Interferon-γ가 간암 세포의 apoptosis에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

신 의 철

Interferon-γ가 간암 세포의 apoptosis에 미치는 영향

지도 박 전 한 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

신 의 철

신의철의 박사 학위논문을 인준함

심사위원____________________________인

심사위원____________________________인

심사위원____________________________인

심사위원____________________________인

심사위원____________________________인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 글

실험에 대한 막연한 기대만을 가지고 연구 생활을 시작한 저를 오늘의 모습으로 만들어 주신 박전한 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 제가 박전한 선생님께 가장 감사하게 생각하는 것은 자율적이고 독립적인 연구 수행의 습관을 길러주셨다는 점입니다.

박사 과정의 연구를 수행하는 동안 친절한 조언과 격려를 아끼지 않으신 안영수 선생님, 한광협 선생님, 이상규 선생님, 김종선 선생님께도 감사드립니다. 특히, 김종선 선생님은 곁에서 과학적인 사고의 방법을 끊임없이 일러주셨습니다. 항상 격려해주신 김주덕 선생님, 김세종 선생님, 최인홍 선생님, 신전수 선생님께 감사드리며, 제가 실험에 지칠 때마다 새로운 의욕을 불어 넣어 주신 김호근 선생님께도 감사드립니다. 또한, 실험실 생활을 하는 동안 좋은 선배와 친구가 되어 주신 이재면 선생님, 최철희 선생님, 최용준 선생님, 김철훈 선생님, 권대호 선생님께 감사드리며, 늘 성원을 보내준 교실 후배들인 박상면 선생님과 최윤희 선생님에게도 감사드립니다. 그리고, 여러모로 도움을 준 최유정 선생님을 비롯한 미생물학 교실원에게도 감사드립니다.

끝으로, 항상 뒤에서 지켜봐 주시며 끝없는 성원과 격려를 보내주시는 부모님과 가족들에게 진심으로 감사드립니다.

대학원 시절의 어느 날, 의과대학 건물에 들어가다가 평소에는 무심히 지나치던, 세워진 돌 위의 글을 읽게 되었습니다. '찾아라 진리를, 너의 사명 다하여' 그 후로, 이 짧은 글귀는 박사 과정의 연구 생활 동안 저의 좌우명이었습니다. 처음에는 '너의 사명 다하여' 열심히 연구하라는 이야기로만 들렸지만, 요즈음에는 우리가 이렇게 열심히 찾아야 할 것은 그 무엇도 아닌 바로 '진리'라고 우리에게 말해주는 듯 합니다. 박사가 된다는 것이 이제야 비로소 '진리'를 찾으러 본격적으로 떠나는 출발점이라는 마음가짐으로, '나의 사명 다하여 진리를 찾도록' 노력하겠습니다.

저 자 씀

차 례

그 림 차 례

국문요약

Interferon-g가 간암 세포의 apoptosis에 미치는 영향

간암 세포를 비롯한 많은 암세포들은 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 나타내는 경향이 있음이 잘 알려져 있다. 그러나, interferon-γ (IFN-γ)에 의해 많은 암세포들은 Fas-mediated apoptosis에 감수성을 띠게 된다. IFN-γ가 암세포에서 Fas-mediated apoptosis를 증가시키는 기전으로는 여러 가지가 제시되었으나, 간암 세포에서는 그 정확한 기전이 규명된 바 없다.

따라서, 본 연구에서는 IFN-γ가 사람 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향과 그 기전을 알아보았다. IFN-γ 전처리를 하지 않고 Fas 자극을 주었을 때는 실험에 사용한 13 가지 세포주 모두 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 나타내었으나, IFN-γ 전처리 후에는 3 가지 세포주(SNU-354, SNU-387, SNU-423)가 감수성을 보였다. IFN-γ가 일부 간암 세포주에서 Fas-mediated apoptosis를 증가시킨 기전을 알아보기 위해, IFN-γ가 간암 세포에서 apoptosis와 관련된 여러 가지 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, IFN-γ는 많은 세포주에서 Fas, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), caspase-1의 mRNA 발현을 증가시켰고, 세포표면 Fas 발현도 증가시켰다. 이 중에서도 특히 세포표면 Fas 발현의 증가는 IFN-γ 처리 후의 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성의 증가와 강한 연관 관계를 보여, IFN-γ에 의한 세포표면 Fas 발현의 증가가 일부 간암 세포에서 보여지는 IFN-γ 전처리에 의한 Fas-mediated apoptosis 증가의 중요한 원인이라고 생각할 수 있었다.

한편, 간암 세포주 중에서 SNU-368 세포는 IFN-γ 처리 후에 Fas 자극 없이도 세포사가 일어남을 관찰하여, 이러한 세포사의 특성과 기전을 규명하였다. 우선, IFN-γ 처리 후에 SNU-368 세포의 세포사가 일어날 때 caspase-3 활성의 증가가 관찰되어, 이러한 세포사는 apoptosis에 의한 것으로 생각할 수 있었다. 또한, SNU-368 세포에서 IFN-γ 처리 후에 apoptosis와 관련된 여러 가지 유전자의 발현 변화를 조사한 결과, Fas, TRAIL, caspase-1의 mRNA 발현이 강하게 증가되었다. 그리고, SNU-368 세포에서 TRAIL 수용체의 mRNA 발현을 조사한 결과, DR4와 DR5는 기본적으로 강하게 발현되고 IFN-γ 처리 후에도 그 발현에 변화가 없는 반면, decoy 수용체인 DcR1은 IFN-γ 처리 전이나 후에도 발현되지 않았고, DcR2는 기본적으로 발현되나 IFN-γ 처리에 의해 그 발현이 감소되었다. 이러한 결과로, IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis는 IFN-γ에 의해 발현이 증가된 TRAIL에 의해 apoptosis가 일어나기 때문이라는 가설을 세울 수 있었고, 수용성 DR4-Fc 융합 단백이 SNU-368 세포에서 IFN-γ에 의해 유도되는 apoptosis를 억제함을 관찰하여 가설을 증명하였다.

또한, IFN-γ 이외의 다른 cytokine들도 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis에 영향을 주는지 알아보았다. 간암 세포에서 interleukin-6 (IL-6)과 interleukin-8 (IL-8)은 apoptosis를 억제하거나 세포의 생존을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다. 따라서, SNU-354와 SNU-368 세포에서 Fas-mediated apoptosis를 유도할 때 IL-6이나 IL-8을 처리하고 그 영향을 조사한

결과, IL-6이나 IL-8은 SNU-354와 SNU-368 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis를 감소시키거나 증가시키지 않는 것으로 나타났다.

결론적으로, 본 연구를 통하여 일부 간암 세포에서 IFN-γ는 세포표면 Fas 발현을 증가시킴으로써 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성을 높일 수 있음을 알았고, 어떤 간암 세포에서는 부수적인 자극 없이 IFN-γ만으로도 apoptosis가 유도되며 이는 IFN-γ에 의한 TRAIL 발현의 증가와 연관이 있음을 알 수 있었다.

핵심되는 말: interferon-γ (IFN-γ), 간암 세포, apoptosis, Fas, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

Interferon-g가 간암 세포의 apoptosis에 미치는 영향

<지도 박 전 한 교수>

연세대학교 대학원 의학과

신 의 철

I. 서 론

세포사멸 수용체(death receptor)는 tumor necrosis factor (TNF) 수용체 family에 속하는 세포막단백으로, TNF family에 속하는 적합한 리간드가 이 수용체에 결합하면 apoptosis를 유도하는 세포내 신호가 전달되어 caspase cascade가 활성화되고, 궁극적으로는 이 수용체를 발현하는 세포에서 apoptosis가 일어난다.[1,2] 세포사멸 수용체 중 가장 많이 알려진 것은 Fas (CD95, APO-1)로,[3,4] 이 수용체의 리간드는 Fas ligand (FasL)이다. FasL가 Fas에 결합하면 Fas 세포내 부위의 death domain에 adaptor 분자인 Fas-associating protein with death domain (FADD)이 결합하며,[5,6] 이에 따라 FADD-like interleukin-1β-converting enzyme (FLICE, caspase-8)의 단백 분해 활성이 증가하고,[7,8] 결과적으로 caspase cascade가 활성화된다(그림 1). 그 결과로 caspase-3과 같은 하위 caspase가 활성화되면, poly (ADP) ribose polymerase (PARP), lamin, rho-GDI, actin, inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) 등의 기질들이 분해되고, 세포는 apoptosis의 과정을 밟게 된다.[9] 이 과정에서 caspase-activated DNase (CAD)가 활성화되어 apoptosis시에 특징적으로 볼 수 있는 DNA ladder가 나타난다.[10,11] 이러한 Fas를 경유한 apoptosis 과정에서 Fas-associated factor 1 (FAF1)은 apoptosis를 촉진하고,[12] Fas-associated phosphatase (FAP)는 apoptosis를 저해하는 기능을 한다.[13] 한편, FasL와 결합할 수 있는 수용체로는 Fas 이외에도 Fas 유전자의 alternative splicing 형태인 수용성 Fas[14]와 decoy receptor 3 (DcR3)[15]이 있어 이들은 FasL가 Fas에 특이적으로 결합하는 것을 경쟁적으로 억제할 수 있다.

Fas 이외에 최근 관심을 받는 세포사멸 수용체로는 TRAIL 수용체가 있다. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL, APO-2L)는 FasL와 마찬가지로 TNF family에 속하며,[16,17] 이에 대한 수용체로는 4 가지가 알려져 있다. 이 중 death receptor 4 (DR4, TRAIL receptor

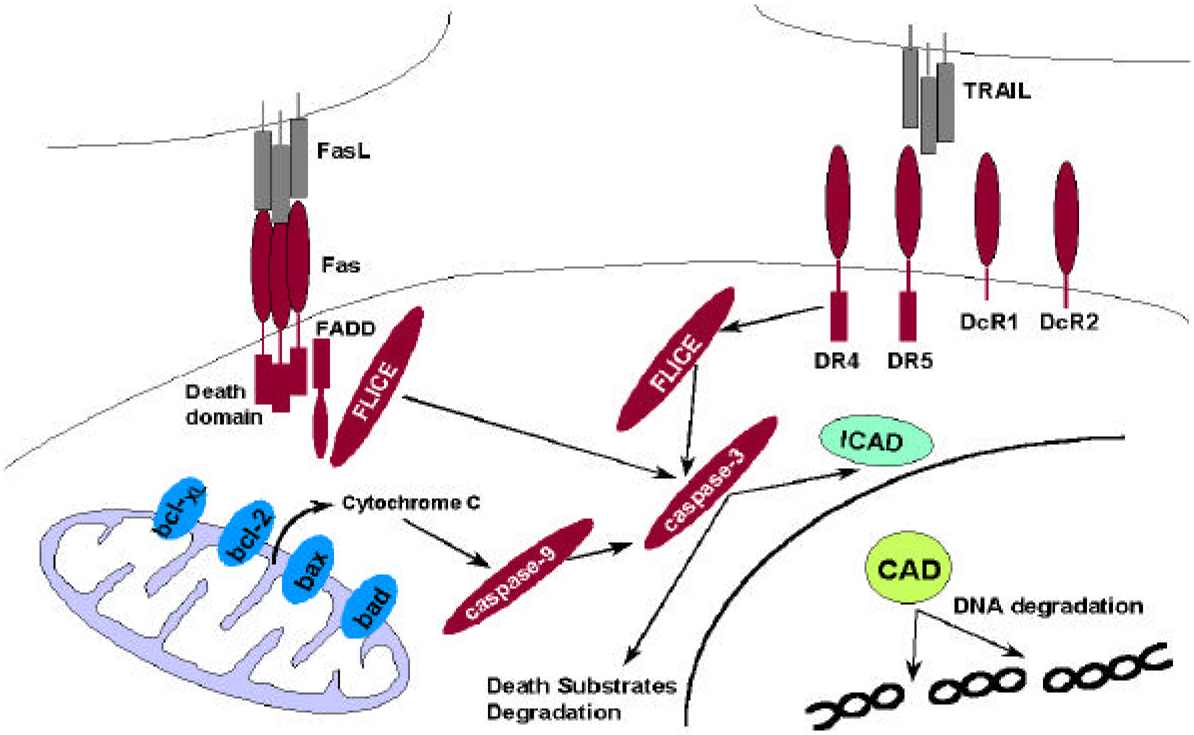


그림 1. 세포사멸 수용체 자극에 의한 apoptosis 경로. Fas에 FasL가 결합하거나, DR4나 DR5에 TRAIL이 결합하면, 이들 세포사멸 수용체의 death domain에 FADD와 같은 adaptor 분자가 결합하고 FLICE가 활성화되면서 caspase cascade가 활성화된다. 이에 따라 세포사멸 기질(death substrate)이 분해되고 결과적으로 apoptosis가 일어난다. 미토콘드리아에서 세포질로 방출되는 cytochrome C도 caspase cascade를 활성화시킬 수 있으며, Bcl-2 family 단백이 cytochrome C의 방출을 조절하여 apoptosis를 일으키거나 억제할 수 있다.

