Trichoplusia ni 세포의 apoptosis 메커니즘 규명을 위한 기초연구

이종민 · 양재명[1] · 이윤형 · 정인식*

경희대학교 유전공학과, [1]서강대학교 생명과학과

(2000년 12월 15일 접수, 2001년 1월 19일 수리)

본 연구에서는 *Trichoplusia ni* 세포의 apoptosis 유도 및 억제 현상의 기초연구를 수행하였다. Apoptosis 유도제로 알려진 hygromycin B에 의한 세포 성장 저해는 200 μg/ml의 수준에서부터 나타났고, 400 μg/ml hygromycin B를 처리한 세포에서는 배양 후 2일부터 DNA가 분절되어지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 dexamethasone과 sodium butyrate를 첨가시 세포성장은 저해되었지만 DNA 분절현상이 보이지 않아 apoptosis의 유발여부를 확인할 수 없었다. 그리고 caspase 기능억제제의 apoptosis 지연효과를 보기 위해 200 μg/ml hygromycin B로 apoptosis를 유발한 상태에서 Ac-DEVD-CHO를 첨가하여 세포성장을 비교해 본 결과 이 저해제에 의해 약 36% 정도 apoptosis가 억제되었음을 확인하였다. *N*-acetylcysteine의 경우도 apoptosis 지연 효과가 있었다. *Bcl*-계에 속하는 anti-apoptotic 유전자의 발현연구로서 apoptosis 저해 단백질인 *bcl*-2 유전자를 곤충세포에 형질전환시킨 후 이 단백질이 한시적으로 발현되는 것을 western blot 분석법으로 확인하였으며 apoptosis가 지연된 곤충세포주의 개발이 가능하다는 결론을 보였다.

Key words : *Trichoplusia ni*, apoptosis, DNA 분절현상

서 론

배양중에 곤충세포는 necrosis 또는 apoptosis에 의해 사멸이 일어난다. Necrotic 사멸은 membrane integrity가 물리 및 화학적 손상에 기인하는 것으로 세포가 팽창한 후 삼투압에 의해 파열된다. 이러한 necrosis와는 다르게 apoptosis는 세포유전자, 효소 및 신호전달 체계에 의해 일어나는 일련의 반응이다. 세포는 크로마틴과 세포질내 소기관이 응축되기 전에 상당한 부피감소를 유발한다. 세포막융기 돌출현상(membrane blebbing)이라는 과정을 거쳐 부풀어 오르며 응축된 핵은 붕괴된다. Apoptosis는 진핵세포에서 신경 및 면역계의 발달, 바이러스 증식의 억제, 암발달 억제 등의 중요한 역할을 수행한다.[1] 곤충세포는 생물반응기내에서 배양되고 다양한 물질의 생산에 이용되고 있는 현실을 고려해 볼 때 이러한 배양중 세포들의 생존시간 연장은 생물공정의 생산성 증가에 크게 기여할 수 있다고 생각된다.

Apoptosis는 세포예정사(programmed cell death: PCD) 로서 초기단계(initiation phase), 작동단계(signalling phase), 및 분해단계(degradation phase) 등의 3 단계로 구성된다.[1] 초기단계는 세포에 각종 화학적, 생화학적 및 유전적인 자극이 가해지는 단계이다. 일단 apoptosis가 시작되면 신호전달단계 중에 자극이 세포조직을 통해 전달된다. 이 단계에서는 여러 유전자가 발현되어 조절기능을 수행하게 된다. 이들 중 *bcl*-2 계는 apoptosis cascade에서 중요한 역활을 수행하고 있는 것으로 알려져 있다.[2-3] 특히 *bcl*-2, *bcl*-x_L, *mcl*-1, *E1B-19K* 및 BHRF-1 등은 apoptosis를 억제하고 *bax*, *bcl*-x_s, *bad*와 *bak*는 apoptosis를 촉진하는 유전자로 추측되고 있다.[4-5] 최근 연구에 의하면 외부자극에 대하여 *bcl*-2와 *bcl*-x_L이 apoptosis를 저해, 미토콘드리아 막전위 조절 및 cysteine protease(caspase, ICE-like protease)계의 기능 조절에 관여함이 보고되었다.[6-8] 미토콘드리아 막 투과성의 변형과 caspase의 활성화는 PCD를 유도하는 효과기 단계에서 중요한 요인이다. 그리고 caspase의 활성이 저해되지 않으면 효과기 단계의 생화학적인 변화는 apoptosis의 최종 단계인 분해단계로 가게 된다. 이 단계에서 특징적인 변화는 세포 원형질막 있는 phosphatidylserine의 노출, 거대분자의 합성저해, endonuclease, protease 등의 활성화 등이다. 이러한 변화는 핵의 lamina 분해, 세포골격의 변화, 세포체의 파괴 등을 유도한다.[8]

