

Camptothecin으로 유발된 생쥐 3T3 섬유모세포의 세포자멸사에서 Bcl-2, Bax, Cytochrome c 및 Caspase-3의 발현

안영준 · 이민섭 · 강구

강원대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2002년 1월 8일

게재승인 : 2002년 3월 27일

책임저자 : 강 구

우 200-701 강원도 춘천시 효자 2동 192-1

강원의대 병리학교실

전화: 033-250-8841

Fax: 033-242-7571

E-mail: guk@cc.kangwon.ac.kr

The Expression of Bcl-2, Bax, Cytochrome C and Caspase-3 in Camptothecin-Induced Apoptosis of Mouse 3T3 Fibroblasts

Young Jun Ahn, Min Sup Lee and Gu Kang

Department of Pathology, Kangwon National University College of Medicine, Chunchon, Korea

Background : Camptothecin (CPT), which has been used for cancer treatment and apoptosis study, is an extract of *Camptotheca acuminata* Dence. It is known that CPT induces apoptosis as an inhibitor of DNA topoisomerase I. We investigated the possibility that camptothecin induces anti-apoptotic bcl-2 and pro-apoptotic bax, cytochrome c and caspase-3. **Methods :** We performed immunocytochemical stains for bcl-2, bax and cytochrome c, and also performed western blots for caspase-3 and the three proteins above using mouse 3T3 fibroblasts treated with CPT (0.5 μ g/mL). The immunostain for bcl-2 was done 12 hours after a microinjection of antisense oligomer to bcl-2 in the nuclei of the cells. **Results :** On immunocytochemistry, bcl-2 showed no expressions regardless of CPT treatment and microinjection of the antisense oligomer. The expression of cytochrome c was not changed before and after CPT treatment, and bax demonstrated weak or moderate expressions at 36 and 48 hours after the treatment. There were no expressions at 0, 12, and 24 hours after CPT treatment. On western blot, bcl-2 exhibited no expressions before and after CPT treatment. Expressions of cytochrome c and caspase-3 increased after CPT treatment, and expressions of bax decreased 24 hours after CPT treatment followed by a tendency of increased expressions as time went by. **Conclusions :** In the CPT-induced apoptosis of mouse 3T3 fibroblasts, CPT induced increased expressions of bax, cytochrome c and caspase-3 with no expressions of bcl-2, which are associated with the apoptosis pathway.

Key Words : Apoptosis-Camptothecin-Fibroblasts

국소이성화효소(topoisomerase)는 복제, 전사, 동중 재조합(homologous recombination), 염색질 재형성(chromatin remodeling)의 결과로 발생하는 DNA의 초나선 장력(supercoiling tension)을 조절한다.¹ Camptothecin (CPT)은 회수라고 불리는 *camptotheca acuminata* Dence (Nssaceae)의 추출물로 I형 DNA 국소이성화효소와 상호작용하여 여러 가지 세포에 세포자멸사를 유발시키는 것으로 알려져 있다.²⁻⁷ 이것은 공유 국소이성화효소 I-DNA 복합체에 우선적으로 결합하고, 효과적인 재결합(religation)과 DNA로부터 국소이성화효소의 유리 속도를 느리게 한다. 이와 같이 분리가 억압된 단백질-DNA 복합체는 전사와 복제의 진행을 가로막는 장애물로 작용하여 2중 가닥 DNA의 절단을 증가시키고 급속한 세포자멸사를 유발하는

것으로 사료된다.¹ 또한 CPT와 같은 DNA 국소이성화효소 억제제는 항암제로⁴ 또는 세포배양에서 세포자멸사를 유도하는 데 이용되고 있다.⁸

세포자멸사는 다양한 내적 및 외적 통제하에 이루어지고, 고도로 보존되어 있고 조절되는 세포의 자살이다.^{9,10} 세포사 신호는 세포막으로부터 Bcl-2 가족의 세포자멸사 촉진 분자인 bid, bax, 그리고 bad를 통하여 사립체에 전달되어 cytochrome c의 유리 and Apaf-1-caspase-9 활성화를 유도할 수 있다. 반대로 bcl-2는 이 cytochrome c의 전위를 억제하여 세포질의 caspase 활성화와 세포자멸사를 억제하는 것으로 알려져 있다. 활성화된 caspase-9은 caspase-3를 활성화하여 세포의 세포자멸사를 유발시킨다.^{10,11}

