

인체 흑색종 세포 (SK-MEL-28 Cell Line)에서 Cisplatin, Heptaplatin, 그리고 Sunpla 에 의한 Apoptosis 의 유도

최수라 · 명평근[#]

충남대학교 약학대학 임상생화학실, 형질전환복제돼지센터
(Received March 2, 2004; Revised April 9, 2004)

Induction of Apoptosis by Cisplatin, Heptaplatin and Sunpla in Human Melanoma (SK-MEL-28) Cell Line

Su-La Choi and Pyung-Keun Myung[#]

Lab of Clinical Biochemistry, Research Center for Transgenic Cloned Pigs, College of Pharmacy,
Chungnam National University, Daejon 305-764, Korea

Abstract — A wide variety of cancer chemotherapeutic agents have been shown to induce programmed cell death (PCD, APOPTOSIS) in various tumor cell lines *in vitro*. cis-Malonato [(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isoprpyyl-1,3-dioxolane] platinum(II) (heptaplatin), which is a new drug approved by KFDA in 1999, in a novel platinum-based antitumor agent with clinical potential against stomach cancer and the 3rd generation of the cisplatin. This study was performed to know how heptaplatin and cisplatin and sunpla (mixture of heptaplatin and mannitol) affect on SK-MEL-28 cell line, and how they induce the apoptosis. At EM analysis, the morphology of the cell was changed by treatment of the cisplatin, heptaplatin and sunpla. Apoptotic body formed around plasma membrane, and chromatin condensation represented in nucleus. This phenomenon is one of the characteristic of the apoptosis. The DNA of SK-MEL-28 cell line truncated by cisplatin and sunpla treatment was identified on 2% agarose gel electrophoresis. TUNEL assay was performed to know whether SK-MEL-28 cell die as apoptosis or necrosis by cisplatin, heptaplatin and sunpla. At this result, fluorescence intensity increased according to increase of time and concentration. Therefore, it was identified that cisplatin, heptaplatin and sunpla induced apoptosis. Fas expressed on SK-MEL-28 cell membrane by cisplatin, heptaplatin and sunpla was identified by using flow cytometer and the expression of bcl-2(anti-apoptotic gene) decreased according to increase of concentration of the cisplatin, heptaplatin and sunpla. Cisplatin, heptaplatin and sunpla induced apoptosis against SK-MEL-28 cell line, and the apoptotic mechanism was identified as Fas-mediated apoptosis and decreased bcl-2 expression.

Keywords □ cisplatin, heptaplatin, sunpla, TUNEL assay, Fas expression, RT-PCR, apoptosis

Apoptosis 발생기전은 수용체에 의해 야기된 신호전달체계의 자극, 혹은 수용체에 의해 유도된 자극의 소실에 의해 활성화된다.¹⁾ Fas는 apoptosis를 유도하는 대표적인 수용체로서 Fas가 anti-Fas-antibody와 결합^{2,3)}하거나, Fas에 특이적인 ligand와 결합⁴⁾을 하게되면 T세포나 B세포^{5,6)} 또는 다양한 세포주³⁾에서는 죽음신호(death signal, apoptotic signal)가 유도된다.^{2,6,7)} 이 Fas는 apoptotic signal을 전달하는 intercellular domain과 transmembrane domain, 그리고 세 개의 cystein-rich domain으로 구성되어 있으며,⁸⁾ Fas에 의해 매개되는 세포죽음(Fas-mediated

apoptosis)의 기전이 최근에 명백히 밝혀져 있다.⁹⁻¹³⁾

현재 apoptosis와 관련된 조절유전자에 대해서도 많이 연구되어져 있다. 특히 Fas/FasL에 의해 유도되는 apoptosis와 관련된 조절유전자 중에서 그 기능과 역할이 밝혀져 있는 것이 bcl-2 유전자이다.^{14,15)} bcl-2 유전자는 원종양 유전자(proto-onco-gene)로 과거로부터 밝혀진 암 유전자와는 달리 apoptosis를 억제하여 세포수명을 연장시켜 다른 암 유전자의 영향을 받을 수 있는 기회를 증가시키는 유전자로서,¹⁶⁾ bcl-X_L, bag, mcl-1 등의 유전자가 bcl-2 family를 구성하고 있고, 이들 유전자와는 상호경쟁적으로 작용한다. 동종 결합체나 이종 결합을 형성하는 bax 유전자와 bcl-X_S, bcl-X_B, 그리고 bak 등의 유전자는 bcl-2 유전자와 bcl-2 family의 apoptosis를 억제하는 기능에 대하여 반대되는 작용을 함으로써 apoptosis를 촉진하는 것으로 알려져 있다.^{17,18)} 본 연

