B104 세포에서 시스프라틴에 의한 신경세포고사와 이에 대한 Bcl-2 의 억제효과 기전

연세대학교 대학원

의과학사업단

박 선 아

B104 세포에서 시스프라틴에 의한 신경세포고사와 이에 대한 Bcl-2 의 억제효과 기전

지도 안 용 호 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

박 선 아

박선아의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001 년 6 월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기 까지 세심한 배려로 지도하여 주신 안용호 선생님께 마음으로부터 감사를 드립니다. 아울러 연구내용을 세심하게 살펴주신 이병인 선생님, 최경숙 선생님, 김태승 선생님, 정현철 선생님께도 감사드립니다.

좋은 충고와 도움을 주신 신경과학 교실 여러 선생님들과 동료들, 그리고 어려운 시기를 함께 한 아주대 신경과, 의과학 연구소, 뇌질환 연구소의 여러 선생님들과 연구원들에게 감사 드립니다.

아울러 연구기간 중 언제나처럼 힘이 되어주시고 인도하여 주신 하나님과 사랑하는 부모님, 가족, 그리고 남편과 두아이들에게 감사의 마음과 함께 이 논문을 드립니다.

저 자 씀

목 차

그 림 차 례

국문요약

B104 세포에서 시스프라틴에 의한 신경세포고사와 이에 대한 Bcl-2의 억제효과 기전

시스프라틴에 의한 신경독성이나 Bcl-2의 억제효과의 기전에 대해서 아직까지 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 시스프라틴에 의한 신경독성에 연관되는 세포내 신호전달체계를 신경계 세포인 백서의 신경모세포종 세포주 B104 세포를 이용하여 연구하였다.

시스프라틴에 노출되면 B104 세포는 세포고사를 일으키는데, 이 과정에서 p53과 Bax 단백질의 축적이 일어났다. 이때 흥미롭게도 세포내의 대표적인 신호전달 물질인 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)의 활성도가 p53과 Bax의 축적보다 시간적으로 선행하여 현저히 증가됨이 관찰되었다. 선택적으로 ERK1/2의 바로 윗단계 신호단백질인 MEK를 억제시키는 PD98059 처리하여 ERK1/2의 활성화를 억제시키면, 시스프라틴에 의한 신경세포의 고사의 억제와 더불어 p53과 Bax의 축적도 일어나지 않았다. 이 같은 결과는 ERK가 시스프라틴에 의한 신경세포고사 과정에서 p53의 활성을 매개한다는 중요한 증거가 되는 것이다.

또한 시스프라틴에 의한 신경독성을 억제하는 치료법 개발을 위한 기본 방편으로 대표적인 세포고사 억제 유전자인 Bcl-2 유전자를 B104 세포에 과발현 시켰을 때 시스프라틴에 의한 신경독성 효과가 나타나지 않음이 확인되었다. 이 때 ERK의 활성과 이에 의해 매개되는 p53의 활성도 억제됨이 관찰되었다. 따라서 본 연구결과를 통해서 시스프라틴은 ERK – P53 – Bax로 이어지는 신호전달 체계를 통하여 신경세포고사를 일으키며, Bcl-2의 시스프라틴에 의한 신경독성에 대한 세포보호는 ERK의 윗단계를 억제함으로써 이루어짐을 알 수 있다.

핵심되는 말: 세포고사, Bcl-2, 시스프라틴, Extracellular signal-regulated kinase (ERK), p53, B104 cells

B104 세포에서 시스프라틴에 의한 신경세포고사와 이에 대한 Bcl-2 의 억제효과 기전

< 지도 안 용 호 교수 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

박 선 아

I. 서 론

현재 가장 널리 이용되고 있는 항암제인 시스프라틴은 세포내 DNA 에 손상을 일으켜 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 이로 인한 신경계 부작용은 흔하고 경우에 따라서 치명적이다. 이독성, 말초신경병증, 뇌신경병증, 그리고 뇌병증 등은 신경독성으로 인한 대표적인 질환이다[1,2]. 세포수준에서 시스프라틴은 신경세포의 고사를 일으킨다[3-8]. 그러나 그 동안 그 기전에 있어서 신호전달체계의 역할에 대해서는 충분한 연구가 이루어지지 못했다. 단지 몇몇 보고에서 Fas 와 Fas-L 가 신경모세포종 세포에서[6], 그리고 p53 이 마우스 후근신경절 세포-신경모세포의 잡종세포 (hybrid cell)에서 시스프라틴에 의한 세포고사에 관련된다고 하였다[9].

P53 은 다양한 세포에서 DNA 손상으로 인한 세포고사를 유도하는 주된 매개체가 된다[10]. P53 이 시스프라틴에 의한 세포고사에도 관련된다는 것은 신경세포외의 다른 종류의 세포주에서 이미 규명된 바 있다[11,12]. 한편, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-JUN amino-terminal protein kinase (JNK), 그리고 p38 MAPK 로 구성된 MAPK kinase 경로도 신경세포가 아닌 다양한 암세포에서 DNA 손상으로 인한 세포손상에 관여된다고 알려져 있는데[13-17], 최근에 이같은 MAP kinase 들이 자외선으로 인한 세포손상 모델에서 p53 을 안정화 시켜 이의 활성화를 유도하는 것으로 알려졌다[18-21]. 따라서 본 연구자는 이같은 기존의 문헌에 의거하여 MAP kinase 들과 p53 신호전달체계가 시스프라틴에 의한 신경세포의 독성에도 관여되는지 여부를 신경세포인 B104 세포주를 이용하여 연구하였다.

Bcl-2 는 대표적인 세포고사 억제 단백질로서 이를 과발현 시키면 다양한 종류의 세포손상에 대한 세포의 저항력이 증가되는데 이는 신경세포의 경우에도 허혈, 도파민, 베타 아밀로이드, 그리고 DNA 손상으로 인한 신경세포 소멸에서 규명된 바 있다[22-25]. 그리고 신경모

세포종 세포에서는 Bcl-2를 과발현 함으로써 시스프라틴에 의한 세포고사를 약화 시켰다는 연구 보고도 있다[3,5]. 그러나, 이때 어떠한 세포 신호전달체계를 통하여 Bcl-2가 시스프라틴에 의한 세포고사를 방지하였는지에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 한가지 가능성은 Bcl-2 같은 세포고사 억제 단백질과 Bax 같은 세포고사 유도 단백질이 직접 상호작용을 하여 그 구성 비율에 따라 세포고사에 대한 저항성이나 민감성이 결정된다고 생각해 볼 수 있다[26]. 또한 Bcl-2는 최근에 DNA 손상으로 인한 세포독성에 있어서 p53에 의해 매개되는 세포고사를 억제할 뿐 아니라 p53에 의해 유도되는 표적유전자의 전사 활성화도 방해하는 것으로 보고되고 있다[27,28]. 본 연구에서도 Bcl-2의 과발현은 이전의 결과들과 마찬가지로 시스프라틴에 의한 세포고사를 완전히 억제하였다. 본 연구자는 이같은 Bcl-2의 신경세포 보호효과의 작용 부위가 세포신호전달체계의 어느 단계에서인지 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

