

전골수성 백혈병 세포주 HL-60에 대한 Doxorubicin 유발성 Apoptosis와 Anti-Fas 항체 유발성 Apoptosis의 비교

윤경식*^{1,3} · 설지연¹ · 오현정¹ · 이광수¹ · 이원규^{2,4} · 정성철¹
¹국립보건원 특수질환부 유전질환과, ²국립독성연구소 혈액병리과,
³울지의대 생화학교실, ⁴가천의대

Comparison between Doxorubicin and Anti-Fas Antibody induced Apoptosis in Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60

Kyung-Sik YOON*^{1,3}, Ji Yeon SEOL¹, Hyun Jeong OH¹, Kwang Soo LEE¹,
Won Kyu LEE^{2,4}, and Sung Chul JUNG¹

¹Lab of Genetic Disease, Department of Biomedical Science, National Institute of Health, Korea,
²Division of Hematopathology, Department of Pathology, National Institute of Toxicology Research and
³Department of Biochemistry Eulji Medical College,
⁴Gachon Medical College

(Received October 29, 1998; accepted December 7, 1998)

Abstract – Induction of apoptosis is considered to be the underlying mechanism that accounts for the efficiency of chemotherapeutic drugs. It has recently been proposed that doxorubicin (DOX) can induce apoptosis in human leukemic cells via the Fas/Fas Ligand (FasL) system. Comparison of Fas and FasL mRNA expression between drug- and anti-Fas antibody(Fas-Ab)- induced apoptosis was analyzed for examining the role of Fas/FasL system in the mediation of drug-induced apoptosis. After HL-60 cells were routinely cultured, MTT assay was performed for cytotoxicity test. Giemsa staining was carried out to monitor the apoptosis morphologically. By semiquantitative RT-PCR analysis, the expression of Fas and FasL at 4, 10, 24 hours was determined after DOX and Fas-Ab treatment. Dose-dependent cytotoxicity was induced by DOX-treatment, while Fas-Ab treatment showed the similar dose-dependent pattern but the cytotoxicity is not reached at LD₅₀ at 100 ng/ml concentration of Fas-Ab. In the 10ng/ml DOX and 10ng/ml Fas-Ab treated group, typical apoptotic cell morphology was shown such as fragmented nuclei and cell membrane budding in the Giemsa-stained slide. Fas mRNA expression was not changed significantly in the both groups. But, FasL mRNA expression was induced significantly at initial period of apoptosis. In this study, Fas/FasL interaction assumed to be involved in drug-induced apoptosis.

Keywords □ Apoptosis, HL-60, Doxorubicin, Anti-Fas Antibody, Fas Ligand

Apoptosis(세포사망프로그램)의 기전에 밀접한 연관이 있다고 알려진 Fas, FasL 단백질을 이용하여 apoptosis의 이해 및 응용을 위한 광범위한 노력들이 현재 진행되고 있다. Fas 단백질은 세포 표면 수용체로 CD95 또는 APO-1 이라고 하며 Tumor Necrosis Factor(=TNF)/Nerve Growth Factor (NGF) Receptor superfamily에 속하는 45 kDa 분자량의 I형 세포막 단백질이고 생체내 광범위한 조직에서 발현되어 외부 자극으로 oligomerization이 일어나고 이는 다양한 신호전달

경로를 통하여 apoptosis를 매개하는 것으로 알려져왔다(Itoh 등, 1991). Fas에 결합함으로써 세포내 apoptosis를 유발하는 것으로 알려진 Fas Ligand(FasL)는 II형 세포막 단백질로 주로 활성화된 T세포, 정소조직, 안구 등에서 제한적으로 발현하고 TNF family에 속하며 Fas와의 결합으로 세포내 apoptosis 신호전달을 하는 것으로 알려진다(Suda 등, 1993).

항암제 치료시 약물의 분자생물학적 기전 연구에서 최근 apoptosis가 중요한 역할을 담당한다고 알려지고 있는데 Friesen 등(1996)을 통해 알려진 사실은 T-림프구 계열 백혈병세포인 CEM, Jurkat 등에서 약물 유발성 apoptosis의 경

* To whom correspondence should be addressed.

우 FasL의 발현이 증가되어 항암제의 기전에 Fas/FasL의 작용이 중요한 역할을 한다는 것이다. 하지만 Villunger 등 (1997)의 보고에 따르면 항암제의 작용기전으로서 Fas/FasL의 상호작용 뿐 만 아니라 다른 기전이 있을 것으로 예측한 바 있어 아직 Fas/FasL 상호작용의 항암제 작용기전에의 역할에 대한 논란이 있다.