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5929 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) pyung@cnu.ac.kr

구에서는 1999년 국내신약1호인 sunpla가 한국인의 위암치료 약물로서 개발된 바 있으나 현재 세계적으로 매년 약 5%의 비율로 성장하고 있는 피부암에 대한 항암제를 개발하기 위하여 피부암 세포인 melanoma(SK-MEL-28)를 대상으로 항암제로 알려져 있지만 그 독성으로 인해 현재 사용이 제한되고 있는 cisplatin과 그의 제 3세대 화합물인 heptaplatin 그리고 만니톨과 혼합되어 제형의 형태로 만들어진 sunpla가 세포주기(cell cycle)의 G2/M기를 정체시킴으로서 피부암에 대한 항암효과를 일으킴을 확인한 바,¹⁹⁾ 그 화합물들이 SK-MEL-28 cell 에서 apoptosis를 유도함으로 항암 효과를 일으키는지를 확인하기 위한 실험들이 수행되어졌다.

실험방법

시약, 기구 및 기기

사용한 피부암 세포주인 SK-MEL-28 세포는 생명공학연구소에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양시 사용되는 RPMI-1640 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycine, phosphate buffer saline(PBS)는 Gibco에서, cisplatin은 Sigma에서 heptaplatin과 sunpla는 신경인더스트리에서 공급받아 사용하였다. CO₂ 가스는 안전가스에서 구입하여 사용하였고, 그 외에 사용된 시약은 세포배양용 시약 또는 특급시약을 사용하였다. 세포수 계수는 hematocytometer를 이용하여 광학현미경(BHS, Olympus optical Co. Japan)으로 관찰하여 실시하였다. 5 ml flow cytometry용 tube는 Falcon #2052를 사용하였고, TUNEL assay와 Fas expression 분석은 충남대학교 약학대학의 FACSCalibur(Bectone&Dickinson, USA)을 이용하여 유세포 분석법으로 실시하였다.

세포배양

세포배양용 배지로서 56°C에서 미리 불활성화한 10% FBS와 penicillin-streptomycin 100 unit/ml이 포함된 RPMI-1640 배지가 사용되었으며, 세포는 모든 경우에 있어서 37°C, 5% CO₂ 가 유지되는 CO₂ incubator(3546 S/N 25401-3156, Formascientific Inc., USA)를 사용하여 배양하였다. 세포의 회수방법으로는 세포를 배양하고 있던 배지를 조심스럽게 버리고 1× Trypsin-EDTA 용액(Gibco)으로 CO₂ incubator에서 2분간 반응시킨 후 세포를 떼어냈다. 그 후 원심분리하여 세포를 세척하고 회수하여 RPMI-1640 완전배지로 부유한 후 계대배양 하거나 실험에 사용하였다.

전자현미경에 의한 apoptosis 관찰

Cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla를 최종농도가 100 μM이 되게 처리해서 24시간이 지난 후 세포를 PBS로 세척하고 trypsin-EDTA 용액을 사용해 세포를 모은 후 다시 PBS로 1회 세척해

준 다음 원심분리해서 상층액을 버리고 남아있는 세포침전물에 전고정액인 2.5% glutaraldehyde(0.1 M phosphate buffer pH 7.4) 용액을 넣어 전고정 하였다. 그 후 인산 완충용액 (0.1 M phosphate buffer pH 7.4)으로 세척하고 다시 1% OsO₄에 후고정하여 완충액으로 세척하였다. 탈수과정은 3차 증류수로 희석된 계열별 알코올로 탈수시키고 propylene oxide로 치환한 다음 epon 혼합물(polybed 812 kit. Polyscience사 제품)로 그 비율은 A(Epon 812+DDSA) : B (Epon 812+MNA)가 4 : 6으로 하여 침투 및 포매한 후 열중합 과정을 거쳐 블록을 제작하였다. 중합(polymerization)은 37°C, 45°C 및 60°C에서 각각 12시간, 24시간 및 48시간을 실시하였고 제작된 블록은 각각 3~5거씩 무작위로 선정하여 초박절편기에 유리칼을 장치하여 각 블록을 공통적으로 시료의 중간 부분까지 박절한 다음 0.5 μm 두께로 준초박 절편을 만들어 1% toluidine blue로 염색하였고 광학현미경 상에서 시료의 중심부분을 기준으로 하여 관찰부분을 제외한 나머지 부분을 제거한 후 diamond knife를 이용하여 간섭색이 silver-gold로 보이는 60~80 mmenRp로 초박절편을 만들어 grids에 부착하였다. 이 중 전자염색은 약물을 처리하지 않은 세포군(대조군)과 약물을 처리한 세포군(실험군) 모두 같은 조건으로 2% uracyl acetate에 25분간 전도염색 시켜 3차 증류수로 수세한 후 건조시키고 다시 1% lead citrate에 6분간 염색시켜 수세 및 건조하여 투과전자현미경(Hitachi H-600)을 사용해 가속전압 75 kV에서 관찰하였다.