시스프라틴은 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA)로부터, PD98059는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다. Phospho-ERK 특이 항체, 총 ERK에 대한 항체, phospho-JNK 항체, 총 JNK 항체, phospho-p38 항체, 총 p38 항체는 New England BioLabs 사 (Beverly, MA, USA)로부터 구입하여 이용하였고, p53에 대한 항체는 Calbiochem 사(La Jolla, CA, USA)로부터, Bcl-2, Bax, Fas 그리고 p21에 대한 항체는 Santa Cruz Biotech 사 (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 이용하였다. Enhanced chemiluminescence reagents는 Amersham 사 (Arlington heights, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

백서의 신경모세포종 세포주인 B104 세포를 5% 우태아혈청과 5% 마혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 5% CO_2, 37°C 조건하에서 세포배양기에서 배양하였다.

3. MTT (3-(4,5-Dimerhylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

시스프라틴 처치 후 pyridine nucleotide redox 상태를 지표로 세포의 생존능력을 측정하는 MTT 환원 반응을 이용하여 세포사멸의 정도를 측정하였다. 1×10^5 개의 세포가 100 μL의 배지에 포함되도록 분주하여 96 well-plate에서 배양한 후 PD98059 전처치 후 혹은 전처지 없이 계획된 시간 동안 시스프라틴에 노출시켰다. 그 후 10 μL의 MTT 용액을 (5 mg/ml in phosphage-buffered saline (PBS))을 각각의 well에 첨가 하였고 그 후 plates를 37°C 세포배양 인큐베이터에 3 시간 방치하여 반응이 이루어지게 하였다. Dimethyl sulfoxide (Sigma, St. Louis)로 착색된 물질이 유출되게 한 후 570 nm 파장에서 630 nm를 참고치로 하여 dual beam microtiter plate reader를 이용하여 absorbance를 측정하였다.

4. Hoechst 33258 을 이용한 핵염색

B104 세포를 coverslip 에 얹어 배양시킨 후 계획된 시간동안 시스프라틴에 노출시킨 후 4% paraformaldehyde (ph 7.4)에 10 분간 고정하고, PBS 로 3 차례 조심스럽게 세척한 후 10 μg/mL 의 농도로 PBS 에 녹인 Hoechst 33258 (Sigma, St Louis, USA)에 10 분간 반응시키고 다시 세척한 후 형광현미경을 이용하여 핵 모양을 관찰하였다.

5. DNA 분절화 분석

계획된 시간동안 시스프라틴에 노출된 B104 세포의 총 DNA 를 추출하여 DNA 의 분절화 형태를 분석하기 위하여, 세포를 0.5% Triton X-100, 5 mM Tris (pH 7.4), 그리고 20 mM EDTA 가 포함된 용액에서 용출하였다. 용출액을 모아, 흔든 후 4°C, 16,090 g 에서 15 분간 원심분리를 하였다. 상층액을 모아 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)로 추출한 후 300 mM 의 sodium acetate 를 함유한 ethanol 에서 침전시킨 후 Tris-EDTA buffer (pH 7.4)에 다시 녹였다. 이 상태의 DNA 를 1.2% agarose gel 에서 전기영동 하였다.

6. TUNEL assay 및 세포고사 평가

B104 세포를 coverslip 에 분주하여 시스프라틴에 노출되기 전 1 일 동안 세포배양기에서 배양하였다. 그 후 원하는 시간동안 시스프라틴이 함유된 배지에 노출시킨 후 4% paraformaldehyde (pH 7.4)에 10 분간 고정 후, 제작사에서 권유한 방법대로 TUNEL assay kit (Roche Molecular Biochemicals)를 이용하여 TUNEL 염색을 실시하였다.

7. Immunoblotting

세포를 PBS 에 세척한 후 얼음 위에서 RIPA buffer (50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 를 함유한 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS), 1 μg/mL pepstatin A)에 15 분간 녹였다. 용출액을 18,890 g 에서 15 분간 원심분리한 후 침전액은 버리고, Bio-Rad protein assay 를 이용하여 40 μg 의 단백질을 정량하여 얻은 후 12% acrylamide sodium dodecylsulfate-denaturing gel 에 전기영동하였다. Gel 을 immobilon membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer 시킨 후 원하는 항체를 이용하여 제작사에서 권유한 방법대로 반응을 시켰다. 항체와 반응한 특이 단백질의 detection 은 enhanced chemiluminescence system 를 이용하여 실시하였다.

8. Bcl-2 를 과발현하는 세포주의 생산

Full-length *bcl-2* cDNA 를 포함한 vector 를 이용하여 B104 세포를 형질전환 시킨 후 puromycin (5 μg/mL)을 이용하여 3 주간 형질전환된 세포를 selection 하였다. 빈 vector

만으로 형질전환한 세포도 만들어 대조군으로 이용하였다. 그 후 선택된 세포군의 Bcl-2 의 발현을 Western blot analysis 를 통하여 확인하였다.

III. 결 과

1. 시스프라틴에 의한 세포고사

시스프라틴에의한 신경독성에 연관된 세포내 신호전달체계를 연구하기 위하여 백서의 중추신경계의 신경원세포로부터 기원한 B104 세포주를 본 연구에 이용하였다[29]. B104 세포에 시스프라틴을 처치하면 세포수축과 함께 apoptotic bodies 와 같은 형태학적인 변화를 일으키며 (그림 1A) 염색질 응결 (chromatin condensation) 과 분절화가 Hoechst 33258 로 핵염색 시 확인되었고 (그림 1B) 180-200 base pair 간격의 DNA 분절화가 관찰되어 (그림 1C) 세포고사가 일어남을 알 수 있었다. MTT 환원반응에 따라 세포독성은 10 μL 의 시스프라틴에 노출된지 12 시간 후부터 점진적으로 일어남을 알 수 있었다 (그림 1D).

