

저 농도의 전자선을 조사한 전골수구성 백혈병 세포 죽음에서의 TNF- α 작용 효과

Cell Death of Human Promyelocytic Leukemia Cell after Low Dose of Electron Beam Irradiation with TNF- α

김동현, 고성진
부산가톨릭대학교 방사선학과

Dong Hyun Kim(dhkim@cup.ac.kr), Seong-Jin Ko(sjko@cup.ac.kr)

요약

급성전골수구성 백혈병(Acute promyelocytic leukemia, APL)은 혈액암으로 치료가 쉽지 않을 뿐만 아니라 항암치료에 가장 효과가 좋다는 방사선 치료를 해도 오히려 정상세포에도 작용하여 부작용을 초래하게 된다. 본 연구에서는 전자선(EB)을 TNF- α 와 같이 처리하였을 경우 정상세포와 암세포의 세포 죽음에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. HL-60 세포는 APL 세포주로서 사용하였고 DMSO를 처리하여 분화시킨 HL-60 세포는 정상과립구의 성질을 나타내어 정상대조군으로 이용하였다. 그 결과 TNF- α 를 전자선을 처리한 HL-60 세포에서만 세포독성효과를 나타내었고 이 과정에서 TNF- α 는 caspase 3를 활성화 시켜서 세포자멸사를 유도하여 세포가 죽음에 이르게 하였다. 결론적으로 TNF- α 는 항암치료의 부작용을 없애기 위해 저농도의 전자선 치료 시 함께 사용하여 암 세포의 제거를 증가시켜 암의 치료효율을 높일 수 있는 유효물질로 사료된다.

■ 중심어 : | HL-60 Cells | TNF- α | EB Irradiation | 세포자멸사 |

Abstract

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a cancer of the blood. Although electron beam (EB) irradiation is used with other anti-cancer agents, EB irradiation can be harmful to normal tissues around the cancer. In the present study, we evaluate the differential cytotoxic effect of EB irradiation with other molecules, including TNF- α , on DMSO-treated HL-60 cells and HL-60 cells. HL-60 cells are the human promyelocytic leukemia cell line and are differentiated by DMSO. DMSO-treated HL-60 cells are considered to be normal granulocytic cells. In these results, TNF- α may be used as the potential agent for the treatment of blood cancer without side effects in low dose of EB irradiation therapy.

■ keyword : | HL-60 Cells | TNF- α | EB Irradiation | Apoptosis |

1. 서론

HL-60 세포는 혈액과 골수에서 발생하는 암인 전골

수구성 백혈병 연구에 주로 사용되는 세포로 특히 급성 전골수구성 백혈병(acute promyelocytic leukemia, APL)의 발병기전 및 치료법을 위한 연구에 이용된다.

* 본 연구는 2012년도 부산가톨릭대학교 교내연구 지원에 의한 연구결과임.

접수일자 : 2014년 05월 07일

심사완료일 : 2014년 05월 28일

수정일자 : 2014년 05월 28일

교신저자 : 김동현, e-mail : dhkim@cup.ac.kr

특히 APL은 외과적 수술로 치료하기 어려운 암이기 때문에 주로 화학요법을 통해 치료한다. 화학요법은 암세포에 특이적인 세포독성을 가지고 있는 물질을 처리한 다음 암세포의 죽음이 유발되는지 확인하여 항암효과를 확인하는 것으로 이때 암세포의 세포자멸사와 그와 관련된 작용기전을 연구하고 규명하는 것이 중요하다 [1]. APL의 치료제로는 주로 비타민 A의 파생물인 all-trans retinoic acid (ATRA)를 이용해 백혈병 세포의 분화 및 세포자멸사를 유도하여 치료에 사용해왔지만, ATRA는 일부 호흡곤란, 발열, 저혈압 등을 동반하는 retinoic acid syndrome (RAS)를 유발한다[2]. 여전히 부작용이 없으면서 효과적인 항암 치료제가 부족한 필요한 실정이고 더욱 새로운 치료물질을 발굴 및 개발하는 것이 필요하다. 이런 암 치료에 치료제 말고도 방사선 치료를 동반하여 그 치료효과를 높이고 있다. 특히 전자선(EB)는 이미 암 치료에 이용되고 있지만 혈액암 보다는 피부암이나 조직에서 발생하는 암의 치료에 많이 이용하고 있는 추세이다. 또한 방사선 조사도 가장 효과적인 암치료법으로 치료효과를 높이지만 동시에 암 이외에 정상 조직 및 세포에도 영향을 미쳐 다양한 부작용을 유발하기도 한다. 그래서 본 실험에서는 매우 낮은 농도의 전자선을 조사한 다음 표적세포인 암세포에만 작용하는 면역화학물질을 이용하여 방사선 감수성을 높이는 것과 동시에 암 세포의 죽음 유도를 더욱 활성화하여 암세포 제거에 이용해 보고자 하였다.