Fas/FasL 결합으로 이루어진 Fas 신호전달체계는 Fas의 세포내 death domain 부위가 FADD 등과 작용하고 이는 다시 caspase라는 proteinase cascade에 의한 신호전달이 주요한 기전으로 작용하고 있다(Antoku K 등, 1997). 이 기전에는 매우 복잡하고 다양한 인자들이 촉진 및 저해작용에 관여하는 것으로 알려지는데 bcl2-family, ceramide, p53 단백질들과의 관련성이 대표적으로 알려져 있다(Vaux와 Strasser, 1996).

항암제의 작용에서 Fas 신호전달체계의 활성화는 백혈병 뿐 아니라 간암(Muller 등, 1997), 신경아세포종(Fulda 등, 1997), 결장암(Micheau 등, 1997), 유방암(Shen과 Novak, 1997)등에서 다양하게 중요성이 인정되고 있다. 하지만 신경외배엽 종양(Fulda 등, 1997), T 세포 백혈병(Eischen 등, 1997) 등에서 약물 유발성 apoptosis에 Fas가 관여하지 않는다는 상반된 의견도 제시되고 있다.

백혈병에서의 Fas 신호전달체계와 관련된 실험들을 살펴보면, T-림프구 계열 Jurkat 세포에서 Fas-Ab 처리 후 apoptosis는 cytochrom c의 관여를 통해 미토콘드리아 기능 소실에 의해 일어난다고 지적하고 있고(Krippner 등, 1996), B 림프구 계열 실험에서는 급, 만성림프성백혈병, 비호치킨병 세포 등에서 CD40의 수용체결합이 Fas 발현을 증가시키고 이는 apoptosis를 유발한다고 보고하고 있다(Wang 등, 1997). 또한 단핵구계열의 U937 세포주에 대한 실험에서도 Fas 유발성 apoptosis가 약물 유발성 apoptosis의 중요한 기전이었고 현재 이를 이용한 새로운 약제개발이 시도되고 있다(Pom-Ares 등, 1997). 한편 조혈전구 세포의 apoptosis는 골수이형성증후군에서 증가되고 이는 Fas 발현증가로 인한다고 알려진다(Bouscary 등, 1997).

이상과 같이 백혈병의 apoptosis에서 Fas, FasL 발현의 증가는 DOX 이외에 carboplatin, etoposide, methotrexate, cytarabine 등의 다양한 항암제의 치료적 농도에서 관찰되었다. 또한 백혈병등에서 흔하게 관찰되는 약제내성은 항암제치료시 수시로 접하게 되는 문제인데 이때 Fas의 역할이 중요할 것이라고 시사하는 보고(Kakahara 등, 1997; Frisen 등, 1997)들도 있다. 본 연구진은 DOX와 FasL의 agonist로 작용하는 Fas-Ab를 사용하여 전골수백혈병 세포인 HL-60을 처리하여 세포생존율과 apoptosis 양상을 관찰하고 Fas 및 FasL mRNA 발현의 연관성을 비교해 봄으로써 약물 유발성 apoptosis에 있어서의 Fas/FasL 상호작용의 중요성을 이해하고자 하였다.

실험방법

세포배양

HL-60세포주는 사람의 급성 전골수성 백혈병 세포주로서 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml)이 첨가된 RPMI1640 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 세포독성실험 및 apoptosis관찰시에는 실험직전 FBS 무첨가배지로 변경하여 사용하였다.

세포독성실험

Fas가 매개하는 세포독성을 알아보기 위해, 6-well tissue culture plate에 5×10^5 cells/ml을 분주하고 DOX(Sigma Chemical Co. USA) 3~400 ng/ml, anti-Fas human monoclonal IgM antibody(anti-Fas Ab, clone CH-11, MBL, Japan) 3~100 ng/ml을 각각의 최종농도별로 첨가하였고 대조군은 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리하였다. 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 3, 24, 48시간 반응시킨 후, 96-well flat-bottom microtiter plates의 각 well에 100 µl씩 분주한 다음, PBS에 용해한 MTT stock solution과 incomplete medium을 첨가하여 MTT의 최종농도가 0.5 mg/ml이 되게 하여 37°C에서 4시간 동안 반응을 시켰다. 1,500 rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액은 제거하고 Sorenson's glycine buffer(0.1M glycine, 0.1M NaCl, pH 10.5)와 isopropanol을 1:1로 혼합한 용액을 150 µl 넣고 침전을 완전히 용해시킨 후, ELISA reader(Molecular Dynamics Co. USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Apoptosis 확인(Giemsa staining slide)

상기의 약물 및 항체처리 세포들을 슬라이드 글라스위에 100 µl 점적하고 10% methanol 용액으로 5분간 고정한 후 공기중에 말리고 modified Giemsa solution(Sigma Chemical Co., USA) 20 µl씩을 점적하여 10분간 염색하고 증류수로 2회 세척, 건조한 후 Apoptosis의 형태학적인 특징들을 관찰하였다.