DNA fragmentation에 의한 apoptosis 관찰

2×10⁶개의 세포에 cisplatin과 sunpla를 최종농도가 0, 5, 10, 50 그리고 100 μM이 되게 처리한 후 3시간이 지나서 세포를 배양하던 배양액을 농도별로 구분한 50 ml tube에 옮기고 전술한 세포회수방법으로 세포를 모두 모았다. 원심분리 한 후 상층액을 버리고 세포침전물을 PBS로 부유하며 씻으면서 모두 eppendorf tube로 옮겼다. 다시 원심분리 한 후 상층액은 버리고 세포침전물에 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.5% SDS, 10 mM EDTA, 그리고 50 μg/ml proteinase K가 포함되어있는 용액 4.0 μl를 첨가하여 세포를 37°C에서 10시간 동안 lysis했다. 그런 후 다시 0.5 mg/ml RNase A를 20 μl 넣고 37°C에서 10시간 동안 배양하면서 RNA를 제거했다. 앞의 과정을 거쳐서 얻어진 DNA에 40% sucrose와 0.25% bromophenol blue 그리고 1%(w/v) low-melting point agarose를 포함하는 10 mM EDTA (pH 8.0)을 70°C에서 녹여 만든 용액 10 μl를 혼합한 후 0.5 μg/ml ethidium bromide를 포함하는 2% agarose gel에다 loading 하여 55 mA에서 1시간 30분간 전기영동 하였다.

TUNEL 분석실험

Cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla를 최종농도가 0, 1, 5, 그

리고 10 μM 이 되게 처리해서 24시간과 48시간 동안 시간별로 배양한 후 농도와 시간별로 표시한 50 ml tube에 세포를 배양하던 배양액을 모두 모으고 세포회수방법으로 세포를 회수하였으며, 원심분리 후 상층액은 모두 버리고 남아있는 세포침전물을 PBS로 세척하면서 FACS tube로 세포를 옮겼다. 다시 원심분리한 후 남아있는 세포침전물에 1% paraformaldehyde을 1 ml 넣고 얼음 위에서 15분 동안 방치했다. 그리고 70% ethanol 1 ml을 넣고 -20°C에서 24시간 동안 놓아두면서 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고 원심분리 후 남아있는 세포침전물에 0.2 M sodium cacodylate(cacodylic acid), 2.5 mM Tris-HCl(pH 6.6), 2.5 mM CoCl_2 (cobalt chloride), 0.25 mg/ml BSA, 5U terminal deoxy nucleotidyl transferase, 그리고 0.5 nmol dUTP-biotin(biotin-16-dUTP)를 혼합한 용액 50 μl 를 넣었다. 37°C에서 30분간 방치한 후 PBS로 다시 씻어주고 원심분리하여 남은 세포 침전물에 다시 streptavidin-FITC 1 μg 이 들어있는 PBS 100 μl 를 넣고 상온에서 30분간 방치했다. 그런 후 PBS로 세포를 세척하고 다시 PBS를 1 ml 채운 후 flow cytometer로 분석했다.

세포 표면의 Fas 발현 측정

Cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla의 최종농도가 0, 1, 10 그리고 100 μM 이 되게 처리하고 24시간 후 trypsin-EDTA 용액 처리로 떼어낸 세포를 농도별로 50 ml tube에 모았다. 원심분리 후 상층액을 버리고 세포침전물을 PBS로 세척하고 FACS tube로 옮겼다. 다시 원심분리 후 세포침전물에 anti-Fas-FITC(anti-CD95 FITC)를 시료당 20 μl 을 넣고 어두운 실온에서 30분간 방치한 후 PBS로 다시 세척하고 죽은 세포집단을 구분하기 위해 20 $\mu\text{g/ml}$ PI를 넣어 방치 한 후 flow cytometer로 Fas의 발현을 분석했다.