곤충세포를 이용한 유용단백질 생산공정에서 발현체계 및 기능 개선과 관련되어 apoptosis의 지연 또는 억제에 의한 세포 발현 시스템의 향상은 산업적으로 유용한 단백질의 대량생산에서 생산성을 극대화하는 획기적인 체계가 될 것이다. 현재 국내에서는 이종의 단백질을 발현하는 발현체계로써 곤충세포를 이용하는 연구는 많이 수행되고 있으나 이들 발현체계 및 기능 개선에 관한 연구는 미진한 상태이다.

본 연구는 여러 곤충 세포주 중에서 *Trichoplusia ni*(*T. ni*) 세포의 apoptosis 기작을 규명하기 위해 apoptosis 유도 및 억제 현상의 기초 연구를 수행하였다. 주요 apoptosis 유도제와 기타 apoptosis 유도제 등의 *T. ni* 세포 apoptosis와의 관계, caspase 기능억제제 또는 기타 apoptosis 저해제 처리와 곤충세포 apoptosis 지연과의 관계 등을 조사하였다. 아울러 *bcl*-계에 속하는 anti-apoptotic 유전자의 한시적인 발현연구도 수행하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 세포 apoptosis 확인. *T. ni*(High five) 세포는 무혈청배지인 Sf900II-SFM(Gibco-BRL, USA)를 사용하여 배양

*연락저자
Phone : 82-31-201-2436; Fax : 82-31-202-9885
E-mail : ischung@khu.ac.kr

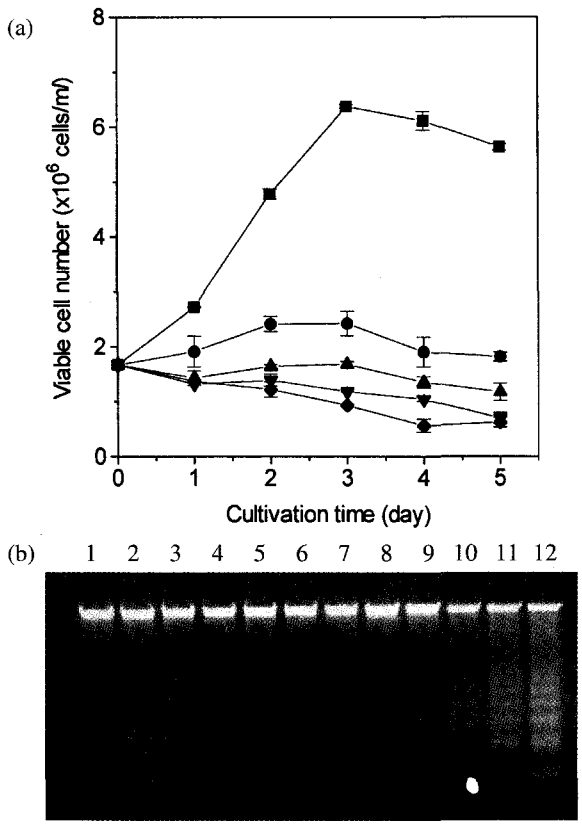

Fig. 1. Effect of hygromycin B on cell growth (a) and agarose gel electrophoresis of genomic DNA from *T. ni* (High five) cells treated with hygromycin B (b). (a) ■: 0; ●: 200; ▲: 400; ▼: 800; ◆: 1000 μg hygromycin B/m*l*, (b) 1-6: 0-5 day, without hygromycin B; 7-12: 0-5 day, with 400 μg/m*l* hygromycin B.

