

Flow Cytometric Analysis of Apoptosis Inhibition by Silkworm Hemolymph

의원중, 김은정, 박태현

서울대학교 공과대학 응용화학부 세포 및 미생물공학 연구실

Tel (02) 880-1587, FAX (02) 880-7295

Abstract

The effect of silkworm hemolymph on insect cell apoptosis was investigated. The addition of silkworm hemolymph into the culture medium either before or during the baculovirus infection increased the host cell longevity. Silkworm hemolymph also inhibits apoptosis induced by actinomycin D, the RNA synthesis inhibitor. In this study, a flow cytometry was used for the quantitative analysis of apoptosis inhibition by silkworm hemolymph.

1. 서론

배칼로바이러스는 곤충세포에 감염되어 apoptosis라는 능동적이며 프로그램화 되어 있는 세포 죽음을 유도한다. 기존 연구에서 배양 배지에 FBS의 일부를 누에체액으로 대체하였을 경우 곤충세포-배칼로바이러스 시스템에서의 재조합 단백질의 생산량이 증대됨을 보았다¹⁾. 또한, 감염 후 세포의 생존율이 누에체액에 의해 연장이 되었으며²⁾, DNA fragmentation 분석과 TUNEL assay를 통하여 이것이 누에체액의 apoptosis 저해 작용임을 확인하였다³⁾. 본 연구에서는 TUNEL assay와 flow cytometry를 이용하여 누에체액의 곤충세포-배칼로바이러스 시스템에서 apoptosis 저해 효과와 그 외의 apoptosis 유도 물질에 의해 유도되는 apoptosis 저해 작용을 보였다. 또, 누에체액의 바이러스 유전자의 발현에 미치는 영향을 SDS-PAGE를 통하여 분석하였다.

2. 재료 및 방법

Cell line, media 그리고 virus

*Spodoptera frugiperda*는 10% FBS 또는 5% FBS/5% 누에체액이 첨가된 Grace medium에서 배양되었다. 사용된 재조합 바이러스는 *Autographa californica* nuclear polyhedrous virus로 폴리헤드린 프로모터에 의해 β -galactosidase를 생산한다.

세포와 바이러스 단백질

세포의 lysis는 sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer (2% SDS)를 이용

하였다.

Apoptosis 유도 및 분석

바이러스 감염은 multiplicity of infection (MOI) of 13으로 이루어 졌다. Actinomycin D는 200ng/mL으로 사용하였다. TUNEL assay의 경우, 전 과정은 제조사의 방법과 동일하게 실행하였다(BMS). Flow cytometric analysis는 50 μ g/mL propidium iodide로 세포를 염색하였으며, 염색된 세포는 FACSCalibur flow cytometer (B & D)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