2. 시스프라틴에 의한 세포고사 과정에서 일어나는 p53 의 축적과 ERK 의 활성화

최근에 본 연구자는 p53 이 마우스 후근신경절 세포-신경모세포의 잡종세포에서 시스프라틴에 의한 세포고사에서 주된 역할을 한다는 연구결과를 발표한 바 있다[9]. 본 연구에서는 B104 세포를 이용하여 p53 의 발현과 이에 의해 발현된다고 알려진 대표적인 표적 단백질의 변화 여부를 세포고사 동안 관찰하였다. 시스프라틴 노출 후 p53 의 발현은 서서히 증가하여 24 시간 후까지 이어졌다. 그리고 Bax 의 증가도 p53 의 축적과 더불어 관찰되었다. 그러나 다른 p53 유도 단백질인 Bcl-2, p21, Fas 의 변화는 관찰되지 않았다 (그림 2A). 다음 단계로 시스프라틴의 신경세포고사에서 MAP kinase 들의 발현에 변화가 있는지를 관찰하였다. 세 종류의 MAP kinase 의 활성화와 밀접한 연관성이 있는 인산화된 형태의 MAP kinase 들의 변화를 Western blot 을 이용하여 관찰하였다. ERK 의 활성화는 시스프라틴에 노출된지 1 시간이 지난 초기부터 현저하게 증가되기 시작하여 지속되었다. 그러나 총 ERK 의 양에는 변화가 없어 확실히 ERK 의 활성화가 이루어 졌음을 알 수 있었다 (그림 2B). 반면, JNK 나 p38 의 활성화는 B104 세포에 총 JNK 양이나 p38 양이 많음에도 불구하고 시스프라틴에 노출된 기간동안 관찰되지 않았다.

3. ERK 의 활성화 억제를 통한 시스프라틴에 의한 세포고사 방지

ERK 가 활성화 됨을 확인한 후 이러한 증가가 시스프라틴에 의한 신경세포고사에 있어서 어떠한 역할을 하는 지 알기 위하여 다음단계의 연구를 시행하였다. 선택적으로 ERK 의 바로 윗단계인 MEK 의 활성화를 억제하는 PD98059 를 전처치하면 TUNEL 염색이나, DNA 분절화

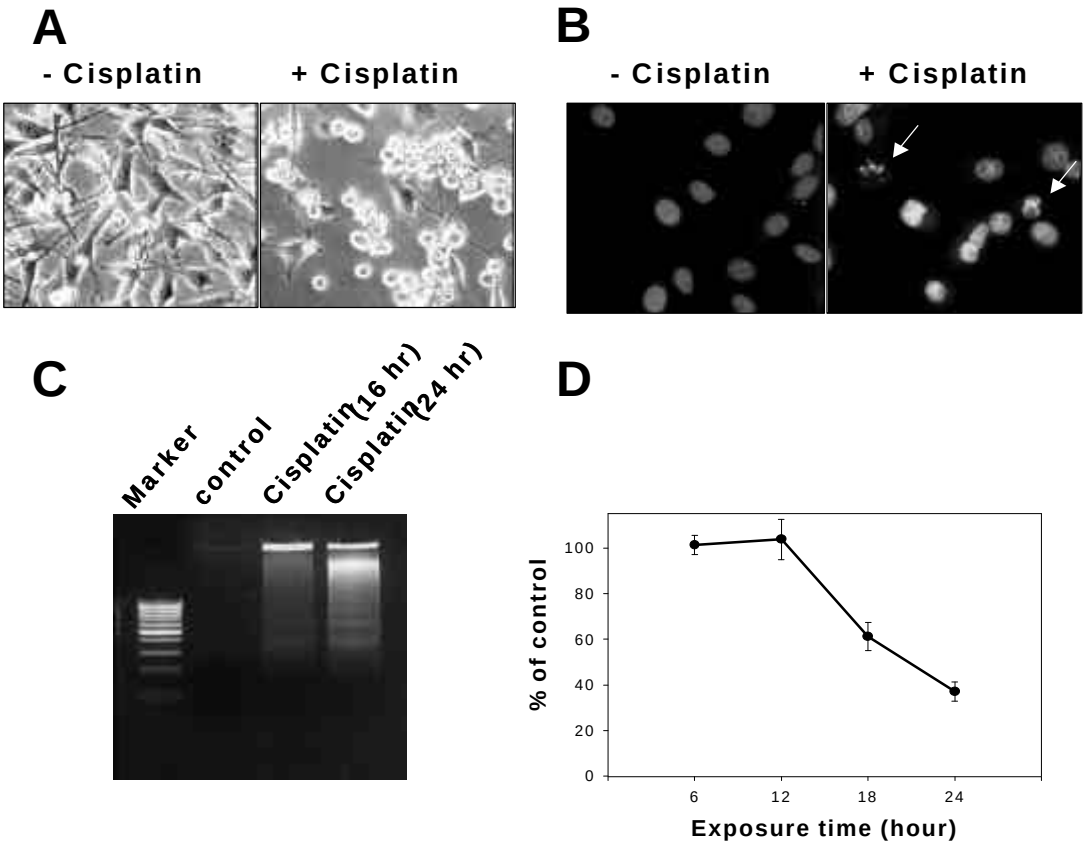

그림 1. Cisplatin induces apoptosis in B104 cells. B104 cells and B104 cells treated with 10 μM cisplatin for 16 hr were collected for analysis. A: The changes of cellular morphologies. Cells were observed by phase contrast microscopy (magnification, ×200). B: Chromatin condensation and DNA fragmentation in cisplatin-treated B104 cells. Cells were stained with Hoechst 33258 and observed by fluorescence microscopy (magnification, ×400). Arrows indicate the condensed and fragmented nuclei. C: DNA fragmentation following cisplatin treatment. Genomic DNAs were extracted from cells treated with 10 μM cisplatin for 16 hr and 24 hr. D: MTT reduction assay following cisplatin treatment. Cells were treated for the indicated time points. Viability of B104 cells was measured by MTT assay. Values from each treatment group were expressed as a percentage relative to the untreated matching control (100%).

