자연살 세포에 의한 HepG2와 Hep3B 간암세포주의 세포사멸 기전 분석

연세대학교 대학원

의과학 사업단

김 형 란

자연살 세포에 의한 HepG2와 Hep3B 간암세포주의 세포사멸 기전 분석

지도 김 종 선 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 형 란

김형란의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

차 례

그림 차례

국문요약

자연살 세포에 의한 HepG2와 Hep3B 간암세포주의 세포사멸 기전 분석

자연살 세포(Natural Killer cell)는 종양세포 및 바이러스에 감염된 숙주세포를 제거하는 기능을 하며, 부적절한 골수 이식을 거부하고 사이토카인 분비를 통해 면역반응을 조절하는 등 생체 내 면역방어기전에 중요한 역할을 담당하고 있는 행동 세포(effector cell)이다. 자연살 세포와 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte; CTL)에 대한 다양한 연구를 통해 표적세포에 대해 세포독성능을 보이는 두 가지 주요한 기전이 밝혀졌다. Perforin/granzyme 등의 과립 분비를 통해 세포괴사(necrosis)와 세포고사(apoptosis)를 유도하는 기전과 death receptor/ligand interaction을 통해 세포고사를 유도하는 기전이다. 자연살 세포가 백혈병세포에 대해 탁월한 세포독성능을 보일 뿐만 아니라 폐암, 유방암, 육아종 등의 고형 종양세포에 대해서도 세포독성능을 발휘할 수 있다고 알려져 있는데, 한국형 호발암의 하나인 간암세포에 대한 세포독성 작용은 구체적으로 밝혀진 바가 없었다. 특히 자연살 세포 표면의 세포사멸(cell death) ligand를 통해 간암세포에서 세포고사가 유도될 수 있는지에 대해서는 알려진 바가 없어 이에 대한 연구가 필요하였다.

본 연구에서 자연살 세포에 의한 간암세포의 세포사멸을 알아보기 위해 ^{51}Cr release assay를 수행한 결과, HepG2와 Hep3B 세포는 자연살 세포에 대해서 매우 높은 감수성을 보이는 것으로 나타났고, JAM test 결과, 자연살 세포가 HepG2

세포의 세포고사는 유도하지 못하지만, Hep3B 세포의 세포고사를 유도하는 것이 관찰되었다. 자연살 세포를 0.5% paraformaldehyde로 고정시켜서 과립 분비를 억제한 후 JAM test를 시행하여, 자연살 세포 표면의 ligand와 Hep3B 세포 표면의 수용체의 작용에 의해서도 Hep3B 세포에서 세포고사가 유도된다는 것을 확인하고, 자연살 세포에 발현되어 있는 ligand들과 HepG2, Hep3B 세포 표면에 발현되어 있는 수용체들을 유세포 분석과 역전사 중합효소 연쇄반응으로 조사하였다. 자연살 세포는 세포고사를 유도하는 대표적인 ligand인 FasL를 발현하고 있고, HepG2 세포에서는 FasL의 수용체인 Fas가 발현되어 있으나, Hep3B 세포는 Fas를 발현하지 않았다. HepG2 세포에 agonistic anti-Fas IgM antibody인 CH11을 처리해도 세포사멸이 유도되지 않는다는 보고가 있고, 자연살 세포에 의해서 일어나는 HepG2 세포의 세포사멸이 antagonistic anti-Fas IgG antibody인 ZB4로 억제되지 않는 것을 볼 때, HepG2 세포는 Fas를 발현하고 있긴 하지만 Fas/FasL를 통해서 사멸되지는 않는 것을 확인할 수 있었다. 자연살 세포는 FasL 이외에도 표적세포의 세포고사를 유도할 수 있는 대표적인 ligand로 알려진 TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)을 발현하고 있었고, HepG2와 Hep3B 세포에서 TRAIL에 대한 수용체인 DR (death receptor)4와 DR5의 전사체가 발현되어 있었다. HepG2와 Hep3B 세포에 recombinant TRAIL을 처리한 결과, HepG2와 Hep3B 세포에서 세포고사가 유도되었으며, 특히 Hep3B 세포에서 보다 효과적으로 유도되었다.

이상의 결과로, 자연살 세포가 주로 과립 분비를 통해서 HepG2와 Hep3B 세포의 세포사멸을 유도하고 Fas를 발현하는 HepG2 세포는 자연살 세포의

FasL에 의한 세포사멸에 저항성을 가지며 Fas를 발현하지 않는 Hep3B 세포에서 관찰되는 세포고사에 자연살 세포의 FasL 외에 TRAIL같은 다른 세포사멸 ligand들이 관여할 가능성이 있음을 알 수 있었다.

본 연구를 통해 얻은 자연살 세포의 간암세포 사멸 기전에 대한 구체적인 정보는 간암의 예방 및 치료법 개발에 유용하게 활용될 수 있는 기초적인 자료가 될 것이다.

핵심 되는 말: 자연살 세포, HepG2, Hep3B, perforin/granzyme, FasL/Fas, TRAIL/DR4,DR5

자연살 세포에 의한 HepG2와 Hep3B 간암세포주의 세포사멸 기전 분석

<지도교수 **김 종 선**>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 형 란

Ⅰ. 서론

자연살 세포(Natural Killer cell)는 항원에 의한 사전 감작 없이도 주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex; MHC) class Ⅰ 분자를 발현하고 있지 않거나 발현이 현저히 줄어든 종양세포를 포함한 폭넓은 표적세포에 대한 세포독성능을 나타낸다는 측면에서, 그리고 세포표면 CD marker들의 발현 양상과 분비하는 cytokine profile을 비교해 볼 때, T 세포나 B 세포와는 뚜렷이 구별되는 면역 세포(immune cell)이다[1].

자연살 세포를 비롯하여 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte; CTL)에 대한 오랜 연구를 통하여 이들이 표적세포에 대해 세포독성능을 보이는 두 가지 주요한 기전이 밝혀졌다. 처음에는 세포독성능을 갖는 과립을 분비하여 표적세포를 죽이는 기전이 주요 관심의 대상이었는데, 여기서 분비되는 과립에는 perforin이라고 하는 pore-forming 단백질과 granzyme A와 B라고 하는

serine protease family 등이 있다[2]. Perforin은 주로 표적세포의 세포괴사(necrosis)를 일으키는 것으로 알려져 왔으나, granzyme과 협력하여 세포고사(apoptosis)도 유도하는 것으로 알려지고 있다. Perforin/granzyme을 통한 세포독성 기전은 calcium ion을 필요로 한다고 알려져 있는데, 최근에 CTL이 calcium ion이 없는 상태에서도 표적세포를 죽이는 것을 보고 다른 기전을 찾기 시작했다[3,4]. 이렇게 확인된 또 다른 기전은 Fas (CD95)나 TNF receptor (TNFR) 같은 표적세포 표면의 TNFR-like molecules과 FasL와 TNF 같은 세포독성 세포의 ligand가 맞물려서 표적세포를 죽이는 기전이다[4,5]. 그리고 CTL 뿐만 아니라 자연살 세포도 Fas/FasL 상호작용에 의해서 표적세포의 세포고사를 일으킨다는 것이 밝혀졌다[6]. 이 두 가지 기전-과립 의존성 세포괴사 기전 및 세포사멸 수용체 매개 세포고사 기전-은 완전히 다른 기전으로 진행되지만, 표적세포에서는 이 두 가지 기전 모두 세포고사를 일으킬 수 있다는 측면에서 명확히 구분해 내기가 쉽지 않다. 두 기전 공히 caspase cascade 활성이 일어나고, 결국에는 표적세포의 세포고사가 일어나기 때문이다[7,8].

이 두 가지 기전을 세부적으로 살펴 보면(그림 1), 우선 자연살 세포와 표적세포가 만나게 되면 자연살 세포에서 perforin과 granzyme 등의 과립들이 분비된다. 그 중 66-75 kDa의 perforin만이 세포용해효과를 갖는데, monomer로 존재하던 perforin이 Ca^{2+} 존재시에 polymer를 형성하게 된다. 12개에서 18개의 분자로 이루어진 polymerized perforin에 의해서 tubule이 형성되는데, 이 tubule에 의해서 내경이 6-16 nm 정도 되는 transmembrane channel이 형성되고 표적세포가 용해된다. 이렇게 perforin에 의해서 형성된 pore 때문에 표적세포의 세포괴사가

유도되고, 이 pore를 통해서 granzyme 등의 단백분해 효소들이 표적세포 내로 들어가서 caspase cascade의 활성을 유발시켜서 표적세포의 세포고사를 유도하기도 한다[9].