누에체액의 apoptosis 저해 효과는 TUNEL assay를 통해서 확인 할 수 있었다. 이 분석에서는 DNA가 많이 절단될수록, 높은 세기의 fluorescence를 나타낸다. 누에체액이 없는 배지에서 배양된 세포에 배쿨로바이러스를 감염시켰을 경우(Fig. 1 (a)), 감염 동안에 누에체액을 처리하였을 경우(Fig. 1 (b))에 비해 더 많은 양의 fluorescence를 보였다. 이 결과는 배쿨로바이러스에 의해 유도된 곤충세포의 apoptosis가 누에체액에 의해 현저하게 저해됨을 보여준다. 이 현상에 대한 한가지 가능한 설명으로서 누에체액이 apoptosis 저해 성분을 포함하고 있음을 들 수 있다. 또 다른 가능성으로서 누에체액의 apoptosis 저해 물질로 알려진 *p35*의 발현 증가를 들 수 있다. Figure 2는 SDS-PAGE 결과이다. 누에체액이 첨가된 배지에서의 β -galactosidase 유전자 등 바이러스 유전자 발현량 증가(lane 5, 6)가 위의 가정의 타당성을 제공하여 준다. 기존 연구²⁾에서 세포가 배쿨로바이러스에 감염되면 세포 생존율이 감염 후 3일 동안 높은 수준으로 유지되었으며, 5%의 누에체액이 첨가된 배지에서는 감염 후 6일 동안 높은 생존율을 나타내었다. 이를 flow cytometer를 이용하여 apoptosis의 진행 정도를 정량화 하였다(Fig. 3). 감염 5일 후 누에체액이 첨가되지 않은 배지(Fig. 3 (a))에서는 apoptotic body (M1)가 전체에 대해 40.5%를 차지하는 반면, 누에체액이 5% 첨가된 배지(Fig. 3 (b))에서는 9.57%로 나타났다. 이는 누에체액이 배쿨로바이러스에 의해 유도된 곤충세포의 apoptosis 저해작용을 정량적으로 설명해 준다. 감염 도중 바이러스 용액에 각각 5%에 해당하는 FBS와 누에체액을 첨가하였을 경우(data not shown) 감염 3일까지는 M1의 비율이 비슷하나, 4일 후부터는 누에체액이 첨가되었을 경우가 12.9%이고, FBS가 첨가되었을 경우는 18%로서 누에체액에 적응된 경우보다는 적지만, 어느 정도 저해 효과를 보였다. 이는 Fig. 1의 결과와도 일치한다. 다른 방법에 의한 apoptosis 유도에 대해서도 누에체액이 저해작용을 갖고 있는지 확인하기 위해 actinomycin D를 사용하였다. Figure 4는 actinomycin D를 200ng/mL로 처리했을 경우의 결과로 누에체액의 actinomycin D에 의해 유도되는 apoptosis에 대한 저해 효과를 보여준다. 이 결과는 누에체액이 갖고 있는 apoptosis 저해 효과가 배쿨로바이러스-곤충세포 시스템으로

만 국한되는 것이 아니라 다른 apoptosis 메커니즘에 대해서도 저해 능력이 있음을

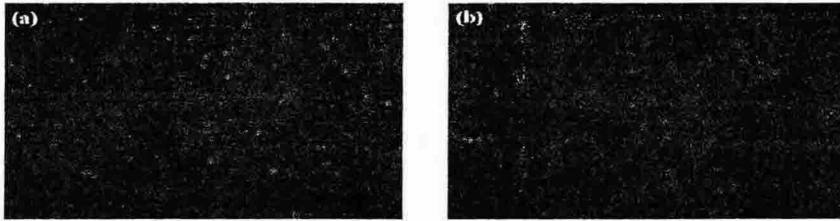


Fig. 1 Inhibition effect of silkworm hemolymph on DNA strand breaks. Cells were infected for 4 day. Cell were either not treated (a) or treated (b) with 5% silkworm hemolymph in the infection step.

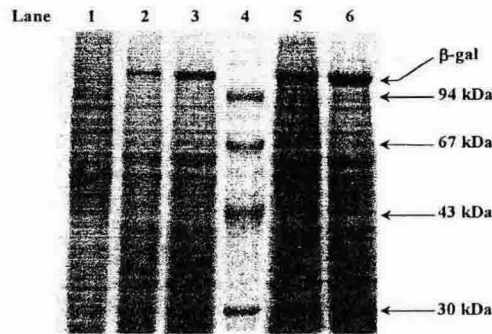


Fig. 2 Silkworm hemolymph enhanced the production of viral proteins.
 lane 1: before infection; lane 2: 2 days after infection in 10% FBS medium; lane 3: 3 days after infection in 10% FBS medium
 lane 4: marker (Size is indicated in the margin)
 lane 5: 2 days after infection in 5% FBS / 5% hemolymph medium
 lane 6: 3 days after infection in 5% FBS / 5% hemolymph medium