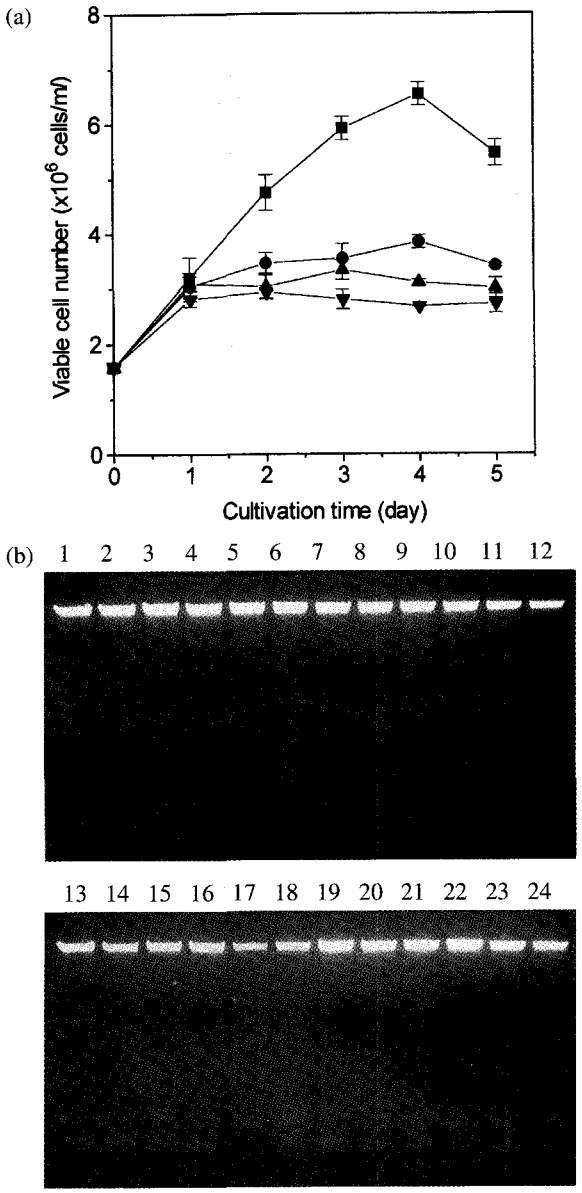

Fig. 2. Effect of dexamethasone on cell growth (a) and agarose gel electrophoresis of genomic DNA from *T. ni* cells treated with dexamethasone (b). (a) ■: 0; ●: 25; ▲: 50; ▼: 100 μM dexamethasone, (b) 1-6: 0-5 day, 0 μM; 7-12: 0-5 day, 25 μM; 13-18: 0-5 day, 50 μM; 19-24: 0-5 day, 100 μM dexamethasone.

하였고, 3-4일 간격으로 새로운 배지를 공급해 주었다. 그리고 세포배양을 위해 T-25(Nunc, Denmark) flask를 이용하였으며 온도는 27℃에서 유지되었다. QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 apoptosis가 일어나는 *T. ni* 세포(2×10^6 cells/m*l*)에서 genomic DNA를 추출하였다. 또한 1.8% agarose gel상에서 이 DNA를 전기영동한 후, apoptosis가 유발된 세포의 특징 중 하나인 DNA의 분절현상(fragmentation)을 관찰하였다.

Apoptosis 유도제의 처리. Hygromycin B, dexamethasone, 그리고 sodium butyrate의 농도를 변화시키면서 *T. ni* 세포에 처리한 후, 각 처리제의 농도에 따른 apoptosis 유발 정도를 측정하였다. 먼저 hygromycin B(DUCHEFA, Netherlands)에 의한 *T. ni* 세포 생존에 미치는 영향을 검토하기 위해서 5일 동안 0, 200, 400, 800, 1000 μg/ml의 hygromycin B를 농도별로 처리한 후 세포 성장 정도를 확인하였고 이때의 세포 성장 저해가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위해서 각 시간에 따른 genomic DNA를 추출하여 전기영동한 후 DNA의 분절현상을 관찰하였다. 그리고 dexamethasone(Sigma, USA)은 위와 같은 방법을 적용하여 0, 25, 50, 100 μM의 농도별로 세포 성장저해 및 DNA 분절발생 여부를 검토하였다. 또한 sodium butyrate(Sigma, USA)의 경우도 첨가농도를 0, 2.5, 5, 10 mM로 달리하여 실험을 수행하였다.

Caspase 기능억제제 처리. Apoptotic 대사경로에 관련된 caspase 기능억제 현상을 연구하기 위해 caspase 기능억제제를 *T. ni* 세포에 처리하였다. Caspase 기능억제제는 포유류 세포에서 존재하고 있는 것으로 알려지고 있는 caspase 3에 대한 저해제 acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde(Ac-DEVD-CHO)(Pharmingen, USA)를 DMSO에 녹인 후, 배양 초기의 *T. ni* 세포에 최종농도가 200 μg/m*l*이 되도록 hygromycin B를 처리하고 동시에 이 저해제를 1, 10, 25, 50 μM로 각각 처리하여 4일간 세포를 배양한 후 apoptosis가 유발된 상태에서 hygromycin B를 처리하지 않은 세포의 성장 또는 200 μg/m*l* hygromycin B만 처리한 세포의 성장정도와 비교 분석하였다.