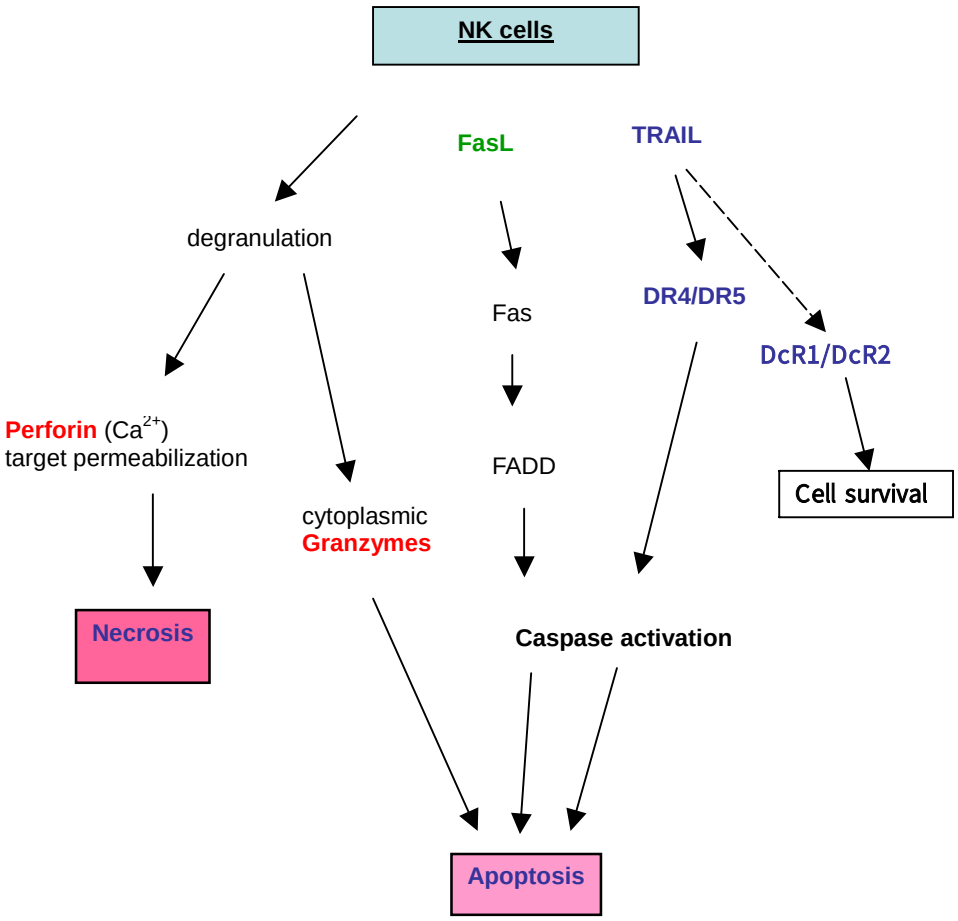


그림 1.자연살 세포가 표적세포의 세포사멸을 유도하는 기전

세포고사를 유도하는 세포사멸 ligand의 대표적인 것이 Fas ligand (FasL)이고, 그에 대한 수용체는 Fas이다. 자연살 세포 표면에 발현되어 있는 FasL와 표적세포의 Fas가 결합하면 Fas 세포 내 부위의 death domain에 adaptor 분자인 Fas-associating protein with death domain (FADD)이 결합하며[10,11], 이에 따라 FADD-like interlukin-1 β-converting enzyme (FLICE, caspase-8)의 단백분해 활성이 증가하고[12,13], 결과적으로 caspase cascade가 활성화 된다. 그 결과로 caspase-3 같은 하위 caspase가 활성화되면 표적세포가 세포고사의 과정을 거치게 되는데[14] 이 과정에서 caspase-activated DNase (CAD)가 활성화되어 세포고사시에 특징적으로 일어나는 DNA fragmentation이 일어나게 된다[15,16].

최근에는 TNF family의 새로운 구성원인 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)[17,18]도 그 수용체를 통하여 표적세포의 세포고사를 유도하는 것으로 판명되었다. TRAIL에 대한 수용체로는 4가지가 알려져 있는데, 이 중 death receptor4 (DR4, TRAIL receptor 1)와 DR5 (TRAIL receptor 2)는 Fas와 유사하게 세포 내 부위에 death domain을 가지고 있어, adaptor 분자를 통한 caspase cascade의 활성화를 유도하고 결과적으로 세포고사를 유도할 수 있다[19-23]. 반면, decoy receptor 1 (DcR1, TRAIL receptor 3)과 DcR2 (TRAIL receptor 4)는 TRAIL과 결합은 하지만, 세포 내 부위에 death domain이 없거나 truncation 되어 있어 세포고사를 유도할 수 없고, 오히려 DR4와 DR5가 TRAIL과 특이적으로 결합할 때 경쟁적 억제자 역할을 한다[20,21,24-27]. 처음에는 CTL의 TRAIL이 표적세포의 DR4, DR5를 통해서 세포고사를 유도한다고 알려졌는데, 그 후에 자연살 세포도 TRAIL을 발현하고 있으며, IL-2에 의해서 활성화된 자연살

세포가 이 TRAIL을 통해서 표적세포의 세포고사를 유도한다는 것이 밝혀졌고[28], 마우스 간 세포에서 발현되고 있는 TRAIL에 의해서 간으로의 암 전이가 억제된다는 것이 보고되었다[29]. 그리고 IFN-α[30]와 IFN-γ[31] 생성을 유도하는 IL-12에 의해서 간, 비장, 폐에 존재하는 자연살 세포의 TRAIL이 upregulation 되고, 이로 인해 암의 전이가 억제되며, IFN-β에 의해 사람 흑색종 세포에서 TRAIL에 의한 세포고사가 더 잘 일어난다[32]는 보고도 이어져, 세포독성세포에 의해 유도되는 TRAIL 매개 세포고사의 중요성이 부각되고 있다[33].

자연살 세포의 세포독성효과는 전통적으로 백혈병세포에 대하여 탁월하다고 알려져 왔는데, 최근의 연구 결과는 자연살 세포가 백혈병세포 뿐만 아니라 전이성 흑색종, 폐암, 유방암 및 육아종과 같은 고형종양세포도 효과적으로 죽일 수 있고 세포사멸 수용체 매개 세포고사도 여기에서 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다[34-36]. 그런데 한국형 호발암의 하나인 간암(hepatocellular carcinoma; HCC)의 경우에는 간경변이나 간암 환자들이 정상인보다 자연살 세포의 세포독성능이 떨어져 있고, 이렇게 줄어든 세포독성능이 간질환의 발병과 초기 진행에 관여할 것이라는 보고만 있고[37] 직접 자연살 세포가 간암세포의 사멸에 어떠한 영향을 주는지에 대해서 연구한 것은 아직 보고된 바가 없다. 간암세포는 Fas/FasL를 통한 세포고사에 대해 저항성을 보이고 있는데[38] 정상 간세포가 Fas를 풍부하게 발현하고 있기 때문에 간은 Fas를 통한 자극을 받기 쉬운 조직이라는 측면에서 이에 관한 원인 규명이 필요하다[39-41]. 이는 아마도 정상 간세포가 간암 발생 과정을 거치는 과정에서

Fas 발현이 줄어들어 간암세포가 Fas 매개 세포고사에 대한 저항성을 획득하는 기전으로 이해되고 있다[42-45]. 실제로 Fas를 발현하고 있는 간암 환자가 그렇지 않은 환자보다 수술후 50개월간의 무질환 생존율이 높게 나타나는 등 임상적으로도 좋은 예후를 보인다는 보고도 있다[46]. 특히 자연살 세포 표면의 세포사멸 수용체를 통해 간암세포의 세포고사가 유도될 수 있는지에 대해서는 알려진 바가 없어 이에 대한 연구가 필요하다. 따라서 우선 자연살 세포에 대한 간암세포들의 감수성을 체계적으로 조사한 후에, 어떠한 기전으로 자연살 세포가 간암세포의 세포사멸을 유도 하는지에 대한 규명이 필요하다.

본 연구에서는 Fas 매개 세포고사에 저항성을 보이는 등 이미 알려진 간암세포주의 특성들을 참고로, 자연살 세포에 의한 간암세포주의 세포사멸 효과와 그 기전에 대해 구체적으로 규명해 보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세포배양

실험에 사용한 사람 간암세포주는 HepG2 (ATCC HB 8065)와 Hep3B (ATCC HB 8064) 세포였다. HepG2와 Hep3B 세포는 minimum essential medium (MEM)에 각각 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 첨가하여 5% CO_2, 37℃에서 배양하였다. 만성골수성백혈병세포주인 K562 (ATCC CCL 243) 세포와 급성림프아구성 백혈병세포주인 MOLT-4 (ATCC CRL 1582) 세포를 자연살 세포에 감수성을 보이는 표적세포로 사용하였고, B 림프종 세포주인 Daudi (ATCC CCL 213) 세포를 자연살 세포에 저항성을 보이는 표적세포로 사용하였는데, K562 세포는 DMEM에 Daudi 세포와 MOLT-4 세포는 RPMI1640 (Gibco BRL)에 위와 같은 방법으로 배양하였다.

2. 자연살 세포 분리

건강한 성인의 전혈을 채혈해 자연살 세포 분리용 RosetteSep™ (Stemcell Technology, Vancouver, Canada)[47] 50 ㎕를 1 ㎖ 전혈과 섞어 20분 동안 배양하였다. 배양한 혈액을 인산완충식염액으로 2배 희석하여 Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)에 얹어서 원심분리(1600 rpm, 20 min)하고, Ficoll 층과 혈장 층 사이의 자연살 세포 층을 분리해서 1% FBS가 포함된 인산완충식염액으로 3회 세척(1600 rpm, 10 min)하였다. 분리한 자연살 세포의

순도를 확인하기 위해서 자연살 세포를 0.1% BSA가 포함된 인산완충식염액으로 2회 세척하고 CD3-FITC/CD16-PE+CD56-PE (Becton Dickinson Bioscience, Lincoln Park, NJ, USA)를 첨가하여 빛을 차단한 상태로 4℃에서 30분간 반응시키고 0.1% BSA가 포함된 인산완충식염액으로 2회 세척하여 FACStar (Becton Dickinson Bioscience)로 형광강도를 측정하였다. 순도를 확인한 자연살 세포는 10% FBS를 포함한 complete RPMI 1640에 IL-2 (Endogen, Woburn, MA, USA)를 100 ng/㎖로 넣어주고 5% CO_2, 37℃ 에서 배양하였다.