1)와 death receptor 5 (DR5, TRAIL receptor 2)는 Fas와 유사하게 세포내 부위에 death domain을 가지고 있어, adaptor 분자를 통한 caspase cascade의 활성화를 유도하고, 결과적으로 세포의 apoptosis를 유도할 수 있다.[18-22] 반면 decoy receptor 1 (DcR1, TRAIL receptor 3)과 decoy receptor 2 (DcR2, TRAIL receptor 4)는 TRAIL과 결합은 하지만, 세포내 부위에 death domain이 없어 apoptosis를 유도하는 세포내 신호를 전달할 수 없고, 오히려 DR4와 DR5가 TRAIL과 특이적으로 결합할 때 경쟁적 억제자 역할을 한다.[19,20,23-26] 이외에도 TRAIL은 원래 tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (TRANCE, receptor activator of NF-κB ligand)의 수용성 수용체로 알려진 osteoprotegerin과도 결합을 하며,[27] 따라서 osteoprotegerin도 TRAIL의 또 다른 decoy 수용체 역할을 할 것으로 추정된다. 한편, TRAIL은 정상 세포에서는 apoptosis를 유발하지 않고 암세포에서만 선택적으로 apoptosis를 유발하는 것으로 알려졌는데, 이는 decoy 수용체가 정상 세포에서는 발현되고 암세포에서는 발현되지 않기 때문인 것으로 여겨지기도 하였다.[28]

이들 세포사멸 수용체에 특이적으로 결합하는 리간드인 FasL와 TRAIL은 생리적으로 주로 면역세포의 세포독성 작용 분자(effector molecule)로서 그 기능을 발휘한다. FasL는

활성화된 T 세포나 natural killer (NK) 세포의 표면에 발현되어 perforin, granzyme과 더불어 세포독성 T 세포나 NK 세포의 주요 세포독성 작용 분자로 기능하며,[29,30] T 세포의 활성화에 의해 유도되는 T 세포 자신의 apoptosis에도 관여한다.[31] 또한, FasL는 종종 암세포에서 발현되기도 하는데, 암세포에서 발현된 FasL는 암조직에 침윤된 면역세포의 apoptosis를 유도하여 암세포가 숙주의 항종양 면역 감시(anti-tumor immune surveillance)를 회피하는 기전으로 작용하기도 한다.[32-36] 한편, TRAIL의 생체 내 생리적 기능에 대해서는 아직 명확히 알려지지는 않았으나, T 세포, 단핵세포(monocyte), 수상돌기세포(dendritic cell)에서 발현하는 TRAIL은 이들 세포가 암세포와 같은 표적세포에 세포독성을 나타낼 때 세포독성 작용 분자로 기능할 것이라는 보고가 있다.[37-40] 최근에는 간 NK 세포(liver NK cell)가 간으로의 암세포 전이를 억제하며, 이 때 간 NK 세포의 세포독성 작용 분자로 FasL, perforin과 더불어 TRAIL이 중요한 역할을 한다는 보고가 있어, TRAIL이 숙주의 항종양 면역 감시에 중요한 역할을 함이 제시된 바 있다.[41]

이렇게 FasL나 TRAIL이 숙주의 항종양 면역 감시에서 면역세포의 세포독성 작용 분자로 중요한 역할을 한다면, 암세포에 따라 FasL 또는 TRAIL-induced apoptosis에 감수성 또는 저항성이 있다는 것은 암세포의 숙주 항종양 면역 감시에 대한 감수성 또는 저항성을 대변하는 지표가 된다고 볼 수 있을 것이다. 그리고, 암이 발생하기 위해서는 암세포가 FasL나 TRAIL에 의한 apoptosis에 저항성을 가져야 할 것이다. 실제로 많은 암세포들이 다양한 기전을 통하여 FasL나 TRAIL에 의한 apoptosis에 저항성이 있음이 보고되었다. 이러한 기전으로 지금까지 잘 알려진 것으로는 Fas의 발현 저하,[42] 수용성 Fas의 발현,[14] Bcl-2의 과발현,[43-45] DcR3의 유전자 증폭 및 과발현,[15] FLICE inhibitory protein (FLIP)이나 inhibitor of apoptosis (IAP) family 단백의 발현[46-48] 등이 있다.

생체내 여러 정상 세포들 중에서 간세포는 다른 세포들에 비하여 세포사멸 수용체를 매개로 하는 apoptosis에 대한 감수성이 높다.[49,50] FasL와 유사하게 Fas를 자극할 수 있는 단클론 항체를 마우스의 복강 내에 주입하면, 마우스는 간세포의 파괴로 인한 간기능 부전으로 죽게 되며,[51] 간염 등에 의한 간 손상에서 Fas-mediated apoptosis의 중요성이 보고된 바도 있다.[52,53] 또한, TRAIL의 경우에서도 대부분의 정상 세포들이 TRAIL 자극에 의해서 apoptosis가 유발되지 않는 반면, 사람 간세포는 TRAIL 자극에 의해 apoptosis가 유발됨이 보고되었다.[54] 이러한 사실을 생각해 보면, 간암 생성 과정에서는 다른 암 생성 때보다도 FasL나 TRAIL에 의한 apoptosis에 더욱 큰 저항성을 획득해야 할 것으로 예상되며, 실제로 사람 간암 세포가 FasL나 TRAIL에 의한 apoptosis에 저항성을 나타낸다는 보고들이 있다.[55,56] 사람 간암에서는 일반적으로 Fas의 발현이 저하되어 있거나 발현되지 않으며,[33,42,57,58] 이러한 이유로 간암 세포가 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 가지는 것으로 생각된다. 특히 Fas가 발현되지 않는 간암보다 Fas가 발현되는 간암의 임상적인 예후가 더 양호함이 보고된 바 있다.[59] 간암 세포의 TRAIL-induced apoptosis에 대한 감수성 또는 저항성에 대한 보고는 아직 많지 않지만, 지금까지 보고

된 바에 따르면 간암 세포는 TRAIL-induced apoptosis에 저항성을 가지고 있으나,[56] 아직 그 기전은 정확히 밝혀지지 않았다.

암세포에서 FasL나 TRAIL에 의한 apoptosis에 대한 감수성 또는 저항성에 영향을 미치는 요인에는 여러 가지가 있을 수 있으나, 그 중의 하나로 각종 cytokine들을 들 수 있다. 암이 존재하는 미세 환경(microenvironment) 내에는 여러 가지 cytokine들이 존재할 수 있는데, 이러한 cytokine들 중에는 암 주위에 침윤된 T 세포와 같은 면역세포에 의해서 분비된 것도 있고, 암세포 자체가 생성, 분비한 것들도 있다. 실제로 간암 세포에서도 많은 종류의 cytokine이나 chemokine 유전자가 발현되고 있다.[60,61] 암 주변의 미세 환경 내에 존재할 수 있는 cytokine들 중, T 세포나 NK 세포에 의해서 분비되는 대표적인 cytokine으로는 interferon-γ (IFN-γ)가 있다. IFN-γ는 여러 암세포에서 다양한 자극에 의한 apoptosis를 증가시키는 것으로 알려졌으며, Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성도 증가시킨다.[62-67] IFN-γ가 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성을 증가시키는 기전으로는 Fas 발현의 증가,[62-65] Bcl-2나 Bcl-x_L 발현의 감소,[63,64] Bax나 Bak 발현의 증가,[63,66] caspase-1이나 다른 caspase의 발현 증가[66,67] 등 여러 가지 다양한 기전이 보고되어 있다. 이러한 기존의 연구 결과들은 제각기 다른 기전들을 보고하고 있는데, 이러한 차이는 각 연구들이 제한된 세포를 대상으로 하였기 때문이라고 생각된다. 사람 간암 세포에서도 IFN-γ에 의해 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성이 증가한다는 보고가 있으나,[68] 명확한 기전은 보고되지 않았다. 한편, IFN-γ가 TRAIL-induced apoptosis에 미치는 영향에 대해서는 아직 명확한 보고가 없고, 다만 여러 세포에서 IFN-γ가 TRAIL의 발현을 증가시킨다는 보고들이 있다.[39,40,69-71]

간암 세포에서 분비할 수 있는 cytokine 중에서는 interleukin-6 (IL-6)이 apoptosis에 미치는 영향이 비교적 명확하게 알려져 있다. 특히, IL-6은 간암 세포에서 B형 간염 바이러스(hepatitis B virus)의 HBx에 의해 그 발현이 유도되며,[72] 간암 세포에서 transforming growth factor-β (TGF-β)에 의한 apoptosis를 억제하는 것이 보고된 바 있다.[73] 그리고, IL-6의 apoptosis 억제 효과는 phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase)/Akt 경로와 signal transducers and activators of transcription (STAT) 3의 활성화에 의한다는 것이 보고되었다.[73] 그러나, IL-6이 간암세포에서 Fas-mediated apoptosis도 억제하는지에 대해서는 보고된 바 없다. 또한, 간암 세포에서 interleukin-8 (IL-8) 유전자가 발현되며,[61,74] 암세포에서 분비된 IL-8은 간암 세포나 췌장암 세포의 생존율을 증가시킨다는 보고가 있다.[74] 그러나, IL-8이 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향에 대해서도 보고된 바 없다.

본 연구에서는 간암 세포와 항종양 면역세포 간의 상호 작용을 더욱 잘 이해하기 위하여, 간암 주변의 미세 환경에 존재할 수 있는 몇몇 cytokine들이 사람 간암 세포의 apoptosis에 미치는 영향을 알아보았다. 특히, IFN-γ가 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향 및 그 기전과 IFN-γ 자체만으로도 유도되는 apoptosis의 특성 및 기전을 집중적으로 조사하였다. 또한, 간암 세포에서 IL-6과 IL-8이 Fas-mediated apoptosis에 미

치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 간암 세포주와 세포배양

실험에 사용한 사람 간암 세포주는 SK-HEP-1 (ATCC HTB 52), Hep G2 (ATCC HB 8065), Hep G2.2.15,[75] Hep 3B (ATCC HB 8064), PLC/PRF/5 (ATCC CRL 8024), SNU-182, SNU-354, SNU-368, SNU-387, SNU-398, SNU-423, SNU-449, SNU-475이었다. 이 중 SNU 간암 세포주들은[76] 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였고, 그 외의 세포주는 연세의대 미생물학교실에서 보관, 계대배양하고 있는 세포주를 이용하였다. 정상 간에서 기원된 세포주인 Chang liver (ATCC CCL 13)도 연세의대 미생물학교실에서 보관, 계대배양하고 있는 세포주를 이용하였다.

세포주들은 10% 우태아혈청(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 100 U/ml의 penicillin, 100 μg/ml의 streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco BRL) 배양액에서 배양하여 실험에 사용하였다.

2. Lactate dehydrogenase 분석

세포사의 정도를 측정하기 위해 lactate dehydrogenase (LDH) 분석을 시행하였다.[77] 간암 세포를 24 well plate에서 50-60% 정도의 면적을 차지하도록 배양한 후, 250 U/ml의 IFN-γ (Genzyme, Cambridge, MA, USA)로 처리하였다. 36 시간 후, well 당 500 μl의 신선한 배양액으로 교환하였으며, 이 때 효현제 역할을 하는 anti-Fas IgM 단클론 항체인 CH11 (MBL, Watertown, MA, USA)을 250 ng/ml의 농도로 투여하고 배양하였다. 그리고, IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis를 억제할 때는 재조합 DR4-Fc 융합 단백(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)이나 재조합 Fas-Fc 융합 단백(R&D Systems)을 투여하기도 하였고, IL-6이나 IL-8의 영향을 보기 위해서는 재조합 IL-6 (R&D Systems)이나 재조합 IL-8 (R&D Systems)을 투여하기도 하였다. 그 후, 다시 36 시간을 배양한 후 LDH 분석을 시행하였다. Well 당 500 μl의 배양액 중 100 μl의 배양액을 96 well plate의 한 well로 옮기고, 남은 세포에는 최종농도가 1%가 되도록 Triton X-100을 가하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해액 50 μl를 96 well plate로 옮긴 후, NADH (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 pyruvate (Sigma)를 넣고 plate reader를 이용하여 340 nm의 파장에서 흡광도의 변화를 측정하여, LDH의 활성을 결정하였다. 세포사의 정도는 다음과 같은 공식으로 정하였다.
세포사 백분율 = [(배양액 100 μl의 LDH 활성 − 신선한 배지 100 μl의 LDH 활성) / 2 × (세포 용해액 50 μl의 LDH 활성 − 1% Triton X-100이 포함된 신선한 배지 50 μl의 LDH 활성)] × 100

3. 3-(4-,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide 분석

세포생존율을 평가하기 위해 3-(4-,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 분석을 시행하였다.[78] 한 well당 1 × 10^4개의 간암 세포를 96 well plate에 넣고 세포가 바닥에 붙도록 하였다. 다음 날, 200 ng/ml의 재조합 수용성 TRAIL (R&D Systems)이 들어 있는 배양액으로 교체한 후, 24 시간 동안 배양하였다. 각 well당 2 mg/ml의 MTT 용액 50 μl를 가하고 37℃에서 4 시간 동안 놓아두고, plate를 200 g에서 10 분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 남은 침전물에 dimethyl sulfoxide 50 μl를 넣어 침전물을 녹이고, 환원된 MTT를 plate reader를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

4. Caspase-3 활성도 측정

간암 세포를 IFN-γ로 처리한 후, 형광을 나타낼 수 있는 caspase-3 기질인 Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethyl coumarin (Ac-DEVD-AMC; Pharmingen, San Diego, CA, USA)을 이용하여 caspase-3 활성도를 측정하였다.[79] 간암 세포의 세포 용해액을 얻기 위하여 세포를 1% Triton X-100가 포함된 세포 용해 완충액으로 처리하였고, 이렇게 얻은 세포 용해액에 Ac-DEVD-AMC를 섞은 후 37℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그리고, 여기서 발생하는 형광강도를 spectrofluorometer를 이용하여 측정하였다. 이 때 활성화 파장은 380 nm이었고, 방출 파장은 420 nm에서 측정하였다. 각 시료의 형광강도는 세포 용해액의 총 단백질 농도로 나누어 보정하였다.

5. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

배양한 간암 세포에서 RNeasy mini kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 5 μg의 총 RNA에 2 μg의 random hexamer (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 2 μl의 10 mM dNTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 200 U의 M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL)를 첨가하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 하고 4 μl의 1.25 mM dNTP, 0.25 U의 *Taq* polymerase (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA), 증폭하고자 하는 유전자에 합당한 primer 조합을 10 pmole씩 넣어 thermal cycler (Perkin Elmer)에서 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.[35] 중합효소 연쇄반응에 사용한 primer는 다음과 같다. DcR1: 5'-GAT CCC CAA GAC CCT AAA GTT-3', 5'-GGT TTC CAC AGT GGC ATT GGC-3'; DcR2: 5'-AGG GAT GGT CAA GGT CAG TAA T-3', 5'-GAT GTC AGC GGA GTC AGC GTC A-3'; FasL: 5'-ATG TTT CAG CTC TTC CAC CTA CAG AAG GA-3', 5'-CAG AGA GAG CTC AGA TAC GTT GAC-3'; β-actin: 5'-CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA-3', 5'-TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-3'. 중합효소 연쇄반응은 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분의 조건으로 시행하였고, 예비실험을 통하여 각각의 증폭하고자 하는 유전자에 적합한 중합효소 연쇄반응 주기 수를 결정하여 시행하였다. 중합효소 연쇄반응

산물은 agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

6. RNase protection assay

RNase protection assay (RPA)는 RiboQuant^TM multi-probe RNase protection assay kit (Pharmingen)를 사용하여 시행하였다.[42] 약술하면 hAPO-1, hAPO-2, hAPO-3, hAPO-3c (Pharmingen) template set를 template로 하고, 각각 2.75 mM의 ATP, GTP, CTP와 100 μCi [^{32}P]-UTP (3000 Ci/mmol, NEN, Boston, MA, USA), 20 U의 T7 RNA polymerase를 이용하여 [^{32}P]-labeled antisense riboprobe을 합성하고, 간암 세포의 총 RNA를 [^{32}P]-labeled antisense riboprobe과 56℃에서 16시간동안 hybridization시켰다. 여기에 20 ng의 RNase A와 50 U의 RNase T1을 처리하고 분해되지 않은 duplex RNA hybrid를 8 M의 urea가 포함된 6% denaturating polyacrylamide gel에서 전기영동한 후, autoradiography로 결과를 확인하였다. 각 band의 강도는 densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량적으로 측정하였다.