기타 apoptosis 저해제의 처리. Apoptosis 지연기능을 갖고

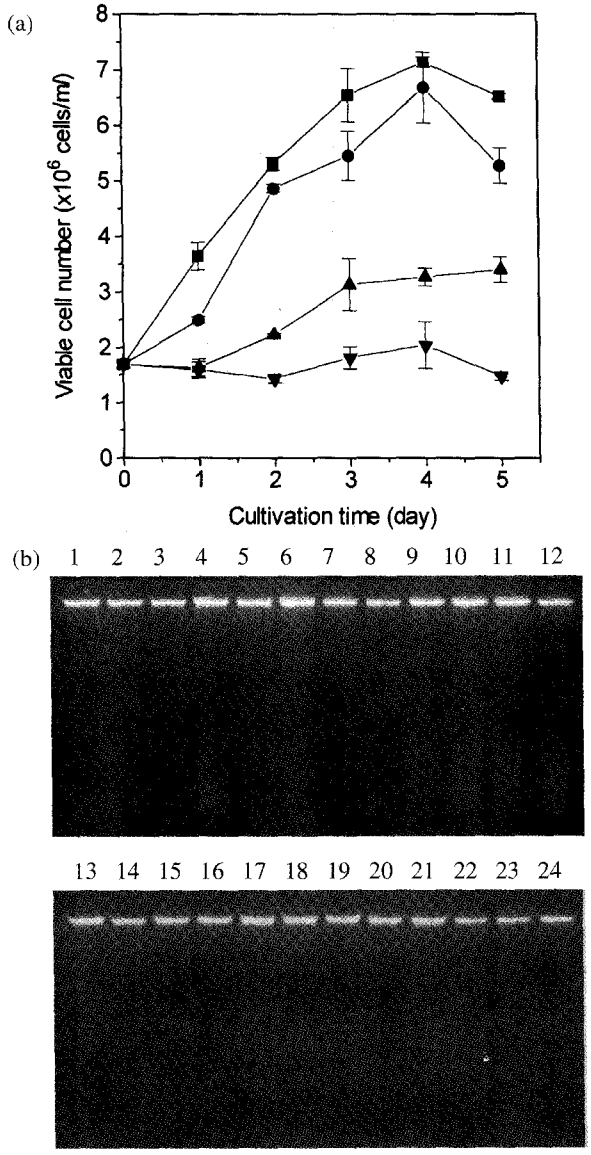

Fig. 3. Effect of sodium butyrate on cell growth(a) and agarose gel electrophoresis of genomic DNA from *T. ni* cells treated with sodium butyrate(b). (a) ■: 0; ●: 2.5; ▲: 5; ▼: 10 mM sodium butyrate, (b) 1-6: 0-5 day, 0 mM; 7-12: 0-5 day, 2.5 mM; 13-18: 0-5 day, 5 mM; 19-24: 0-5 day, 10 mM sodium butyrate.

있는 것으로 일부 보고되어 있는 *N*-acetylcysteine(Sigma, USA)을 hygromycin으로 처리한 *T. ni* 세포에 첨가하여 세포 apoptosis 지연효과를 조사하였다. 상기 항목의 경우와 같이 200 μg/ml hygromycinB를 *T. ni* 세포에 처리한 상태에서 5 mM의 *N*-acetylcysteine을 처리하여 3일간 배양한 후, 이 때의 세포 성장정도와 genomic DNA의 분절유발정도를 N-acetylcysteine을 처리하지 않은 대조구와 비교 분석하였다.

***Bcl-2* 발현 벡터 제작.** *Bcl-2* 유전자는 pB4(ATCC 79804)로부터 확보하였다. 발현 벡터는 pB4의 *EcoR*I 절편을 pIZT/V5-His(Invitrogen, USA) 벡터의 EcoRI site에 삽입하여 구축하였다(Fig. 6). 그 후 pIZT/V5-His/*Bcl-2* 재조합 vector에 유전자 삽입에 대한 방향과 reading frame은 제한효소 지도분석법과 염기서열 결정법으로 확인하였다.

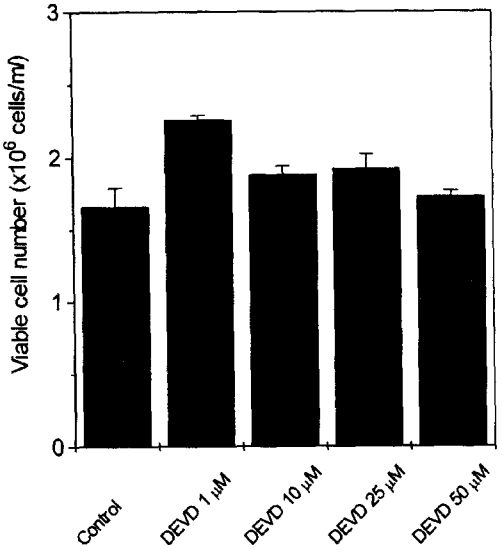

Fig. 4. Effect of caspase inhibitor, Ac-DEVD-CHO on the growth of *T. ni* cells treated with final concentration of 200 μg/ml hygromycin B.