3. HepG2와 Hep3B 세포의 형태 관찰

HepG2 세포와 Hep3B 세포를 자연살 세포와 4시간동안 혼합 배양한 후 표적세포의 형태변화와 antagonistic anti-Fas IgG antibody (clone ZB4) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) 전처치로 Fas를 block한 HepG2 세포와 자연살 세포를 혼합배양한 후 HepG2 세포에서 일어나는 형태변화를 inverted microscope (Zeiss, Zena, Germany)로 관찰하였다. 특별한 언급이 없는 한 표적세포와 자연살 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI1640에서 혼합배양하였다.

4. ^{51}Cr release assay

표적세포를 96-well plate에 2X10^4 cells/well로 seeding하고, 표적세포가 plate 바닥에 붙을 때까지 배양하였다. 세포배양액을 제거하고 1시간 동안 ^{51}Cr (NEN, Boston, MA,USA)을 10 μCi/well로 uptake시켰다. ^{51}Cr을 제거하고 같은

배양액으로 3회 세척한 후 자연살 세포와 표적세포의 비율을 달리해서 자연살 세포를 첨가한 후, well 당 부피를 200 μℓ로 맞추어 4시간 동안 배양하였다. Plate를 원심분리해서 상층액만 170 μℓ 덜어 냈다. 그 상층액을 다시 원심분리해서 140 μℓ의 상층액을 덜어내고, 이를 다시 원심분리해서 100 μℓ만 green tube에 담아 γ-counter로 radiation 양을 측정하였다. [(experimental value - negative control value)/(positive control value - negative control value)]X 100의 식으로 자연살 세포의 (%) cytotoxicity를 계산하였다.

5. JAM test

표적세포를 96-well plate에 $1X10^4$ cells/well로 seeding하고, 표적세포가 plate 바닥에 붙을 때까지 배양하였다. 세포배양액을 제거하고 overnight으로 ^{3}[H]-thymidine (NEN)을 20 μCi ^{3}[H]-thymidine/well로 uptake시켰다. ^{3}[H]-thymidine을 제거하고 자연살 세포와 표적세포의 비율을 달리해서 자연살 세포를 첨가한 후 2시간 동안 배양하였다. 상층액을 다른 96-well plate의 같은 위치의 well에 옮긴 후 plate 바닥에 붙어있는 세포들을 0.125% trypsin/ 0.5 mM EDTA (Gibco BRL)를 사용하여 plate 바닥으로부터 떼어냈다. Glass fiber filter (Wallac Oy, Turkr, Finland)에 세포를 흡착시키고 meltilex (Wallac)를 녹여 filter를 덮은 후 β-counter (Wallac)로 radiation양을 측정하였다. (1- experimental value/negative control value) X100의 식으로 자연살 세포가 표적세포의 세포고사를 유발시키는 양을 계산하였다.

6. 자연살 세포 고정

자연살 세포에서 과립 분비를 억제시키기 위해서 자연살 세포를 고정시켰다. 자연살 세포와 표적세포의 비율을 맞추어 EP tube에 담아 원심분리(2000 rpm, 2 min)해서 상층액을 제거하였다. 4% parpaformaldehyde (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 RPMI를 섞어서 0.5% paraformaldehyde를 만들었다. 0.5% parafoemaldehyde를 syringe filter로 filtering하였다. 자연살 세포를 0.5% parafo-rmaldehyde에 부유시켜서 20분간 고정 시켰다. 인산완충식염액으로 3회 세척한 후 표적세포와 혼합배양하였다.

7. Western Blot

자연살 세포와 표적세포를 혼합배양한 후 용해용 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH7.4 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 15 μg/ml leupeptin, 2 mM NaF, 2 mM $NaVO_4$)으로 HepG2, Hep3B 세포와 K562, MOLT-4 세포에서 세포용해액을 추출하여 SDS-PAGE를 시행한 후 전기영동된 단백을 polyvinyl-idene difluoride membrane (Pierce, Rockford, IL, USA)으로 전이시켜 PBST (인산완충식염액, 0.01% Tween 20)에 녹인 5% BSA를 사용하여 2시간 동안 blocking하고, anti-caspase-3 antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 anti-cleaved caspase-3 antibody (Cell Signaling Technology)[48,49]를 5% skim milk-PBST에 1000배 희석해서 실온에서 4시간 동안 붙인 후 peroxidase-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG(H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove,

PA, USA)를 5% skim milk-PBST에 1000배 희석해서 실온에서 2시간 동안 붙이고, chemiluminescence western blotting detection system인 Supersignal WestDico chemiluminescent substrate (Pierce)을 이용하여 immunoblot으로 자연살 세포에 의해 표적세포에서 일어나는 caspase-3 활성을 관찰하였다. Loading control을 위해 α-tubulin antibody (Ab-1) (Oncogene Research Products, Boston, MA, USA)를 실온에서 2시간 동안 붙이고 HRP-conjugated goat anti mouse antibody (Santa Cruze Biotechnology, Santa Cruze, CA, USA)를 실온에서 1시간 동안 붙였다.

8. 유세포 분석

HepG2와 Hep3B 세포 표면의 Fas 발현을 확인하기 위하여 면역형광염색 및 유세포 분석을 시행하였다. 표적세포를 0.125 % trypsin/ 0.5 mM EDTA를 이용하여 배양용기 바닥으로부터 떼어내었다. 바닥으로부터 떼어낸 세포를 0.1% BSA가 포함된 인산완충식염액으로 2회 세척하고 anti-Fas monoclonal antibody (DX2) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시키고, 0.1% BSA가 포함된 인산완충식염액으로 2회 세척했다. FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Becton Dickinson Bioscience)를 첨가하여 빛을 차단한 상태로 4℃에서 30분간 반응시키고, 인산완충식염액으로 2회 세척하여 FACStar로 형광강도를 측정하였다. 측정 결과는 WinMDI 2.8 프로그램(Joshep Trotter)을 이용하여 분석하였다.

9. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

HepG2와 Hep3B 세포에서 RNeasy mini kit (Qiagen, Santa Claria, CA, USA)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 1 μg의 총 RNA에 100 ng의 random hexamer (Amersham Pharmacia Biotech), 8 μℓ의 2.5 mM dNTP (TaKaRa, Shiga, Japan), 200U의 M-MLV reverse transcriptase (Gibco BRL)를 첨가하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 하고 2 μℓ의 2.5 mM dNTP, 1 U의 Taq polymerase (TaKaRa), 증폭하고자 하는 유전자에 합당한 primer 조합을 20 pmol 씩 넣어 thermal cycler에서 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응에 사용한 primer와 반응 조건은 다음과 같다. DR4: 5′-TTACACCAATGCTTCCAACAAT-3′, 5′-AGGAGTCAAAGGGCACGATGTT-3′ (94℃ 30초, 59℃ 1분, 72℃ 1분); DR5 :5′-GCCTCATGGTCAATGAGATAAAGGTGGCT-3′, 5′-CCAAATCTCAAAGTACGCACAAACGG-3′ (94℃ 30초, 59℃ 1분, 72℃ 1분); DcR1 :5′-GGTTTCCACAGTGGCATTGGC-3′, 5′-GATCCCCAAGACCCTAAAGTT-3′ (94℃ 30초, 61℃ 1분, 72℃ 1분); DcR2 :5′-AGGGATGGTCAAGGTCAGTAAT-3′, 5′-GATGTCAGCGGAGTCAGCGTCA-3′ (94℃ 30초, 58℃ 1분, 72℃ 1분); β-actin :5′-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3′, 5′-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3′ (94℃ 30초, 68℃ 2분, 72℃ 1분). 중합효소 연쇄반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

Ⅲ. 결과

1. 자연살 세포의 분리

정상 자연살 세포가 어떠한 기전으로 HepG2와 Hep3B 세포의 세포사멸을 유도하는지를 분석하기 위해서 사람말초혈액으로부터 자연살 세포를 분리했다. 우선 정상인의 말초혈액에서 PBMC를 분리해서 anti-$CD16^{+}CD56^{+}/CD3^{-}$ antibodies를 사용하여 유세포 분석으로 PBMC중 자연살 세포가 차지하는 양을 확인하였고(그림 2a), 자연살 세포가 비교적 많은 공혈자를 선택해서 자연살 세포를 분리했다. 자연살 세포 분리는 RosetteSep^{TM} antibody cocktail[47]을 이용해서 CD3, CD4, CD19, CD36, CD66b을 발현하는 세포들을 제거하는 negative selection 방법을 사용했다. 특별한 언급이 없는 한 분리한 자연살 세포는 100 ng/㎖의 IL-2를 첨가한 RPMI 1640 에서 1일간 배양하여 사용하였다. anti-$CD16^{+}CD56^{+}/CD3^{-}$ antibodies를 사용하여 유세포 분석으로 확인하여(그림 2b) 80%이상의 순도를 가진 자연살 세포를 가지고 실험을 진행하였다.