7. 면역형광염색 및 유세포분석

간암 세포표면의 Fas 발현을 확인하기 위하여 면역형광염색 및 유세포분석을 시행하였다.[42] 간암 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 처리한 후, 0.125%의 trypsin과 0.5 mM의 EDTA를 이용하여 배양용기 바닥으로부터 제거하였다. 바닥으로부터 제거된 세포를 인산완충식염액으로 세척하고 세포수를 측정하였다. 5×10^5개의 간암 세포를 1% 우태아혈청이 포함된 RPMI 1640에 부유시킨 후, anti-Fas 단클론 항체인 DX2 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시키고, 인산완충식염액으로 2회 세척하였다. FITC가 부착된 goat anti-mouse IgG 항체(Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA)를 첨가하고 빛을 차단한 상태로 4℃에서 30분간 반응시키고, 인산완충식염액으로 세척하였다. 마지막으로 1% paraformaldehyde 인산완충식염액으로 고정한 후, FACStar (Becton Dickinson)를 이용하여 형광강도를 측정하였다. 측정결과는 WinMDI 2.8 프로그램을 이용하여 분석하였다. 세포표면 ICAM-1의 발현도 같은 방법으로 측정하였고, 이 때는 anti-ICAM-1 단클론 항체인 84H10 (Immunotech, Marseille, France)을 사용하였다.

III. 결　　과

1. IFN-g가 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향

IFN-γ가 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 간암 세포에 250 U/ml의 IFN-γ를 36 시간 동안 전처리한 후, 효현성 anti-Fas 항체인 CH11을 250 ng/ml의 농도로 처리하고 36 시간을 더 배양한 후, LDH 분석을 시행하여 apoptosis

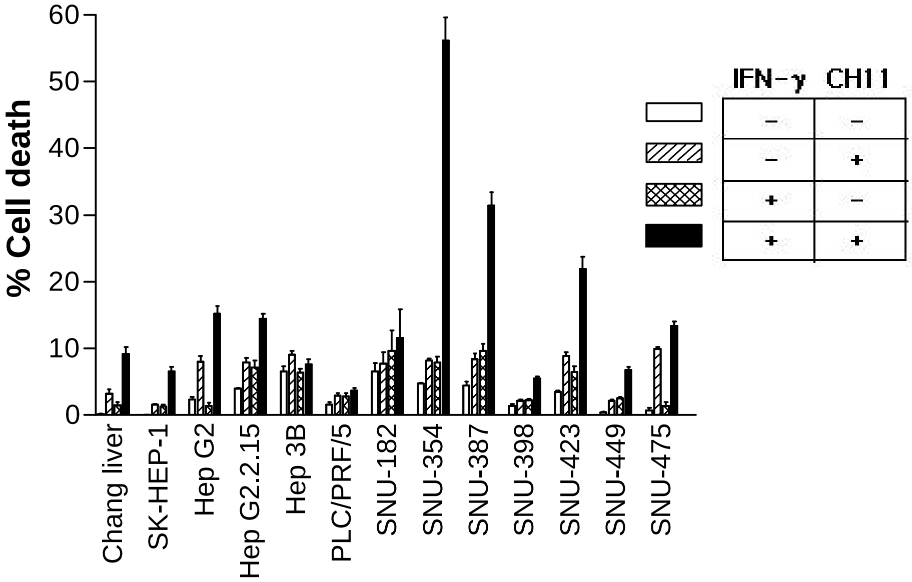


그림 2. IFN-γ가 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. 간암 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 전처리하고 배양액을 제거한 후, 효현성 anti-Fas 항체인 CH11을 250 ng/ml의 농도로 포함하고 있는 배양액을 넣어 36 시간 동안 처리하였다. LDH 분석을 시행하여 세포사 백분율을 구하였다. 독립적으로 4 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 나타내었다.

의 정도를 평가하였다. IFN-γ를 전처리하지 않고 CH11만을 처리하였을 때는, 13 가지의 모든 세포주에서 10% 이하의 세포사를 보여 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 나타내었다. 반면, IFN-γ를 전처리하고 CH11을 처리하였을 때는 SNU-354, SNU-387, SNU-423의 3 가지 세포주에서 20% 이상으로 세포사의 정도가 증가하여 Fas-mediated apoptosis에 감수성을 보였다. 그러나, 나머지 10 가지 세포주는 IFN-γ 처리 후에도 여전히 10% 이하의 세포사를 보여 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 나타내거나, 세포사가 10-20%로 apoptosis의 정도가 조금 증가하는데 그쳤다(그림 2).

2. IFN-g가 간암 세포에서 apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향

IFN-γ가 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis를 증가시키는 기전을 알아보기 위하여, 간암 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 24 시간 동안 처리하고 다양한 apoptosis 관련 유전자들의 mRNA 발현 변화를 관찰하였다. 관찰한 apoptosis 관련 유전자로는 Fas와 세포내 Fas 신호전달 경로에 관여하는 유전자들, *bcl-2* family에 속하는 유전자들, caspase family에 속하는 유전자들을 포함시켰고, RPA를 이용하여 관찰하였다. 그 결과, IFN-γ에 의한 Fas mRNA의 증가가 Chang liver, Hep G2, SNU-354, SNU-387, SNU-423, SNU-449, SNU-475의 7 가지 세포주에서 관찰되었고(그림 3A), Fas mRNA 발현 정도를 densitometer로 측정하여

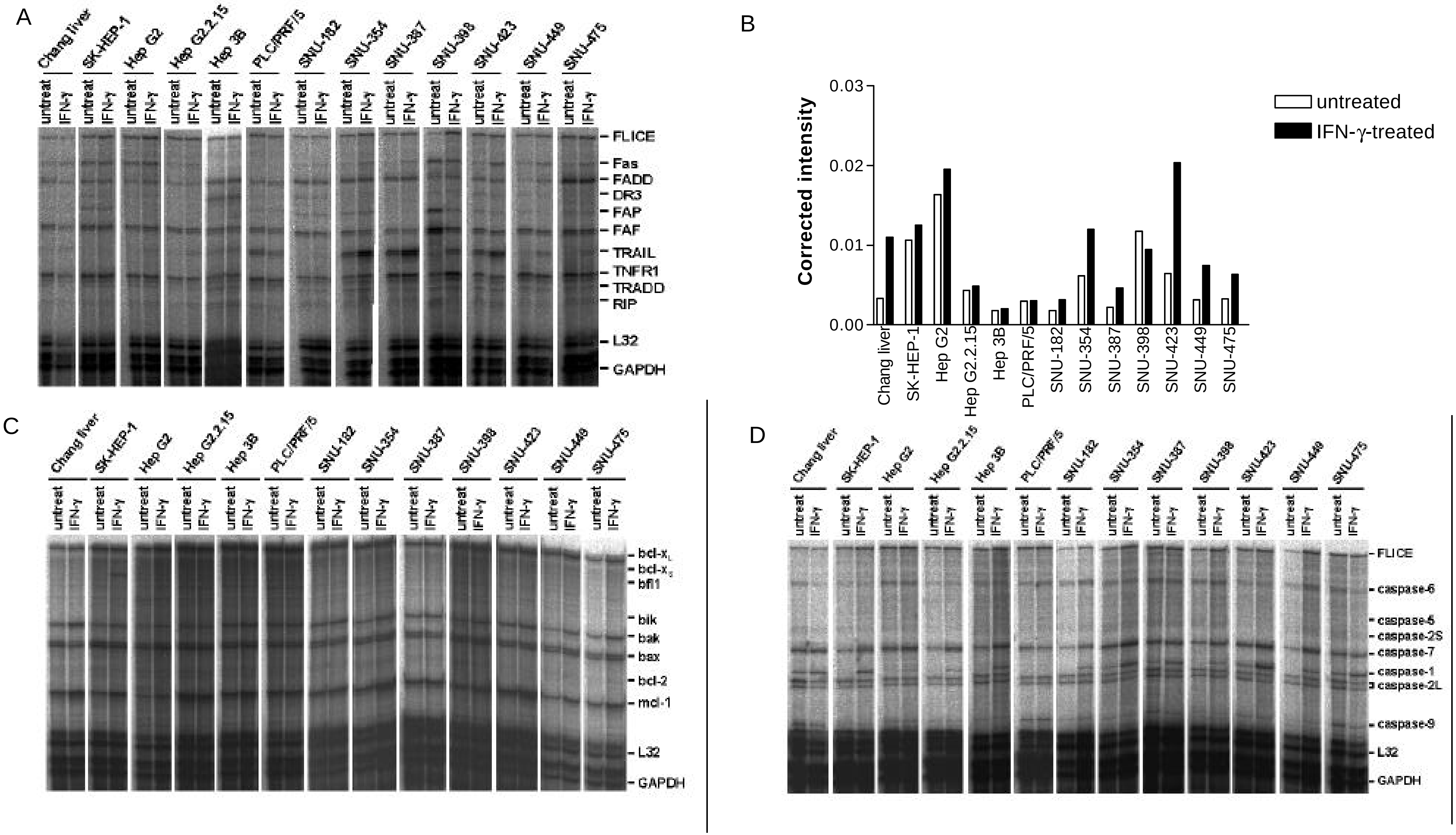


그림 3. IFN-γ가 간암 세포에서 apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향. 간암 세포를 250 U/ml 의 IFN-γ로 24 시간 동안 처리한 후, 총 RNA 를 분리하고 apoptosis 관련 유전자들의 발현을 조사하기 위해 RPA 를 시행하였다. (A) FLICE, Fas, FADD, death receptor 3 (DR3), FAP, FAF, TRAIL, TNF receptor 1 (TNFR1), TNFR1-associated death domain protein (TRADD), receptor interacting protein (RIP)의 mRNA 발현. (B) Fas mRNA 발현을 정량적으로 비교하기 위해 RPA 에서 관찰된 Fas band 와 internal control 인 GAPDH band 의 강도를 densitometer 로 측정하고 그 비를 구하여 히스토그램으로 나타내었다. (C) *Bcl-2* family 에 속하는 유전자들의 mRNA 발현. (D) Caspase family 에 속하는 유전자들의 mRNA 발현

정량화한 결과, Chang liver, SNU-354, SNU-387, SNU-423, SNU-449, SNU-475 세포주에서 IFN-γ에 의한 Fas mRNA의 증가가 두드러짐을 알 수 있었다(그림 3B). Fas 이외에 세포내 Fas 신호전달 경로에 관여하는 유전자들의 mRNA 발현도 일부 세포주에서 IFN-γ에 의해 변화되었다. SNU-449에서는 IFN-γ에 의해 FADD mRNA의 발현이 증가되었고, SNU-398에서는 FLICE와 FADD의 발현이 증가되었으며, FAF와 FAP의 발현이 감소되었다. 그리고, TRAIL mRNA 발현의 증가가 여러 세포주에서 관찰되었다.

반면, *bcl-2* family에 속하는 유전자들 중에서는 IFN-γ에 의해 mRNA 발현이 변화하는 유전자가 없었다(그림 3C). 또한, 특기할 만한 사실은 실험에 사용한 많은 간암 세포주들에서 *bcl-2* mRNA를 검출할 수 없었다는 점이다.

Caspase family에 속하는 유전자들 중에서는 PLC/PRF/5를 제외한 모든 세포주에서 IFN-γ에 의해 caspase-1 mRNA의 발현이 증가되었고, 이러한 현상은 기본적으로 caspase-1 mRNA의 발현이 검출되지 않는 세포주들에서도 나타났다(그림 3D). Caspase-1 이외의 caspase들은 IFN-γ에 의한 mRNA 발현 변화가 없었다.

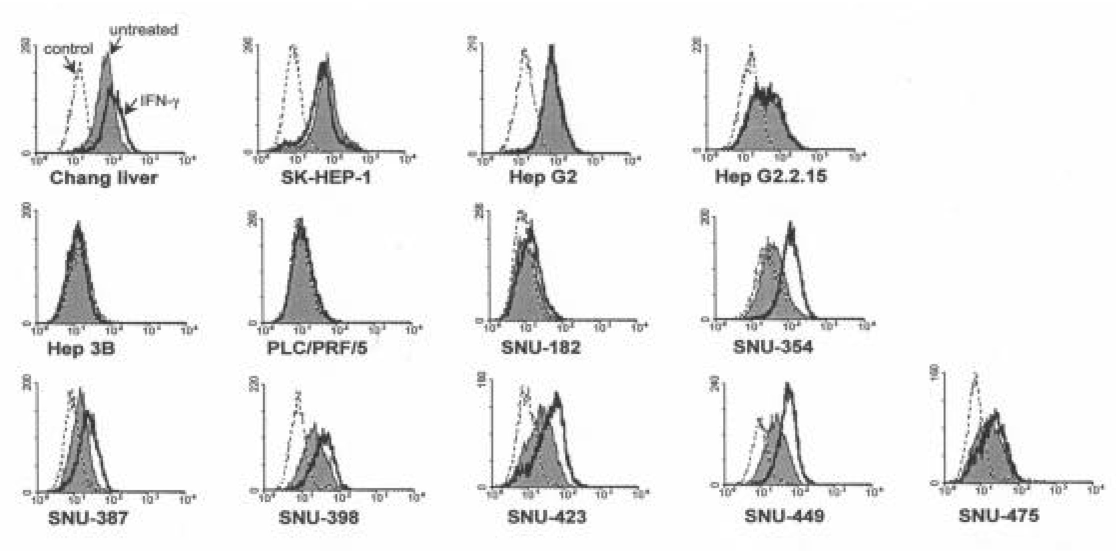
그러나, 이렇게 IFN-γ에 의해 mRNA 발현이 변화하는 여러 apoptosis 관련 유전자들 중, IFN-γ 전처리에 의해 Fas-mediated apoptosis가 비교적 크게 증가하였던 SNU-354, SNU-387, SNU-423 세포주에서만 특이적으로 발현 변화를 보이는 유전자는 찾을 수 없었다.