***T. ni* 세포로의 transfection.** pIZT/V5-His/*Bcl-2* 벡터를 3일간 배양한 *T. ni* 세포에 lipofectin(Gibco-BRL, USA)을 사용하여 형질전환하였다. 형질전환배지를 만들기 위해서 플라스미드 DNA와 lipofectin 을 각각 Sf900II-SFM에 희석한 후 이것을 1 : 5의 비율로 함께 혼합하였다. 이 형질전환배지는 15분 동안 상온에서 유지되었으며 6-well plate에 2시간 전에 분주 되어진 *T. ni* 세포에 공급하였다. 이 세포를 24시간 동안 배양한 후에 lipofectin을 제거하기 위해 형질전환배지를 버리고 새로운 적당량의 Sf900II-SFM 배지를 공급하였다. 이 후 4일간 이 세포를 배양하고 세포와 배지를 3000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 회수하여 *bcl-2* 발현측정에 이용하였다.

***Bcl-2* 유전자 발현 분석.** 세포 추출물과 배지를 각각 세포 내 및 세포 외의 *Bcl-2* 단백질 분석에 사용하였다. 단백질 시료는 Laemmli의 방법[9]에 따라 SDS-PAGE로서 분석하였다. 겔 상에서 전기영동 되어진 단백질들은 nitrocellulose membrane으로 이동시키고 mouse anti-*Bcl2*(ZYMED, USA) monoclonal antibody(1 : 200 v/v)로 2시간 반응시킨 후 anti-mouse IgG (Sigma, USA) alkaline phosphatase conjugate(1 : 1000 v/v)로 다시 2시간 반응시켰다. 그 후 nitrocellulose membrane을 세척하고 BM purple AP substrate(Boehringer Mannheim, Germany) 용액으로 반응시켰다. 그리고 이 반응은 증류수로 중단시켰다.

결과 및 고찰

Apoptosis 유도제가 *T. ni* 세포 apoptosis에 미치는 영향. Hygromycin B, dexamethasone, 그리고 sodium butyrate 등은 여러 보고에 의하면 포유류세포에서 apoptosis를 유발하는 주요 유도제임이 밝혀져 있다.[10-12] 그러나 *T. ni* 세포에서도 이러한 기능을 지니고 있는지에 대해서는 아직 보고된 바 없기에 이러한 유도제들의 농도를 변화시키면서 *T. ni* 세포에 처리한 후, 각 처리제의 농도에 따른 apoptosis 유발 정도를 측정하였

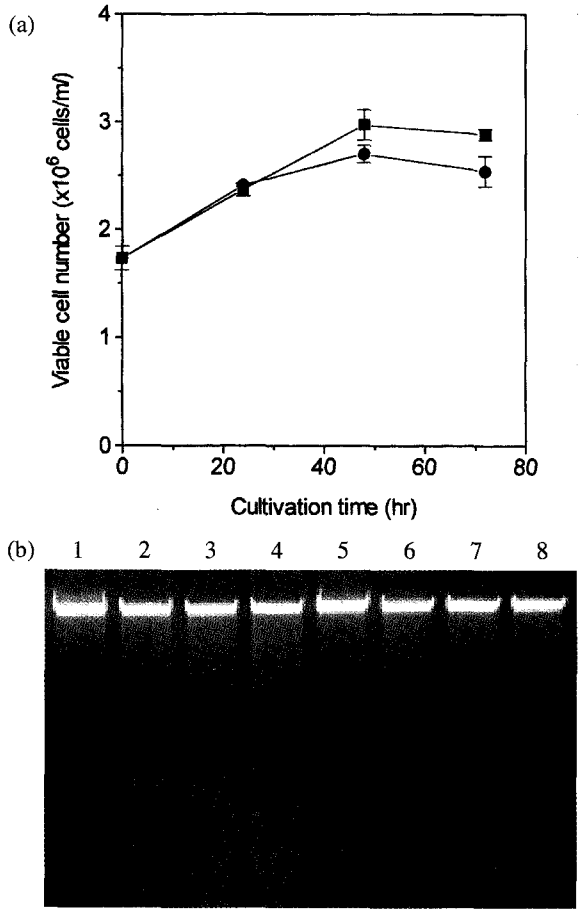

Fig. 5. Effect of *N*-acetylcysteine on the growth of *T. ni* cells treated with final concentration of 200 μg/ml hygromycin B (a) and agarose gel electrophoresis of genomic DNA from *T. ni* cells treated with *N*-acetylcysteine (b). (a) ●: 0 mM; ■: 5 mM N-acetylcysteine, (b) 1-4: 0-3 day, 0 mM; 5-8: 0-3 day, 5 mM N-acetylcysteine.