Semiquantitative RT-PCR

Apoptosis를 유발하고 이 때 Fas와 FasL의 발현을 관찰하기 위하여 Villunger 등과 Friesen 등의 실험을 참고하여 적정농도인 DOX, Fas-Ab 각각 10 ng/ml 씩을 4, 10, 24시간 반응하여 세포들을 Ultraspec™ RNA kit(Biotecx, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하고, UV 분광광도계로 260 nm에서 흡광도를 측정하여 각각의 농도를 1 µg/ml로 맞추었다. Total RNA 2 µg에 oligo(dT) primer를 넣어 15 µl로 하여 70°C에 5분간 반응시킨 다음, 곧바로 얼음속에 넣었다. 여기에 M-MLV RT 5×reaction buffer, 25 mM dNTP, Recombination RNasin Ribonuclease inhibitor(25U, Promega, USA), M-MLV Reverse Transcriptase(200U, Promega)를 넣고 총 25 µl 용량으로 하여 42°C에서 60분간 반

Table I. Used Primer and the result size for PCR

Primer		Nucleotide sequence	Result size
GAPDH	Sense	accacagtcctatgccatcac (948-967)	451 bp
	Antisense	tccaccaccctgttgctgta(1399-1380)	
Fas	Sense	ctcagtagggaggtggggaa (143-162)	1098 bp
	Antisense	aattgcatactcagaactg (1241-1221)	
FasL	Sense	aggactgagaagaagtaaaa (134-153)	966 bp
	Antisense	ctgaatacaacattctcggg (1100-1081)	

응시켰다. 생성된 first-strand cDNA에 Taq DNA polymerase(TaKaRa, Japan)를 사용하여 PCR(Perkin Elmer, 2400, USA)을 하였다. 반응 혼합물은 94°C, 5분간 변성시킨 다음, house keeping gene인 GAPDH경우엔 21cycle, Fas는 30cycle, FasL는 33cycle을 반응시켰다.

이때 증폭조건은 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초로 하였다. 시발체로는 Table I의 시발체들을 사용하여 증폭하여 특이적인 band를 관찰하였다. PCR의 annealing 온도에 대한 점검을 통하여 60°C를 정하였고 기하급수적인 양상으로 증폭되는 회수를 검사하여 각각의 반응 회수를 설정하였다. 1% agarose 전기영동 후 2 µg/µl Ethidium Bromide 용액에서 5분간 염색하고 자외선 하에서 관찰하고 band의 농도를 TINA Image Analyzer(Ver. 2.09 g)를 이용하여 분석하였다. 이때 대조군으로는 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였고 대조군에 비해 증가된 정도를 비교하였다.

실험결과

DOX과 Fas-Ab에 의한 세포생존을 검사

HL-60 세포주에 약물과 항체를 각 농도별로 처리했을 때, 약물처리군의 경우 최종농도 3 ng/ml의 저농도처리시 오히려 세포생존율이 대조군에 비하여 증가하는 양상을 보였고 16 ng/ml의 농도에서부터는 농도의존적인 세포생존율의 변화를 관찰할 수 있었다. 특히 400 ng/ml이상의 고농도 처리시 세포생존율이 24시간에서부터 급격히 감소하는 양상을 보였다(Fig. 1A).

항체처리군의 경우 저농도에서는 농도구배에 따른 세포생존율을 보였다. 즉 3-6 ng/ml의 저농도에 비해 25 ng/ml 이상의 고농도군에서는 24시간에 약 75%, 48시간에 70%, 72시간에 55% 정도의 세포생존율의 변화로 농도에 따른 세포생존율의 변화가 관찰되었으나 25 ng/ml 이상의 농도에서는 세포생존율의 변화양상이 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