RT-PCR에 의한 bcl-2 유전자의 발현 측정

Cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla의 최종농도가 0, 1, 10 그리고 100 μM 이 되게 처리한 후 6시간 동안 배양한 6×10^6 세포를 PBS로 세척하고 1× Trizol reagent로 세포를 떼어냈다. 이 부유액을 e. tube로 옮기고 50 μl CHCl_3 를 첨가하고 15초 동안 vortex한 후에 얼음위에서 30분간 방치했다. 그리고 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 다른 깨끗한 e. tube로 옮기고 동량의 cold-isopropanol을 넣어 가볍게 섞어준 후 4°C에서 2시간 동안 방치하였다. 다시 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 침전물에 75% cold-ethanol을 가하고, 4°C, 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 침전물에 DEPC-D.W를 첨가한 후 실온에서 10분간 흔들어 녹여 주었다. DEPC-D.W 998 μl 와 2 μl RNA를 혼합하여 260 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 잰 후 이 흡광도 값에 40을 곱해

서 RNA농도를 계산하였다. 이 RNA가 들어있는 e. tube을 75°C에서 10분간 열처리하고 RNA농도가 3 μg 이 되게 취한 다음 역전사 효소 (reverse transferase) 1 μl , 2.5 mM dNTP 4 μl , 5× reverse transferase buffer 4 μl , random primer 1 μl , 0.1 M DTT 2 μl 를 넣고 DEPC-D.W로 전체가 20 μl 되게 맞추고 37°C에서 1시간 반응시켜서 cDNA를 합성하였다. 그 후 cDNA 3 μl 와 Taq. Polymerase 0.15 μl , 10×Taq. Polymerase Buffer 3 μl , 2.5 mM dNTP 2.4 μl , 10 pmol specific primer 1 μl 을 넣고 DEPC-D.W로 총 30 μl 되게 맞추고 PCR을 수행하였다. PCR의 조건은 94°C에서 3분 동안 cDNA를 완전히 변성시킨 후 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 35회 반복한 후 만들어진 β -actin 유전자와 bcl-2 유전자를 72°C에서 10분간 더 방치한 후 1% agarose gel로 전기영동하여 β -actin과 bcl-2 유전자의 발현을 확인하였다. β -actin의 oligonucleotide 서열은 sense oligonucleotide가 5'-GTGGGCGCCCCAGGCACCA-3', antisense oligonucleotide가 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'이며, bcl-2의 oligonucleotide 서열은 sense oligonucleotide가 5-CACCTGTGGTCCACCTGAC-3', antisense oligonucleotide가 5-ACAGTTCACAAAGGCATCC-3'이다.

실험결과 및 고찰

EM 사진

세포가 죽을 때 한 세포내에서 여러 입자들이 나누어지고 이 나누어진 입자들이 막(membrane)에 의해 둘러 싸여지며 결국 이웃하는 세포들의 식작용(phagocytosis)에 의해 사라지게 되는 과정인 apoptosis와 세포를 둘러싼 환경이 급격하게 변화하였을 때 세포가 더 이상 그 환경에 적응할 수 없어 세포가 팽창되고 이온 농도가 변화되며 그리고 마지막으로 물이 유입되어 세포가 파괴되어 죽게되는 necrosis^{15,20}를 한 눈에 구분할 수 있는 것은 세포 모양을 측정함으로써 가능하다. 따라서 heptaplatin과 sunpla에 의해 유도된 SK-MEL-28 세포의 죽음이 apoptosis인지 necrosis인지를 확인하며, cisplatin에 의해 apoptosis로 죽은 세포의 형태와도 비교하기 위해 전자현미경 사진을 통해 분석해 보았다. 그 결과, 약물을 처리하지 않은 정상세포는 흑색종 세포의 특징인 커다란 핵이 세포의 중심에 자리잡고 있었으며, 그 핵은 완전히 갖추어진 핵막으로 둘러싸여 있었고, 비교적 매끄러운 세포막을 가지고 있는 것으로 나타났다. 또한 골지체와 리소좀 등의 세포 소기관들이 뚜렷이 보이는 반면, cisplatin을 처리한 세포는 apoptotic body라고 할 수 있는 작은 입자들이 세포막 주위에 생겼으며, 핵속의 chromatin은 농축되어 있었다. Heptaplatin과 sunpla를 처리한 세포에서도 apoptotic body라고 할 수 있는 입자들이 세포막 주위와 핵막 주위에 묻혀있음을 확인할 수 있었고, 또한 파괴되었던 핵막을 확인할 수 있었다. 특히, heptaplatin