다. 먼저, hygromycin B에 의한 *T. ni* 세포 생존에 미치는 영향은 Fig. 1(a)에 나타내었다. 실험은 T-25 flask에서 시행하였으며, 초기 세포농도는 약 1.7×10^6 cells/ml이였다. 이 결과에 따르면 hygromycin B를 처리하지 않은 세포의 최대 농도는 약 6.4×10^6 cells/ml임에 반하여 200 μg hygromycin B/ml을 처리한 세포의 최대 농도는 약 2.4×10^6 cells/ml인 것으로 보아 hygromycin B에 의한 세포 성장 저해는 200 μg/ml의 수준에서부터 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 이 결과가 apoptosis 유발에 의한 것인지를 확인하기 위하여 hygromycin B를 처리하지 않은 것과 400 μg/ml hygromycin B를 처리한 세포를 5일간 배양하여 각 시간에 따른 세포의 genomic DNA를 추출하여 전기영동한 후 DNA의 분절현상정도를 Fig. 1(b)에 나타내었다. 이 결과에 따르면 400 μg hygromycin B/ml을 처리한 세포에서는 배양 후 2일부터 DNA가 분절되어지는 것을 확인할 수 있기 때문에 hygromycin B에 의한 세포성장 저해는 apoptosis 유발에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 그리고 dexamethasone도 위와 같은 방법으로 세포 성장저해 및 DNA 분절여부를 검토하였는데, Fig. 2(a)와 (b)에서 보는 바와 같이 dexamethasone을 첨가할 경우 25 μM 이상에서 세포성장은 저

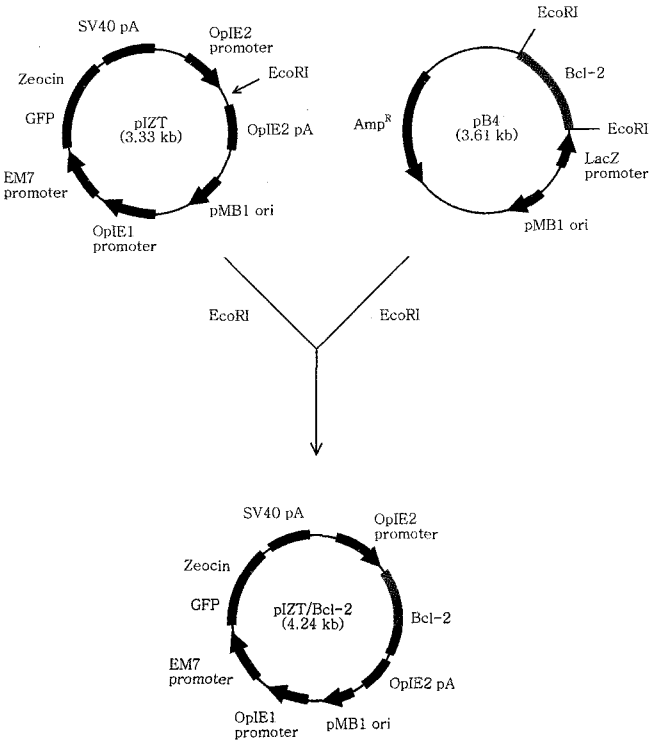

Fig. 6. Construction of plasmid pIZT/*Bcl*-2.

해되는 것으로 확인되었으나 DNA 분절현상은 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험에 사용한 농도수준에서는 apoptosis가 유발되지 않는 것으로 생각된다. 또한 sodium butyrate의 경우도 Fig. 3(a)와 (b)에서 보는 바와 같이 첨가농도 5 mM 이상에서 세포성장은 저해되었으나 DNA 분절현상은 관찰되지 않았다.