Apoptosis 확인

HL-60세포에 약물 및 항체처리시 apoptosis로 진행되는 것을 형태학적인 변화로 알아보기 위해 농도별로 DOX과

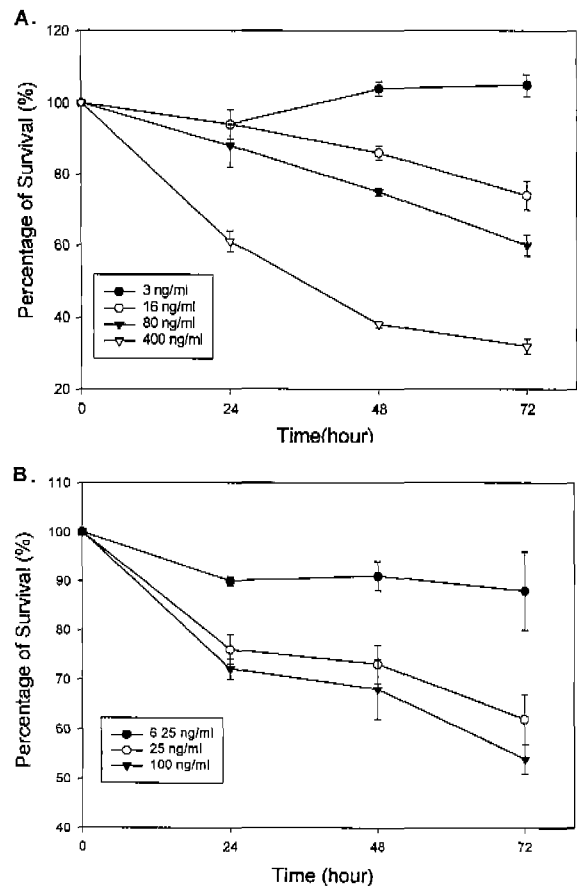


Fig. 1. Percentage survival of HL-60 cell with varying concentration. Dose- and time-dependent induction of apoptosis in HL-60 cell was shown in A) DOX-treated HL-60 cell and B) Fas-Ab-treated HL-60 cell. Data are mean \pm SD of triplicate results. Cell viability was determined by the MTT assay.

Fas-AB로 처리하고 24, 48시간 경과후, Giemsa 염색을 한 결과, apoptosis의 특징인 cell membrane blebbing, apoptotic body, 염색체 농축 및 핵의 분절등을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이 때 피사의 조직학적인 특징인 세포막 파괴 등은 관찰되지 않았다. 세포의 형태학적인 특징은 저농도군(DOX 3-16 ng/ml, Fas-Ab 6.25-25 ng/ml) 및 고농도군(DOX 80-400 ng/ml, Fas-Ab 100 ng/ml)에서 큰 차이를 보이지 않았지만 고농도군의 세포배양시 Apoptosis의 특징적

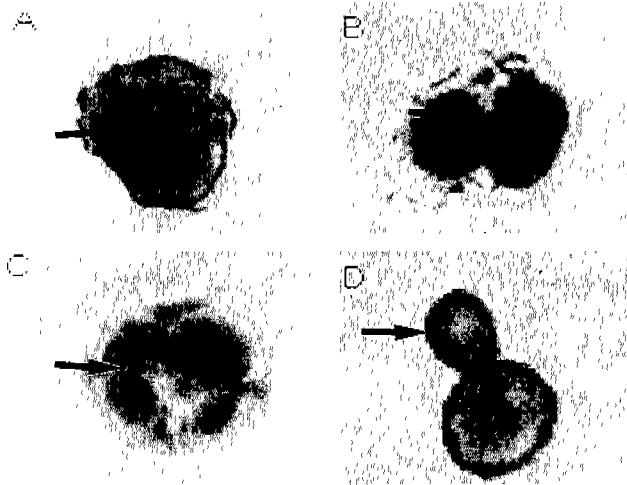


Fig. 2. Morphological examination of Apoptotic cell by Giemsa staining.

- A) anti Fas-Ab 12.5 ng/ml 24 hr treated cell (×400)
- B) DOX 3.2 ng/ml 24hr treated cell (×400)
- C) anti Fas-Ab 100ng/ml 48hr treated cell (×400)
- D) DOX 16 ng/ml 48hr treated cell (×400)

Arrow in A), B), C) indicate a typical apoptotic cell with fragmented nuclei. And arrow in D) indicate a cell membrane budding. Cell was stained with Giemsa solution and photographed under LM microscopy (magnification, ×400).