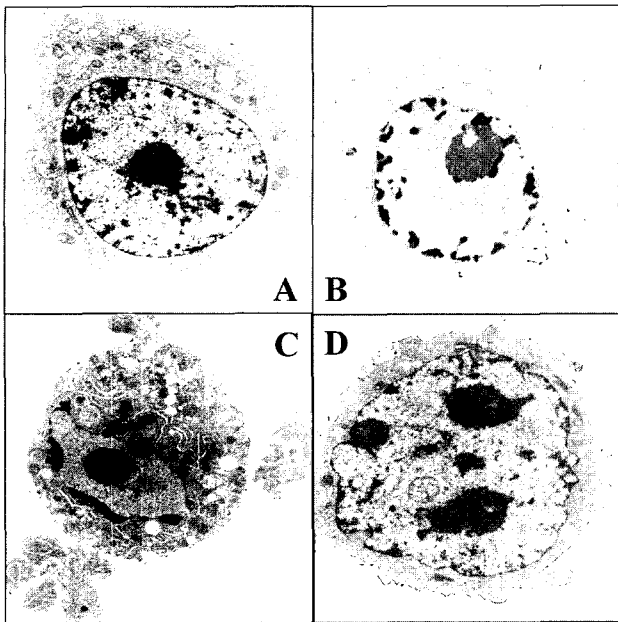


Fig. 1 – Electronic photomicrographs present SK-MEL-28 cells which cultured with 100 μ M drug treatment for 24 hrs. A : control, B : cisplatin, C : heptaplatin, D : sunpla.

을 처리한 세포에서는 세포막으로 둘러싸여져 가는 apoptotic body를 확인할 수 있었다. 그리고 sunpla를 처리한 세포에서는 apoptosis의 또 다른 특징인 chromatin을 포함한 채 다양한 크기로 조각나 있는 핵을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

DNA fragmentation

Apoptosis에 의해 죽게되는 세포의 가장 일반적인 특징 중 하나는 agarose gel 전기영동상에서 나타나는 DNA fragmentation이다. 이것은 DNA가 smear되는 형태로 나타나는 necrosis와 확실히 구분되는 장점을 가지고 있다. 따라서 cisplatin과 sunpla가 SK-MEL-28 세포의 DNA에 미치는 영향을 알아보기 위해서 이들 각각의 약물을 최종농도가 0, 5, 10, 50 그리고 100 μ M이 되게 세포에 처리한 후 agarose gel 전기영동을 통해 DNA의 변화된 모양을 확인해 보았다. 그 결과, 약물을 처리하지 않은 세포의 DNA(control)은 절단된 형태로 나오지 않았고, cisplatin과 sunpla를 처리한 세포의 DNA는 3시간이 지난 후 처리한 모든 농도에서 ladder 모양으로 절단된 형태를 띄고 있음을 확인하였으며, 그 절단된 모양이 모두 유사한 형태인 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

TUNEL assay

사전에 보고되어진 cell cycle 분석 실험¹⁹⁾과 전자현미경에 의한 분석 그리고 DNA fragmentation에 의한 분석들을 통해 cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla가 apoptosis로 SK-MEL-28

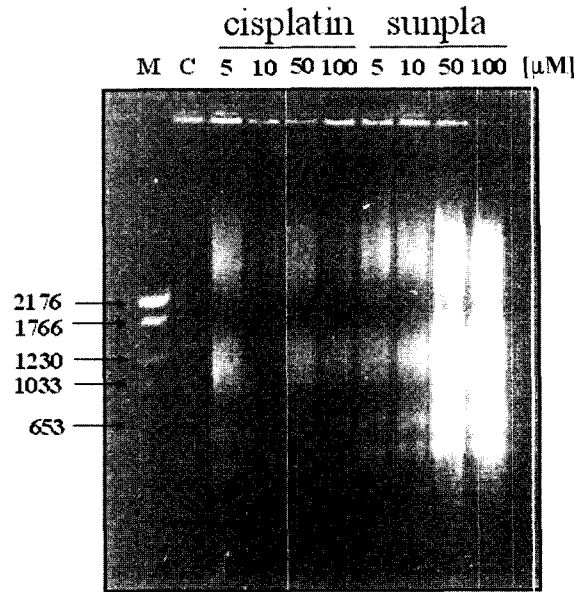


Fig. 2 – DNA fragmentation of SK-MEL-28 cells by cisplatin and sunpla. SK-MEL 28 cells were treated concentrations of 0, 5, 10, 50 and 100 μ M of cisplatin and sunpla for 3 hrs. The markers indicate that M is a DNA marker, and C is a control which was cultured with media only.