본 연구에서 camptothecin은 배양세포의 세포자멸사를 유발하는 데 사용되었으며, bcl-2에 대한 anti-sense oligomer를 생쥐 3T3 섬유모세포에 미세주입을 한 후 세포의 형태학적 변화와 실제로 bcl-2의 생성이 억제되는가를 알아보고, CPT에 의하여 유도된 생쥐 3T3 섬유모세포의 자멸사에서 bcl-2, cytochrome c, bax, 그리고 caspase-3의 발현이 어떻게 변하는가와 이들의 관련성을 조사해 보고자 하였다.

재료와 방법

생쥐 3T3 섬유모세포를 penicillin-streptomycin (각각 100 U/mL, 100 µg/mL, GibcoBRL, U.S.A.)을 함유한 DMEM 배양액(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, U.S.A.)에 10% FBS (fetal bovine serum, GibcoBRL, U.S.A.)를 첨가하여 37°C, 95% air, 5% CO₂의 환경 하에서 배양하였다. Bcl-2의 open reading frame의 첫 번째 6 codons (G3139)에 대한 antisense oligomer (18-mer) phosphothioate oligonucleotide (5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3')¹² Bioneer (Korea)에 주문 제작하였다.

Bcl-2에 대한 antisense oligomer의 미세주입

Petri 접시에서 배양액을 제거한 후 1x 인산염완충액으로 1회 씻어냈다. 0.05% trypsin 용액(GibcoBRL, U.S.A.)으로 접시에 붙어 있는 세포를 떼어내어 DMEM 용액을 첨가하고 1,300 g에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 다시 DMEM을 첨가하여 세포수가 5-10×10⁴/mL이 되게 하였다. Polylysine으로 코팅된 cover slip에 다이아몬드 연필로 표시를 하고 cover slip을 petri 접시에 놓은 후 그 위에 세포수가 5-10×10⁴/mL인 배양액을 약 30-40 µL를 떨어뜨려 2-4시간동안 배양기에 넣고 세포가 cover slip에 붙기를 기다렸다. 배양기에서 꺼낸 petri 접시에 10% 우태혈청을 함유한 DMEM 배양액을 넣었다. 약 12시간에서 하루가 지난 후 혈청이 없는 DMEM에 2-3시간 배양하였다. 현미경(Olympus IX70, Japan)에 부착된 micromanipulator 및 microinjector (Transjector 5246, Eppendorf, Germany)를 이용하여 혈청이 없는 DMEM 용액 내에 있는 cover slip에 부착된 생쥐 3T3 섬유모세포의 핵내에 상기 antisense oligomer (1.35 mg/mL)를 주입하였다. 12시간 동안 배양한 후 현미경으로 관찰하고, bcl-2에 대한 단 클론 항체(NeoMarkers & BD Biosciences, U.S.A.)로 면역세포화학적 검사를 시행하였다.