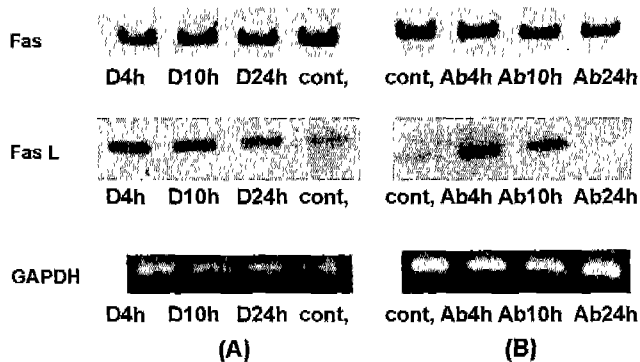


Fig. 3. Fas, FasL, GAPDH mRNA expression. Semiquantitative RT-PCR of Fas and FasL mRNA after DOX treated and Fas-Ab treated HL-60 cell is seen. After DOX and Fas-Ab treatment, Increased expression of FasL is seen at 4 hr and gradually decreased at 10, 24 hr. GAPDH was used as internal control for semiquantitative RT-PCR. (D4H, D10H, D24H indicates 4, 10, 24 hr DOX treatment, and Ab4H, Ab10H, Ab24H does 4, 10, 24 hr Fas-Ab treatment)

인 세포들이 더 많이 관찰되었다.

Fas와 FasL mRNA 발현의 변화(Fig. 3)

형태학적인 특징과 세포생존율을 고려하여 apoptosis를 유발할 수 있는 저농도로 처리한 후의 Fas 및 FasL mRNA의 발현양상을 비교관찰하였다. 10 ng/ml 농도의 DOX를 처리한 지 4시간 경과후 FasL 발현은 약 4배 정도 증가하였다가 10시간에서는 3.2배 증가, 24시간에는 1.5배 정도로 감소하

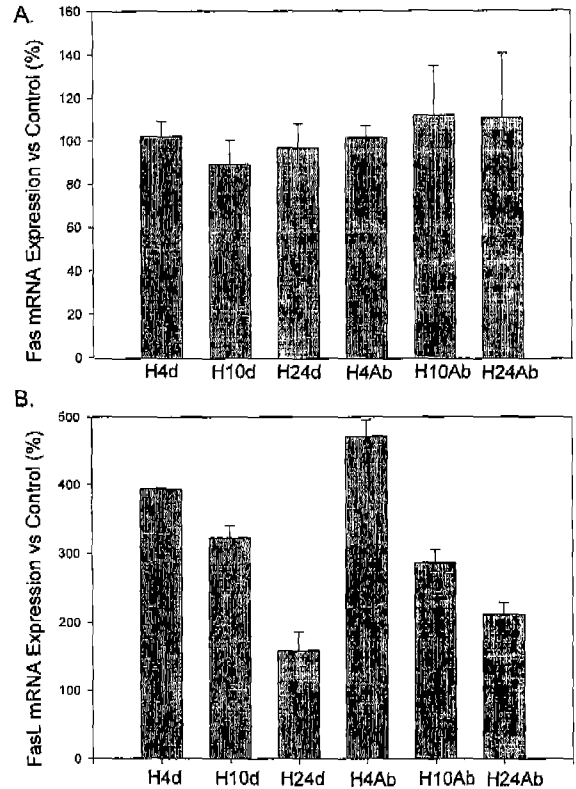


Fig. 4. Comparison between DOX treated and Fas-Ab treated HL-60 cell

- A) Fas mRNA expression pattern in 4 hr, 10 hr, 24 hr
 - B) FasL mRNA expression pattern in 4 hr, 10 hr, 24 hr
- The data shown are from a representative experiment of three independent experiments performed. (D4H, D10H, D24H indicates 4, 10, 24 hr DOX treatment, and Ab4H, Ab10H, Ab24H does 4, 10, 24 hr Fas-Ab treatment)

는 양상을 보인 반면 Fas 발현은 대조군에 비해 증가 및 감소의 변화가 나타나지 않았다. 그러나 10 ng/ml 농도의 Fas-Ab 처리시에는 4시간에서 FasL 발현이 4.7배, 10시간에서 2.9배, 24시간에서 2.1배 증가되는 양상을 보였고 Fas 발현은 DOX 처리군과 같게 유의하게 증가하거나 감소하지 않았다. DOX 처리군과 Fas-Ab 처리군 모두 FasL 발현은 유사한 양상이었는데, 4시간에서 최고치에 이르렀다가 시간의 경과에 따라 감소하는 경향을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 4A, B).

고 찰

Fas/FasL 상호작용의 apoptosis에서의 중요성은 백혈병이 외에 피부각질세포에 대한 자외선 조사시 Fas, FasL 발현의 증가(Levercus 등, 1997). 면역관용이 알려진 고환내 생식세포에서 apoptosis(Lee 등, 1997), 이를 이용한 기관이식 등의 시도 등이 활발히 이루어지며 많은 것들이 밝혀지고 있다. 또한 Fas 매개 신호전달과정에 대해서는 임파구의

apoptosis에서 ceramide를 통한 Ras, Rac단백질들의 조절에 의하여 세포사망과 성장 및 분화의 다양한 반응들이 유도될 수 있다는 사실이 밝혀져 있다(Gulbin 등, 1997).