3. IFN-g에 의한 세포표면 Fas의 증가와 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성의 연관

다수의 간암 세포주에서 IFN-γ에 의해 Fas mRNA의 발현이 증가하였으므로(그림 3A, 그림 3B), 동일한 자극에 의해 세포표면 Fas 단백의 발현 변화도 일어나는지 알아보았다. 이를 위해 간암 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 처리한 후, 세포표면 Fas를 anti-Fas 항체로 면역형광염색하고 유세포분석을 시행하였다. Chang liver, SNU-354, SNU-387, SNU-398, SNU-423, SNU-449는 IFN-γ로 처리하지 않아도 세포표면 Fas를 발현하였고, IFN-γ 처리에 의해 그 발현이 증가하였다(그림 4A). SK-HEP-1, Hep G2, Hep G2.2.15, SNU-475는 IFN-γ로 처리하지 않아도 세포표면 Fas를 발현하나, IFN-γ 처리에 의한 발현 변화는 없었다. 반면, SNU-182는 IFN-γ로 처리하지 않았을 때 세포표면 Fas를 매우 약하게 발현하고 IFN-γ 처리에 의해서도 그 발현이 거의 증가하지 않았고, Hep 3B와 PLC/PRF/5는 IFN-γ 처리 여부와 상관 없이 세포표면 Fas를 전혀 발현하지 않았다.

IFN-γ 처리에 의한 세포표면 Fas의 증가와 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성의 변화와의 연관성을 알아보기 위해, IFN-γ 처리에 의한 세포표면 Fas의 증가를 정량화하였다. 이를 위해 IFN-γ 처리 전후의 세포표면 Fas의 발현 정도를 평균 형광강도로 정량화한 후, 동일 세포주에서 IFN-γ 처리 후의 평균 형광강도를 IFN-γ 처리 전의 평균 형광강도로 나누어 IFN-γ 처리에 의한 세포표면 Fas의 증가 정도를 정량화하였다(그림 4B). 그 결과, SNU-354, SNU-387, SNU-423, SNU-449는 IFN-γ 처리에 의해 세포표면 Fas 발현

A



B

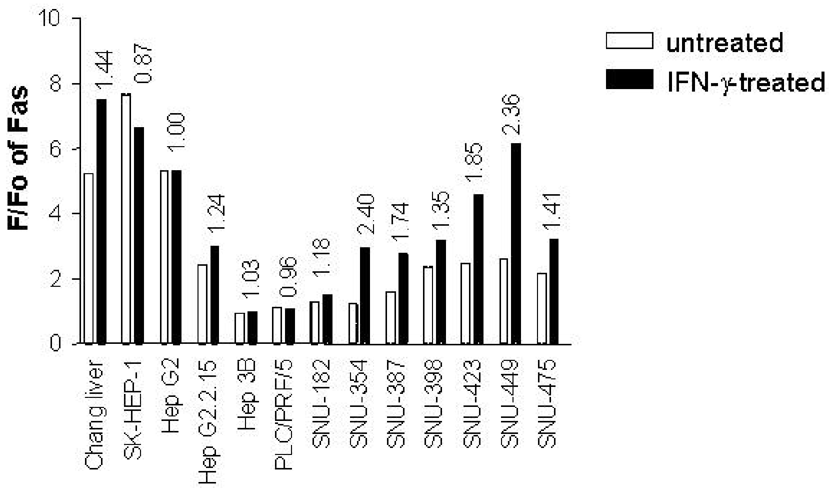


그림 4. IFN-γ 처리에 의한 간암 세포표면 Fas 발현 증가. (A) 간암 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 처리한 후, DX2 anti-Fas 항체와 이차항체로 면역형광염색을 시행하고 유세포 분석을 시행하였다. 점선은 anti-Fas 항체 없이 이차항체로만 염색을 시행한 음성대조군, 색으로 칠해진 부분은 IFN-γ 처리를 하지 않고 Fas를 염색한 경우, 실선은 IFN-γ 처리를 한 후 Fas를 염색한 경우이다. (B) 세포표면 Fas의 발현 정도를 정량화하여 히스토그램으로 나타내었다. F/Fo는 anti-Fas 항체로 염색한 경우의 평균 형광강도와 anti-Fas 항체 없이 이차항체로만 염색을 시행한 음성대조군의 평균 형광강도의 비이다. 각 히스토그램 위의 숫자는 IFN-γ 처리 후의 F/Fo 값을 IFN-γ을 처리하지 않았을 때의 F/Fo 값으로 나눈 것으로, IFN-γ 처리에 의해 세포표면 Fas의 발현이 증가한 정도를 나타낸다.

이 1.5배 이상 증가하여, 다른 세포주들보다 더 큰 증가 양상을 보였다. 이 4 가지 세포주 중에서 SNU-354, SNU-387, SNU-423의 3 가지 세포주는 IFN-γ 처리에 의해 Fas-mediated apoptosis가 크게 증가하였던 세포주들이었다.

이러한 결과로 간암 세포에서 IFN-γ 전처리에 의한 Fas-mediated apoptosis 증가는 IFN-γ 처리에 의한 세포표면 Fas 발현 증가 정도에 의존적임을 알 수 있었다.

4. IFN-g에 의한 세포표면 Fas 발현 조절에서 세포주간 차이 분석

위의 실험을 통하여 간암 세포에서 IFN-γ 전처리에 의한 Fas-mediated apoptosis의 증가는 IFN-γ 처리에 의한 세포표면 Fas 발현의 증가 정도에 의존적이라는 결론을 얻었으므로, IFN-γ를 처리하였을 때 세포표면 Fas 발현이 많이 증가하는 세포일수록 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성이 증가할 것으로 예상할 수 있을 것이다. 그러나, 세포주마다 IFN-γ 처리에 대한 반응이 매우 달라서 어떤 세포주는 세포표면 Fas 발현이 증가하는 반면, 어떤 세포주는 세포표면 Fas 발현에 전혀 변화가 없었다. 이렇게 IFN-γ 처리에 대하여 무반응을 보이는 세포주에서 무반응의 가능한 원인으로는 세포내 IFN-γ 신호전달에 이상이 있는 경우와 Fas 전사 및 발현 조절 시스템에 문제가 있는 경우로 대별해 볼 수 있을 것이다. 이 두 가지 경우 중 어떠한 원인 때문에 IFN-γ 처리에 무반응을 보이는지를 알아보기 위해, 간암 세포에 IFN-γ를 처리하고 IFN-γ에 의해 발현이 증가하는 것으로 잘 알려진 ICAM-1의 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과, IFN-γ를 처리하였을 때, 세포 표면 Fas 발현에 변화가 없거나 매우 조금 증가하였던 Hep G2, Hep 2.2.15, Hep 3B, SNU-182, SNU-475에서 동일한 IFN-γ 처리에 의해 세포표면 ICAM-1의 발현이 증가하였다. 반면, IFN-γ를 처리하였을 때 세포표면 Fas 발현이 증가하였던 SNU-387, SNU-398은 동일한 IFN-γ 처리에 의한 세포표면 ICAM-1의 발현 증가를 보이지 않았다(그림 5). 이러한 결과로, IFN-γ 처리에 의한 Fas 발현의 변화에 있어 무반응을 보이

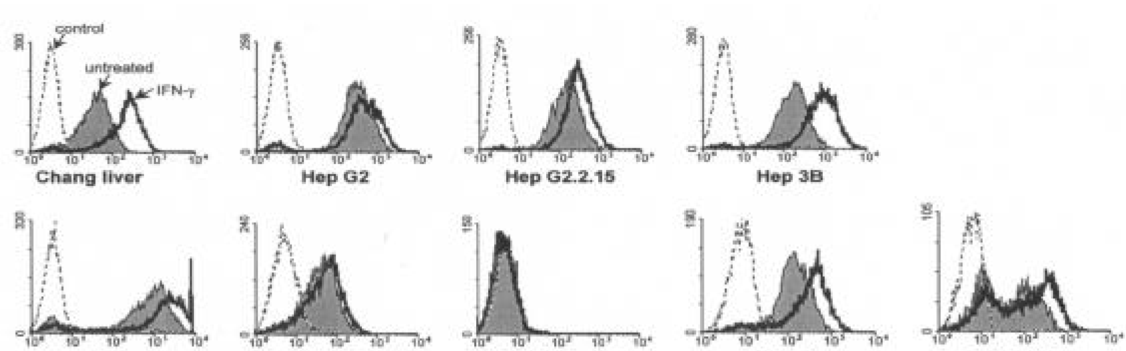


그림 5. IFN-γ 처리에 의한 간암 세포표면 ICAM-1 발현 변화. 간암 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 처리한 후, anti-ICAM-1 항체와 이차항체로 면역형광염색을 시행하고 유세포 분석을 시행하였다. 점선은 anti-ICAM-1 항체 없이 이차항체로만 염색을 시행한 음성대조군, 색으로 칠해진 부분은 IFN-γ 처리를 하지 않고 ICAM-1을 염색한 경우, 실선은 IFN-γ 처리를 한 후 ICAM-1을 염색한 경우이다.

는 세포주에서 무반응의 원인은 세포내 IFN-γ 신호전달의 이상 때문이 아니라, Fas 전사 및 발현 조절 시스템에 문제가 있기 때문인 것으로 추정할 수 있었다.

5. IFN-g에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis

위의 실험에서 IFN-γ가 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위하여 간암 세포에 IFN-γ를 전처리한 후, CH11을 처리하고 LDH 분석을 시행하던 중,

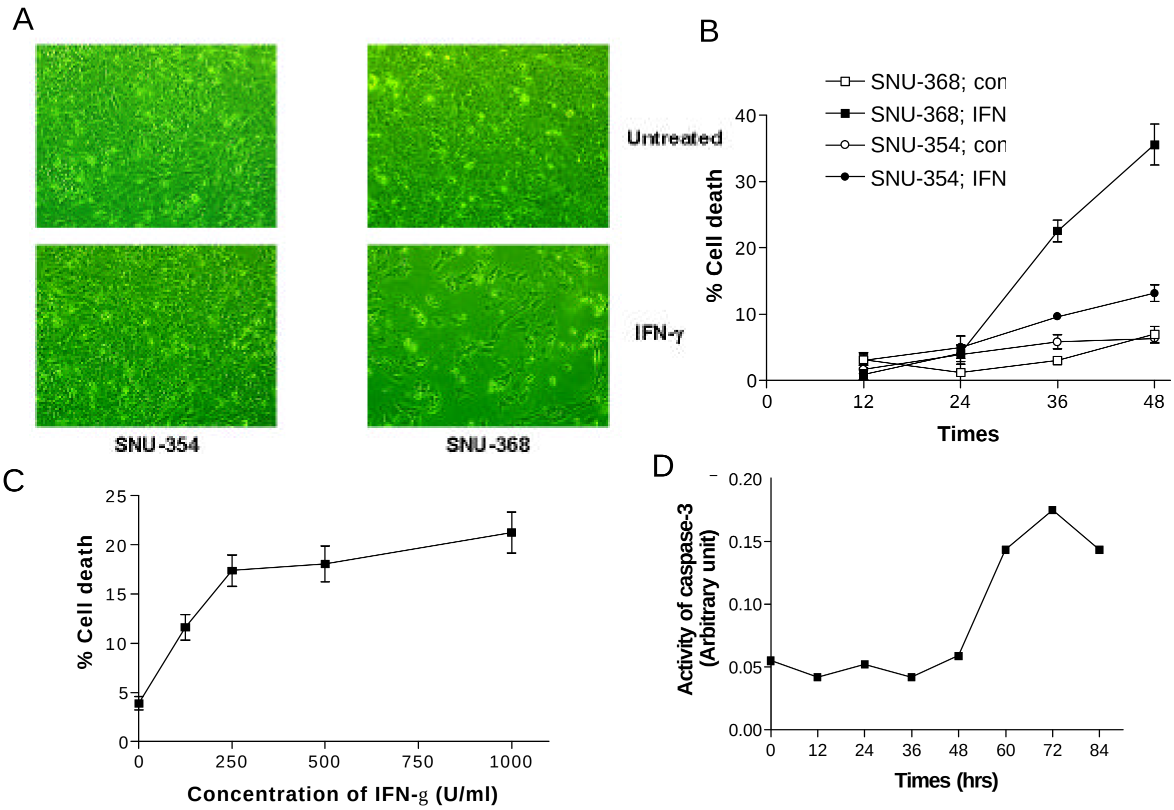


그림 6. IFN-γ 처리에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis. (A) SNU-354와 SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 처리하고 4 일 동안 배양한 후, 위상차 현미경으로 관찰하였다. (B) SNU-354와 SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 처리하고 신선한 배양액으로 교체한 후, 다시 12-48시간(IFN-γ 처리로부터는 48-84 시간)을 배양하고 시간에 따른 세포사 백분율을 구하기 위해 LDH 분석을 시행하였다. 독립적으로 4 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 나타내었다. (C) SNU-354와 SNU-368 세포를 다양한 농도의 IFN-γ로 36 시간 동안 처리하고 신선한 배양액으로 교체한 후, 다시 36시간을 더 배양하여 IFN-γ 농도에 따른 세포사 백분율을 구하기 위해 LDH 분석을 시행하였다. 독립적으로 4 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 나타내었다. (D) SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 처리하고 다양한 시간 동안 배양한 후, 세포 용해액을 얻었다. 세포 용해액을 Ac-DEVD-AMC와 섞고 37 °C에서 1 시간 동안 정치한 후, spectrofluorometer를 이용하여 형광강도를 측정하였다. 보정을 위해 측정된 형광강도를 각각의 세포 용해액의 단백질 농도로 나누었다.