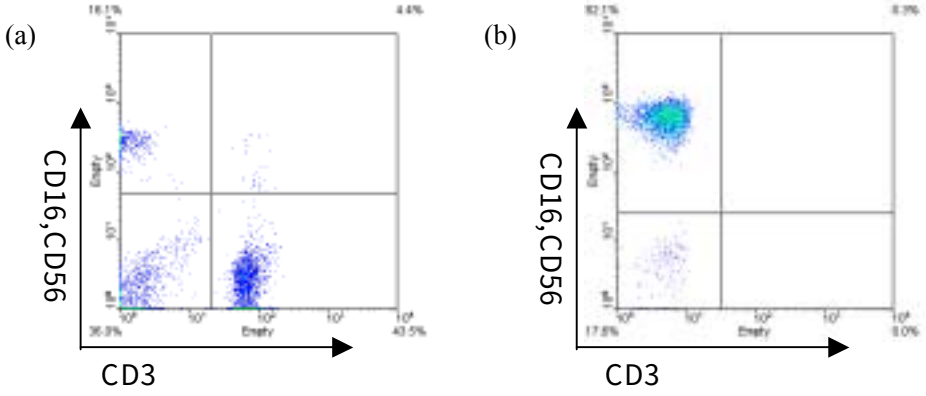


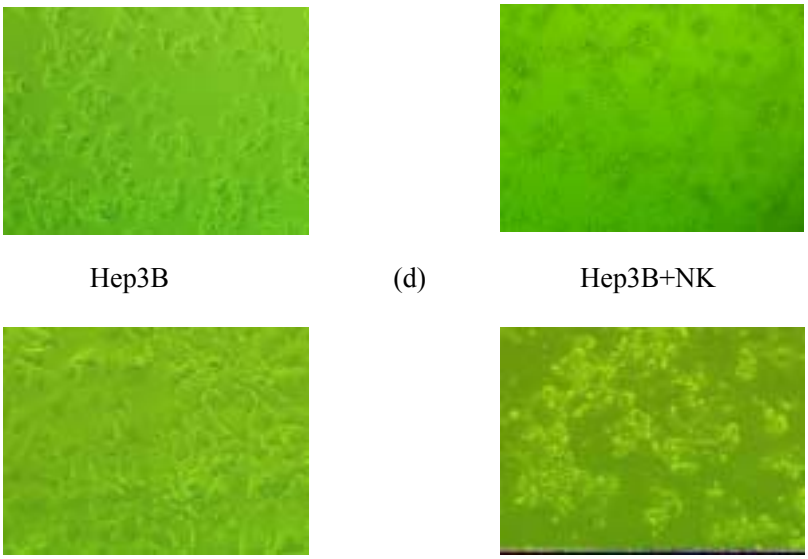
그림 2. 사람말초혈액으로부터 자연살 세포 분리.

(a) 사람말초혈액으로부터 PBMC를 분리해서 $CD16^{+}CD56^{+}/CD3^{-}$ antibodies로 자연살 세포의 양을 확인하였다. (b) PBMC로부터 RosetteSep^{TM} antibody cocktail 처리하여 negative selection으로 자연살 세포를 분리하였고, 80%이상의 순도를 가진 자연살 세포가 분리된 것을 확인했다.

2. 자연살 세포와 혼합배양시에 HepG2와 Hep3B 세포에서 관찰되는 형태 변화

HepG2와 Hep3B 세포를 자연살 세포와 4시간 동안 혼합배양한 후 HepG2와 Hep3B 세포의 형태 변화를 관찰한 결과, 표적세포들은 둥글게 변하며 배양용기 바닥에서 떠오르는 등의 세포사멸시에 보이는 형태학적인 변화를 수반하는 것을 확인했다(그림 3).

(a) HepG2 (b) HepG2+NK



(c) Hep3B (d) Hep3B+NK

그림 3.자연살 세포와 혼합배양시에 HepG2와 Hep3B 세포에서 관찰되는 형태 변화

HepG2와 Hep3B 세포를 자연살 세포와 E:T ratio를 3:1로 맞추어 4시간 혼합배양한 후에 inverted microscope로 세포의 형태 변화를 관찰하였다.

3. HepG2와 Hep3B 세포에 대한 자연살 세포의 세포독성능

자연살 세포에 의한 HepG2와 Hep3B 세포의 세포사멸 정도를 알아보기 위해서 ^{51}Cr release assay를 수행하였다. 이미 자연살 세포에 대해서 감수성을 갖는다고 알려져 있는 K562[50] 세포와 자연살 세포에 대해서 저항성을 갖는다고 알려진 Daudi 세포를 각각 양성대조군과 음성대조군으로 사용하여, K562 세포나 Daudi 세포에 대한 자연살 세포의 세포독성능과 HepG2와 Hep3B 세포에 대한 자연살 세포의 세포독성능을 E:T ratio를 달리하여 비교해 보았다. 자연살 세포가 K562 세포 보다는 다소 약하지만, Daudi 세포 보다는 훨씬 강하게 HepG2와 Hep3B 세포의 세포사멸을 유도할 수 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 4).

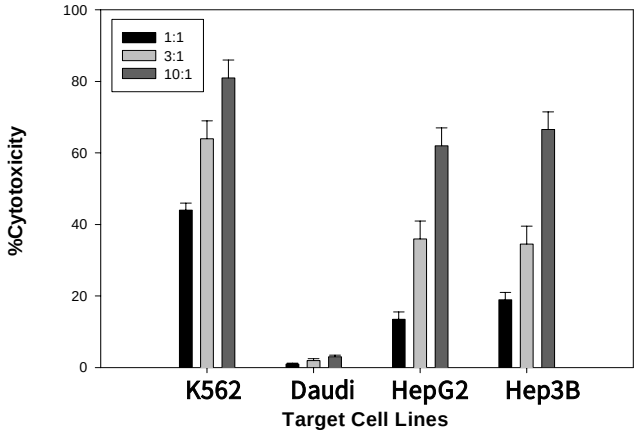


그림 4. HepG2와 Hep3B 세포에 대한 자연살 세포의 세포독성능

K562, Daudi, HepG2, Hep3B 세포를 자연살 세포와 1:1, 3:1, 10:1로 E:T ratio를 맞추어 4시간 동안 혼합 배양한 후 ^{51}Cr release assay로 표적세포에 대한 자연살 세포의 세포독성능을 측정하였다. 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 나타내었다.

4. 자연살 세포에 의해서 HepG2, Hep3B, 세포에서 유도되는 세포고사

Perforin/granzyme 등의 과립 분비를 통해서는 세포괴사와 세포고사가 일어나고 자연살 세포의 ligand와 표적세포의 수용체의 작용을 통해서는 세포고사가 일어나는데 자연살 세포가 HepG2와 Hep3B 세포의 세포사멸을 유도할 때 일어나는 세포고사를 측정하기 위해서 JAM test를 시행하였다. 자연살 세포가 주로 세포괴사의 방법을 통해 세포사멸을 유도한다는 K562 세포와 세포고사의 방법을 통해 세포사멸을 유도한다고 알려진 MOLT-4[50] 세포의 세포고사를 함께 측정해서 HepG2와 Hep3B 세포의 세포고사와 비교해 보았다(그림 5). 결과로 볼 때 HepG2 세포에서는 세포고사가 일어나지 않는 반면, 자연살 세포가 Hep3B 세포의 세포고사를 유도하는 것을 알 수 있었다.

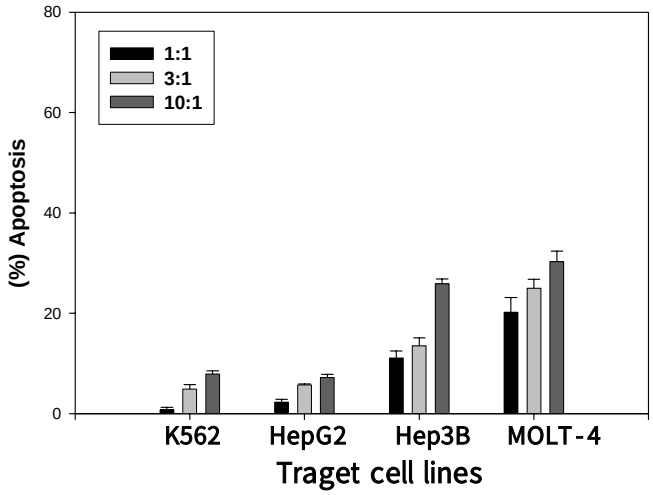


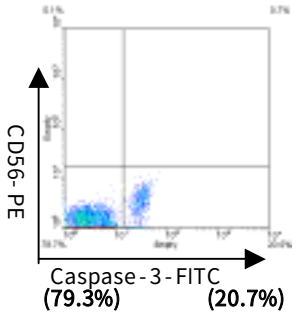
그림 5. 자연살 세포에 의해 HepG2, Hep3B 세포에서 유도되는 세포고사

자연살 세포와 표적세포를 1:1, 3:1, 10:1 로 E:T ratio를 맞추어 2시간 동안 혼합배양한 후 JAM test를 수행하여 표적세포에서 일어나는 세포고사를 측정하였다. 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 나타내었다.

JAM test로 DNA fragmentation을 측정하여 세포고사를 확인했는데, 다른 방법으로 자연살 세포에 의해서 유도되는 HepG2와 Hep3B 세포의 세포고사를 확인하기 위해서 세포고사가 일어날 때 특징적으로 관찰되는 caspase-3의 활성을 측정하였다. 표적세포들과 자연살 세포를 혼합배양하는 system을 사용하기 때문에 표적세포와 자연살 세포를 구별해 내는 작업이 필요했다. 표적세포와 자연살 세포를 혼합배양한 후 active caspase-3에 대한 항체와 자연살 세포의 특징적인 세포표면분자에 대한 항체를 동시에 사용하여 유세포 분석으로 표적세포에서 일어나는 caspase-3 활성을 측정하였다(그림 6). 결과를 볼 때 K562 세포와 혼합 배양한 자연살 세포에서 caspase-3 활성이 유도되고 MOLT-4, HepG2, Hep3B 세포와 혼합배양한 자연살 세포에서는 caspase-3 활성이 일어나지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 유세포 분석 결과, HepG2 세포에서는 자연살 세포와 혼합배양하기 전에 비해 caspase-3 활성을 보이는 세포 수가 증가하지 않았으나 MOLT-4와 Hep3B 세포에서 caspase-3 활성을 보이는 세포 수가 증가함을 관찰할 수 있었다. 각 실험에서 자연살 세포를 제외한 표적세포의 caspase-3 활성을 백분율로 계산하여 괄호 안에 표시하였다(그림 6a). 이는 자연살 세포에 의해 HepG2 세포에서는 세포고사가 일어나지 않으며, Hep3B 세포에서는 세포고사가 일어난다는 JAM test의 결과를 확인해 주는 것으로 생각된다. K562 세포 이외의 표적세포와 혼합배양했을 때에는 자연살 세포에서 caspase-3 활성이 일어나지 않는 것을 확인했기 때문에 자연살 세포와 혼합배양한 표적세포의 세포용해액으로 western blot을 수행한 결과, K562, MOLT-4, Hep3B 세포에서 caspase-3 활성이 일어나는 것을 관찰할 수

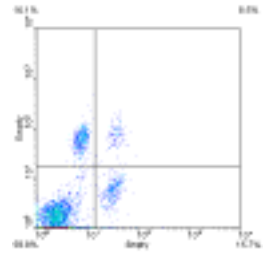
있었다(그림 6b). 이는 유세포분석에 의한 caspase-3 활성 측정과 일치되는 결과이다. K562 세포가 자연살 세포의 세포고사를 유도한다는 보고[51]로 미루어 볼 때 자연살 세포와 혼합배양한 K562 세포에서 보여주는 caspase-3 활성 증가는 자연살 세포에서 기원되었으리라 생각된다.