염증을 포함한 다양한 세포의 자극에 의해 세포는 면역반응을 유발하게 되고 그로인해 면역물질 들을 생산해 내고, 세포사이의 신호전달과 면역반응을 더욱 활성화시킨다. 이러한 물질 중에 대표적인 물질로 TNF- α 가 있다[3]. TNF- α 는 면역과 염증반응에 관여하는 대표적인 염증성 사이토카인 중 하나로 수용체에 결합하여 세포내로 자극을 전달한다[4]. 특히, TNF- α 와 그 수용체의 결합은 주요 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성을 유도하여 caspase의 연쇄반응을 조절함으로써 세포자멸사를 억제하거나 반대로 세포자멸사를 유발하기도 한다. 또한 TNF- α 의 농도가 낮으면 세포자멸사 유도에는 관여하지 못하지만, 고농도의 TNF- α 는 인체 내에서 급성 쇼크 등의 증상을 일으킬

수 있다[5]. 이전 연구에서도 표적 세포의 종류, TNF- α 의 양, 처리시간, 결합하는 수용체의 종류 등 다양한 요소들에 의해 서로 다른 반응들을 유도한다고 보고되어지고 있다[6][7]. 그러므로 TNF- α 는 서로 다른 조건에 따라 세포의 죽음을 유도할 수도, 세포의 생존을 유도할 수도 있는 양면적인 기능이 있는 물질로 여겨지고 있다.

본 연구에서도 이러한 사실을 바탕으로 세포의 생사에 있어서 TNF- α 의 양면적인 작용기전을 이용하여 사람 골수구성 백혈병 세포주인 HL-60 세포를 분화시켜 정상세포로 간주하는 성숙 HL-60 세포와 암세포인 미성숙 HL-60 세포의 생존에 TNF- α 의 작용을 확인하고자 하였다. 특히, 방사선 조사 기법과 병행하였을 경우 더욱 효과적으로 항암효과가 있는지 파악하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 세포배양

HL-60 세포(American Type Culture Collection, Rockville, USA)는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml의 penicillin, 100 μ g/ml의 streptomycin (Life technologies, Inc., USA)이 포함된 RPMI 1640배지(Life technologies, Inc.)에서 배양하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 조건으로 배양하였다. HL-60 세포는 전골수구성 백혈병 세포로 이용하였고 같은 계열의 정상세포를 준비하기 위해 HL-60세포에 DMSO를 처리하여 과립구로 분화를 유도하였다. 그래서 3일 동안 1.3% DMSO-처리 HL-60 세포는 정상대조군으로 사용하고 DMSO-미처리 HL-60 세포는 암세포군으로 사용하였다[8].

각각의 대조군과 암세포군에 1, 5, 10, 20 Gy의 전자선을 조사한 다음 새로운 배지로 갈아주어 배양하였다. 이때, TNF- α 처리군은 전자선 조사 3시간 이후에 각각 10 ng/ml 농도의 TNF- α 를 처리하여 다시 16시간 배양하였다.

2. MTT assay

MTT assay kit (Roche, Penzberg, Germany)를 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. 전자선을 농도별로 조사한 다음 세포를 1×10^5 cells/50 μ l의 농도로 부유하여 96 well plate에 분주하였다. 각각 16시간이 지나고, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solution을 10 μ l 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간을 배양한 다음 100 μ l의 solubilization solution을 추가로 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 하루 동안 방치한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. Apoptosis assay

세포고사를 확인하기 위해 annexin-V와 propidium iodide (PI) (BD bioscience, San Diego, CA) 염색을 실시한 다음 유세포 분석기로 annexin-V에 염색된 세포의 수를 측정하였다. Annexin-V에 염색된 모든 세포가 세포고사가 일어난 세포로 정의하고 각 샘플 당 총 10,000개의 세포를 분석하였다.