면역세포화학적 검사

유리슬라이드 뒷면에 세포를 부착 배양시킨 후 CPT 0.5 µg/

mL를 함유한 배양액에서 0, 12, 24, 36, 48시간 동안 배양하고, 4% paraformaldehyde 용액으로 30분간 고정하였다. 인산염완충액에 1-2시간 동안 담근 후 덮개유리를 꺼내어 그 위에 3% BSA (bovine serum albumin) 용액 40-50 µL를 20분간 점적한 후 실온에서 건조시켰다. 건조된 덮개유리 위의 세포들을 30분간 인산염완충액에 담근 후 면역세포화학적 검사를 시행하였다. 세포막의 투과성을 증가시키기 위하여 Cytonin (Trevigen, U.S.A.)으로 30분간 처리하고, bcl-2 (NeoMarkers & BD Biosciences, U.S.A.), cytochrome c (NeoMarkers, CA U.S.A.), bax (NeoMarkers, CA, U.S.A.)에 대한 단 클론 항체를 100배 희석하여 사용하였으며, 내인성 과산화효소의 작용을 억제시키기 위하여 0.3% 과산화수소로 10분간 처리한 후 인산염완충액으로 씻어냈다. Blocking antibody로 Super block (Scytek, Utah, U.S.A.)으로 10분간 반응시켰다. 1차 항체로 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체로 UltraTek anti-polyvalent, biotinylated antibody, UltraTek HRP (Scytek, Utah, U.S.A.)을 각각 10분간 반응시킨 후 인산염완충액으로 씻어내고, 발색제로 diaminobenzidine을 이용한 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 상기 항체를 이용한 면역염색상 광학현미경으로 관찰하여 세포질이 갈색으로 염색된 경우 양성으로 판단하였다.

Western blot

CPT 0.5 µg/mL를 함유한 배양액에서 0, 24, 36, 48시간 동안 직경이 10 cm인 조직배양용 petri 접시에 생쥐 3T3 섬유모

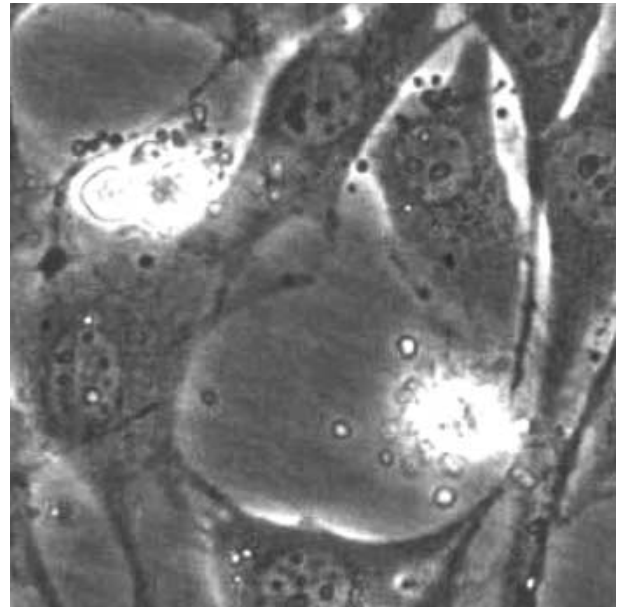


Fig. 1. Camptothecin-induced apoptosis with cytoplasmic fragmentations begins to be seen frequently 12 hours after camptothecin treatment.

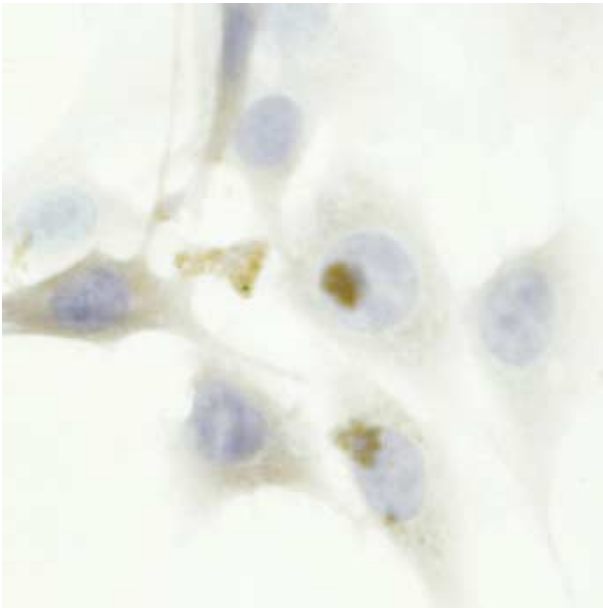


Fig. 3. On immunocytochemistry for bax 32 hours after camptothecin treatment, the fibroblasts show positive reactions in their cytoplasm.