를 통하여 확인되었던 세포고사가 일어나지 않았다 (그림 3A 와 3B). 이같은 PD98059 의 세포고사 억제 효과는 용량이 증가함에 따라 의존적으로 증가하였다 (그림 3C). 이 같은 실험결과를 통해 볼 때, ERK 가 시스프라틴에 의한 세포고사에 있어서 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

시간적으로 시스프라틴에 노출된 후 ERK 의 활성화는 p53 의 축적이나 Bax 의 활성화보다 선행함을 관찰하였기 때문에 (그림 2A 와 2B), ERK 가 직접적으로 시스프라틴에 의한 p53 경로 활성화에 영향을 미치는지 여부를 확인하고자 실험을 진행하였다. 50 μM 의 PD98059 를 처리 후 Western blot 으로 활성화된 ERK 의 발현 여부를 확인해 본 결과 시스프라틴에

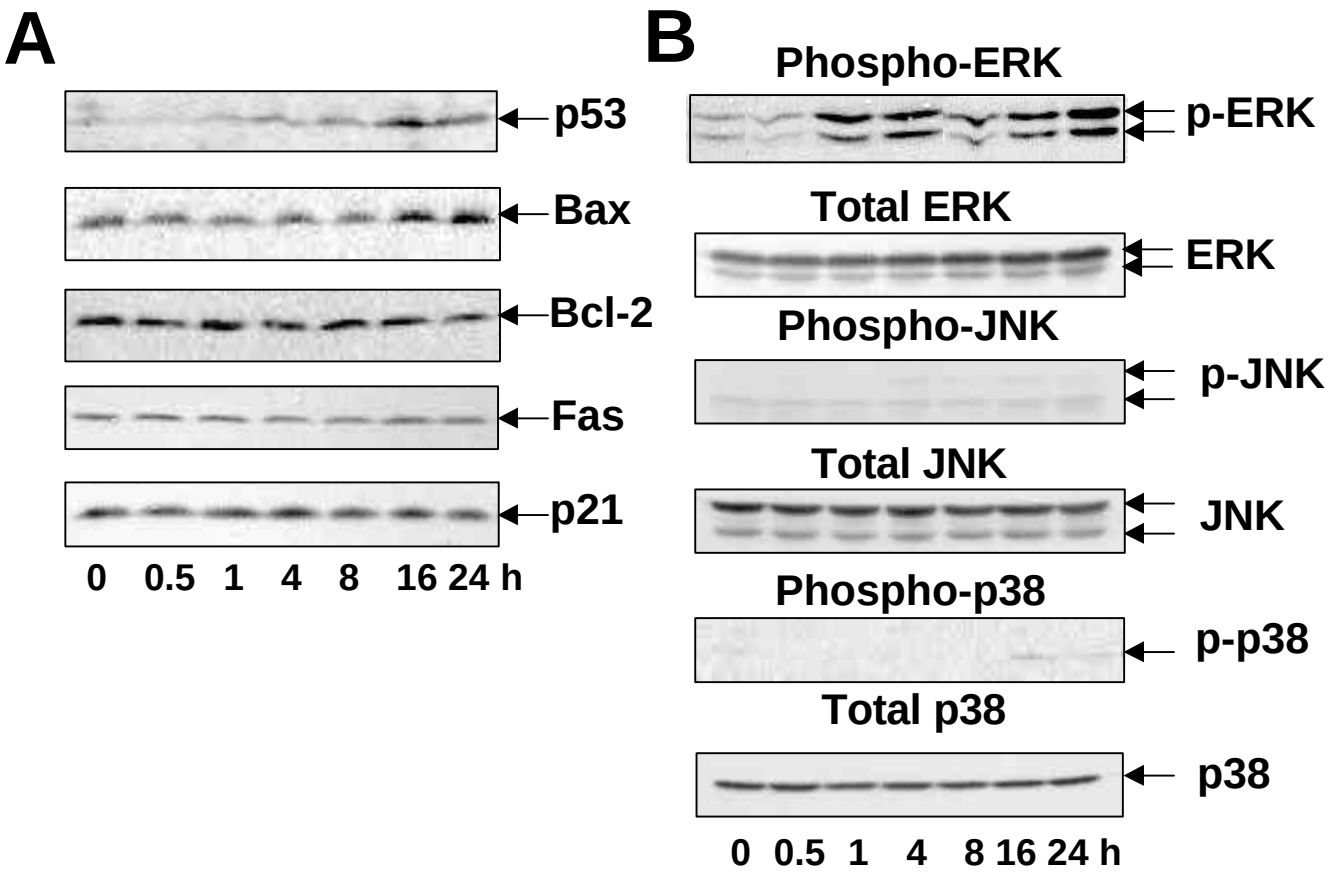

그림 2. Changes in the expression of the gene products involved in p53 signaling pathway and the activities of MAP kinases in B104 cells treated with 10 μM cisplatin. A total of 40 μg of cell extracts was resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. A: A gradual accumulation of p53 protein was observed after cisplatin treatment. Of the tested candidate p53-downstream target proteins, induction of Bax was noted from 16 hr. In contrast, the expression of Bcl-2, Fas, and p21 was not altered throughout the exposure to cisplatin. B: Changes in the activities of ERK1/2, JNK, and p38 MAPK after treatment of cisplatin. Western blot analysis using the phospho-specific antibodies to detect the activated form of MAPKs was performed. Significant activation of ERK was noted from 1 hr of cisplatin treatment. In contrast, activation of JNK and p38 was barely detected. Immunoreactive ERK, JNK, and p38 were also probed by immunoblotting with anti-ERK, anti-JNK, and anti-p38 antibody, demonstrating no significant changes in protein levels during the treatment with cisplatin. Similar results were achieved in three separate experiments with comparable outcomes.

의한 ERK의 활성화가 완벽하게 억제되었다 (그림 3D). 이같은 조건하에서는 시스프라틴에 의한 p53의 축적 뿐 아니라 Bax 단백질의 활성화 또한 억제되었고, Bcl-2, Fas 그리고 p21의 발현은 PD98059 전처치 여부에 상관없이 변화가 없었다 (그림 3D). 따라서 이러한 결과들을 통해 볼 때 ERK는 시스프라틴에 의한 B104 세포의 사멸에 있어서 p53을 매개함으로써 세포고사를 유도하는 역할을 함을 알 수 있었다.