Caspase 기능억제제 처리와 *T. ni* 세포 apoptosis 지연과의 관계 연구. Caspase(ICE-like protease)는 현재까지 10여종이 확인되고 있으며 이들은 세포의 PCD(programmed cell death)에 관여하는 것으로 알려져 있다.[13] 이러한 caspase는 apoptosis 대사 경로에 중요하게 관련된 효소이기 때문에 이들의 기능을 억제시킬 경우 apoptosis가 지연되어질 수 있다. 이 caspase 기능 억제제를 통하여 *T. ni* 세포의 apoptosis를 어느정도 저지할 수 있는지를 검토하였다. Fig. 4에서 caspase-3 기능억제제(Ac-DEVD-CHO)를 처리한 경우 다소 적기는 하지만 최대 36%까지 세포성장저해를 극복한 것으로 나타났다. 여기서 우리가 얻을 수 있는 결론은 아직 확인되어지지 않은 *T. ni* 세포의 caspase가 그 caspase-3 저해제와 크게 반응하지 않는 것으로 보아 포유류 세포에서 발견된 caspase-3와는 유사성이 다소 작을 것이라 추측할 수 있었다.

기타 apoptosis 저해제의 apoptosis 지연과의 관계 연구. *N*-acetylcysteine은 항산화제로써 apoptosis에 대한 지연 기능을 지니고 있음이 일부 보고되어지고 있다.[14] 이러한 항산화제의 *T. ni* 세포에서의 apoptosis 지연 기능을 확인하고자 5 mM *N*-acetylcysteine을 처리하여 처리하지 않은 대조구와 비교해 본 결과를 Fig. 5(a)와 (b)에서 나타내었다. 시간에 따른 세포성장률이 5 mM *N*-acetylcysteine을 처리한 세포에서 대조구보다 다소 높은 수준으로 나타났으며, 이러한 세포의 DNA 분절정도

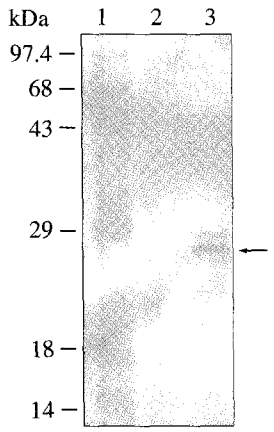

Fig. 7. Western blot analysis of *T. ni* cells transformed with pIZT/*Bcl-2* (*bcl-2* expression vector). 1, molecular size marker; 2, control cells; 3, transformed cells

도 대조구보다 적게 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *T. ni* 세포에서 *N*-acetylcysteine이 apoptosis를 지연시키는 기능을 지니고 있음을 보여주고 있다.

BCL-2 단백질의 한시적인 발현. Apoptosis는 여러 종류의 유전자 산물에 의해 조절되는데 anti-apoptotic 유전자인 *bcl-2*가 세포예정사 조절인자(PCD regulator)로 많이 연구되었다. *Bcl-2*의 대량발현은 여러 종류 세포의 경우에 생물반응기 조업중에 나타나는 영양분 소모, 바이러스의 감염, 산소의 고갈, hydrodynamic stress와 같은 자극에 대해 apoptosis를 제한하거나 지연시키는 결과가 보고된 바 있다.[15-17] 따라서 우리는 이 *bcl-2*가 *T. ni* 세포에서 발현되어질 수 있는지를 확인하기 위해 *bcl-2* 발현 벡터를 구축하고 형질전환하여 한시적인 발현 가능성을 western blotting으로 확인하였다. Fig. 7은 분자량 26-27 kDa의 BCL-2 단백질이 형질전환되어진 세포의 추출물로부터 검출되는 것을 보여주고 있다.

이상의 결과에서 규명된 *T. ni* 세포 apoptosis의 유도 및 억제 메커니즘을 바탕으로 앞으로 anti-apoptotic 유전자를 안정적으로 발현하는 *T. ni* 세포주를 개발하여 생산성이 향상된 새로운 발현체제를 개발하려고 한다. 향후 더욱 체계적인 *bcl*-계 유전자의 발현연구를 수행하여 이 유전자의 apoptosis 지연 기능을 분석하고, 이러한 연구 결과들을 토대로 apoptosis가 지연되는 신기능 곤충세포주를 개발하고 이 세포주를 이용해서 유용 단백질의 대량생산 연구를 수행하여 생명공학 산업에 응용할 수 있는 기초 기반기술 확립이 가능할 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초 연구(1999-1-221-002-3)의 지원으로 수행되었음을 감사드립니다.