(a)



K562

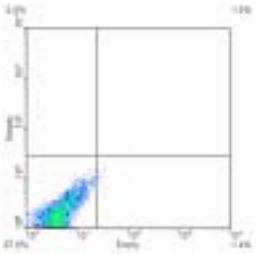
(79.3%) (20.7%)



K562+NK

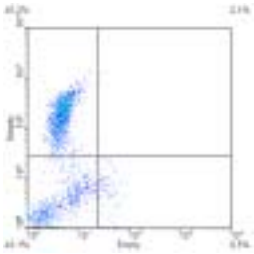
(79.3 %) (20.7 %)

MOLT-4



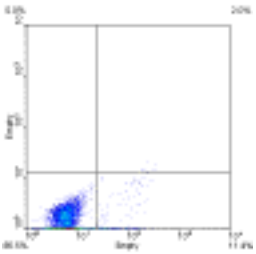
(98.6%) (1.4%)

MOLT-4+NK



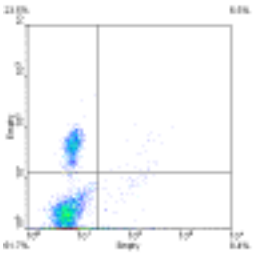
(82 %) (18 %)

HepG2



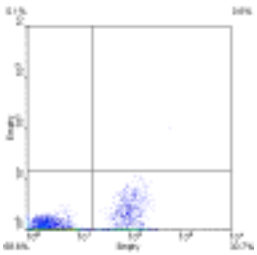
(88.4%) (11.6%)

HepG2+NK



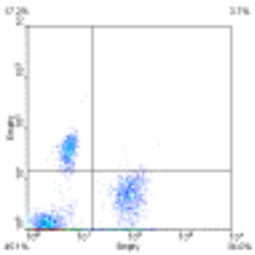
(88.1 %) (11.9 %)

Hep3B



(69.1%) (30.9%)

Hep3B+NK



(57.1 %) (42.9 %)

(b)

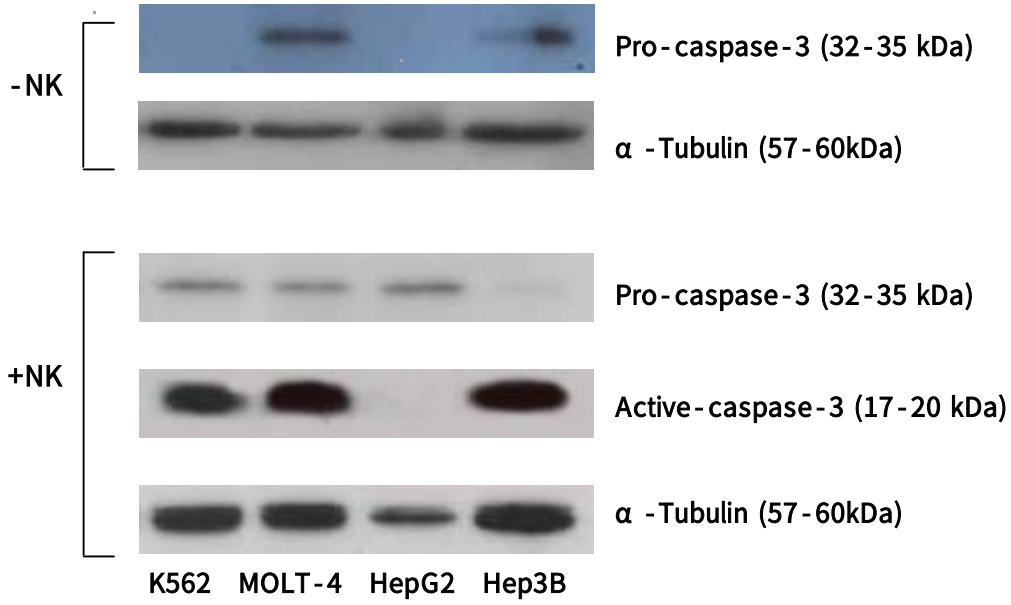


그림 6. 자연살 세포와 혼합배양 했을 때 표적세포에서 일어나는 caspase-3 활성

(a) 자연살 세포와 2시간동안 혼합배양한 후 유세포 분석으로 caspase-3 활성을 측정하였다. FITC-labeled active caspase-3 antibody와 PE-labeled CD56 antibody를 사용하여 표적세포와 자연살 세포를 구별하였다. (b) 자연살 세포와 2시간 혼합배양한 후 표적세포의 세포용해액을 사용하여 Western blot을 수행하였다. –NK: 자연살 세포와 혼합배양하기 전, +NK: 자연살 세포와 혼합배양한 후

5. 자연살 세포 고정으로 과립 분비를 억제하였을 때의 세포사멸

자연살 세포를 paraformaldehyde로 고정하여 perforin/granzyme 등의 과립 분비를 억제 시킨 후 ^{51}Cr release assay와 JAM test를 수행하여 과립 분비를 통한 세포사멸을 배제한 순수하게 자연살 세포의 ligand들과 표적세포의 수용체들의 작용을 통해 유도되는 세포사멸을 관찰하였다. ^{51}Cr release assay를 수행한 결과, 과립 분비를 억제했을 때 자연살 세포의 세포독성능이 거의 완벽히 소멸됨을 관찰할 수 있었고(그림 7), JAM test 결과로는 자연살 세포의 과립 분비를 억제하여도 고정된 자연살 세포가 표적세포의 세포고사를 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다(그림 8). 이러한 결과는 자연살 세포의 세포사멸 ligand와 HepG2, Hep3B 세포표면의 세포사멸 수용체간의 상호작용에 의해 세포고사가 일어날 수 있음을 시사해 준다.

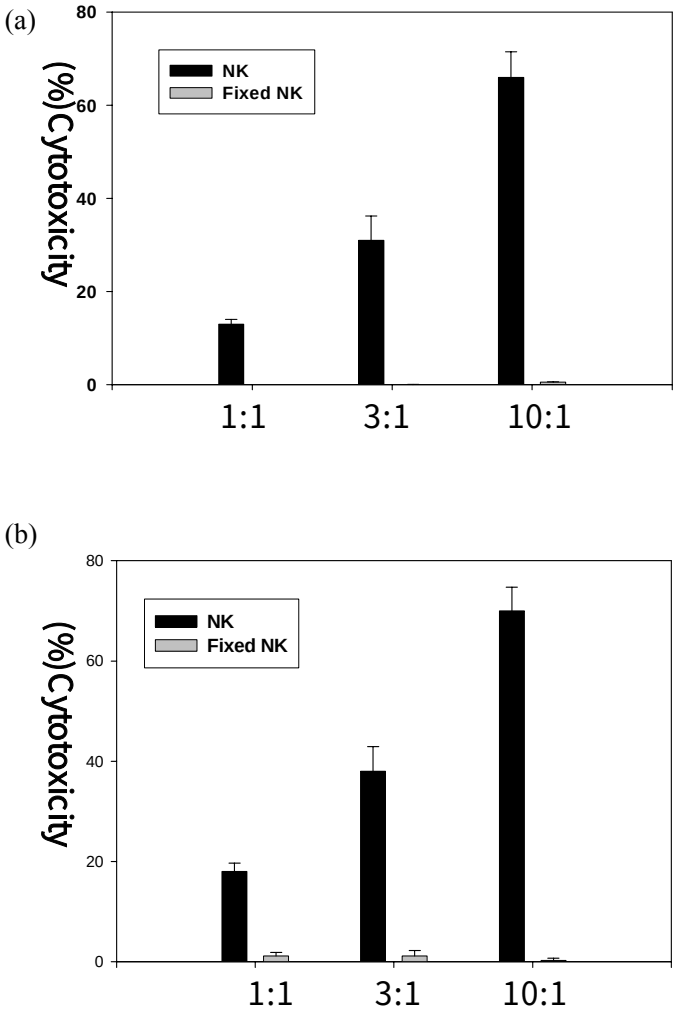


그림 7. 과립 분비가 억제된 자연살 세포가 유도하는 세포사멸

0.5% paraformaldehyde로 자연살 세포를 20분간 고정시켜서 자연살 세포의 과립 분비를 억제시킨 후 자연살 세포와 표적세포의 E:T ratio를 1:1, 3:1, 10:1로 맞추어 4시간 혼합배양한 후 ^{51}Cr release assay를 수행하였다. (a)는 HepG2 세포를, (b)는 Hep3B 세포를 표적세포로 사용하여 실험한 것으로 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 나타내었다.