4. Bcl-2 과발현 시 시스프라틴에 의한 ERK의 활성화 억제

신경모세포종에 Bcl-2를 과발현 시키면 시스프라틴에 의한 세포고사가 억제되지만[3,5], 그

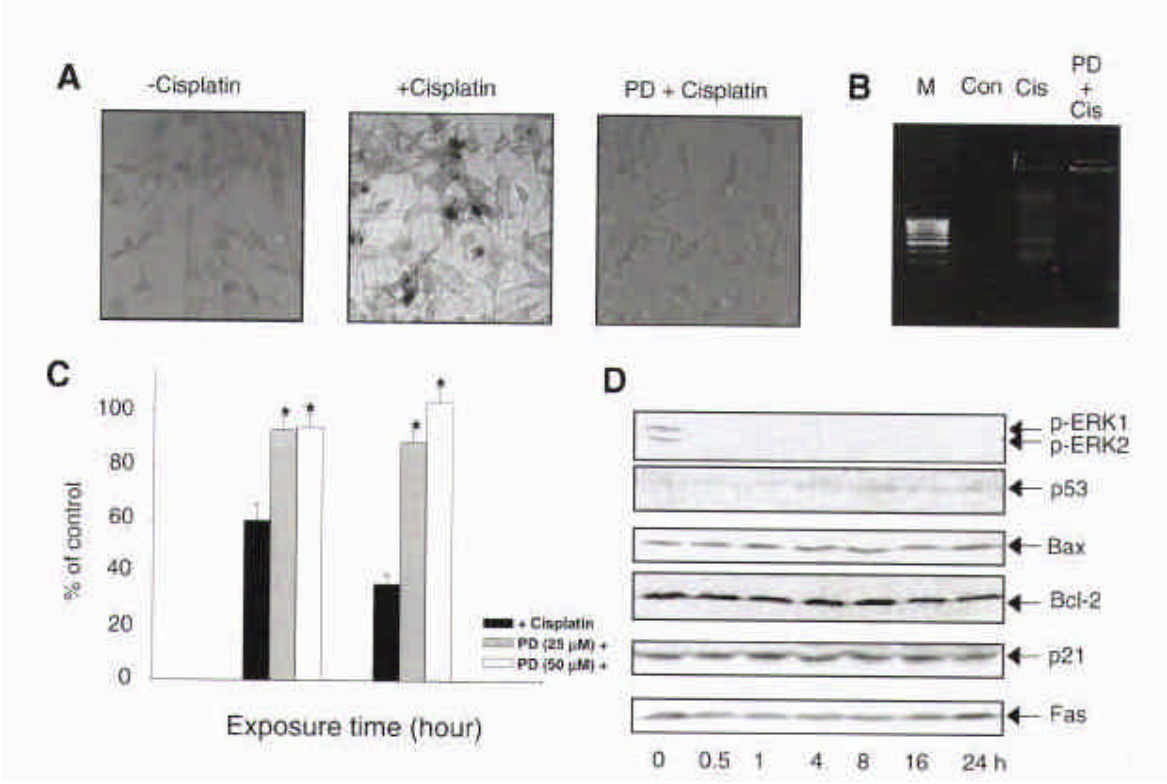

그림 3. Treatment of PD98059 blocks cisplatin-induced apoptosis of B104 cells suppressing the accumulation of p53 and Bax. A: B104 cells were pretreated with 50 μM PD98059 for 30 min and further treated with 10 μM cisplatin for 24 hr. Cisplatin-induced DNA fragmentation as assessed by TUNEL assay was not detected in B104 cells preincubated with PD98059. B: Gel electrophoresis of genomic DNAs demonstrating anti-apoptotic effect of PD98059 in cisplatin-induced cell death of B104 cells. C: The cyto-protective effect of PD98059 was dose-dependent, when the viability of B104 cells was measured by MTT assay. *$p < 0.05$ compared with the group treated with cisplatin only. D: Effect of PD98059 (50 μM) treatment on the expression of the gene products involved in p53 signaling pathway. Treatment of PD098059 (50 μM) completely blocks ERK activation in cisplatin-treated (10 μM) B104 cells. Accumulation of p53 and Bax is inhibited by the combined treatment of PD98059 (50 μM) and cisplatin while the expression of Bcl-2, Fas, and p21 was not altered by the same treatment. M, marker; Con, control; Cis, cisplatin

기전에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 따라서 본 연구자는 시스프라틴에 의한 세포고사에 대한 Bcl-2의 억제작용기전을 연구하기 위하여 Bcl-2 과발현 세포를 만들어 실험을 시작하였다 (그림 4A). B104 세포에 Bcl-2를 과발현시키면 시스프라틴에 대한 세포독성이 현저히 감소한다는 기존의 보고를 재확인 하였다 (그림 4B-D). 그런데 흥미롭게도 Bcl-2 과발현 세포에서는 시스프라틴에 의한 ERK의 활성화가 이루어 지지 않음이 확인 되었다. 게다가 시스프라틴의 세포고사 과정에서 관찰되었던 p53과 Bax의 발현 역시 억제됨이 관찰되었다 (그림 4E). 이러한 결과는 Bcl-2가 시스프라틴에 의한 ERK 활성화와 이로 인한 p53