세포를 계하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, apoptosis와 necrosis를 구분하는 것에 대한 이 실험들이 가지고 있는 단점들

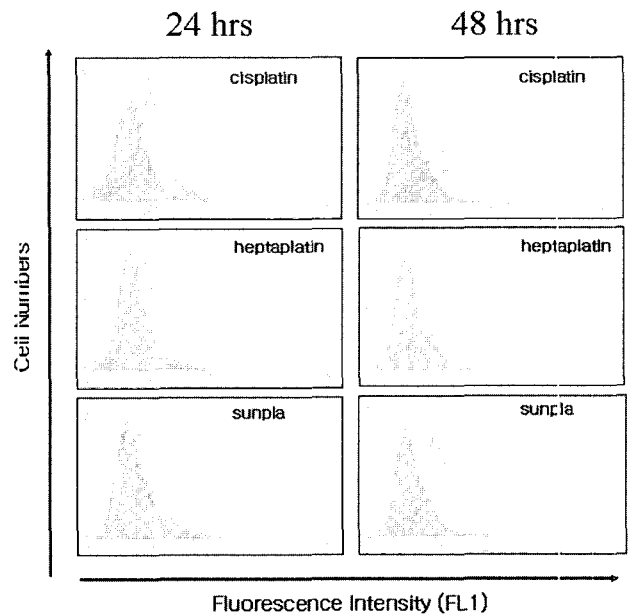


Fig. 3 – TUNEL assay was performed to identify that apoptosis of SK-MEL-28 cells were induced by cisplatin, heptaplatin and sunpla. SK-MEL-28 cells were treated with concentrations of 0, 1, 5 and 10 μ M of each drugs and cultured for 24 hrs and 48 hrs. The black color is 0 μ M (control), the yellow color is 1 μ M, the green color is 5 μ M, the blue color is 10 μ M.

때문에 cisplatin, heptaplatin 그리고 선플라 이 세가지 약물이 apoptosis로 세포를 죽이는 것을 더 확실하게 확인하고, 또한 앞의 결과들을 더욱 확고하게 해 줄 수 있는 TUNEL assay 방법으로 실험을 해 보았다. Cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla 각각의 최종농도를 0, 1, 5, 그리고 10 μM 이 되게 SK-MEL-28 세포에 처리하고 24시간과 48시간 동안 배양하여 flow cytometer로 분석하였다. 그 결과 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 24시간 배양시 cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla 모두에서 농도가 증가할수록 형광강도가 증가하고 있는 것으로 나타났다. 이는 이전 결과들로부터 예상된 바와 같이 cisplatin에 의해 가장 크게 apoptosis가 유도되어졌으며, sunpla에 의해서 가장 적게 유도되었다. 그리고 48시간 배양 시에는 세가지 약물 모두에 의해서 24시간 배양 시보다 형광강도가 크게 증가되어졌는데, sunpla의 경우에는 농도가 증가함에 따라 형광강도가 증가되는 것으로 나타났지만 cisplatin과 heptaplatin의 경우에는 비슷한 양상으로 5 μM

보다는 10 μM 에서 오히려 형광강도가 감소했음을 알 수 있었다. 이는 DNA fragmentation에서 보여진 결과와 상응하는 것으로 sunpla의 경우 농도가 증가할 수록 절단된 DNA band의 형광이 강해졌으며, cisplatin의 경우는 5 μM 을 처리했을 때가 10 μM 을 처리했을 때보다 절단된 DNA의 양이 적음을 알 수 있었다.

Fas expression

Fas는 세포의 표면에서 발견되어 apoptosis가 일어나도록 유도한다고 보고되어져있다.¹⁾ 따라서 세포에 cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla를 각각 0, 1, 10 그리고 100 μM 으로 처리하고 24시간과 48시간 동안 배양한 후 anti-CD95 FITC 항체(anti-Fas-FITC)를 사용해 결합시킨 후 flow cytometer로 분석하였다. Fig. 4에서 이 세 가지 약물에 의해 농도와 시간에 의존적으로 형광강도가 강해진 것을 볼 수 있어 Fas의 발현이 약물의 농도가 증가할수록 그리고 약물을 처리한 후 배양한 시간이 길어질수록 증가한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla 모두 Fas의 발현을 증가시킴에 의해 SK-MEL-28 세포를 apoptosis로 죽게하는 기전임을 확인 할 수 있었다.