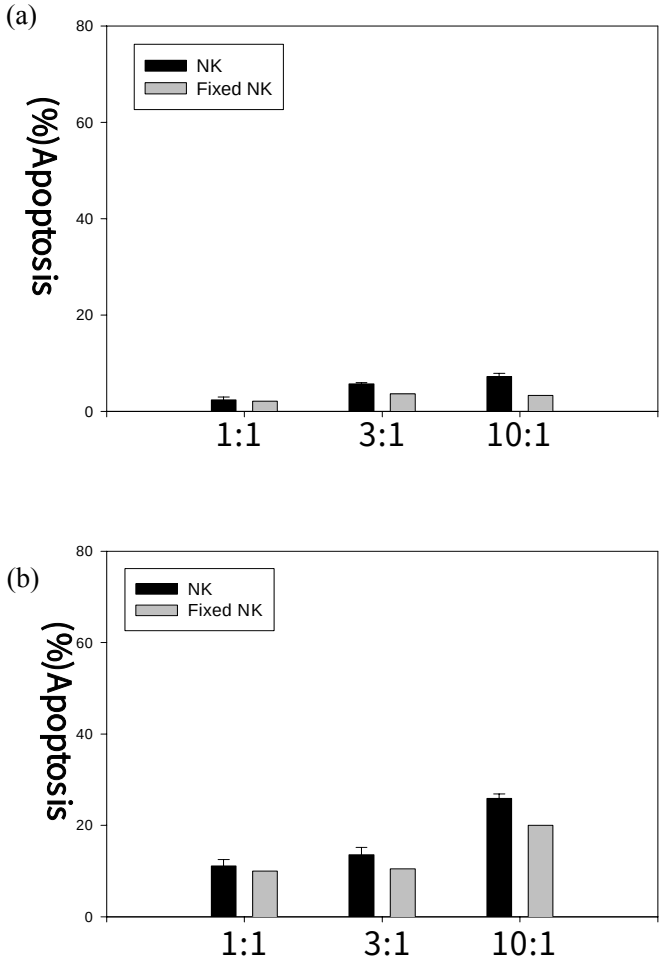


그림 8. 과립 분비가 억제된 자연살 세포가 유도하는 세포고사

0.5% paraformaldehyde로 자연살 세포를 20분간 고정시켜서 자연살 세포의 과립 분비를 억제시킨 후 자연살 세포와 표적세포의 E:T ratio를 1:1, 3:1, 10:1로 맞추어 2시간 혼합 배양한 후 JAM test를 수행하였다. (a)는 HepG2 세포를, (b)는 Hep3B 세포를 표적세포로 사용하여 실험한 것으로 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 나타내었다.

.

6. 자연살 세포의 FasL와 HepG2, Hep3B 세포의 Fas의 상호 작용을 통한 세포사멸

HepG2와 Hep3B 세포에서 자연살 세포의 FasL에 대한 수용체인 Fas의 발현을 관찰하기 위해 유세포 분석을 시행하였다. HepG2 세포에서는 Fas가 발현되어 있고 Hep3B 세포에서는 Fas가 전혀 발현되지 않은 것을 확인할 수 있었다(그림 9). 자연살 세포와 직접 혼합배양했을 때 세포사멸의 양상을 보이는 HepG2 세포의 형태 변화가 Fas의 neutralizing antibody인 ZB4에 의해서 억제되는지를 확인한 결과 자연살 세포에 의해서 유도되는 HepG2 세포의 형태 변화가 ZB4에 의해서 억제되지 않는 것을 알 수 있었다(그림 10). 이러한 결과는 자연살 세포에 의한 HepG2 세포의 사멸은 Fas-mediated pathway를 경유하지 않는다는 것을 의미한다.

(a) (b)

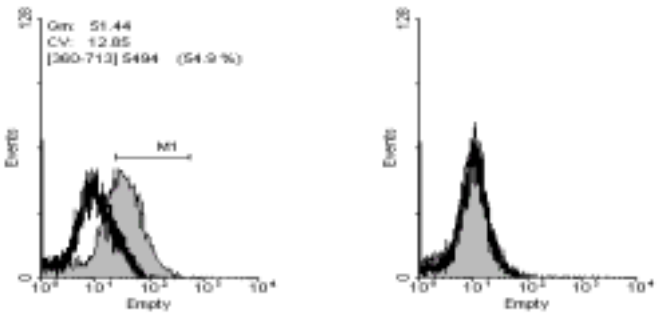


그림 9. HepG2와 Hep3B 세포에서 Fas발현

표적세포에서 발현되고 있는 Fas를 유세포 분석으로 측정하였다. (a)는 HepG2 세포이고 (b)는 Hep3B 세포에서 발현되는 Fas를 측정한 것이다

(a) HepG2

(b) HepG2+NK

(c) HepG2+NK +ZB4 (2 μg/ml)

그림 10. 자연살 세포가 유도하는 세포사멸에 대한 ZB4의 억제 효과 확인

자연살 세포와 혼합배양하기 1시간 전에 HepG2 세포에 ZB4를 처리해 주고 4시간 동안 자연살 세포와 혼합배양한 후 HepG2 세포의 형태 변화를 inverted microscope로 관찰하였다.

7.자연살 세포의 TRAIL과 HepG2, Hep3B 세포의 DR들의 상호작용에 의한 세포 사멸

HepG2, Hep3B 세포에서 TRAIL에 대한 수용체인 DR4, DR5, DcR1, DcR2의 발현을 확인한 결과 HepG2, Hep3B 세포가 DR4, DR5, DcR1, DcR2의 전사체를 모두 갖고 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 11). 그리고 TRAIL이 그에 대한 수용체의 전사체를 갖고 있는 HepG2, Hep3B 세포의 세포사멸을 유도할 수 있는지를 살펴보기 위해서 recombinant TRAIL을 24시간 동안 표적세포에 처리한 결과 recombinant TRAIL이 농도에 비례하게 HepG2 세포와 Hep3B 세포의 세포고사를 유도할 수 있다는 것을 확인하였다(그림 12). 이는 자연살 세포에 의한 HepG2, Hep3B 세포의 고사는 자연살 세포 표면의 TRAIL과 표적세포의 DR간의 상호 작용에 의할 수 있다는 가능성을 보여주는 결과이다.

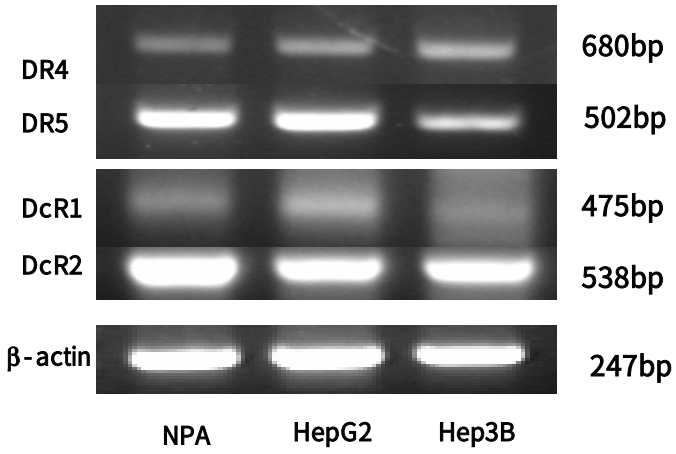


그림 11. HepG2 세포와 Hep3B 세포에서 TRAIL 수용체들의 전사체 발현

역전사 중합효소 연쇄반응으로 HepG2와 Hep3B 세포의 세포사멸 수용체들의 전사체를 확인하였다. β-actin으로 control을 잡았고, 이미 TRAIL receptors의 전사체가 존재하는 것을 확인한 갑상선암 세포주인 NPA 세포를 양성대조군으로 사용하였다.

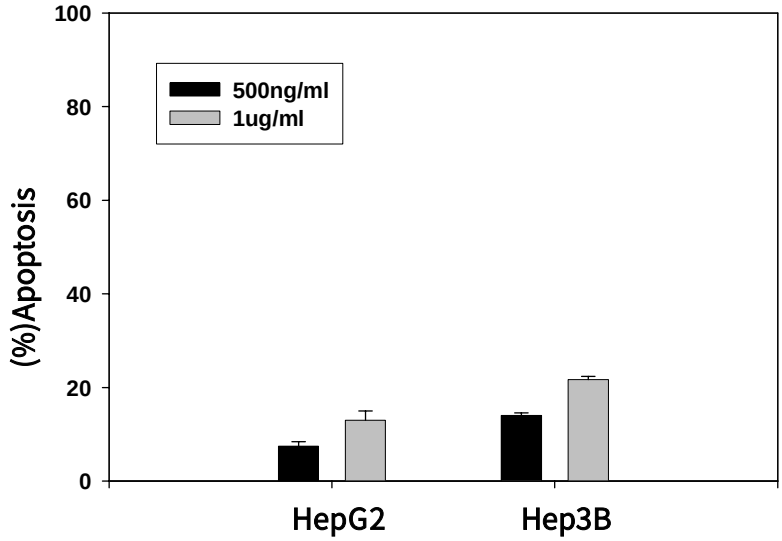


그림 12. Recombinant TRAIL를 통해 HepG2와 Hep3B 세포에서 유도되는 세포고사

Recombinant TRAIL을 500 ng/ml과 1 μg/ml로 24시간 처리한 후 HepG2와 Hep3B 세포에서 유도되는 세포고사를 JAM test로 확인하였다. 각 값은 triplicate로 3번 실험을 반복하여 얻은 결과를 mean±SD로 나타내었다.