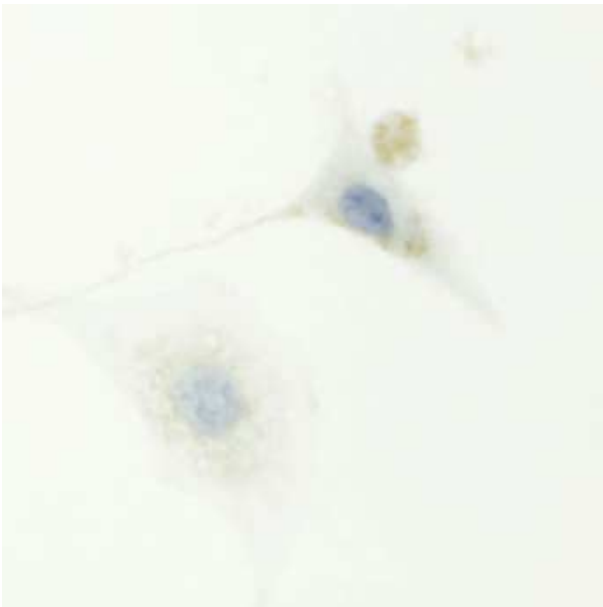


Fig. 4. High power view of Fig. 2B5. Immunostaining for bax shows a positive reaction in the cytoplasm.

모세포는 세포질의 분절화를 동반한 세포자멸사의 소견을 보였다(Fig. 1). 면역세포화학적 검사에서 bcl-2는 반복된 면역 염색 결과 발현되지 않는 것으로 판단하였다(Fig. 2A1-5). Bax는 여러 차례 검사한 결과 CPT 투여한 후 32, 36시간 혹은 48시간이 지나서 미약하게 혹은 중등도로 발현되었으며, CPT 투여한 후 0, 12, 24, 72시간에 bax가 발현된 경우는 없었다(Fig.

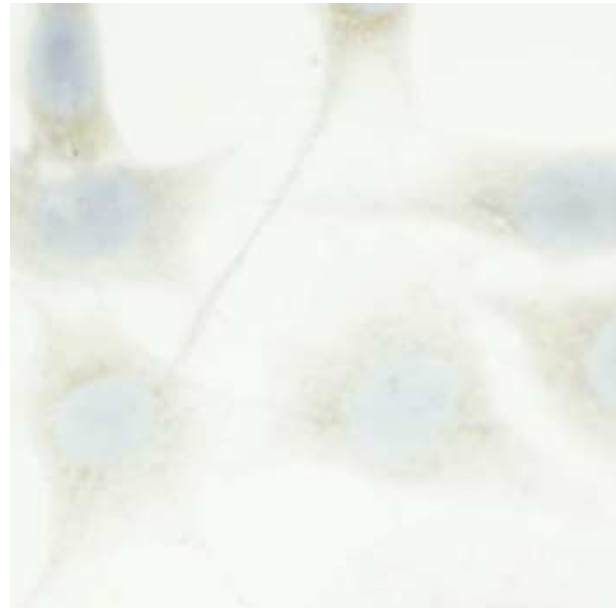


Fig. 5. High power view for Fig. 2C5 shows positive cytoplasmic staining for cytochrome c.

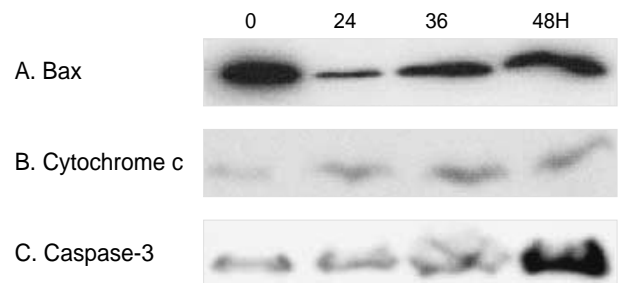


Fig. 6. Western blots for cytochrome c and caspase-3 show an increased tendency of the expression after camptothecin treatment. The expression of bax decreases 24 hours after CPT treatment and then increases gradually.