참고문헌

1. Wyllie, A. H. (1993) Apoptosis. *Br. J. Cancer* **67**, 205-208.
2. Kane, D. J., Ord, T., Anton, R. and Eredesen, D. E. (1995) Expression of *bcl-2* inhibits necrotic neural cell death. *J. Neurosci. Res.* **40**, 269-275.
3. Mah, S. P., Zhong, L. T., Liu, Y., Roghani, A., Edwards, R. H. and Bredesen, D. E. (1993) The protooncogene *bcl-2* inhibits apoptosis in PC12 cells. *J. Neurochem.* **60**, 1183-1186.
4. Oh, J. H., O'Malley, K. L., Krajewski, S., Reed, J. C. and Oh, Y. J. (1995) Bax accelerates staurosporine-induced but suppresses nigericin-induced neuronal cell death. *Neuroreport* **8**, 1851-1856.
5. Tsujimoto, Y., Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W. and Matsuda, H. (1997) *Bcl-2* and *Bcl-*X_L block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia* **11**, 380-382.
6. Cheng, E. H. Y., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Hardwick, J. M. (1996) Bax-independent inhibition of apoptosis by *Bcl-*X_L. *Nature* **379**, 554-556.
7. Clem, R., Cheng, E., Karp, D., Kirsch, D., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M., Griffin, D., Earnshaw, W., Veliuona, M. and Hardwick, J. (1998) Modulation of cell death by *Bcl-*X_L through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **95**, 554-559.
8. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Waguri, S., Uchiyama, Y., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1996) Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by *Bcl-2* and ICE inhibitors: possible involement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene* **12**, 2045-2050.
9. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
10. Philip, G. C., Branton, E. and Gordon, C. S. (1995) Introduction of p53-independent apoptosis by hygromycin B: Suppression by *Bcl-2* and adenovirus E1B 19-kDa protein. *Exp. Cell. Res.* **221**, 55-59.
11. Cifone, M. G., Migliorati, G., Parroni, R., Marchetti, C., Millimaggi, D., Santoni, A. and Riccardi, C. (1999) Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: Apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood* **93**, 2282-2296.
12. Bernhard, D., Ausserlechner, M. J., Tonko, M., Loffler, M., Hartmann, B. L., Csordas, A. and Kofler, R. (1999) Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *FASEB J.* **13**, 1991-2001.
13. Stennicke, H. R. and Salvensen, G. S. (1997) Biochemical characteristics of caspase-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* **272**, 25719-25723.
14. Sakaguchi, N., Inoue, M., Isuzugawa, K., Ogihara, Y. and Hosaka, K. (1999) Cell death-inducing activity by gallic acid derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 471-475.
15. Perani, A., Singh, R. P., Chauhan, R. and Al-Rubeai, M. (1998) Variable functions of *bcl-2* in mediating bioreactor stress-induced apoptosis in hybridoma cells. *Cytotechnology* **28**, 177-188.
16. Mastrangelo, A. J., Hardwick, J. M., Zou, S. F. and Betenbaugh, M. J. (2000) Part II. Overexpression of *bcl-2*

family members enhances survival of mammalian cells in response to various culture insults. *Biotech. Bioeng.* **67**, 555-564.

17. Fussenegger, M., Fassnacht, D., Schwartz, R., Zanghi, J. A., Graf, M., Bailey, J. E. and Portner, R. (2000) Regulated overexpression of the survival factor *bcl*-2 in CHO cells increases viable cell density in batch culture and decreases DNA release in extended fixed-bed cultivation. *Cytotechnology* **32**, 45-61.

Basic Studies on the Apoptosis Mechanism of *Trichoplusia ni* Cell Line

Jong Min Lee, Jai Myung Yang[1], Youn Hyung Lee and In Sik Chung*(*Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea;* [1]*Department of Life Science, Sogang University, Seoul 121-742, Korea*)

Abstract : To elucidate the apoptosis mechanism of *Trichoplusia ni* cell, fundamental studies for apoptosis induction and suppression were performed. Hygromycin B, a known inducer of apoptosis, started the inhibition of *T. ni* cell growth at 200 μg/m*l* concentration. Furthermore, at 400 μg/m*l* concentration, DNA fragmentation was detected on day 2 of incubation. Although both dexamethasone and sodium butyrate inhibited *T. ni* cell growth, DNA fragmentation was not detected by both treatments. Also, when apoptosis induced *T. ni* cells with 200 μg/m*l* hygromycin B were treated with caspase inhibitor (Ac-DEVD-CHO), the apoptotsis was suppressed by 36%. In addition, *N*-acetylcysteine, another apoptosis repressor, also inhibited the apoptosis of *T. ni* cells. In order to express the anti-apoptosis gene (*bcl*-2), *T. ni* cells were transiently transformed with *bcl*-2 and its expression was confirmed by western blot analysis. These results showed the potential of developing new insect cell lines with suppressed apoptosis.

Key words : *Trichoplusia ni*, apoptosis, DNA fragmentation

*Corresponding author