Ⅳ. 고찰

자연살 세포가 종양세포 및 바이러스에 감염된 숙주세포를 제거하는 기능을 하며, 부적절한 골수 이식을 거부하고 B 세포와 T 세포의 면역반응을 조절하는 등 생체 내 면역방어기전에 중요한 역할을 담당하고 있다는 것은 잘 알려져 있으며[1], 표적세포의 사멸을 유도하는 기전도 perforin과 granzyme 등의 과립을 분비하는 기전[2]과 Fas/FasL, death receptors/TRAIL 등의 receptor/ligand 작용에 의한, 크게 두 가지 기전[4,5]으로 나뉜다는 것도 비교적 잘 알려져 있다[3-5]. 원래 자연살 세포는 백혈병세포에 대해서 탁월한 세포독성능을 보인다고 알려져 있고, 폐암, 유방암, 육아종 등의 고형종양세포의 세포사멸도 유도할 수 있다[34-36]고 보고되었다. 본 연구에서는 HepG2 세포와 Hep3B 세포를 표적세포로 해서 자연살 세포가 어떠한 기전으로 한국형 호발암이자 조직에서 유래한 고형종양세포인 간암세포의 세포사멸을 유도하는지에 대해서 알아보았다.

우선 자연살 세포가 HepG2 세포와 Hep3B 세포를 효과적으로 죽일 수 있다는 것을 확인하였고, 세부적으로 자연살 세포에 의해서 일어나는 표적세포의 세포사멸을 세포괴사와 세포고사로 나누어 보았다. JAM test는 간단히 DNA fragmentation을 측정할 수 있는 방법인데,[53] 이 방법은 자연살 세포와 표적세포를 짧은 시간동안 혼합배양하여 수행하기 때문에 혼합배양 초기에 일어나는 세포고사를 효과적으로 측정할 수 있는 방법이다. 이 방법으로 표적세포에서 일어나는 세포고사를 측정한 결과, Hep3B 세포에서 세포고사가

일어나는 것을 확인했다. 최근의 연구결과에 의하면 표적세포에서 발현되는 MHC class Ⅰ 분자와 결합하여 활성화 신호가 아닌 억제 신호를 전달하는 억제성 수용체(killer cell immunoglobulin-like receptor; KIR)가 자연살 세포에 표현되어 있다고 밝혀 졌는데[54-56] 실험 결과를 보이진 않았지만 표적세포에서 MHC class Ⅰ분자 발현 정도에 차이가 없는 것을 확인하였으며, 이는 두 표적세포의 ^{51}Cr release assay와 JAM test 결과의 차이는 KIR에 의해 기인되는 것이 아니라는 것을 시사 한다.

세포고사가 일어나면서 특징적으로 나타나는 현상으로 caspase-3의 활성을 볼 수 있는데, JAM test 결과로 DNA fragmentation을 확인했고 유세포 분석과 western blotting으로 caspase-3 활성을 확인했다. 혼합배양에서 가장 문제가 되는 것이 표적세포와 자연살 세포가 섞여서 표적세포에서 일어나는 변화만을 명확히 측정하기가 어렵다는 점이다. 그래서 유세포 분석으로 caspase-3 활성을 측정할 때 자연살 세포의 특징적인 세포표면분자인 CD56에 대한 항체를 함께 사용해서 자연살 세포에서 일어나는 caspase -3 활성도 함께 확인하고자 하였다. 유세포 분석으로 자연살 세포와 혼합배양했을 때 표적세포에서 일어나는 caspase-3 활성을 분석한 결과, MOLT-4와 Hep3B 세포에서 caspase-3의 활성을 관찰할 수 있었고, K562 세포를 제외한 다른 표적세포들과 혼합배양한 자연살 세포에서는 caspase-3 활성이 일어나지 않는다는 것을 알 수 있었다(그림 6). K562 세포와 혼합배양한 자연살 세포에서는 caspase-3 활성이 관찰되었는데, 이것은 이미 보고된 K562 세포가 IL-2의 자극을 받은 자연살 세포의 세포고사를 유도한다는 것과 일치하는 결과이다[51]. 유세포 분석으로 K562

세포를 제외한 다른 표적세포들과 혼합배양한 군에서 관찰되는 caspase-3의 활성이 자연살 세포에서 일어나는 것이 아니라고 확신할 수 있었고, western blot으로도 caspase-3 활성을 확인하였다. 자연살 세포와 혼합배양한 K562, MOLT-4, Hep3B 세포에서 cleaved form의 caspase-3를 확인하였는데, K562 세포는 혼합배양한 자연살 세포에서 일어난 세포고사로 인해서 caspase-3 활성이 관찰되었고, MOLT-4 세포는 주로 세포고사를 통해 죽는다고 알려진 바와 일치하고 Hep3B 세포도 JAM test의 결과와 일치하는 것을 확인하였다. 이는 자연살 세포가 HepG2 세포의 세포고사는 유도하지 못하고 Hep3B 세포의 세포고사를 유도할 수 있음을 시사한다.

Perforin/granzyme 분비를 통해서 세포괴사와 세포고사가 유도되고 자연살 세포의 세포 표면 death ligand와 표적세포의 세포사멸 수용체를 통해서도 세포고사가 유도되는데, 과립 분비를 통한 세포고사를 제거하기 위해서 자연살 세포를 고정하는 방법을 사용 하였다. 자연살 세포를 고정한 후에도 Hep3B 세포에서 세포고사가 일어나는 것을 JAM test로 확인해서, 자연살 세포가 Hep3B 세포의 세포고사를 유도하는데 표적세포 표면의 세포사멸 수용체가 관여한다는 것을 알았다. 우선 표적세포에서 자연살 세포의 FasL에 대한 수용체인 Fas의 발현을 관찰하였는데, HepG2 세포는 Fas를 발현하고 있고, Hep3B 세포는 Fas를 발현하고 있지 않은 것을 확인하였다. Fas를 발현하는 HepG2 세포에 대해서는 agonistic anti-Fas IgM antibody인 CH11을 처리하여 LDH assay로 세포사멸을 측정했을 때 세포사멸이 유도되지 않았다는 보고가 이미 있었고[52], 자연살 세포와 직접 혼합배양했을때 HepG2 세포에서 관찰되는

형태학적 변화가 antagonistic anti-Fas IgG antibody인 ZB4로도 억제되지 않는 것을 볼 때, HepG2 세포는 자연살 세포의 FasL에 대한 Fas를 통한 세포고사에 저항성을 갖는다는 것을 알 수 있었다. HepG2 세포는 FasL에 의해 유도되는 세포고사에 대해 저항성을 보이고, Hep3B 세포는 Fas를 발현하고 있지 않으므로, 자연살 세포에서 발현되고 있는 또 하나의 중요한 세포사멸 유도 ligand인 TRAIL을 통한 세포고사 유도를 생각해 보았다. TRAIL에 대한 수용체는 4가지로 알려져 있는데, 그중 DR4와 DR5는 세포 내 부분에 death domain이 있어서 세포고사를 유도 하고[19-23], DcR1과 DcR2는 세포 내 부위에 death domain이 없거나 truncation 되어 있어서 세포고사를 유도하는 세포 내 신호를 전달할 수 없어서 오히려 DR4, DR5가 TRAIL과 결합할 때 경쟁적 억제자 역할을 한다[20,21,24-27]. 우선 표적세포에서 TRAIL에 대한 수용체의 전사체가 존재하는지 알아보았다. HepG2, Hep3B 세포에서 DR4, DR5와 DcR1, DcR2의 전사체를 모두 확인할 수 있었기 때문에 표적세포에서 일어나는 세포고사가 TRAIL receptors에 의한 것이라는 가능성을 확인하기 위해서, recombinant TRAIL (rTRAIL)로 세포고사를 유도해 보았다. rTRAIL을 처리했을 때도 표적세포에서 세포고사가 유도되고 처리해준 rTRAIL의 농도가 증가함에 따라 표적세포에서 일어나는 세포고사도 증가하는 것을 확인하였고, HepG2 세포보다 Hep3B 세포에서 효과적으로 세포고사가 유도됨도 확인할 수 있었다. 자연살 세포와 표적세포를 혼합배양한 후 세포고사를 측정했을 때 Hep3B 세포에서만 caspase-3 활성을 확인하는 등, Hep3B 세포만이 세포고사를 통해 사멸되는 현상을 강하게 보였던 것과 유사한 결과이다. JAM test 결과에 의하면,

자연살 세포에 의해서 직접 유도된 표적세포의 세포고사가 rTRAIL을 처리하여 유도된 표적세포의 세포고사보다 더 낮은 수치를 보이는데 rTRAIL은 24시간 처리한 것이고, 자연살 세포는 2시간 혼합배양을 한 결과로 처리 시간의 차이 때문에 그러한 차이가 난다고 생각해 볼 수 있다. rTRAIL에 의해서 표적세포의 세포고사가 유도되는 것은 확인하였지만 그것만으로 자연살 세포가 TRAIL/DR를 통해서 표적세포의 세포고사를 유도한다고 결론 내리기에는 부족하다. 앞으로 TRAIL-receptor1으로 자연살 세포의 TRAIL을 block시킨 후 혼합배양했을 때 표적세포에서 일어나는 세포고사를 확인하여 자연살 세포가 Hep3B 세포의 세포고사를 유도하는데 TRAIL이 관련되어 있다는 사실을 밝히는 과정이 필요하다.

이상의 연구 결과를 종합해 보면, 자연살 세포가 HepG2 세포와 Hep3B 세포의 세포사멸을 유도하는데 주로 perforin/granzyme 등의 과립 분비를 통해서 세포사멸을 유도하고, HepG2 세포는 Fas에 의해서 유도되는 세포고사에 저항성을 가지고 있으며, Hep3B 세포의 세포고사를 유도하는데 자연살 세포의 TRAIL과 Hep3B 세포의 TRAIL 수용체들이 관여할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

본 실험에서 관찰한 이러한 현상들이 실제 간암 환자의 간암세포에서도 관찰되는지 확인해 볼 필요가 있고, 이러한 경우에 그 환자의 자연살 세포를 사용할 때와 정상인의 자연살 세포를 사용할 때의 결과를 비교하는 것도 흥미로운 연구가 될 것이다.

