery D, Mckearn JP, Korsmeyer SJ: Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hematopoietic cell lines. *J Immunol* **144**: 3602-3610, 1990.
- 20) Nunez G, Clarke MF: The bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* **4**: 399-403, 1994.
- 21) Rao L, White E: Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection. *Curr Opin Genet Dev* **7**: 52-58, 1997.
- 22) Ray S, Bullock G, Nunez G, Tang C, Ibrado AM, Huang Y, Bhalla K: Enforced expression of bcl-x_s induce differentiation and sensitizes chronic myelogenous leukemia-blast crisis K562 cells to 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine-mediated differentiation and apoptosis. *Cell Growth Differ* **7**: 1617-1623, 1996.
- 23) Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM and Goeddel DV: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**: 1243-1252, 1995.
- 24) Savill JS, Wyllie AH, Henson PM, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophage. *J Clin Invest* **83**: 865-875, 1989.
- 25) Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV: The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13973-13978, 1996.
- 26) Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowel PD, Croce CM: Cloning of the Chromosome Breakpoint of neoplastic B cells with the t (14:18) Chromosome Translocation. *Science* **226**: 1097, 1984.
- 27) Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ: Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair. *Cell* **75**: 229, 1993.
- 28) Villa P, Kaufmann SH and Earnshaw WC: Caspases and caspase inhibitors.: *Trends Biochem Sci* **22**: 388-393, 1997.
- 29) Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr: NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**: 1680-1683, 1998.
- 30) White E: Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* **10**: 1-15, 1996.
- 31) Xu HM, Tepper CG, Jones JB, Fernandez CA, Studzinski GP: 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 protects HL60 cells against apoptosis but down-regulates the expression of the bcl-2 gene. *Exp Cell Res* **209**: 367-374, 1993.
- 32) Yee AS, Shin HH, Tevosian SG: New perspectives on retinoblastoma family function in differentiation. *Front Biosci* **3**: 532-547, 1998.