SNU-368 세포에서는 CH11을 처리하지 않아도 IFN-γ 처리만으로도 세포가 죽는 현상이 관찰되었다. 이러한 SNU-368 세포의 세포사를 규명하기 위하여, SNU-368 세포에 IFN-γ를 처리하고 다양한 방법으로 세포사를 측정하였다. 이 과정에서, 여러 가지 apoptosis 관련 유전자 발현 양상은 SNU-368과 비슷하지만 IFN-γ 처리만으로는 죽지 않는 SNU-354 세포를 대조군 세포로 이용하여 실험을 수행하였다. 먼저 세포의 죽음을 형태학적으로 확인하기 위해 SNU-354와 SNU-368 세포에 250 U/ml의 IFN-γ를 처리하고 4 일 후 위상차 현미경으로 세포를 관찰하였다. 그 결과, SNU-354 세포에서는 큰 변화가 없는 반면, SNU-368 세포는 바닥에서 떨어지는 현상이 관찰되었다(그림 6A). IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 세포사의 kinetics를 알아보기 위해, IFN-γ를 처리하고 여러 시간대별로 LDH 분석을 시행한 결과, 60 시간 후부터 SNU-368 세포의 세포사가 일어나기 시작하였다(그림 6B). 또한, IFN-γ의 농도와 SNU-368 세포의 세포사와의 상관관계를 알아보기 위해 IFN-γ를 여러 가지 농도로 처리하고 LDH 분석을 시행한 결과, 세포사 반응은 IFN-γ의 농도에 따라 증가하여 250 U/ml을 투여하였을 때 plateau에 도달하였다(그림 6C). 마지막으로, apoptosis에서 특징적으로 일어나는 caspase cascade의 활성화가 IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 세포사에서 일어나는지 알아보기 위해 SNU-368 세포에 IFN-γ를 처리하고 caspase-3의 활성도를 측정한 결과, 48 시간부터 caspase-3의 활성이 증가하여 72 시간에 최고조에 달한 후 감소하는 양상을 보였다(그림 6D).

6. IFN-g가 SNU-368 세포에서 apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향

IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis에서 IFN-γ 처리로부터 SNU-368 세포의 세포사까지의 시간이 비교적 긴 것으로 보아, IFN-γ에 의해 어떤 apoptosis 관련 유전자의 전사가 조절되고, 이에 따라 이차적으로 SNU-368 세포의 apoptosis가 유도될 것이라는 가설을 세울 수 있었다. 따라서, IFN-γ가 SNU-368 세포에서 apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 24 시간 동안 처리하고 다양한 apoptosis 관련 유전자들의 mRNA 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과, caspase family 유전자들 중에서는 caspase-1 mRNA 발현 증가가 관찰되었지만(그림 7A), *bcl*-2 family 유전자들은 발현 변화를 보이지 않았다(그림 7B). Fas와 Fas 관련 유전자들 중에서는 Fas와 TRAIL mRNA 발현의 증가가 관찰되었다(그림 7C). 그러나, 이러한 변화는 IFN-γ에 의해 apoptosis가 일어나는 SNU-368 세포와, apoptosis가 일어나지 않는 SNU-354 세포에서 공통적으로 관찰되었다.

IFN-γ에 의해 SNU-368 세포에서 Fas mRNA 발현이 증가하였고, 일부 세포에서는 IFN-γ가 FasL/Fas 경로를 통하여 apoptosis를 유도한다는 이전의 보고가 있었으므로,[80] SNU-368 세포에서도 IFN-γ에 의해 작동되는 FasL/Fas 경로를 통하여 apoptosis가 유도될 가능성이 있는지 알아보고자 하였다. 이를 위해 SNU-368 세포에서 IFN-γ 처리에 의한

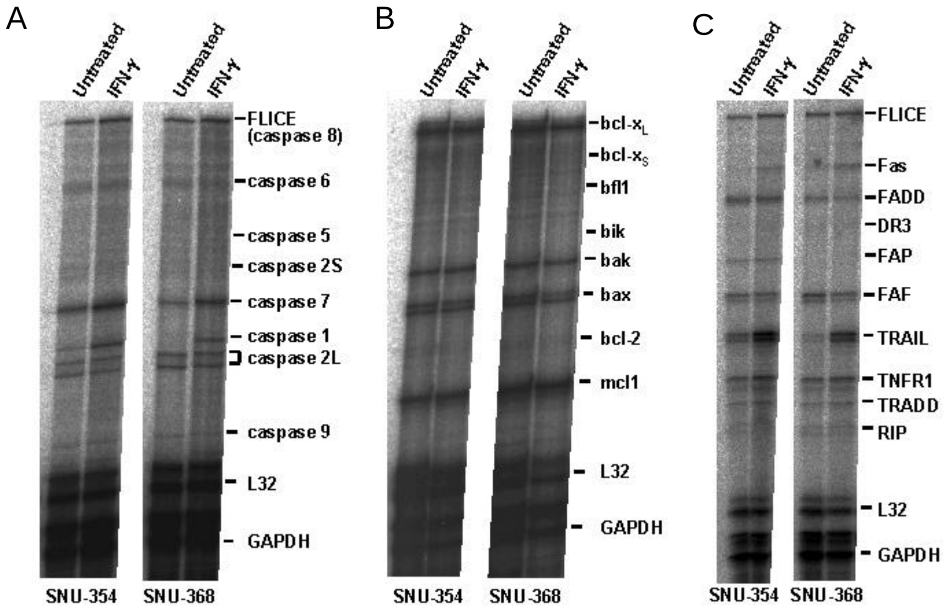


그림 7. IFN-γ가 SNU-354와 SNU-368 세포에서 apoptosis 관련 유전자 발현에 미치는 영향. SNU-354와 SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 24 시간 동안 처리한 후, 총 RNA를 분리하고 apoptosis 관련 유전자들의 발현을 조사하기 위해 RPA를 시행하였다. (A) Caspase family에 속하는 유전자들의 mRNA 발현. (B) *Bcl-2* family에 속하는 유전자들의 mRNA 발현. (C) FLICE, Fas, FADD, DR3, FAP, FAF, TRAIL, TNFR 1, TRADD, RIP의 mRNA 발현.

세포표면 Fas의 발현 변화와 FasL mRNA 발현 변화를 조사하였다. 그 결과, IFN-γ에 의해 SNU-354와 SNU-368 세포에서 세포표면 Fas 발현이 증가하였으나(그림 8A), Fas-mediated apoptosis를 유도하기 위해 필요한 FasL는 SNU-368 세포에서는 발현되지 않고, 오히려 IFN-γ에 의해 apoptosis가 일어나지 않는 SNU-354 세포에서만 발현되었다(그림 8B). 그리고, FasL의 발현은 IFN-γ에 의해 변화를 보이지 않았다. 따라서, IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis가 FasL/Fas 경로를 통해 일어날 수 있다는 가능성은 배제할 수 있었다.

7. IFN-g가 SNU-368 세포에서 TRAIL 수용체 유전자 발현에 미치는 영향

IFN-γ에 의해 SNU-368 세포에서 TRAIL의 mRNA 발현이 크게 증가하였으므로(그림 7C), IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis에서 TRAIL-induced apoptosis가 매개되어 있는지 알아보기 위해, SNU-354와 SNU-368 세포에서 TRAIL 수용체 유전자의 mRNA 발현을 조사하고 IFN-γ에 의한 변화도 조사하였다. TRAIL 수용체 중 TRAIL과 결합하였을 때 apoptosis를 매개하는 수용체인 DR4와 DR5는 두 세포주에서 모두 mRNA의 발현을 보였고, 그 정도는 IFN-γ 처리에 의해서 변화가 없었다(그림 9A). 그러나, TRAIL이

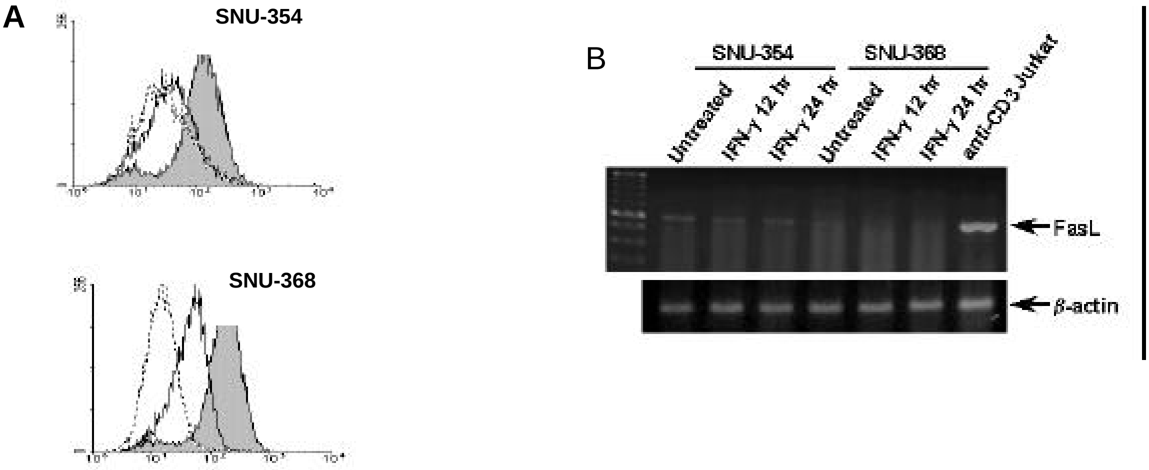


그림 8. SNU-354와 SNU-368 세포에서 IFN-γ에 의한 세포표면 Fas의 발현 변화와 FasL mRNA의 발현 변화. (A) SNU-354와 SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 처리한 후, DX2 anti-Fas 항체와 이차항체로 면역형광염색을 시행하고 유세포 분석을 하였다. 점선은 anti-Fas 항체 없이 이차항체로만 염색을 시행한 음성대조군, 실선은 IFN-γ 처리를 하지 않고 Fas를 염색한 경우, 색으로 칠해진 부분은 IFN-γ 처리를 한 후 Fas를 염색한 경우이다. (B) SNU-354와 SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 12 또는 24 시간 동안 처리한 후, 총 RNA를 분리하고 FasL mRNA의 양을 정량하기 위해 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. FasL mRNA를 잘 발현하는 양성대조군 세포로 anti-CD3 항체 자극을 준 Jurkat 세포(anti-CD3 Jurkat)를 사용하였다.

DR4나 DR5에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제할 수 있는 decoy 수용체 중의 하나인 DcR1은 SNU-354 세포에서는 발현되었으나, SNU-368 세포에서는 발현되지 않았으며, IFN-γ 처리에 의해 SNU-354에서만 그 발현이 증가되었다(그림 9B). 또 다른 decoy 수용체인 DcR2는 두 세포주에서 모두 기본적으로 발현을 하였으나, IFN-γ 처리에 의해 SNU-368 세포에서 그 발현이 조금 감소하였다. 이러한 결과를 통하여 SNU-368 세포에서 IFN-γ는 TRAIL의 발현을 증가시키고, 증가된 TRAIL이 DR4나 DR5에 결합하여 apoptosis를 유도한다는 가설을 세울 수 있었다.

8. IFN-g에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis에서 TRAIL의 역할

위에서 제시한 가설이 옳다면, SNU-368 세포는 TRAIL-induced apoptosis에 감수성이 있고 SNU-354 세포는 TRAIL-induced apoptosis에 저항성이 있을 것으로 예상된다. 이를 확인하기 위해 SNU-354와 SNU-368 세포에 200 ng/ml의 재조합 수용성 TRAIL을 투여하고 MTT 분석을 시행한 결과, 예상과 같이 SNU-368 세포에서는 세포 생존율이 감소하

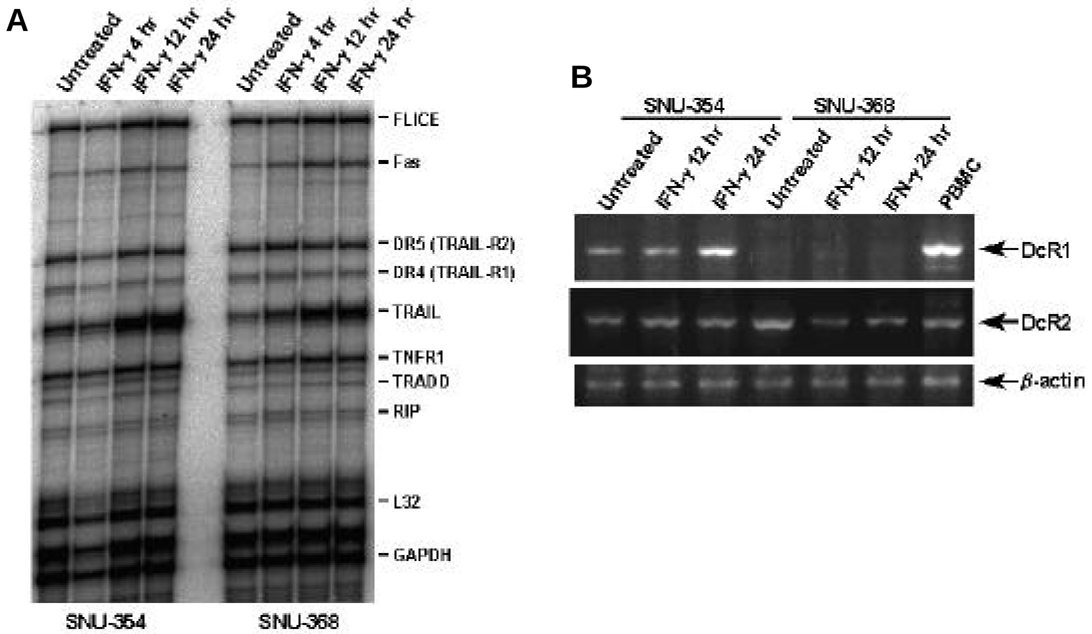


그림 9. IFN-γ가 SNU-354와 SNU-368 세포에서 TRAIL 수용체 발현에 미치는 영향. SNU-354와 SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 표시된 시간 동안 처리한 후, 총 RNA를 분리하였다. 분리된 총 RNA로 DR4와 DR5 mRNA 발현을 보기 위해 RPA를 시행하거나(그림 A), DcR1과 DcR2 mRNA 발현을 보기 위해 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응을 시행하였다(그림 B).