Ⅴ. 결론

본 연구에서는 자연살 세포가 조직에서 유래한 고형종양세포인 사람 간암세포주 HepG2 세포와 Hep3B 세포의 세포사멸을 유도하는지 여부와, 세포사멸이 유도된다면 이 때의 세포사멸 기전의 특징을 조사하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HepG2 세포와 Hep3B 세포가 원래 자연살 세포에 대한 감수성이 높다고 알려진 K562 백혈병세포보다는 다소 약하지만, 자연살 세포에 대한 뚜렷한 감수성을 보였다.
2. 자연살 세포에 의해서 HepG2 세포는 세포고사가 유도되지 않고, Hep3B 세포는 세포고사가 유도되어, Hep3B 세포에서 caspase-3 활성이 관찰되었다.
3. 과립 분비를 통한 세포사멸을 억제하여도 Hep3B 세포에서 세포고사가 유도되었으며, 이는 death receptor/ligand의 작용을 통해 세포고사가 유도될 수 있음을 의미한다.
4. HepG2 세포는 Fas를 발현하고 있으나, 자연살 세포의 FasL를 통해 유도되는 세포고사에 저항성을 보였다.
5. Hep3B 세포는 Fas를 발현하고 있지 않지만, 자연살 세포에 의해 세포사멸 수용체 매개 세포고사가 일어나는 것을 보아, TRAIL receptors와 같은 다른 세포 사멸 수용체가 작용함을 알 수 있다.

6. Recombinant TRAIL에 의해서 TRAIL receptors의 전사체를 갖고 있는 표적세포의 세포고사가 유도되었다.

이상의 결과로, 자연살 세포가 주로 과립 분비를 통해서 HepG2 세포와 Hep3B 세포의 세포사멸을 유도하고, Fas를 정상적으로 표현하는 HepG2 세포는 자연살 세포의 FasL에 의한 세포사멸에 저항성을 가지며, Fas를 발현하지 않는 Hep3B 세포에서 관찰되는 세포고사에 자연살 세포의 FasL 외에 TRAIL같은 다른 세포사멸 ligand들이 관여하고 있음을 알 수 있다.

참고문헌

1. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. Adv Immunol 1989;47:187-376
2. Berke G, Rosen D, Ronen D. Mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis: functional cytolytic T cells lacking perforin and granzymes. Immunology 1993;78:105-12
3. Ostergaard HL, Kane KP, Mescher MF, Clark WR. Cytotoxic T lymphocyte mediated lysis without release of serine esterase. Nature 1987;330:71-2
4. Podack ER, Hengartner H, Lichtenheld MG. A central role of perforin in cytolysis? Annu Rev Immunol 1991;9:129-57
5. 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
6. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med 1989;169:1747-56
7. Darmon AJ, Bleackley RC. Proteases and cell-mediated cytotoxicity. Crit Rev Immunol 1998;18:255-73
8. Trapani JA. Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic

lymphocytes. Int Rev Cytol 1998;182:111-92

9. Krahenbuhl O, Tschopp J. Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. Immunol Today 1991;12:399-402; discussion 03

10. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem 1995;270:7795-8

11. 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

12. 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

13. 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 signaling complex. Cell 1996;85:817-27

14. Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT, et al. CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. J Biol Chem

1996;271:1841-4

15. 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
16. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 1998;391:96-9
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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

22. 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

23. 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

24. 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 emerging TRAIL receptor family. J Exp Med 1997;186:1165-70

25. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. Immunity 1997;7:813-20

26. Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. FEBS Lett 1998;424:41-5

27. 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

28. Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Nonstad U, Egeberg K, Sundan A, et al.

Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. Cytokine 1999;11:664-72

29. 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

30. Dorothee G, Vergnon I, Menez J, Echchakir H, Grunenwald D, Kubin M, et al. Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes express APO2 ligand (APO2L)/TRAIL upon specific stimulation with autologous lung carcinoma cells: role of IFN-alpha on APO2L/TRAIL expression and -mediated cytotoxicity. J Immunol 2002;169:809-17

31. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. Cell Immunol 2001;214:194-200

32. Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Jacobs BS, Borden EC. IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. J Immunol 2002;169:847-55

33. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrout RH, Sedger LM, Kayagaki N, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection

from tumor metastasis. J Exp Med 2001;193:661-70

34. Alvarado CS, Findley HW, Chan WC, Hnath RS, Abdel-Mageed A, Pais RC, et al. Natural killer cells in children with malignant solid tumors. Effect of recombinant interferon-alpha and interleukin-2 on natural killer cell function against tumor cell lines. Cancer 1989;63:83-9

35. Pollock RE, Lotzova E, Stanford SD. Surgical stress impairs natural killer cell programming of tumor for lysis in patients with sarcomas and other solid tumors. Cancer 1992;70:2192-202

36. Itoh K, Platsoucas CD, Balch CM. Monocyte- and natural killer cell-mediated spontaneous cytotoxicity against human noncultured solid tumor cells. Cell Immunol 1987;108:495-500

37. Chuang WL, Liu HW, Chang WY. Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma relative to early development and tumor invasion. Cancer 1990;65:926-30

38. Natoli G, Ianni A, Costanzo A, De Petrillo G, Ilari I, Chirillo P, et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. Oncogene 1995;11:1157-64

39. Feldmann G. Liver apoptosis. J Hepatol 1997;26 Suppl 2:1-11

40. Galle PR, Krammer PH. CD95-induced apoptosis in human liver disease. Semin Liver Dis 1998;18:141-51

41. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller 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

42. 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

43. 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 Hepat 1997;4:303-7

44. 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

45. 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

46. 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

47. Lansdorp PM, Aalberse RC, Bos R, Schutter WG, Van Bruggen EF. Cyclic tetramolecular complexes of monoclonal antibodies: a new type

of cross-linking reagent. Eur J Immunol 1986;16:679-83

48. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. J Biol Chem 1994;269:30761-4

49. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 1995;376:37-43

50. Oshimi Y, Oshimi K, Miyazaki S. Necrosis and apoptosis associated with distinct Ca2+ response patterns in target cells attacked by human natural killer cells. J Physiol 1996;495 (Pt 2):319-29

51. Rodella L, Zamai L, Rezzani R, Artico M, Peri G, Falconi M, et al. Interleukin 2 and interleukin 15 differentially predispose natural killer cells to apoptosis mediated by endothelial and tumour cells. Br J Haematol 2001;115:442-50

52. Shin EC, Shin WC, Choi Y, Kim H, Park JH, Kim SJ. Effect of interferon-gamma on the susceptibility to Fas (CD95/APO-1)-mediated cell death in human hepatoma cells. Cancer Immunol Immunother 2001;50:23-30

53. Matzinger P. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. J Immunol Methods 1991;145:185-92

54. Lanier LL. NK cell receptors. Annu Rev Immunol 1998;16:359-93

55. Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. Annu Rev Immunol 1999;17:875-904

56. Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. Adv Immunol 1994;55:341-80

Abstract

Characteristics of the killing mechanism of human natural killer cells against Hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Hep3B

Hyong Ran Kim

Department of Medical Sciences
The Graduated School, Yonsei University

(Directed by Professor Jongsun Kim)

NK cells play important roles in innate immunity by exhibiting cytotoxicity against cells infected by viruses or bacteria, transplantated cells and neoplastic tumor cells. There are two major pathways in the killing mechanism of NK cells. In one pathway, death receptor on target cells is cross-linked by effector cell ligand, and it triggers a relatively well-studied death pathway involving caspase activation. Another pathway involves a polarized secretion of preformed perforin and granzymes by effector cell granule exocytosis, which leads to rapid target caspase activation as well as a caspase-independent death pathway. NK cells display an effect not only in the elimination of leukemia cells but also in that of solid tumors. However, it is not known whether NK cells can kill liver

cancer cells which are solid tumors. Particularly, it is not known whether apoptosis of hepatocellular cacinomas can be led through NK cell surface ligand.

To investigate whether NK cells can kill liver cancer cell lines, two hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Hep3B were co-cultured with primary human NK cells and NK cell-mediated cytotoxicity was examined using ^{51}Cr release assay. All target cells appeared to be extremely sensitive to the NK cell-mediated cytotoxicity. Whereas, JAM test (^{3}[H]-Thymidine release assay) results showed that NK cells induce apoptotic death of Hep3B only. To explore the possible involvement of Fas in NK cell cytotoxicity against hepatocellular carcinomas cell lines, cell surface Fas expression of HepG2 and Hep3B was investigated. HepG2 expressed Fas on the surface but Hep3B didn't. Treatment of ZB4 did not block NK-induced morphological change of HepG2. Therefore, it is highly likely that HepG2 is resistant to Fas-mediated cell death. In addition to FasL, NK cells also express TRAIL, a ligand of death receptor, which is able to lead to apoptosis of target cells. Both HepG2 and Hep3B appeared to express mRNAs of TRAIL receptors (DR4, DR5, DcR1, DcR2). Interestingly, treatment of recombinant TRAIL (rTRAIL) induced more apoptotic death of Hep3B. This suggests that NK cell-induced apoptotic Hep3B death might be mediated by TRAIL on NK cell surface.

The information about the characteristics of the killing mechanism of human NK cells against hepatocellular carcinoma cell lines obtained from this study could be used to design a useful protocol for prevention or cure of liver cancers.

Key Words : NK cell, HepG2, Hep3B, perforin/granzyme, FasL/Fas, TRAIL/DR4.DR5