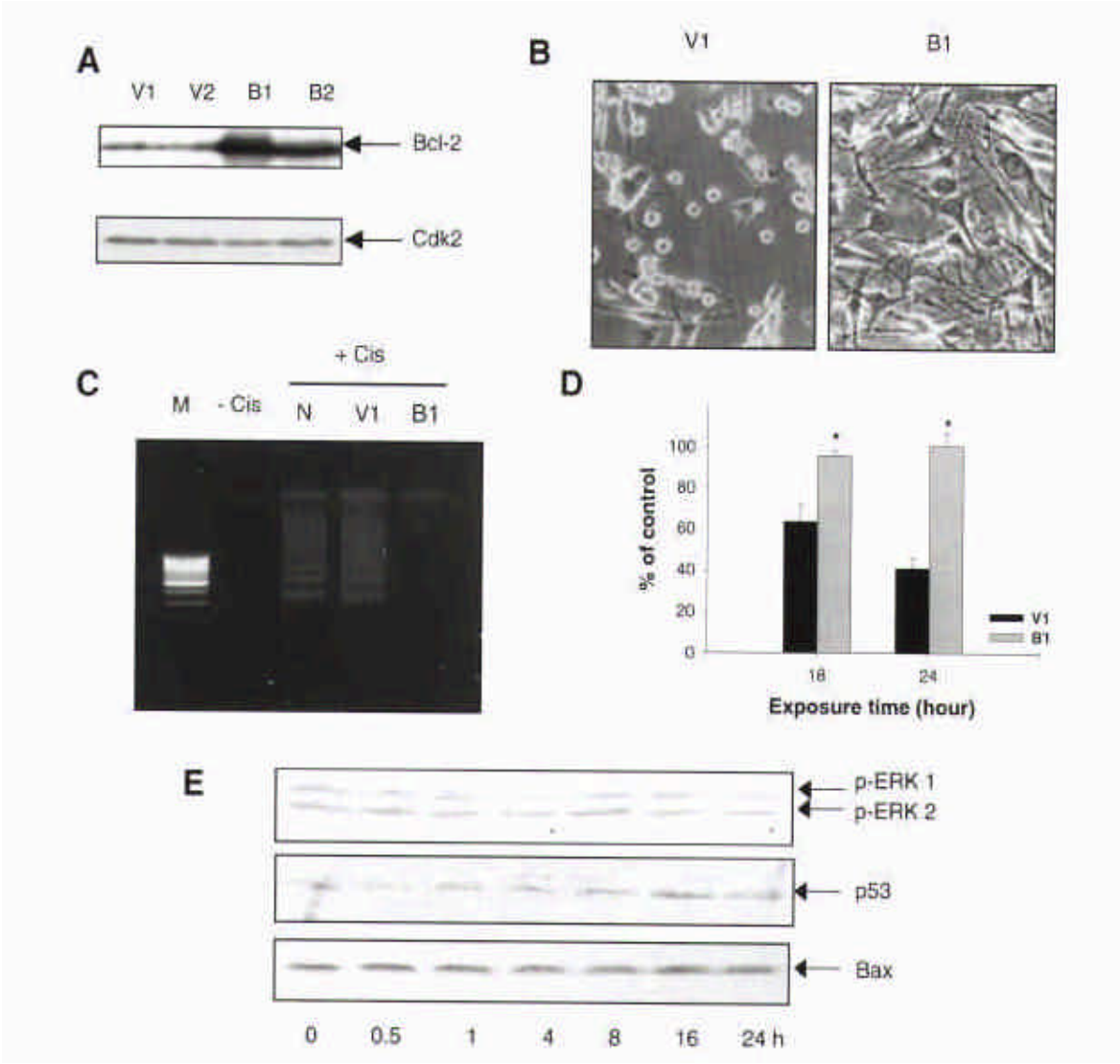

그림 4. Overexpression of Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis of B104 cells suppressing ERK activation and the subsequent accumulation of p53 and Bax. A: Western blot analysis of Bcl-2 protein expression in the stably transfected B104 cells. V1 and V2, B104 sublines transfected with pcDNA3; B1 and B2, B104 sublines transfected with *bcl-2* gene. Loading of equal amount of the proteins in each lane was confirmed by Western blot analysis of Cdk2. B, C and D: The cell survival of the B104 cells overexpressing Bcl-2 (B1) and control cells (V1: the cells stably transfected with pcDNA3) were compared at 24 hr after treatment with cisplatin (10 μM) by phase contrast microscopy (B), gel electrophoresis (C), and MTT assay (18 hr and 24 hr). *$p < 0.05$ compared with V1 (D). E: Effect of Bcl-2 overexpression on cisplatin-induced ERK activation and the subsequent accumulation of p53 and Bax. Cisplatin-induced ERK activation and accumulation of p53 and Bax were suppressed in Bcl-2 overexpressing cell lines. M, marker; Cis, cisplatin; N, null

의 활성화를 억제함으로써 세포고사 억제 효과를 나타냄을 의미한다.

Ⅳ. 고 찰

본 연구자는 B104 신경모세포종을 이용하여 시스프라틴에 의한 세포독성에 관련되는 세포내 신호전달체계에 대하여 연구하였다. 본 연구를 통해 ERK가 시스프라틴의 세포독성에 있어서 세포고사로 유도하는 필수적인 역할을 함을 알 수 있었다. ERK는 시스프라틴에 노출 후에 현저히 증가하였고, 선택적인 억제제로 ERK 활성화를 막은 경우에는 시스프라틴에 의한 세포사멸이 일어나지 않음이 관찰 되었다. 최근 Wang 등은 Hela 세포에서 시스프라틴에 의한 세포고사에 있어서 ERK가 필요하다는 결과를 발표했는데[30], 이는 본 연구 결과와 일치한다. 그 밖에 ERK는 몇몇 특수한 상황 - asbestos, hyperoxia 또는 cytokine에 의한 - 에서 세포고사의 매개체로서 역할을 한다는 보고들이 있다[31-33]. 그러나 ERK는 그 동안 많은 연구를 통하여 신경세포를 포함한 다양한 세포에서 여러가지 자극에 의한 - oxidative stress, tumor necrosis factor-α, growth factor deprivation, 그리고 pro-apoptotic drugs - 세포고사에 대항하는 세포보호 작용을 하는 대표적인 단백질로 알려져 왔다[30,34-38]. 또한 다양한 세포성장인자나 호르몬에 의해서도 활성화되어서 세포의 증식이나 분화에 있어 주된 역할을 하는 것으로 알려져 왔다[39,40]. 즉, 세포고사에 있어 ERK의 역할에 대한 다수의 결론은 세포보호 작용이 있는 ERK의 활성화가 억제됨으로써 세포사멸이 이루어 진다는 것이었다.

Goillot 등은 최근에 MAP kinase가 Fas 에 의한 SHEP 신경모세포종 세포의 고사에 관여한다는 보고를 하였다[41]. 그러나, 본 연구에서 Fas의 발현은 시스프라틴에 의한 세포고사 과정에서 변화가 없었고, Fas 활성제를 처리하여 Fas 경로를 활성화 시켰을 때에도 시스프라틴에 의한 B104 세포에서의 세포고사의 정도는 변화하지 않았다. 따라서 시스프라틴에 의한 ERK의 활성화는 Fas 경로와는 무관하게 세포고사를 일으킴을 알 수 있다.

최근에 본 연구자는 p53 경로가 시스프라틴에 의한 세포고사에 있어 주된 역할을 한다는 사실을 감각신경원세포의 잡종세포를 이용하여 밝힌 바가 있다[9]. 본 연구에 따르면 B104 세포에서도 시스프라틴 노출 후에 p53이 현저히 증가하였고, 이것은 Bax의 활성화를 수반하였다. 그리고 선택적인 억제제를 이용하여 ERK의 활성화를 억제 시키면 p53과 Bax의 활성화도 더불어 억제되었다. 이같은 실험결과는 p53이 시스프라틴의 세포고사 경로에 있어서는 ERK의 조절을 받는 downstream이 된다는 증거라 할 수 있다. 본 연구논문을 준비하고 있던 중, Persons 등이 시스프라틴에 의한 난소암 세포에서 p53이 ERK에 의해서 안정화되고 활성화된다고 발표하였다[42]. 그들은 p53의 전사작용을 이로 인한 p21과 mdm2의 활성화를 통하여 확인하였다. 그리고 PD98059를 사용하여 시스프라틴에 의해 유도되는 ERK

의 활성화를 억제한 후에는 시스프라틴에 의한 세포독성이 증가됨을 관찰하여 이 세포독성 모델에서는 ERK가 세포생존 인자로서 역할을 한다고 발표하였다. 이는 본 연구의 결과와는 대조적인 것으로 이러한 차이의 기전에 대하여 다음과 같이 추정해 볼 수 있겠다. 기존의 문헌에서 보고된 바와 같이 p53에 의해 매개되는 p21의 활성화는 세포고사가 아닌 세포보호작용으로 역할을 한다는 사실을 참고로 생각해 볼 때[10], p53에 의해 활성화되는 다음단계의 신호가 예를 들어 세포고사를 유도하는 Bax 단백질인지, 혹은 세포보호작용을 하는 p21 인지에 따라서 ERK에 의한 p53 활성화로 인한 세포의 운명이 결정된다고 결론 내릴 수 있겠다.