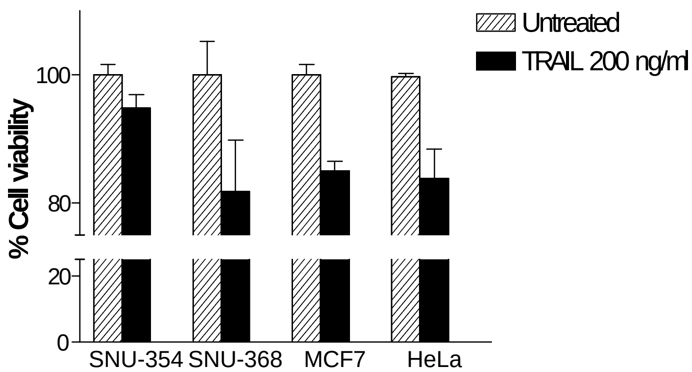


그림 10. SNU-354와 SNU-368 세포의 TRAIL-induced apoptosis에 대한 감수성. 세포를 200 ng/ml의 재조합 수용성 TRAIL로 24 시간 동안 처리하고, 세포 생존율을 알아보기 위해 MTT 분석을 시행하였다. TRAIL로 처리하지 않은 군의 세포 생존율을 100%로 계산하였다. 독립적으로 4 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 나타내었다. MCF7과 HeLa 세포주를 TRAIL-induced apoptosis에 감수성이 있는 양성대조군 세포주로 이용하였다.

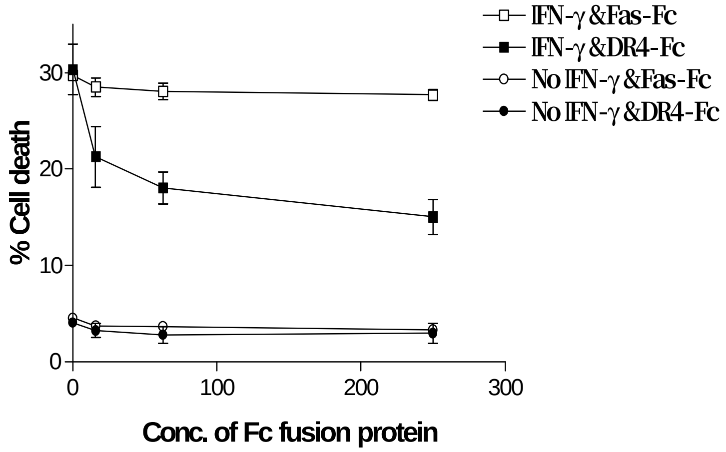


그림 11. SNU-368 세포에서 재조합 DR4-Fc 융합 단백에 의한 IFN-γ-induced apoptosis의 억제. SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ와 표시된 농도의 재조합 DR4-Fc 또는 재조합 Fas-Fc 융합 단백으로 처리하였다. 36 시간 후 배양액을 제거하고, 다시 이전과 동일한 농도의 재조합 DR4-Fc 또는 재조합 Fas-Fc 융합 단백이 포함된 배양액을 넣고 36 시간을 더 배양한 후, LDH 분석을 시행하였다. 독립적으로 3 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 나타내었다.

였고 SNU-354 세포에서는 영향이 없었다(그림 10).

위에서 제시한 가설을 확증하기 위하여 SNU-368 세포를 IFN-γ로 처리하면서, TRAIL이 DR4나 DR5에 결합하는 것을 억제할 수 있는 재조합 DR4-Fc 융합 단백을 같이 처리하여, IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis가 억제되는지 알아보았다. 그 결과, 재조합 DR4-Fc 융합 단백이 농도에 의존적으로 IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis를 억제하는 것을 확인하여 위에서 제시한 가설이 옳음을 확인하였다(그림 11). 그러나, 동일한 조건에서 재조합 Fas-Fc 융합 단백은 IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis를 억제하지 못함을 관찰하여, IFN-γ에 의한 SNU-368 세포의 apoptosis가 FasL/Fas 경로에 의해서 일어나지 않음을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

9. IL-6과 IL-8이 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향

IFN-γ 이외에 간암 주변의 미세 환경 내에 존재할 수 있는 다른 cytokine들도 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis에 영향을 주는지 알아보았다. 특히 IL-6과 IL-8은 간암 세포에서 발현, 분비된다고 보고된 바 있으며,[60,61,74] apoptosis를 억제하거나 세포의 생존을 증가시키는 것으로도 알려져 있다.[73,74] 따라서, IL-6이나 IL-8이 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis를 감소시키는지 알아보았다. 사용한 세포주로는 앞의 실험에서 IFN-γ와 CH11 처리를 통해 apoptosis가 비교적 많이 일어났던 SNU-354와 SNU-368 세포를 이용하였다. 이를 위해 SNU-354와 SNU-368 세포에 IFN-γ 전처리와 CH11 처리를 통하여 apoptosis를

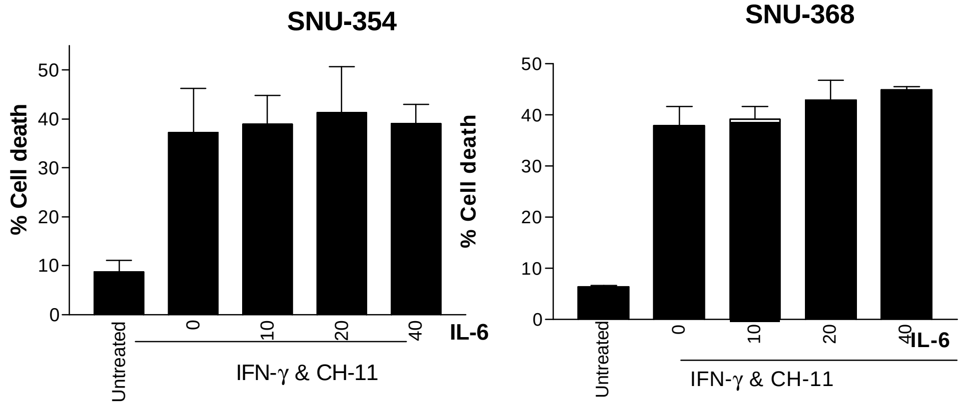


그림 12. IL-6이 간암세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. SNU-354와 SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 전처리하고 배양액을 제거한 후, 250 ng/ml의 CH11 anti-Fas 항체가 포함된 배양액을 넣고 36 시간 동안 배양하여 Fas-mediated apoptosis를 유도하였다. IFN-γ 전처리를 할 때와 CH11 처리를 할 때, 재조합 IL-6을 동시에 처리하였다. Apoptosis의 정도를 알아보기 위해 LDH 분석을 시행하였다. 독립적으로 4 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 나타내었다. 각 막대 아래의 숫자는 처리한 재조합 IL-6의 농도를 나타내며 단위는 ng/ml이다.

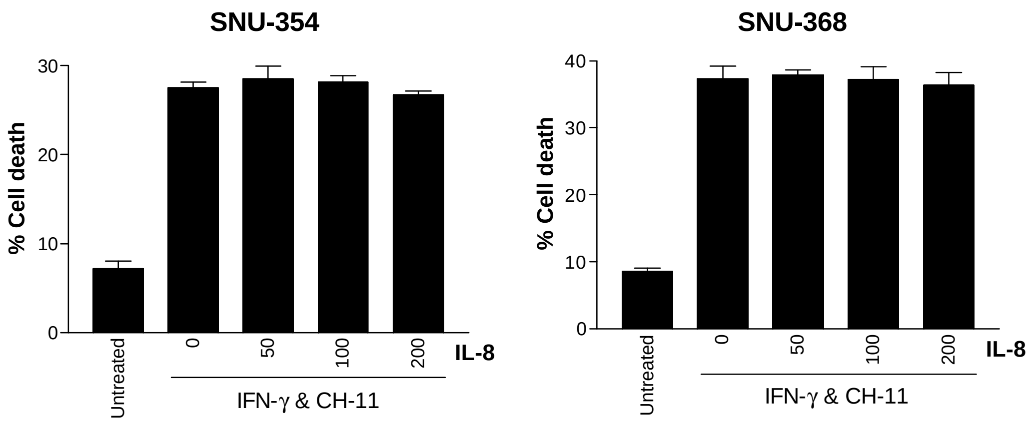


그림 13. IL-8이 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향. SNU-354와 SNU-368 세포를 250 U/ml의 IFN-γ로 36 시간 동안 전처리하고 배양액을 제거한 후, 250 ng/ml의 CH11 anti-Fas 항체가 포함된 배양액을 넣고 36 시간 동안 배양하여 Fas-mediated apoptosis를 유도하였다. IFN-γ 전처리를 할 때와 CH11 처리를 할 때, 재조합 IL-8을 동시에 처리하였다. Apoptosis의 정도를 알아보기 위해 LDH 분석을 시행하였다. 독립적으로 4 회의 실험을 시행하여 그 평균값과 표준오차를 나타내었다. 각 막대 아래의 숫자는 처리한 재조합 IL-8의 농도를 나타내며 단위는 ng/ml이다.

유도할 때, IL-6이나 IL-8을 처리하고 LDH 분석을 시행하였다. 그 결과, IL-6이나 IL-8은 SNU-354와 SNU-368 세포의 Fas-mediated apoptosis를 감소시키거나 증가시키지 않았다 (그림 12, 그림 13).

IV. 고 찰

1. IFN-g가 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis 및 이와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향

IFN-γ가 여러 암세포에서 Fas 수용체 자극을 비롯한 여러 가지 자극에 의한 apoptosis의 정도를 증가시키는 것은 잘 알려져 있다.[62-67] 본 연구에서는 간암 세포에서 IFN-γ가 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향과 Fas-mediated apoptosis와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과, 많은 간암 세포주에서 IFN-γ가 Fas mRNA 발현과 세포표면 Fas의 발현을 증가시킴을 관찰하였다. 한편, 몇몇 세포주에서는 IFN-γ 처리 없이도 기본적으로 강한 세포표면 Fas 발현을 나타냈음에도 불구하고, IFN-γ를 처리 하지 않았을 때는 실험에 사용한 모든 간암 세포주가 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 나타내었고, 이와 유사한 결과는 이전에도 보고된 바가 있었다.[55,81] IFN-γ 전처리 후에는 실험에 사용한 간암 세포주 중에서 3 가지 세포주에서만 Fas-mediated apoptosis에 감수성을 보였고, 나머지 10 가지 세포주 중 일부 세포주에서는 IFN-γ 처리에 의해 Fas의 발현이 증가했음에도 불구하고 IFN-γ 전처리에 따른 Fas-mediated apoptosis의 증가를 보이지 않았다. 이러한 결과는 대부분의 사람 간암 세포가 IFN-γ와 FasL 자극을 동시에 받더라도 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 보일 것임을 시사해주는 결과이다. 그러나, 본 실험에서 사용된 간암 세포주들의 Fas-mediated apoptosis에 대한 저항성이나 IFN-γ 전처리 후의 변화 등은 세포주들이 기원된 간암의 악성도나 임상적인 특성들[76]과는 별다른 연관 관계를 보이지 않았다.

IFN-γ 처리 후에 세포표면 Fas가 1.5배 이상 증가하여 다른 세포주들보다 더 큰 증가 양상을 보인 세포주는 4 가지가 있었는데, 이 중 SNU-449를 제외한 3 가지 세포주가 IFN-γ 전처리 후에 Fas-mediated apoptosis에 감수성을 보인 세포주였다. 이러한 결과로 간암 세포에서 IFN-γ 전처리에 의한 Fas-mediated apoptosis의 증가는 IFN-γ 전처리에 의한 세포표면 Fas 발현 증가 정도에 의존적임을 알 수 있었고, 간암 세포에서 IFN-γ 처리 후에 Fas-mediated apoptosis가 증가하는 경우에 있어, 그 기전은 세포표면 Fas의 증가 때문일 것이라고 생각할 수 있었다. 그러나, Chang liver, SK-HEP-1, Hep G2 세포는 세포표면 Fas를 강하게 발현하지만 Fas-mediated apoptosis에 대하여 저항성을 나타내었기 때문에, 절대적인 세포표면 Fas발현 정도와 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성 사이에는 연관관계가 없다고 생각할 수 있었다. 이러한 세포주들은 세포표면 Fas는 잘 발현하더라도 다른 apoptosis 억제기전이 작동하여 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 나타낼 것으로 생각된다.

본 연구에서 간암 세포에 IFN-γ를 처리하였을 때, Fas 발현의 증가 이외에 caspase-1 mRNA 발현의 증가도 관찰되었다. IFN-γ에 의한 caspase-1 발현의 증가가 apoptosis에서 하는 역할에 대해서는 U937 백혈병 세포와 HT-29 대장암 세포에서 이미 보고된 바 있다.[65,67] 그리고, IFN-γ 자극에 따른 STAT 경로의 활성화에 의해 caspase-1의 발현이 유도되어 apoptosis가 일어나는 경우가 있고,[82] 사람 적혈구 전구세포에서 일어나는 IFN-γ-induced apoptosis는 Fas, caspase-1, -3, -8 등의 발현이 증가해서 일어난다는 보고가 있다.[80,83] 이외에도 STAT1을 발현하지 않는 세포에서는 caspase-1, -2, -3를 발현하지 않고, TNF-α-induced apoptosis에 저항성을 나타낸다는 보고도 있다.[84] 이러한 이전의 보고들은 IFN-γ가 STAT1의 작용을 매개하여 caspase-1의 발현을 증가시키며, caspase-1이 apoptosis 과정에서 중요한 역할을 함을 암시해준다. 그러나, 본 연구에서는 많은 암세포주에서 IFN-γ처리 후에 caspase-1의 발현이 유도되었으나, Fas-mediated apoptosis에 대한 저항성에는 변함이 없는 경우가 많았다. 이러한 결과는 간암 세포에서는 IFN-γ 처리 후의 caspase-1 발현 증가가 Fas-mediated apoptosis에서 중요한 역할은 하지 않음을 암시해주는 것이다.