4. Caspase-3 활성 측정

세포자멸사에서 최종실행자인 caspase 3의 발현변화를 확인하기 위해 caspase-Glo® 3 assay kit (Promega, USA)를 이용하여 caspase 3의 활성변화를 측정하고자 하였다. 먼저 96-well plate에서 세포를 분주하고 물질 처리하여 배양하였다. 배양이 끝나면 키트의 방법에 따라 반응시약과 기질을 넣어 반응시킨 다음 luminometer를 이용하여 chemiluminescence를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 전자선에 의한 세포 독성 확인

HL-60세포에 DMSO를 처리하여 정상 과립구의 특징을 가진 세포로 분화시켰다. 이를 정상세포군으로 간주하고 암세포는 기존의 HL-60세포를 이용하였다. 각각의 세포에 전자선의 처리가 세포 생존에 어떠한 결과를 나타내는지 확인하기 위해 각각 전자선을 1, 5, 10,

20 Gy로 농도별로 조사한 다음 MTT assay로 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 DMSO 처리군과 미처리군에서 모두 농도별로 세포생존율을 억제하는 것을 볼 수 있었다[그림 1].

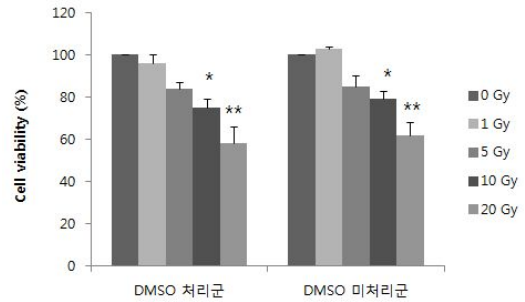


그림 1. DMSO 처리군과 미처리군 HL-60 세포의 세포생존율에 대한 전자선의 영향

또한 이러한 세포 죽음이 세포자멸사에 의한 것인지 확인하기 위해 위와 같은 방법으로 세포에 각각 전자선을 조사한 다음 annexin-V와 PI를 염색한 세포를 유세포분석기로 확인하였다. Annexin-V가 염색된 모든 세포를 세포자멸사가 일어난 세포로 간주하였다. 그 결과 [그림 2]에서 나타난 전자선 조사에 의한 세포생존율의 감소는 세포자멸사의 증가로 인해 나타난 것으로 확인하였다[그림 2].

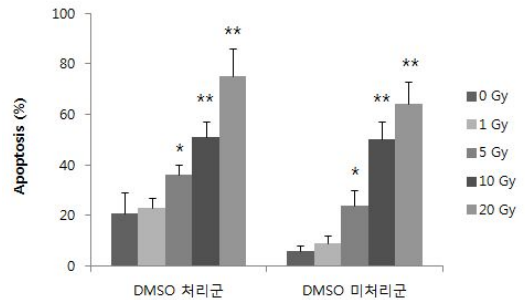


그림 2. DMSO 처리군과 미처리군 HL-60 세포의 세포자멸사에 대한 전자선의 영향

전자선 조사에 의해 통계적으로 유의하게 세포자멸사가 유도되었다. 그러나 [그림 1]과 [그림 2]에서 나타

난 바와 같이 전자선 조사에 의한 세포죽음이 DMSO 처리군이나 미처리군에서 거의 유사하게 유도됨을 확인 할 수 있었다. 이는 AML에서 치료를 위한 전자선 조사가 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 거의 동일하게 작용할 수 있다는 것을 의미한다. 그러므로 본 연구에서는 면역물질인 TNF- α 를 이용하여 정상세포와 암세포에서 서로 작용을 유도하고자 하였다. 특히 이를 이용한 방법이 방사선에 대한 감수성을 표적세포인 암세포에서만 증가시켜 방사선 치료 시 정상세포에는 영향을 주지 않고 암세포에만 세포자멸사를 유도하여 제거할 수 있는지 확인하고자 하였다.

2. 세포독성이 없는 낮은 농도의 전자선 조사 후 암세포에서만 세포고사를 유도하는 물질 확인

DMSO 처리 HL-60 세포와 DMSO 미처리 HL-60 세포에서 세포독성을 보이지 않는 1 Gy의 전자선을 이용해 암세포에만 특이적으로 세포자멸사를 유도하는 방법을 찾고자 하였다. 그래서 각 세포에 1 Gy의 전자선을 조사한 다음 3시간 이후에 TNF- α 10 ng/ml을 처리하고 16시간 동안 배양하였다. 그 결과 1 Gy의 전자선을 조사한 DMSO 처리 HL-60 세포에 TNF- α 처리하였더니 세포자멸사에 큰 영향을 주지 않았다[그림 3]. 오히려 세포자멸사를 일부 억제함을 보였다.