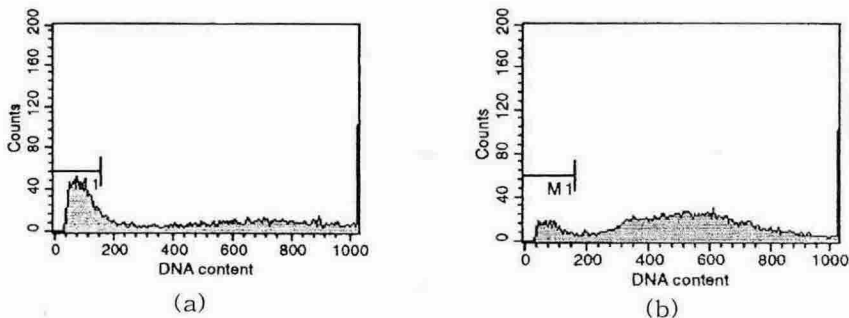


Fig. 3 Flow cytometric analysis of baculovirus-induced insect cell apoptosis (4 days after infection). (a) 10% FBS medium, (b) 5% FBS/5% SH medium

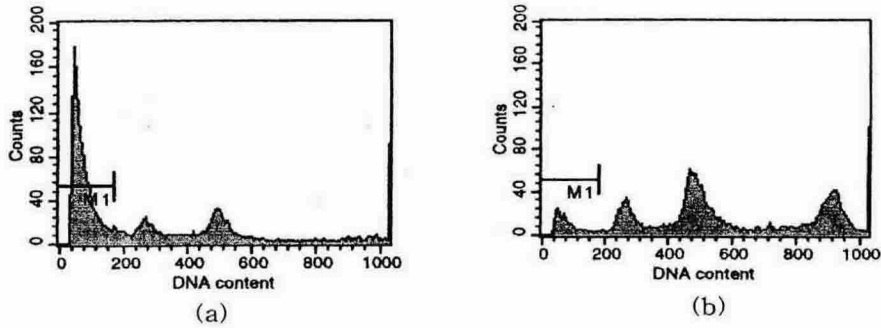


Fig. 4 Flow cytometric analysis of actinomycin D induced insect cell apoptosis (13 hours after actinomycin D treatment). Actinomycin D was treated for 200ng/mL. (a) 10% FBS medium, (b) 5% FBS / 5% SH medium

시사하여 주는 것이며, 또한 포유동물 세포에서 유발되는 apoptosis에 대해서도 저해 능력이 있음을 예측할 수 있다. 따라서, 누에체액 내의 apoptosis 저해 성분을 분리하여, 각 시스템에 대해 어떤 저해 메커니즘을 갖는 지를 알게 된다면 산업적, 의학적으로 많은 응용이 가능할 것으로 기대된다.

요약

배칼로바이러스와 actinomycin D에 의해 유도되는 곤충세포 apoptosis의 누에체액에 의한 저해 효과에 대해 연구하였다. 감염 전 또는 감염 중, 배양 배지에 누에체액을 첨가함으로써 배칼로바이러스에 의해 감염된 숙주 세포의 생존율을 높은 수준으로 유지시켜 주었다. 누에체액은 또한, RNA 합성 저해제인 actinomycin D에 의해 유도된 apoptosis 역시 저해시켰다. 이러한 효과들을 TUNEL assay와 flow cytometry로 확인하였다. 추가적으로, 누에체액은 감염 후 세포 내 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않으나 바이러스 유전자의 발현을 증진시킬 수 있었다.

참고 문헌

1. Ha, S. H. and Park, T. H., "Efficient Production of Recombinant Protein in *Spodoptera frugiperda*/AcNPV System Utilizing Silkworm Hemolymph" (1997), *Biotechnol. Lett.* **19**, 1087-1091
2. Rhee, W. J., Kim E. J., and Park, T. H., "Kinetic Effect of Silkworm Hemolymph on the Delayed Host Cell Death in an Insect Cell-Baculovirus System" (1999), *Biotechnol. Prog.*, **15**, 1028-1032
3. Rhee, W. J. and Park, T. H., "Silkworm Hemolymph Inhibits Baculovirus-Induced Insect Cell Apoptosis" (2000), *BBRC*, **271**, 186-190