본 연구에서는 IFN-γ가 *bcl-2* family 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향도 조사해 보았다. 그 결과, 간암 세포에서 IFN-γ는 *bcl-2* family 유전자의 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았다. 대장암 세포에서는 IFN-γ처리 후의 Fas-mediated apoptosis의 증가가 *bcl-2* family 유전자의 발현 변화 때문이라는 보고가 있다.[63,66] 이들 보고에서는 COLO 201 대장암 세포에서는 Bcl-2 발현의 감소와 Bax 발현의 증가를,[63] 또 HT-29 대장암 세포에서는 Bak 발현의 증가를 보고하고 있다.[66] 그러나 본 연구에서는 이러한 발현의 변화가 관찰되지 않았다. 한 가지 특기할 점은 다른 암과 마찬가지로 간암 세포도 Bcl-2를 과발현시키면 Fas-mediated apoptosis가 억제됨에도 불구하고,[85] 실험에 사용한 모든 간암 세포주에서 *bcl-2* 유전자 mRNA 발현이 검출되지 않았다는 것이다. 이러한 결과로 간암 세포가 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 보이는 기전으로 Bcl-2의 과발현이 이용되지는 않는다고 결론지을 수 있었다.

Fas-mediated apoptosis에 대해 저항성을 획득하는 것은 간세포의 암화(carcinogenesis) 과정에 있어 필수적으로 일어나야 하는 것으로 생각된다. 정상 간세포는 Fas를 많이 발현하며 Fas 자극에 의해 쉽게 apoptosis가 유발된다.[49-51] 게다가 많은 간암이 만성 바이러스성 간염과 연관되어 발생하고 이러한 병변에 FasL를 많이 발현하는 림프구가 침윤되는 것을 고려해 보면, 간암 발생 과정에서는 Fas-mediated apoptosis에 저항성을 보이는 세포들이 선택될 것이며, 결과적으로 이렇게 선택되어 생성된 간암은 Fas-mediated apoptosis에 강한 저항성을 보일 것이다. 그리고, 어떤 간암 세포에서는 FasL를 발현하며, 암세포에서 발현되는 FasL는 암세포 주위에 침윤된 면역세포의 apoptosis를 유도하여 암세포의 면역회피 기전으로 작용한다는 것이 알려져 있다.[33,35] 만약 간암 세포가 이러한 이유로 FasL를 발현한다면 Fas-mediated apoptosis에 대한 저항성 획득은 필수적일 것이다. 간암 세포에서 이러한 Fas-mediated apoptosis에 대한 저항성을 IFN-γ처리에 의해 감소시킬 수 있는지 조사한 본 연구를 통하여, IFN-γ는 일부 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis를 증가시

키며, 이는 IFN-γ에 의한 세포표면 Fas 발현의 증가 정도에 의존적이라는 결론을 얻었다.

2. 간암 세포에서 IFN-g에 의한 apoptosis의 기전 및 IFN-g가 TRAIL 관련 유전자 발현에 미치는 영향

본 연구에서는 SNU-368 세포에서 IFN-γ에 의한 apoptosis의 특성과 기전을 조사하였고, 결과적으로 IFN-γ에 의해 발현이 증가하는 TRAIL에 의한 apoptosis를 그 가능한 기전으로 제시하였다.

최근 여러 가지 세포에서 I형 또는 II형 IFN이 TRAIL의 발현을 증가시킨다는 결과들이 보고되고 있다. 특히 IFN-γ 처리에 의해 수상돌기세포, 섬유아세포(fibroblast), 대식세포(macrophage), 영양아세포(trophoblast), 단핵세포, 갑상샘 소포세포(thyroid follicular cell), 유두상 갑상샘 암세포(papillary thyroid cancer cell) 등에서 TRAIL의 발현이 증가한다는 보고가 있다.[39,40,69-71] 그리고, 이렇게 IFN-γ 처리에 의해 증가한 TRAIL은 단핵세포나 수상돌기세포에서 항종양 활성 기전으로 이용되거나,[39,40] 섬유아세포의 항바이러스 작용 기전으로 이용된다고 제시되었다.[71] 그리고, 태반에서는 영양아세포에서 발현되는 TRAIL이 면역 특권 상태를 유지하는 기전으로 작용한다고 보고되었다.[70] 이러한 이전의 보고에 따르면 IFN-γ에 의해 발현이 증가된 TRAIL은 다른 세포의 apoptosis를 유도하는데 이용된다. 그러나, 본 연구에서는 간암 세포를 대상으로 실험하여 IFN-γ에 의해 TRAIL의 발현이 증가하며, 발현이 증가된 TRAIL에 의해 간암 세포 자신의 apoptosis가 유도됨을 증명하였다. 이러한 결과로 TRAIL의 발현 증가가 IFN-γ의 항종양 기전의 하나로 작용할 것임을 제시할 수 있었다.

본 연구의 결과에서, IFN-γ는 TRAIL에 대한 4 가지 수용체 중에서 DR4와 DR5의 발현은 변화시키지 않았고, SNU-354 세포에서는 DcR1의 발현을 증가시켰으며 SNU-368 세포에서는 DcR2의 발현을 감소시켰다. IFN-γ에 의한 TRAIL 수용체의 발현 변화에 대해서는 많은 보고가 있지는 않으나, 본 연구를 포함한 각 연구들 간에 서로 다른 결과들이 나타났다. 대식세포에서 IFN-γ는 4 가지 TRAIL 수용체 중 DR4의 발현만을 증가시키며,[70] 섬유아세포에서는 모든 4 가지 수용체의 발현을 저하시킨다.[71] 또한, 단핵세포에서는 DR5의 발현만을 감소시킨다.[39] 이렇게 각 연구들 간에 서로 다른 변화들이 보여지는 것은 아마도 세포형에 따른 특이성 때문일 것이다. 이러한 차이의 원인을 규명하기 위해서는 TRAIL에 대한 4 가지 수용체의 전사 조절에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

TRAIL은 암세포에 대한 선택적인 세포독성을 가진 새로운 항암 분자로서 주목을 받았고, 이러한 선택적인 세포독성은 decoy 수용체인 DcR1이 정상 세포에서만 발현되고 암세포에서는 발현되지 않는 경우가 많기 때문이라고 여겨졌다.[28] 그리고, 실제로 재조합 수용성 TRAIL은 항암 분자로서 동물 실험까지 거치게 되었다.[86,87] 그러나, 실제로 모든 암세포가 DcR1을 발현하지 않고, TRAIL-induced apoptosis에 감수성을 보이는지에 대해서는 의

문점이 많다. 오히려 많은 암세포들이 DcR1이나 DcR2와 같은 decoy 수용체를 발현하고, TRAIL-induced apoptosis에 저항성을 보인다는 보고도 있다.[88] 그리고, 본 연구에서도 SNU-354 세포는 TRAIL-induced apoptosis에 저항성을 보였다. SNU-354 세포는 IFN-γ 처리 없이도 TRAIL을 발현하며 IFN-γ를 처리했을 때는 매우 강하게 TRAIL mRNA 발현이 유도되었지만, apoptosis는 일어나지 않았다. 그렇다면 이렇게 TRAIL-induced apoptosis에 저항성을 보이는 암세포에서 TRAIL을 강하게 발현하는 경우 TRAIL의 역할은 무엇일까? 아마도 암세포에서 발현하는 FasL의 경우와 비슷하게 암세포 주위로 침윤되는 면역세포의 apoptosis를 유도하여 암세포의 면역회피 기전으로 이용될 것으로 추측된다. 실제로 FasL는 많은 암세포에서 발현되며,[32-35] 암세포에서 발현되는 FasL는 종양 침윤 T 세포의 apoptosis를 유도한다는 것이 보고된 바 있다.[36] 암세포에서 발현되는 TRAIL에 있어 비슷한 보고가 일부 있어, 림프구성 또는 골수성 백혈병 세포나[89] 유두상 갑상샘 암세포[69]에서 TRAIL이 발현되며, TRAIL에 민감한 세포의 apoptosis를 유도한다는 것이 보고되었다. 그리고, TRAIL을 과발현시킨 선암(adenocarcinoma) 세포는 활성화된 림프구의 apoptosis를 유도하며 생쥐에 주입하였을 때 더 빠른 성장을 보인다는 보고가 있었다.[90] 이 보고에서 이러한 TRAIL의 역할은 stealth 효과라고 언급되었다.

IFN-γ가 항종양 효과를 보이는 것은 알려져 있으나, 정확한 세포독성 기전은 잘 알려져 있지 않았다. 본 연구에서는 IFN-γ가 SNU-368 간암 세포의 apoptosis를 유도하며, 이것은 IFN-γ에 의해 발현이 증가된 TRAIL에 의한 apoptosis라는 것을 증명하여 TRAIL-induced apoptosis 경로가 IFN-γ의 항종양 효과의 기전 중 하나라는 것을 제시하였다.

3. IL-6 및 IL-8이 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향

본 연구에서는 간암 세포에서 생성, 분비되기도 하는 IL-6이나 IL-8이 SNU-354와 SNU-368 간암 세포의 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 조사하였고, 그 결과 IL-6이나 IL-8은 SNU-354와 SNU-368 간암 세포에서 Fas-mediated apoptosis의 정도를 감소시키거나 증가시키지 않음을 관찰하였다.

Hep 3B 간암 세포주를 이용한 이전의 연구에서, IL-6는 TGF-β, 자외선, retinoic acid 등 다양한 자극에 의한 apoptosis를 억제하며, 이러한 apoptosis 억제 효과는 주로 PI-3 kinase/Akt 경로의 활성화에 의한다는 것이 보고되었다.[73,91] 또한, 전립선암 세포에서도 IL-6는 PI-3 kinase를 활성화시키며, 이에 따라 apoptosis를 억제할 수 있다는 보고가 있다.[92] 각종 세포에서 PI-3 kinase가 활성화되면 어떠한 기전으로 세포의 apoptosis가 억제되는지에 대해서는 몇 가지 기전이 알려져 있다. PI-3 kinase가 활성화되면 serine/threonine kinase인 Akt가 활성화되고, 활성화된 Akt는 Bad를 인산화시키며, 이에 따라 Bad는 14-3-3과 결합되고 Bcl-x_L이 유리되어 apoptosis가 억제된다는 것이 잘 알려져 있다.[93,94] 이외에도 최근

PI-3 kinase/Akt 경로는 FLIP의 발현을 증가시켜 apoptosis 억제 기능을 할 수 있다고 알려졌고,[95] Hep 3B 간암 세포에서는 PI-3 kinase/Akt 경로가 Mcl-1의 발현을 증가시켜 apoptosis 억제 기능을 한다는 것이 보고되었다.[91] 그러나, 본 연구에서는 IL-6이 SNU-354와 SNU-368 세포의 Fas-mediated apoptosis를 억제하지 못하였다. 본 연구에서 IL-6이 Fas-mediated apoptosis를 억제하지 못한 이유로 다음의 몇 가지 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫째, 본 실험에서도 IL-6이 SNU-354와 SNU-368 세포의 PI-3 kinase/Akt 경로를 활성화시키고 그 하위의 변화도 일으켰지만 이러한 변화가 Fas-mediated apoptosis를 억제하지 못했을 수 있고, 둘째, IL-6이 SNU-354와 SNU-368 세포에서는 PI-3 kinase/Akt 경로를 활성화시키지 못했을 수 있다. 이러한 가능한 원인 중 어떤 이유로 IL-6이 SNU-354와 SNU-368 세포의 Fas-mediated apoptosis를 억제하지 못하였는지 알아보기 위해서는 SNU-354와 SNU-368 세포의 IL-6 수용체 발현, IL-6 처리에 따른 PI-3 kinase나 Akt, Bad의 인산화 여부, 그리고 FLIP이나 Mcl-1의 발현량 등을 조사해 보아야 할 것이다.

한편, IL-8이 간암 세포를 비롯한 암세포의 apoptosis에 미치는 영향에 대해서는 별로 알려진 바가 없고, 다만 간암 세포나 췌장암 세포, 그리고 대장암 세포의 생존율을 증가시킨다는 보고가 있다.[74,96] 이러한 사실에서 IL-8이 간암 세포의 apoptosis를 감소시키지 않을까 하는 가설을 가지고, 본 연구에서는 SNU-354와 SNU-368 세포에서 IL-8이 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 조사하였지만, 특별한 변화를 주지 않았다. IL-8이 간암 세포의 apoptosis를 감소시키지 않는다면, 어떠한 기전으로 간암 세포의 생존율을 증가시키는지 그 기전을 다른 측면에서 조사해볼 필요가 있을 것이다.

면역세포 뿐만 아니라 암세포에서도 각종 cytokine이나 chemokine을 생성, 분비할 수 있으며, 실제로 간암 세포에서도 IL-6이나 IL-8을 비롯한 cytokine이나 chemokine 유전자가 발현되고 있다.[60,61] 그리고, IL-6과 IL-8은 간암 세포에서 B형 간염 바이러스의 암유발 단백으로 알려진 HBx에 의해 그 발현이 유도됨이 알려져 있다.[72,97] 이렇게 IL-6이나 IL-8이 간암 세포에서 발현된다는 사실은 이들 cytokine이 간암 세포의 증식을 촉진시키거나 apoptosis를 억제하는 등의 간암의 성장에 이로운 작용을 할 것을 간접적으로 시사한다. IL-6이나 IL-8이 간암 세포에서 생성, 분비되어서 간암의 성장에 어떤 기전으로 이로운 효과를 나타낼 지에 대해서는 많은 의문점이 있다.

결론적으로, 본 연구를 통하여 IFN-γ가 간암 세포의 apoptosis에 미치는 영향과 그 기전을 조사함으로써, IFN-γ는 일부 간암 세포의 세포표면 Fas 발현을 증가시킴으로써 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성을 높일 수 있음을 알 수 있었고, 어떤 간암 세포에서는 TRAIL의 발현을 증가시키고, 이에 따라 TRAIL에 의한 apoptosis가 유도되어 부수적인 자극 없이도 IFN-γ만으로도 apoptosis를 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

V. 결　　론

본 연구에서는 사람 간암 세포에서 IFN-γ가 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향 및 그 기전을 조사하였고, IFN-γ처리 자체만으로도 apoptosis가 유도되는 SNU-368 간암 세포에서 IFN-γ-induced apoptosis의 특성 및 기전을 조사하였다. 또한, 간암 세포에서 IL-6과 IL-8이 Fas-mediated apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간암 세포는 Fas-mediated apoptosis 에 저항성이 있으며, 일부 간암세포는 IFN-γ 전처리에 의해 Fas-mediated apoptosis 에 대한 감수성이 증가한다.
2. 일부 간암 세포에서 관찰되는 IFN-γ 전처리에 의한 Fas-mediated apoptosis의 증가는 IFN-γ에 의한 세포표면 Fas 발현의 증가 정도와 강한 연관성이 있다.
3. SNU-368 간암 세포에서 IFN-γ는 Fas 수용체 자극 없이도 apoptosis를 유발하며, 이는 IFN-γ에 의해 발현이 증가된 TRAIL에 의해 apoptosis가 유발되기 때문이다.
4. 간암 세포에서 IL-6이나 IL-8은 Fas-mediated apoptosis의 정도를 변화시키지 않는다.