신경모세포종에 Bcl-2를 과발현 시키면 시스프라틴에 의한 세포고사가 억제된다[3,5]. 그러나 그동안 Bcl-2에 의한 이같은 시스프라틴에 대한 세포보호 효과의 구체적인 기전은 연구된 바가 없었다. 최근에 Bcl-2가 다른 종류의 DNA 손상시에는 p53 안정화와 이로 인한 GADD45, p21, 그리고 Bax의 활성화를 억제한다는 보고가 있었다[27,28]. 게다가 몇몇 보고에서는 다른 종류의 세포고사 모델에서 Bcl-2가 JNK 경로를 억제함으로써 세포고사 억제작용을 한다고 밝혔다[30,43-45]. 본 연구에서 다른 MAP kinase의 활성화는 시스프라틴에 의한 세포고사 과정에서 연관되지 않았고 ERK만이 의미있게 연관되었다. 게다가 이러한 활성화는 Bcl-2의 과발현에 의해 시스프라틴에 의한 세포고사의 억제와 p53과 Bax의 활성화 소실과 더불어 완전히 억제되었다. 이 같은 결과는 Bcl-2의 신경세포 보호 작용부위가 p53을 활성화 시키는 ERK보다 윗단계임을 알게 해 준다.

V. 결 론

시스프라틴에 의한 세포고사에 연관되는 신호전달체계를 밝히고 이를 이용한 향후 치료적 방법 모색을 위한 본 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 시스프라틴에 노출 후 신경모세포종 세포인 B104 세포는 세포고사의 특징적인 변화를 보이며 사멸된다.
2. MAP kinase 들 중에서 ERK가 시스프라틴에 의한 신경 세포의 사멸의 초기에 현저히 증가하여 지속된 활성화를 보인다.
3. 시스프라틴에 의한 신경 세포 사멸과정에서 시간적으로 ERK의 활성화에 뒤이어 p53과 Bax의 활성화가 관찰된다.
4. ERK의 활성화를 선택적인 억제제로 막으면 시스프라틴에 의한 세포고사가 자체가 억제된다. 따라서 이때 ERK가 신경세포 사멸에 있어서 결정적인 역할을 수행함을 알 수 있다. ERK의 활성화가 억제되면 p53의 안정화와 축적, 그리고 이로 인한 Bax의 활성화 또한 동시에 일어나지 않는다. 이러한 결과를 통해 볼 때 p53 경로가 ERK의 활성화에 의존적임을 알 수 있고, ERK – p53 – Bax 로 이어지는 신호전달 체계가 신경세포에서의 시스프라틴의 독성작용의 주된 경로 임을 알 수 있다.

5. Bcl-2의 시스프라틴에 의한 세포독성 억제 효과는 ERK의 활성화 단계를 억제함으로써 이루어 진다. Bcl-2의 과발현은 ERK활성화와 이에 뒤이은 p53과 Bax의 활성화 역시 억제함으로써 시스프라틴에 대한 탁월한 신경세포 보호 효과를 나타낸다.

참 고 문 헌

1.Macdonald D.R. Neurologic complications of chemotherapy, Neurol. Clin. 1991;9:955-967.

2.Keime-Guibert F., Napolitano M., and Delattre J.Y. Neurological complications of radiotherapy and chemotherapy, J. Neurol. 1998;245:695-708.

3.Dole M., Nunez G., Merchant A.K., Maybaum J., Rode C.K., Bloch C.A., and Castle V.P. Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. Cancer Res. 1994;54:3253-3259.

4.Cece R., Barajon I., and Tredici G. Cisplatin induces apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastom cell line, Anticancer Res. 1995;15:777-782.

5. Lasorella A., Iavarone A., and Israel M.A. Differentiation of neuroblastoma enhances Bcl-2 expression and induces alterations of apoptosis and drug resistance, Cancer Res. 1995;55: 4711-4716.

6. Fulda S., Sieverts H., Friesen C., Herr I., and Debatin K. The CD95(APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells, Cancer Res. 1997;57:3823-3829.

7. Gill J.S. and Windebank A.J. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle, J. Clin. Invest. 1998;101:2842-2850.

8. Liu W., Staecker H., Stupak H., Malgrange B., Lefebvre P., and van de Water T.R. Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells, Neuroreport 1998;9:2609-2614.

9. Park S.A., Choi K.S., Bang J.H., Huh K., and Kim S.U. Cisplatin-induced apoptotic cell death in mouse hybrid neurons is blocked by antioxidants through suppression of cisplatin-mediated accumulation of p53 but not of Fas/Fas ligand, J. Neurochem. 2000;75:946-953.

10. Sionov R.V. and Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death, Oncogene 1999;18:6145-6157.

11. Fritsche M., Haessler C., and Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents, Oncogene 1993;8:307-318.

12. Perego P., Giarola M., Righetti S.C., Supino R., Caserini C., Delia D., Pierotti M.A., Miyashita T., Reed J.C., and Zunino F. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems, Cancer Res. 1996;56:556-562.
13. Chen Y.-R., Wang X., Templeton D., Davis R.J., and Tan T.-H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis iuduced by ultraviolet C and γ radiation, J. Biol. Chem. 1996;271:31929-31936.
14. Osborn M.T. and Chambers T.C. Role of stress-activated/c-Jun NH_2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs, J. Biol. Chem. 1996;271:30950-30955.
15. Verheij M., Bose R., Lin X.H., Yao B., Jarvis W.D., Grant S., Birrer M.J., Szabo E., Zon L.I., Kyriakis J.M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., and Kolesnick R.N. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis, Nature 1996;380:75-79.
16. Sanchez-Perez I., Murguia J.R., and Perona R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death, Oncogene 1998;16:533-540.
17. Persons D.L., Yazlovitskaya E.M., Cui W., and Pelling J.C. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: Inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin, Clin. Cancer Res. 1999;5:1007-1014.
18. Fuchs S.Y., Adler V., Pincus M.R., and Ronai Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998;95:10541-10546.
19. Huang C., Ma M.Y., Maxiner A., Sun Y., and Dong Z. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389, J. Biol. Chem. 1999;274:12229-12235.
20. Keller D., Zeng X., Li X., Kapoor M., Iordanov M.S., Taya Y., Lozano G., Magun B., and Lu H. The p38MAPK inhibitor SB203580 alleviates ultraviolet-induced phosphorylation at serine 389 but not serine 15 and activation of p53, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;261:464-471.
21. She Q.B., Chen N., and Dong Z. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation, J. Biol. Chem. 2000;275:20444-20449.
22. Lawrence M.S., Ho D.Y., Sun G.H., Steinberg G.K., and Sapolsky R.M. Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS neurons against neurological insults in vitro and in vivo, J. Neurosci. 1996;16:486-496.
23. Deng G., Su J.H., Ivins K.J., Houten B.V., and Cotman C.W. Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress, Exp. Neurol. 1999;159:309-318.
24. Porat S. and Simantov R. Bcl-2 and p53: role in dopamine- induced apoptosis and