2B1-5, Fig. 3, 4). Cytochrome c는 rhodamine 123의 형광염색 형태로 사립체의 배열과 같이 세포질에 발현되었다(Fig. 5). 이것은 camptothecin을 투여한 후 발현이 증가하지 않았다(Fig. 2C1-5).

면역세포화학적 검사상 bcl-2, bax, 그리고 cytochrome c 단백질의 발현이 CPT의 투여에 의하여 변화하는가에 대한 의문으로 western blot이 시행되었는데, western blot 상 세포질내 cytochrome c의 발현은 시간이 지남에 따라 약간 증가하고, bax의 발현은 CPT 투여 후 24시간에 감소하였다가 36, 48시간에 점차적으로 증가하였으며(Fig. 6), bcl-2는 CPT 투여와 관계없이 발현되지 않았다. Caspase-3는 17 kDa (p17)에서 CPT 투여 후 보다 강하게 발현되었고 CPT 투여 후 48시간에 가장 강하게 발현되었다(Fig. 6).

것으로 사료되었다. Cytochrome c와 caspase-3의 발현이 증가한 것은 CPT에 의한 세포자멸사와 관련이 있는 것으로 사료되었으나, 본 실험으로 bax의 발현이 cytochrome c의 유리와 관련성이 있을 것으로 확인할 수는 없었다. 또한 생쥐 3T3 섬유모세포에서 bcl-2 단백질의 발현이 없는 것으로 보아 이 세포는 bcl-2 유전자를 전달감염시켜 세포자멸사를 연구하는 데 유용할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Redinbo MR, Champoux JJ, Hol WG. Structural insights into the function of type IB topoisomerases. *Curr Opin Struct Biol* 1999; 9: 29-36.
2. Choi H, Byun SY. Enhanced production of anticancer agent camptothecin elicitors in suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 2000; 15: 428-33.
3. Enari M, Hase A, Nagata S. Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J* 1995; 14: 5201-8.
4. Glisson BS, Ross WE. DNA topoisomerase II: a primer on the enzyme and its unique role as a multidrug target in cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 1987; 32: 89-106.
5. Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 1991; 51: 1078-85.
6. Onishi Y, Azuma Y, Sato Y, Mizuno Y, Tadakuma T, Kizaki H. Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1175: 147-54.
7. Shimizu T, Pommier Y. DNA fragmentation induced by protease activation in p53-null human leukemia HL60 cells undergoing apoptosis following treatment with the topoisomerase I inhibitor camptothecin: cell-free system studies. *Exp Cell Res* 1996; 226: 292-301.
8. Pommier Y, Leteurtre F, Fesen MR, *et al.* Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Invest* 1994; 12: 530-42.
9. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
10. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 427-45.
11. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6.
12. Raynaud FI, Orr RM, Goddard PM, *et al.* Pharmacokinetics of G3139, a phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to bcl-2, after intravenous administration or continuous subcutaneous infusion to mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 420-7.
13. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-6.
14. Shibata Y, Takiguchi H, Tamura K, Yamanaka K, Tezuka M, Abiko Y. Stimulation of interleukin-1beta-converting enzyme activity during growth inhibition by CPT-11 in the human myeloid leukemia cell line K562. *Biochem Mol Med* 1996; 57: 25-30.
15. Zhang XW, Xu B. Differential regulation of P53, c-Myc, Bcl-2, Bax and AFP protein expression, and caspase activity during 10-hydroxycamptothecin-induced apoptosis in Hep G2 cells. *Anticancer Drugs* 2000; 11: 747-56 (abstract).
16. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14559-63.
17. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998; 281: 2027-31.
18. Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, *et al.* Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5492-7.
19. Wood DE, Newcomb EW. Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp Cell Res* 2000; 256: 375-82.
20. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998; 8: 267-71.
21. Suzuki A, Kato M. Chemotherapeutic agent CPT-11 induces the new expression of the apoptosis initiator to the cytoplasm. *Exp Cell Res* 1996; 227: 154-9.
22. Keramaris E, Stefanis L, MacLaurin J, *et al.* Involvement of caspase 3 in apoptotic death of cortical neurons evoked by DNA damage. *Mol Cell Neurosci* 2000; 15: 368-79.