이러한 Fas/FasL 상호작용의 중요성에 덧붙여 백혈병의 치료적인 관점에서 고찰하여 보면 항암제처리시 세포생존율의 변화와 Fas/FasL 발현양상이 항체처리군과 비교할 때 유사성을 보이고는 있지만 약물 유발성 apoptosis가 단순히 Fas/FasL 상호작용만으로는 일어날 것이라고 설명하기는 어려웠다. 즉 Fig. 4.(A, B)에서 두 군 모두 Fas/FasL 발현양상은 유사한데 비해 Fig. 1.(A, B)의 세포생존율 변화는 약물처리군의 경우 고농도에서 50%이하로 현저히 세포생존율이 저하되는 반면 항체처리군의 경우 일정농도 이상에서는 더 이상의 세포생존율이 변화하지 않는 양상이었고 100 ng/ml의 고농도에서 72시간 처리해도 50% 이상의 세포생존율을 보였주었다.

DOX, Fas-AB 처리 모두 apoptosis때 나타나는 세포의 형태학적 특징들인 핵의 농축 및 분획과 apoptotic body 등이 세포막 주위에 형성되어짐을 Fig. 2.에서 관찰할 수 있었는데, 이는 단핵구계열 백혈병세포주인 U937세포에 대한 etoposide 처리시 나타나는 세포의 형태학적인 변화와 비교할 때 유사한 결과였다(Dubrez 등, 1996).

저농도의 약물, 항체처리군에서 Fas 및 FasL 발현양상은 DOX 및 Fas-Ab 처리군 모두에서 Fas mRNA의 발현은 변화가 없었던 반면 FasL mRNA의 발현은 두 군 모두에서 4시간 처리시 FasL 발현은 DOX처리시 4배 Fas-AB 처리시 4.7배정도로 현저히 증가되어 있었고 10시간에서 3.2배, 2.9배 정도 증가되어 있었고 24시간에서는 1.5배, 2.1배 정도로 점차 감소되어 가는 양상을 보였다. DOX, Fas-Ab 처리군 모두 FasL 발현이 조기에 일어나고 이는 Fas/FasL 상호작용을 통하여 다양한 세포내 신호전달과정이 진행되어 24, 48, 72시간에 걸쳐서 apoptosis를 유발함으로써 세포생존율의 변화를 유발할 것으로 추정하였다. 또한 HL-60세포에서 약물, 항체처리군 모두에서 Fas 발현은 대조군에 비해 큰 차이가 없는 것을 고려하여 볼 때 FasL 발현증가가 apoptosis를 증가시키는 주요한 기전일 것이라는 생각을 하였다. HL-60세포에 Fas-Ab를 처리하여 실험한 Furukawa 등(1996)의 보고에 의하면 세포주기의 영향, 특히 *cdc2* 유전자의 promotor에 존재하는 Fas-responsive element의 작용으로 세포주기 변동이 생겨 이러한 세포생존율의 변화가 초래된 것으로 추정된다.

Fas 발현이 차이가 없다는 결과는 골수암세포와 Plasmacytoma들에 대한 Fas-Ab처리시 Fas 발현이 세포생존율과 밀접한 연관이 있다는 보고(Villunger 등, 1997)와는 다른 결과였다. 이러한 차이는 백혈구세포의 분화과정중에 나타나는 변화로 인한 것이라고 추정하였고 DOX 및 Fas-Ab 처리군에서 FasL 발현이 증가되는 것은 외부의 자극에 대하

여 백혈구가 개체의 보존을 위해 FasL 발현을 유도하고 이러한 FasL 발현이 in vitro 배양환경내의 백혈구세포들의 세포사망프로그램을 유발하는 것이 아닐까 추정하였다.

두 군에서 Fas와 FasL 발현양상은 큰 차이를 발견할 수 없었던 데 비해 저농도 및 고농도군의 DOX, Fas-Ab 처리시의 세포생존율 변화가 다른 점을 고려한다면 DOX의 세포막내 작용기전 뿐 아니라 핵의 손상 등의 작용기전이 FasL mRNA 발현 상승이외의 기전으로 존재할 것으로 생각되었고 Gamen 등(1997)이 주장하는 Fas 비의존적 경로에 의한 apoptosis기전 또한 그 가능성일 것으로 생각되었다.