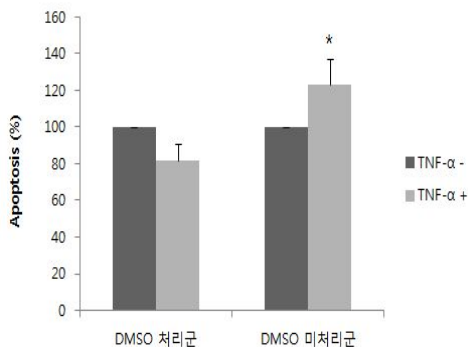


그림 3. DMSO 처리군과 미처리군 HL-60 세포의 세포자멸사에 대한 TNF- α 의 영향

그러나 DMSO 미처리 HL-60 세포에는 TNF- α 를 처

리하였더니 약 30% 정도로 유의하게 세포자멸사가 증가함을 보였다[그림 3]. 이 결과를 통해 낮은 농도인 1 Gy의 전자선은 세포독성에 영향을 주지 않으나 TNF- α 를 같이 처리함으로써 DMSO 미처리 세포인 암세포 HL-60 세포에 세포자멸사를 부분적으로 유도하는 것을 알 수 있다. 그리고 세포의 죽음에 작용하는 caspase cascade 중 최종 실행자인 caspase 3의 발현여부를 확인하였다. Caspase 3는 활성화 되어 최종적으로 세포자멸사를 일으키게 된다[9]. 그래서 각 세포에 1 Gy의 전자선을 조사한 다음 3시간 이후에 TNF- α 10 ng/ml을 처리하고 16시간 동안 배양한 결과 caspase 3의 활성화도가 DMSO 처리군에서는 약간 감소하는 경향을 보인 것에 반해 DMSO 미처리군에서 유의하게 증가한 것을 확인하였다[그림 4]. 이는 TNF- α 에 의한 HL-60 세포의 죽음이 caspase 3의 활성화로 인해 세포자멸사가 유도됨을 나타낸다.

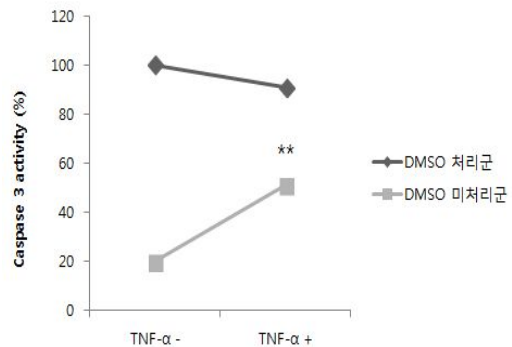


그림 4. DMSO 처리군과 미처리군 HL-60 세포에서 caspase 3의 활성화도에 대한 TNF- α 의 영향

본 연구에서 나타난 바와 같이 TNF- α 는 세포의 종류에 따라 정반대의 작용을 하는 것처럼 다양한 효과를 보인다. 이는 TNF- α 가 세포에게 자극을 줄 때 결합하는 수용체에 의해서도 달리 나타날 수 있다. 주로 TNF- α 는 TNF receptor 1 (TNFR1)과 TNF receptor 2 (TNFR2)로 알려진 두 종류의 transmembrane receptor와 결합하고 그 반응기전은 세포마다 다양하게 작용한다[10]. TNFR1은 대부분의 세포 및 조직에 발현되어 있고, TNFR2는 면역반응 및 세포의 종류에 따라

제한적으로 발현되어 있으면서 세포 증식, 생존, 분화, 세포자멸사 등에 관여한다. 그 중 TNFR1은 세포 밖에서 TNF- α 와 결합하면 세포 내부의 TNFR1과 결합되어 있는 TNF receptor-associated death domain (TRADD), receptor interacting protein-1 (RIP-1), TNFR-associated factor 2 (TRAF2)의 복합체가 떨어져 나온다[11-13]. 떨어져 나온 RIP-1은 mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK) 3에 작용하고 자극 받은 MEKK 3는 IKK, I κ B α 순으로 활성화시키고 최종적으로 NF- κ B의 활성을 유도한다[14][15]. TRAF2 역시 NF- κ B의 활성을 유도한다. 이러한 TNF- α - TNFR1 pathway는 NF- κ B의 활성을 유도를 통해 다양한 세포 활성 및 억제에 작용하게 되고 TNFR2 역시 NF- κ B의 활성을 유도하고 세포 독성 뿐만 아니라 세포자멸사 조절에 관여하게 된다[16]. 또한 TNF- α 는 TNFR와 결합 후 분리되어 나간 FADD가 death-inducing signaling complex (DISC) 활성을 통해 caspase cascade를 자극하게 된다. 먼저 procaspase 8을 자극하여 세포자멸사를 유도하고 이렇게 활성화된 caspase 8은 caspase 9을 거치거나 또는 caspase 3/7을 연속적으로 자극하여 세포자멸사를 실행한다. 본 연구결과에서도 [그림 4]에서 나타난 바와 같이 TNF- α 에 의한 HL-60 세포의 세포자멸사가 caspase 3의 활성 증가를 통해 유도됨을 확인하였다.