이상의 결과로, 일부 간암 세포에서 IFN-γ는 세포표면 Fas 발현을 증가시킴으로써 Fas-mediated apoptosis에 대한 감수성을 높일 수 있고, 어떤 간암 세포에서는 TRAIL의 발현을 증가시키고, 이에 따라 TRAIL에 의한 apoptosis가 유도되므로 부수적인 자극 없이 IFN-γ 만으로도 apoptosis를 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997;8:355-65.
2. Yuan J. Transducing signals of life and death. Curr Opin Cell Biol 1997;9:247-51.
3. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 1991;66:233-43.
4. Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, et al. 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 1992;267:10709-15.
5. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem 1995;270:7795-8.
6. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell 1995;81:505-12.

7. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell 1996;85:803-15.
8. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signalling complex. Cell 1996;85:817-27.
9. Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT, et al. CPP32/Apopain is a key interleukin 1β converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. J Biol Chem 1996;271:1841-4.
10. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 1998;391:43-50.
11. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 1998;391:96-9.
12. Chu K, Niu XH, Williams LT. A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:11894-8.
13. Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. Science 1995;268:411-5.
14. Owen-Schaub LB, Angelo LS, Radinsky R, Ware CF, Gesner TG, Bartos DP. Soluble Fas/APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis? Cancer Lett 1995;94:1-8.
15. Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. Nature 1998;396:699-703.
16. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 1995;3:673-82.
17. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem 1996;271:12687-90.
18. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science 1997;276:111-3.
19. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science 1997;277:815-8.
20. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science 1997;277:818-21.
21. Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. Curr Biol 1997;7:693-6.

22. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. EMBO J 1997;16:5386-97.
23. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emrging TRAIL receptor family. J Exp Med 1997;186:1165-70.
24. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-κB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. Immunity 1997;7:813-20.
25. Mongkolsapaya J, Cowper AE, Xu XN, Morris G, McMichael AJ, Bell JI, et al. Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. J Immunol 1998;160:3-6.
26. Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling. FEBS Lett 1998;424:41-5.
27. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, et al. Osteoprotegerin is a receptor for cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem 1998;273:14363-7.
28. Gura T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. Science 1997;277:768.
29. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. Science 1994;265:528-30.
30. Berke G. The CTL's kiss of death. Cell 1995;81:9-12.
31. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1 (Fas/CD95). Nature 1995;373:438-41.
32. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. Science 1996;274:1363-6.
33. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells – a mechanism of immune evasion? Nat Med 1996;2:1361-6.
34. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. J Exp Med 1996;184:1075-82.
35. Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ. Expression of Fas ligand in human hepatoma cell lones: role of hepatitis-B virus X (HBx) in induction of Fas ligand. Int J Cancer 1999;82:587-91.
36. Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. Curr Opin Immnuol 1998;10:564-72.
37. Thomas WD, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediated CD4 T cell killing of target cells. J Immunol 1998;161:2195-200.

38. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. J Exp Med 1999;189:1451-60.
39. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. J Exp Med 1999;189:1343-53.
40. Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K, Griffith TS. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). J Exp Med 1999;190:1155-64.
41. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. Nat Med 2001;7:94-100.
42. Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim JJ, Kim H, Kim SJ. Expression of Fas-related genes in human hepatocellular carcinomas. Cancer Lett 1998;134:155-62.
43. Hague A, Moorghen M, Hicks D, Chapman M, Paraskeva C. Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. Oncogene 1994;9:3367-70.
44. Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G. Small cell carcinomas of the lung express the bcl-2 protein. Am J Pathol 1994;145:1036-40.
45. Furuya Y, Krajewski S, Epstein JI, Reed JC, Isaacs JT. Enhanced expression of Bcl-2 and the progression of human and rodent prostatic cancers. Clin Cancer Res 1996;2:389-98.
46. Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature 1997;388:190-5.
47. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitor of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene 1998;17:3247-59.
48. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med 1997;3:917-21.
49. Galle PR, Krammer PH. CD95-induced apoptosis in human liver disease. Semin Liver Dis 1998;18:141-51.
50. Feldmann G. Liver apoptosis. J Hepatol 1997;26:1-11.
51. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature 1993;364:806-9.
52. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schller H, Otto G, Stremmel W, et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. J Exp Med 1995;182:1223-30.
53. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. Nat Med 1997;3:409-13.

54. Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Nat Med 2000;6:564-7.
55. Natoli G, Ianni A, Costanzo A, Petrillo GD, Ilari I, Chrillo P, et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. Oncogene 1995;11:1157-64.
56. Yamanaka T, Shiraki K, Sugimoto K, Ito T, Fujikawa K, Ito M, et al. Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. Hepatol 2000;32:482-90.
57. Higaki K, Yano H, Kojiro M. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues. Am J Pathol 1996;149:429-37.
58. Luo KX, Zhu YF, Zhang LX, He HT, Wang XS, Zhang L. In situ investigation of Fas/FasL expression in chronic hepatitis B infection and related liver diseases. J Viral Hepatitis 1997;4:303-7.
59. Nagao M, Nakajima Y, Hisanaga M, Kayagaki N, Kanehiro H, Aomatsu Y, et al. The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance in vivo? Hepatology 1999;30:413-21.
60. Stonans I, Stonane E, Rubwurm S, Deigner HP, Bohm KJ, Wiederhold M, et al. Hep G2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes. Cytokine 1999;11:151-6.
61. Yoong KF, Afford SC, Jones R, Aujla P, Qin S, Price K, et al. Expression and Function of CXC and CC chemokines in human malignant liver tumors: a role for human monokine induced by γ-interferon in lymphocyte recruitment to hepatocellular carcinoma. Hepatol 1999;30:100-11.
62. Fellenberg J, Mau H, Scheuerpflug C, Ewerbeck V, Debatin KM. Modulation of resistance to anti-APO-1-induced apoptosis in osteosarcoma cells by cytokines. Int J Cancer 1997;72:536-42.
63. Koshiji M, Adachi Y, Sogo S, Taketani S, Oyaizu N, Than S, et al. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO 201) by tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and/or interferon-gamma (IFN-γ), resulting from down-modulation of Bcl-2 expression. Clin Exp Immunol 1998;111:211-8.
64. Spanaus KS, Schlapbach R, Fontana A. TNF-α and IFN-γ render microglia sensitive to Fas lignad-induced apoptosis by induction of Fas expression and down-regulation of Bcl-2 and Bcl-x_L. Eur J Immunol 1998;28:4398-408.
65. Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-γ induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. Cancer Res 1998;58:2832-7.
66. Ossina NK, Cannas A, Powers VC, Fitzpatrick PA, Knight JD, Gilbert JR, et al. Interferon-γ modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. J Biol Chem 1997;272:16351-7.

67. Tamura T, Ueda S, Yoshida M, Matsuzaki M, Mohri H, Okubo T. Interferon-γ induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. Biochem Biophys Res Commun 1996;229:21-6.
68. Yano H, Fukuda K, Haramaki M, Momosaki S, Ogasawara S, Higaki K, et al. Expression of Fas and anti-Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. J Hepatol 1996;25:454-64.
69. Bretz JD, Rymaszewski M, Arscott PL, Myc A, Ain KB, Thompson NW, et al. TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells. J Biol Chem 1999;274:23627-32.
70. Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL, et al. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. J Immunol 1999;162:6053-9.
71. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, et al. IFN-γ mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. J Immunol 1999;163:920-6.
72. Lee Y, Park US, Choi I, Yoon SK, Park YM, Lee YI. Human interleukin 6 gene is activated by hepatitis B virus-X protein in human hepatoma cells. Clin Cancer Res 1998;4:1711-7.
73. Chen RH, Chang MC, Su YH, Tsai YT, Kuo ML. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-β-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. J Biol Chem 1999;274:23013-9.
74. Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K, Kashii Y, Higuchi K, Watanabe A. Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. Cancer Immunol Immunother 1998;47:47-57.
75. Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:1005-8.
76. Park JG, Lee JH, Kang MS, Park KJ, Jeon YM, Lee HJ, et al. Characterization of cell lines established from human hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 1995;62:276-82.
77. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J Neurosci Methods 1987;20:83-90.
78. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colormetric assay to measure cell activation. J Immunol Methods 1986;94:57-63.
79. He J, Whitacre CM, Xue LY, Berger NA, Oleinick NL. Protease activation and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment. Cancer Res 1998;58:940-6.
80. Dai CH, Price JO, Brunner T, Krantz SB. Fas ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon γ to produce erythroid cell apoptosis. Blood 1998;91:1235-42.
81. Kubo K, Matsuzaki Y, Okazaki M, Kato A, Kobayashi N, Okita K. The Fas system is not significantly involved in apoptosis in human hepatocellular carcinoma. Liver 1998;18:117-23.

82. Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. Mol Cell Biol 1997;17:5328-37.
83. Dai C, Krantz SB. Interferon γ induces upregulation and activation of caspases 1, 3, and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells. Blood 1999;93:3309-16.
84. Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. Defective TNF-α-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. Science 1997;278:1630-2.
85. Takahashi M, Saito H, Okuyama T, Miyashita T, Kosuga M, Sumisa F, et al. Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. J Hepatol 1999;31:315-22.
86. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. J Clin Invest 1999;104:155-62.
87. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. Nat Med 1999;5:157-63.
88. Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. Curr Opin Immnuol 1998;10:559-63.
89. Zhao S, Asgary Z, Wang Y, Goodwin R, Andreeff M, Younes A. Functional expression of TRAIL by lymphoid and myeloid tumour cells. Br J Haematol 1999;106:827-32.
90. Giovarelli M, Musiani P, Garotta G, Ebner R, Carlo ED, Kim Y, et al. A “stealth effect”: adenocarcinoma cells engineered to express TRAIL elude tumor-specific and allogeneic T cell reactions. J Immunol 1999;163:4886-93.
91. Kuo ML, Chuang SE, Lin MT, Yang SY. The involvement of PI 3-K/Akt-dependent up-regulation of Mcl-1 in the prevention of apoptosis of Hep3B cells by interleukin-6. Oncogene 2001;20:677-85.
92. Chung TDK, Yu JJ, Kong TA, Spiotto MT, Lin JM. Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. Prostate 2000;42:1-7.
93. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 1997;91:231-41.
94. del Peso L, Gonzales-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science 1997;278:687-9.
95. Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW. Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. J Biol Chem 2001;276:6893-6.
96. Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. Cytokine 2000;12:78-85.
97. Mahe Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama M, Ikeda N, Matsushima K, et al. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor κB and CCAAT/enhancer-binding protein-like *cis*-elements. J Biol Chem 1991;266:13759-63.

Abstract

Effects of interferon-g on the apoptosis of human hepatoma cells

Eui-Cheol Shin

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeon Han Park)

Many tumors including hepatoma show resistance to Fas-mediated apoptosis, which is one of the effector mechanisms in the host's anti-tumor response, however, this resistance can be abolished by interferon-γ (IFN-γ) treatment. IFN-γ may sensitize Fas-mediated apoptosis in several different ways, but the exact mechanism in hepatoma remains unclear. In this study, the effect of IFN-γ on the susceptibility of hepatoma cell lines to Fas-mediated apoptosis was investigated. The effect of IFN-γ on the expression of various apoptosis-related genes such as Fas-related genes, *bcl-2* family genes, and caspase family genes was investigated. Although most of the cell lines constitutively expressed considerable amounts of Fas, all tested 13 cell lines were resistant to Fas-mediated cell death. Interestingly, when cells were pretreated with IFN-γ, 3 cell lines (SNU-354, SNU-387 and SNU-423) became significantly susceptible to Fas-mediated apoptosis. IFN-γ also increased the mRNA expression of Fas, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and caspase-1, and the surface expression of Fas in most of the hepatoma cells. More interestingly, the strongly sensitized 3 cell lines showed a potent increment of cell surface Fas expression after IFN-γ treatment. These results suggest that a potent increment of surface Fas expression is a major sensitizing mechanism of IFN-γ in the Fas-mediated apoptosis of hepatoma cells.

Among hepatoma cell lines used in this study, SNU-368 cells underwent cell death by IFN-γ treatment without Fas stimulation. Therefore, IFN-γ-induced cell death of SNU-368 cells and its molecular mechanism were investigated in more detail. During IFN-γ-induced cell death, increase of caspase-3 activity was observed. IFN-γ also increased the mRNA expression of Fas, caspase-1 and TRAIL. In particular, IFN-γ potently increased the mRNA expression of TRAIL. Among 4 TRAIL receptors, IFN-γ did not change the mRNA expression of death-mediating TRAIL receptors, DR4 and DR5, which were constitutively expressed in both cell lines. In contrast, the decoy receptor, DcR1, was not expressed in SNU-368, and another decoy receptor, DcR2 was constitutively expressed, however, its expression level in SNU-368 was decreased by IFN-γ. In addition, exogenous recombinant TRAIL reduced viability in SNU-368 cells. From these findings it was speculated that TRAIL up-regulation and the subsequent TRAIL-induced apoptosis serve as a mechanism of IFN-γ-induced cell death in SNU-368 cells. To confirm this hypothesis, it was demonstrated that soluble DR4-Fc fusion protein, a TRAIL pathway inhibitor, inhibited IFN-γ-induced cell death in SNU-368. These results demonstrated that IFN-γ acts as an inducer of cell death through TRAIL-induced apoptosis.

In this study, the effect of IL-6 and IL-8 on Fas-mediated apoptosis was also investigated in hepatoma cells. Contrast with IFN-γ, IL-6 and IL-8 did not affect on the Fas-mediated apoptosis in SNU-354 and SNU-368 cells.

In conclusion, IFN-γ is able to make hepatoma cells susceptible to Fas-mediated apoptosis through the up-regulation of surface Fas, and induce apoptosis in some hepatoma cells through the up-regulation of TRAIL and subsequent activation of TRAIL-induced apoptosis.

Key Words: interferon-γ (IFN-γ), hepatoma cells, apoptosis, Fas, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)