저자는 고찰을 통하여 Fas/FasL의 상호작용은 세포내에 존재하는 다양한 조절요소들을 함께 관찰함으로써 전체적인 이해가 가능해질 것으로 예측되었는데 그 예로서 조절요소들인 *bcl2* family, p53 등의 관련을 보고한 논문들을 살펴보면 다발성 골수종세포들을 대상으로 한 실험에서는 Fas와 Bax의 발현이 상관관계에 있다고 밝히고 있고(Egle 등, 1997), 간암세포인 HepG2, Huh7, Hep3B세포에 대해 항암제 bleomycin, cisplatin, methotrexate 등을 처리한 Muller 등(1997)은 p53 의존적인 양상으로 Fas, FasL 발현의 증가가 항암제의 기전에 중요하고 약제에 대한 감수성, 저항성의 결정에 Fas 신호전달이 중요하다고 지적한 바 있다.

최근 Suda 등(1996)에 의해 수용성 FasL의 기전이 설명되면서 점점 더 다양한 기전들이 복합적으로 작용하고 있음이 밝혀지고 있는데 Tanaka 등(1998)은 metalloproteinase의 작용에 의하여 수용성인 상태로 존재하는 FasL의 기능이 기존의 지식과는 다르게 세포독성 T 세포에 대한 보호기능이 있다는 것을 밝힌바 있다.

실험결과를 토대로 종양에서의 Fas/FasL 체계의 이용을 고려하여 보면 DOX 뿐만이 아니라 Fas-Ab가 백혈병세포에 세포독성을 줄 수 있고 이들의 작용기전에는 차이가 있을 것으로 생각되므로 Fas-Ab의 세포독성기능을 복합적으로 이용하면 백혈병 및 종양치료에 우수한 효과를 보일 것으로 추정된다. 이러한 추정은 방광암에서 DOX의 처리가 Fas 매개성 세포독성에 상호협력적으로 작용하고 Fas-Ab의 동시투여가 항암효과에 더욱 좋다는 보고(Mizutani 등, 1997)와 일맥상통한다고 할 수 있다.

추가적으로 Fas, FasL의 상호작용에 대한 자세한 고찰을 위하여 Fas 신호전달체계에 주요한 구성요소들인 FADD, caspase에 대한 발현양상을 분석한다면 전체적인 apoptosis에 있어서 Fas/FasL 상호작용의 역할과 항암제의 기전을 이해하는데 많은 도움이 될 수 있을 것으로 예상된다.

결 론

전골수성백혈병세포 HL-60에 있어서 DOX에 의한 사망 기전은 전형적인 apoptosis에 의해서 이루어 졌고 이는 농

도 의존적인 apoptosis로 나타났던 반면, FasL와 동일한 기능을 하는 Fas-Ab 처리시 저농도에서는 농도의존적이었지만 25 ng/ml이상의 농도에서는 농도에 따른 변화를 관찰하기 어려웠다. 이들 DOX 및 Fas-Ab 처리군에 있어서 Fas 매개 신호전달체계의 역할을 Fas/FasL mRNA의 발현을 토대로 분석하여 본 결과 두 군 모두에서 Fas 발현양상은 큰 변화가 없었던 반면 FasL 발현양상은 4, 10, 24시간에서 증가되어 있었고 4시간에서 가장 높은 발현양상을 관찰할 수 있었다. 전골수성백혈병에서 DOX를 사용하는 경우 그 작용기전은 Fas 의존적이기보다는 FasL 의존적인 기전일 것으로 생각되었고 Fas-Ab와 동시 투여할 경우 좋은 효과를 얻을 수 있을 것으로 추정된다.