IV. 결론

의료기관의 종양학과에서는 표재성 악성종양의 경우 전자선을 조사하는 장비인 선형가속장치(linac)를 이용해 우선적으로 치료를 하고 있다. 본 연구에서 확인한 결과를 바탕으로 전자선과 TNF- α 를 이용하여 암세포에 대한 구체적인 기전 파악 및 효능을 더욱 검증한다면 부작용이 적으면서 효율적인 암세포 억제를 유도하는 혈액암 치료법 개발에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

- [1] R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, and S. W. Lowe, "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy," *Cell*, Vol.8, pp.153-164, 2002(10).
- [2] M. S. "Tallman Retinoic acid syndrome: a problem of the past?," *Leukemia*, Vol.16, pp.160-161, 2002.
- [3] R. E. Callard and A. J. Yates, "Immunology and mathematics: Crossing the divide," *Immunology*, Vol.115, pp.21-33, 2005.
- [4] V. Baud and M. Karin, "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives," *Trends Cell Biol*, Vol.11, pp.372-377, 2001.
- [5] H. Wajant, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, "Tumor necrosis factor signaling," *Cell Death Diff*, Vol.10, pp.45-65, 2003.
- [6] D. Wallach, "Cell death induction by TNF: A matter of self control," *Trends Biochem Sci*, Vol.22, pp.107-109, 1997.
- [7] D. Wallach, A. V. Kovalenko, E. E. Varfolomeev, and M. P. Boldin, "Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: A Sanhedrin verdict," *Curr Opin Immunol*, Vol.10, pp.279-288, 1998.
- [8] F. Mollinedo, R. Lopez-Perez, and C. Gajate, "Differential gene expression patterns coupled to commitment and acquisition of phenotypic hallmarks during neutrophil differentiation of human leukemia HL-60 cells," *Gene*, Vol.419, pp.16-26, 2008.
- [9] A. G. Porter, "Flipping the safely caatch of procaspase-3," *Nature Chemical biology*, Vol.2, pp.509-510, 2006.
- [10] N. Parameswaran and S. Patial, "Tumor necrosis factor- α signaling in Macrophages," *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, Vol.20,

pp.87-103, 2010.

- [11] H. Hsu, J. Xiong, and D. V. Goeddel, "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation," *Cell*, Vol.81, pp.495-504, 1995.
- [12] H. Hsu, J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal, and D. V. Goeddel, "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex," *Immunity*, Vol.4, pp.387-396, 1996.
- [13] M. Takeuchi, M. Rothe, and D. V. Goeddel, "Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins," *J Biol Chem*, Vol.16, pp.19935-1994, 1996.
- [14] M. S. Hayden and S. Ghosh, "Signaling to NF-kappaB pathway," *Genes Dev.*, Vol.18, pp.2195-222, 2004.
- [15] S. Vallabhapurapu and M. Karin, "Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system," *Annu Rev Immunol*, Vol.27, pp.693-733, 2009.
- [16] L. A. Tartaglia, R. F. Weber, I. S. Figari, C. Reynolds, M. A. Jr Palladino, and D. V. Goeddel, "The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses," *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol.88, pp.9292-9296, 1991.

저 자 소 개

김 동 현(Dong Hyun Kim)

정회원



- 2009년 2월 : 부산대학교 의공학과(공학박사)
- 1994년 ~ 2011년 2월 : 부산대학교 병원 영상의학과
- 2011년 3월 ~ 현재 : 부산가톨릭대학교 보건과학대학 방사선

학과 조교수

<관심분야> : 자기공명영상학, 방사선영상학

고 성 진(Seong-Jin Ko)

정회원



- 1997년 8월 : 경성대학교 생물학과(이학박사)
- 1982년 3월 ~ 현재 : 부산가톨릭대학교 보건과학대학 방사선학과 교수

<관심분야> : 방사선생물학, 방사선계측학