differentiation, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1999;893:372-375.
25. Saille C., Marin P., Martinou J.-C., Nicole A., London J., and Ceballos-Picot I. Transgenic murinc cortical neurons expressing human bcl-2 exhibit increased resistance to amyloid β-peptide neurotoxicity, Neuroscience 1999;92:1455-1463.
26. Oltvai Z.N. and Korsmeyer S.J. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes, Cell 1994;79:189-192.
27. Froesch B.A., Aime-Sempe C., Leber B., Andrews D., and Reed J.C. Inhibition of p53 transcriptional activity by Bcl-2 requires its membrane-anchoring domain, J. Biol. Chem. 1999;274:6469-6475.
28. Zhan Q, Kontny U, Iglesias M, Alamo I Jr, Yu K, Hollander MC, Woodworth CD, Fornace AJ Jr. Inhibitory effect of Bcl-2 on p53-mediated transactivation following genotoxic stress, Oncogene 1999;18:297-304.
29. Schubert D., Heinemann S., Carlisle W., Tarikas H., Kimes B., Patrick J., Steinbach J.H., Culp W., and Brandt B.L. Clonal cell lines form the rat central nervous system, Nature 1974;249:224-227.
30. Wang X., Martindale J.L., Liu Y., and Holbrook N.J. The cellular response to oxidative stress: influence of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival, Biochem. J. 1998;333:291-300.
31. Jimenez L.A., Zanella C., Fung H., Janssen Y.M.W., Vacek P., Charland C., Goldberg J., and Mossman B.T. Role of extracellular signal-regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H_2O_2, Am. J. Physiol. 1997;273:L1029-L1035.
32. Petrache I., Choi M.E., Otterbein L.E., Chin B.Y., Mantell L.L., Horowitz S., Choi A.M. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates hyperoxia-induced apoptosis in cultured macrophage cells, Am. J. Physiol. 1999;277:L589-595.
33. Pavlovic D., Andersen NA., Mandrup-Poulsen T., Zizirik D.L. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic b-cells, Eur. Cytokine Netw. 2000;11:267-274.
34. Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., and Greenberg M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis, Science 1995;270:1326-1331.
35. Gardner A.M. and Johnson G.L. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase, J. Biol. Chem. 1996;271:14560-14566.
36. Sheng Z., Knowton K., Chen J., Hoshijima M., Brown J.H., and Chien K.R. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy, J. Biol. Chem. 1997;272:5783-5791.

37. Stadheim T.A. and Kucera G.L. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity is required for TPA-mediated inhibition of drug-induced apoptosis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998;245:266-271.
38. Encinas M., Iglesias M., Llecha N., and Comella J.X. Extracellular-regulated kinases and phosphatidylinositol 3-kinase are involved in brain-derived neurotrophic factor-mediated survival and neuritogenesis of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y, J. Neurochem. 1999;73:1409-1421.
39. Cowley S., Paterson H., Kemp P., and Marshall C.J. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells, Cell 1994;77:841-852.
40. Robinson M.J., Stippec S.A., Goldsmith E., White M.A., and Cobb M.H. A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation, Curr. Biol. 1998;22:1141-1150.
41. Goillot E., Raingeaud J., Ranger A., Tepper R.I., Davis R.J., Harlow E., and Sanchez I. Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apototic signaling pathway, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997;94:3302-3307.
42. Persons D.L., Yazlovitskaya E.M., and Pelling J.C. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin, J. Biol. Chem. 2000;275:35778-35785.
43. Park D.S., Stefanis L., Yan C.Y.I., Farinelli S.E., Greene L.A. Ordering the cell death pathway. Differential effects of BCL2, an interleukin-1-converting enzyme family protease inhibitor, and other survival agents on JNK activation in serum/nerve growth factor-deprived PC12 cells, J. Biol. Chem. 1996;271:21898-21905.
44. Park J., Kim I., Oh Y.J., Lee K., Han P.L., Choi E.J. Activation of c-Jun N-terminal kinase antagonizes an antiapoptotic action of Bcl-2, J. Biol. Chem. 1997;272:16725-16728.
45. Srivastava R.K., Sollott S.J., Khan L., Hansford R., Lakatta E.G., and Longo D.L. Bcl-2 and Bcl-XL block thapsigargin-induced nitric oxide generation, c-Jun, NH2-terminal kinase activity, and apoptosis, Mol. Cell. Biol. 1999;19:5659-5674.

Abstract

The mechanism of cisplatin-induced neuronal apoptosis and protective effect of Bcl-2 in B104 cells

Sun Ah Park

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Yong Ho Ahn)

Bcl-2 has been reported to inhibit neurotoxicity induced by cisplatin. However, neither the mechanism of cisplatin-induced neurotoxicity nor the mechanism by which Bcl-2 confers neuroprotection is clear. In this study, the signaling pathways involved in cisplatin-induced neurotoxicity were examined using a rat neuroblastoma cell line, B104. Treatment of B104 cells with cisplatin induced apoptosis, accompanying the accumulation of p53 and Bax protein. Interestingly, Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activities of MAP kinases were markedly enhanced prior to cisplatin-induced accumulation of p53 and Bax. Moreover, inhibition of ERK1/2 activities using PD98059, a selective MEK inhibitor, blocked the apoptotic cell death preventing cisplatin-induced accumulation of p53 and Bax. Furthermore, we confirmed_that overexpression of Bcl-2 in B104 cells resulted in the complete resistance to cisplatin-induced apoptosis. This neuroprotective effect of Bcl-2 was accompanied by the suppression of ERK activation together with inhibition of p53 and Bax accumulation. In conclusion, our results demonstrate that ERK mediates cisplatin-induced p53 activation to trigger apoptosis in B104 cells. And Bcl-2 exerts its cytoprotective effect through the inhibition of cisplatin-induced ERK activation and the subsequent signaling pathway of p53.

Key words: apoptosis; Bcl-2; cisplatin; Extracellular signal-regulated kinase; p53; B104 cells