참고문헌

- Antoku, K., Liu, Z., and Johnson, D. E. (1997). Inhibition of caspase proteases by CrmA enhances the resistance of human leukemic cells to multiple chemotherapeutic agents. *Leukemia*, **11**, 1665-1672.
- Bouscary, D., DeVos, J., Guesnu, M., Jondeau, K., Viguier, F., Melle, J., Picard, F., Dreyfus, F. and Fontenay-Roupie, M. (1997). Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, **11**, 839-845.
- Dubrez, L., Savoy, I., Hamman, A., and Solary, E. (1996). Pivotal role of a DEVD-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways. *EMBO. J.* **15**, 5504-5512.
- Egle, A., Villunger, A., Marschitz, I., Kos, M., Hittmair, A., Lukas, P., Grunewald, K., and Greil, R. (1997). Expression of Apo-1/Fas (CD95), Bcl-2, Bax and Bcl-x in myeloma cell lines: relationship between responsiveness to anti-Fas mab and p53 functional status. *Br. J. Haematol.* **97**, 418-428.
- Eischen, C. M., Kottke, T. J., Martins, L. M., Basi, G. S., Tung, J. S., Earnshaw, W. C., Leibson, P. J. and Kaufmann, S. H. (1997). Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood*, **90**, 935-943.
- Friesen, C., Fulda, S. and Debatin, K. M. (1997). Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia*, **11**, 1833-1841.
- Friesen, C., Herr, I., Peter, H. K. and Debatin, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemic cells. *Nature. Med.* **2**, 574-577.
- Fulda, S., Friesen, C., Los, M., Scaffidi, C., Mier, W., Benedict, M., Nunez, G., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Debatin, K. M. (1997). Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* **57**, 4956-4964.
- Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I. and Debatin, K. M. (1997). The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **57**, 3823-3829.
- Furukawa, Y., Iwase, S., Terui, Y., Kikuchi, J., Sakai, T., Nakamura, M., Kitagawa, S. and Kitagawa, M. (1996). Transcriptional activation of the cdc2 gene is associated with Fas-induced apoptosis of human hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 28469-28477.
- Gamen, S., Anel, A., Lasierra, P., Alava, M. A., Martinez-Lorenzo, M. J., Pineiro, A. and Navel, J. (1997). Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS. Letters.* **417**, 360-364.
- Gulbins, E., Coggshall, K. M., Brenner, B., Schlottmann, K., Linderkamp, O. and Lang, F. Fas-induced apoptosis is mediated by activation of a Ras and Rac protein-regulated signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 26389-26394.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. and Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, **66**, 233-243.
- Kakihara, T., Fukuda, T., Kamishima, T., Naito, M., Tanaka, A., Uchiyama, M. and Kishi, K. (1997). Resistance to apoptosis induced by serum depletion and all-trans retinoic acid in drug-resistant leukemic cell lines. *Leuk. Lymphoma*, **26**, 369-376.
- Krippner, A., Matsuno-Yagi, A., Gottlieb, R. A. and Babior, B. M. (1996). Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 21629-21636.
- Lee, J., Richburg, J. H., Younkin, S. C. and Boekelheide, K. (1997). The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, **138**, 2081-2088.
- Leverkus, M., Yaar, M. and Gilchrist, B. A. (1997). Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp. Cell. Res.* **232**, 255-262.
- Micheau, O., Solary, E., Hammann, A., Martin, F. and Dimanche-Boitrel, M. T. (1997). Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J. Natl. Cancer. Inst.* **89**, 783-789.
- Mizutani, Y., Okada, Y., Yoshida, O., Fukumoto, M. and Bonavida, B. (1997). Doxorubicin sensitizes human bladder carcinoma cells to Fas-mediated cytotoxicity. *Cancer*, **79**, 1180-1189.
- Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Krammer, P. H. and Galle, P. R. (1997). Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p. 53. *J. Clin. Invest.* **99**, 403-413.
- Porn-Ares, M. I., Chow, S. C., Slotte, J. P. and Orrenius, S. (1997). Induction of apoptosis and potentiation of TNF- and Fas-mediated apoptosis in U937 cells by the xanthogenate compound D609. *Exp. Cell. Res.* **235**, 48-54.
- Shen, K. and Novak, R. F. (1997). Fas-signaling and effects on receptor tyrosine kinase signal transduction in human

- breast epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 89-93.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. **75**, 1169-1178.
- Suda, T., Tanaka, M., Miwa, K. and Nagata, S. (1996). Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. *J. Immunol.* **157**, 3918-3924.
- Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. and Nagata, S. (1998). Down-regulation of Fas ligand by shedding. *Nature. Med.* **4**, 31-36.
- Utz, P. J., Hottellet, M., Schur, P. H. and Anderson, P. (1997). Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **185**, 843-854.
- Vaux, D. L. and Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 2239-2244.
- Villunger, A., Egle, A., Kos, M., Hartmann, B. L., Geley, S., Kofler, R. and Greil, R. (1997). Drug-induced apoptosis is associated with enhanced Fas (Apo-1/CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (Apo-1/CD95) signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res.* **57**, 3331-3334.
- Villunger, A., Egle, A., Marschitz, I., Kos, M., Bock, G., Ludwig, H., Geley, S., Kofler, R. and Greil, R. (1997) Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood.* **90**, 12-20.
- Wang, D., Freeman, G. J., Levine, H., Ritz, J. and Robertson, M. J. (1997) Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *Br. J. Haematol.* **97**, 409-417.