RT-PCR에 의한 bcl-2 발현

세포에서 일어나는 모든 현상은 궁극적으로 어떠한 유전자가 발현 또는 감소하느냐에 달려있다. 따라서 RT-PCR 방법에 의해서 apoptosis 억제 유전자인 bcl-2의 발현을 확인해 보았다. 이미 보고되어진 바에 의하면 bcl-2는 apoptosis 억제유전자(anti-apoptotic gene)로써 apoptosis가 증가할수록 세포내 bcl-2의 발현은 감소하는 것으로 알려져 있다. 전술한 실험들에 의해

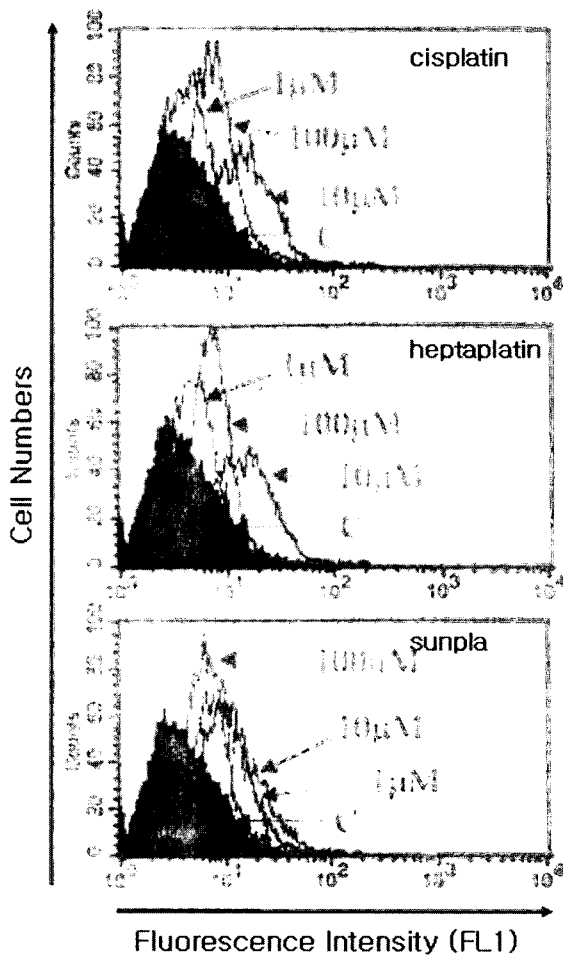


Fig. 4 - Fas expression in SK-MEL-28 cells treated with 1, 10 and 100 μM of cisplatin, heptaplatin and sunpla, respectively, for 24 hrs. Fas expression experiment was performed as described in Materials and Methods.

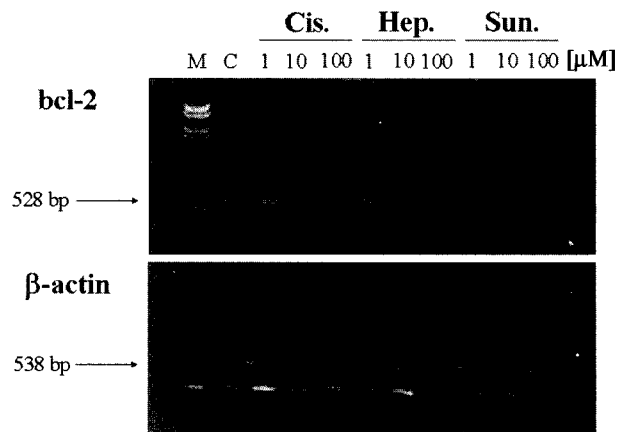


Fig. 5 - Bcl-2 gene expression in SK-MEL-28 cells treated with 1, 10 and 100 μM of cisplatin, heptaplatin and sunpla, respectively, for 6hrs. Then, total RNA was isolated, and RT-PCR was performed and the DNAs were identified by 1% agarose gel electrophoresis. Lane M; protein size markers, C; control, 1; 1 μM drug, 10; 10 μM drug, 100; 100 μM drug. β -actin; house keeping gene.

cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla는 모두 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 apoptosis를 증가시키는 것을 확인했으며, 이를 바탕으로 이들 약물의 농도가 증가할수록 bcl-2의 발현이 감소하는지를 확인해 보았다. 세포에 cisplatin, heptaplatin, 그리고 sunpla를 최종농도가 0, 1, 10 그리고 100 μM 이 되게 처리하여 배양한 후, 세포내 전체 RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, bcl-2의 발현은 약물처리 후 6시간을 배양한 세포에서 약물의 농도가 증가할수록 그 발현이 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5). 즉 cisplatin, heptaplatin 그리고 sunpla 모두 1 μM 보다는 10 μM 에서 발현이 더 감소했으며 10 μM 보다는 100 μM 에서 더 감소하였다. 따라서 이 약물들은 SK-MEL-28 cell에 대해 apoptosis를 유도하며, 그 기전은 Fas의 발현을 증가시킴에 의해 야기되는 apoptosis 억제유전자인 bcl-2의 발현 감소에 의한 것으로 확인되었다.

Fas와 bcl-2 유전자는 수많은 apoptosis 관련 protein들에 의해 연관되어져 있음이 보고되어져 있는 바, 이 약물들에 의한 caspase-1 또는 caspase-3 등의 세포 내 apoptosis 관련 protein들의 발현도 연구되어질 가치가 있다고 사료되어진다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R-11-2002-100-03003)의 지원을 받아 수행되었기에 이에 감사드립니다. 또한 heptaplatin과 sunpla를 제공해주신 이화여자대학교 김대기 박사께 감사드립니다.

문 헌

- 1) Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Dcbatin, K. M. and Krammer, P. H. : *Science* **245**, 301 (1989).
- 2) McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R., Nishioka, N. and Green, D. R. : The end of the cell line : methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Method Cell Biol.* **46**, 153 (1995).
- 3) Suda, T., Takahashi, T., Golstem, P. and Nagata, S. : Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169 (1993).
- 4) Cho, Y. B., Kim K. H. and Kim D. K. : Pharmacokinetics, tissue distribution, and excretion of cis-malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]platinum(II) in dogs. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 1280 (1995).
- 5) Owen-Schanb, L. B., Yonehara, S., Crump, W. D. and Grimm, E. A. : *J. Cell Immunol.* **140**, 197 (1992).
- 6) McGahon, A. J., Nishioka, W. K., Martin, S. J., Mahboubi, A., Cotter, T. G. and Green, D. R. : Regulation of the Fas Apoptotic cell Death Pathway by Abl. *J. Biol. Chem.* **270**, 22625 (1995).
- 7) Orlicki, J. R., Vaishnav, A., Elkon, K. B. and Chac. M. V. : Requirement of cystein-rich receptors of the Fas Receptors for Binding by the Fas Ligand. *J. Biol. Chem.* **272**, 28889 (1997).
- 8) Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. and Negata, S. : The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233 (1991).
- 9) Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., Pongstingl, H. and Krammer, P. H. : Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily, sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 10709 (1992).
- 10) Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. : A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down regulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **169**, 1747 (1989).
- 11) Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M. J., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M. and Krammer, P. H. : *Science* **245**, 301 (1989).
- 12) Nagata, S. and Golstein, P. : *Science* **267**, 1449 (1995).
- 13) Boise, L. H., Gottschalk, A. R., Quintans, J. and Thomson, C. B. : *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **200**, 107 (1995).
- 14) Hockenbery, D. M. : Bcl-2, a novel regulator of cell death. *BioEssays* **17**, 631 (1995).
- 15) Korsmeyer S. J. : Bcl-2 initiate a new category of oncogenes; regulators of cell death. *Bolld* **80**, 879 (1992).
- 16) Oltvai Z. N., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J. : Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog box, that accelerates programmed cell death. *Cell* **369**, 609 (1991).
- 17) Yin, X. M., Oltvai, Z. N. and Korsmeyer, S. J. : BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature* **369**, 321 (1994).
- 18) 서정선 : 20세기말의 의·생물학의 새로운 비전, 아포프토시스 (Apoptosis). *Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology News.* 30.
- 19) Choi, S. L. and Myung, P. K. : Cell viability and flow cytometry analysis of a novel antitumor agent, Heptaplatin in human melanoma cell line, SK-MEL-28. *Yakhak Hoejl* **47**(6), 345 (2003).
- 20) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239 (1972).