

Caco-2 세포의 분화에 따른 세포사멸 감수성의 변화

연세대학교 의과대학 내과학교실, 소화기병연구소, BK 21 의과학사업단

김태일 · 양경민 · 채보아 · 진수현 · 김원호

Differences in the Sensitivity to Apoptosis Based on the Degree of Differentiation of Caco-2 Cells

Tae Il Kim, M.D., Kyoung Min Yang, M.S., Boah Chae, M.S.,
Soo Hyun Jin, M.S., Won Ho Kim, M.D.

Departments of Internal Medicine, Institute of Gastroenterology, Brain Korea 21 Project for Medical Science,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: The balance between proliferation and apoptosis is important for homeostasis during differentiation in crypt-villus axis of intestinal epithelium. In addition, cellular responses to diverse stimuli also vary by the degree of cellular differentiation. We investigated the differences in apoptotic sensitivities in genotoxin- and indomethacin-induced apoptosis, based on the degree of differentiation of epithelial cells. **Methods:** Differentiation was induced by post-confluence culture or treatment of sodium butyrate in Caco-2 cells. Indomethacin, VP-16 and MMS (methyl methanesulfonate), which is a direct-acting DNA alkylating agent, were used for apoptosis induction. Degree of differentiation was measured by alkaline phosphatase activity assay. The apoptotic cell death was measured by MTT assay and flow cytometry. **Results:** Compared to the subconfluent Caco-2 cells, both 7 days post-confluent cells and sodium butyrate-treated cells showed significantly increased alkaline phosphatase activity. Both post-confluence- and butyrate-induced differentiated cells showed increased resistance to MMS- or VP-16-induced apoptosis. While post-confluence-induced differentiated cells showed increased resistance to indomethacin-induced apoptosis, butyrate-induced differentiated cells showed increased sensitivity to indomethacin-induced apoptosis. **Conclusions:** Our data demonstrate that differentiated Caco-2 cells induced resistance to genotoxin- and indomethacin- induced apoptosis, although indomethacin-induced apoptosis was increased in butyrate-induced differentiated Caco-2 cells. (*Intestinal Research* 2005;3:96-103)

Key words: Differentiation, Apoptosis, MMS

서론

장관 점막의 구조는 선(crypt)과 융모(villi)로 이어지는 연속적인 장벽의 형태로 구성되며, 외부 자극에 대한 물리적 보호 장벽의 역할뿐만 아니라 여러 자극에 대한 염증반응 및 암화과정에서 중요한 역할을 하는 세포들로 이루어져 있다. 선-융모 구조에서 각 세포들은 증식, 분화, 사멸과정을 거치게 되며,^{1,2} 위치와 단계마다 발현 분자의 변화와 함께 여러 자극에 대해 다양

한 반응을 보이게 되는데 점막세포의 증식과 사멸의 균형에 의한 항상성이 깨지게 되면 염증에 의한 궤양이나 암화과정을 유발하게 된다. 이러한 염증반응과 암화과정에서 미분화세포와 분화세포는 자극의 종류에 따라 서로 다른 반응들을 보일 수 있다.³ 위에서 언급한 장관 점막 세포의 분화 과정에 관련된 기전의 대부분이 아직 잘 알려져 있지 않은 것처럼 세포 자극에 대한 분화세포와 미분화세포의 반응차이에 대한 기전도 알려져 있지 않은 부분이 많다.

대장 점막상피는 가장 흔한 암 발생 위치의 하나로 많은 종류의 독성 자극에 의해 상피세포가 손상된다. 이러한 독성자극은 세포 자체에서 생성되거나, 혈액을 통하거나 또는 장관을 통한 대변과의 직접적인 접촉과정에서 노출이 가능하다.⁴ 세포 손상 중에서 특히 DNA 손상은 많은 방어기전에 의해 회복되지만 일부의 복구

• 연락처 : 김태일, 서울시 서대문구 신촌동 134번지, (120-752) 연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel: 02) 2228-1930, Fax: 02) 393-6884
E-mail: taekim@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 2002년도 연세대학교 학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임.

되지 않은 DNA 손상은 암화과정의 주요한 원인이 될 수 있다.⁵ DNA 손상은 또한 매우 중요한 세포사멸(apoptosis) 자극으로서 복구되지 않은 경우 세포사멸 과정을 통해 암화과정을 억제하게 되며,⁶ 이와 같은 암화과정의 가장 가능성 있는 표적세포는 선와의 바닥에 위치하여 지속적인 증식이 가능한 줄기세포와 주위의 증식세포이다.⁷ 따라서 DNA 손상에 의한 세포사멸 과정이 세포의 분화 상태에 따라 차이가 있다면 미분화상태의 증식세포일수록 더욱 예민하게 작용하여야 효과적으로 암화과정을 억제할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 DNA 손상 자극으로서 직접적인 DNA 알킬화제제인 MMS (methyl methanesulfonate)와 topoisomerase II 억제제인 VP-16 (etoposide)을 이용하였고,^{8,10} 이와 함께 암억제 및 예방 효과가 잘 알려진 비스테로이드성 항염증제(NSAID)로서 indomethacin을 세포사멸 자극의 하나로 포함시켰다. NSAID는 항종양 효과의 기전에 대해 많은 연구결과와 논란이 있지만 중요한 기전 중의 하나가 여러 분자적 기전이 관여하는 세포사멸 효과로 알려져 있고,¹¹ 암예방효과와 관련하여 생각하면 분화 정도에 따른 세포사멸 반응의 민감도에도 차이를 보일 것으로 생각한다.

본 연구에서는 이상의 여러 세포 사멸 자극에 대한 미분화세포와 분화세포의 세포사멸반응의 차이를 알아보고자 하였고, 대표적으로 알려져 있는 세포분화 모델로서 대장암세포주인 Caco-2 세포의 밀집(confluence)에 의한 세포분화 유도방법¹²과 sodium butyrate를 처리하여 분화를 유도하는 방법을 이용하였다.¹³

대상 및 방법

1. 대상세포 배양 및 실험약제

실험에 사용한 대장암세포주 Caco-2 세포(ATCC HTB37, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)는 100 U/mL penicillin과 100µg/mL streptomycin, 그리고 10% 열 비활성화 우태아혈청(fetal bovine serum) (Hyclone, Logan, UT, USA)이 포함된 RPMI 1640 medium (Gibco/BRL, Burlington, Ont., Canada)으로 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 실험에 사용된 세포사멸 자극을 위한 약제로서 MMS (Sigma, St. Louis, USA), VP-16 (Sigma, St. Louis, USA), indomethacin (Sigma, St. Louis, USA)를 이용하였다.

2. 세포 분화 유도

대장암 세포주인 Caco-2 세포의 비분화상태(subconfluence)를 미분화상태로 정의하고 보통 70% 정도의 포화도를 보이는 상태로 정하였다. 두 가지 방법으로 세포분화를 유도하였다. Caco-2 세포의 밀집(confluence)에 의한 세포분화 유도방법은 Caco-2 세포가 100% 포화도를 보이는 상태를 0일로 하여 7일째까지 2일 간격으로 배지를 바꾸어 주면서 계속 배양하여 세포 분화를 유도하였다. Sodium butyrate를 이용한 세포분화 유도방법은 70% 포화도를 보이는 Caco-2 세포에 sodium butyrate 1.0 mM과 2.0 mM을 처리하여 3일간 배양하면서 세포분화를 유도하였다.

3. Alkaline phosphatase assay

세포분화 정도의 지표로서 alkaline phosphatase (AP)의 활성을 측정하였으며,¹⁴ 세포 용해액(cell lysate)을 7 mM p-nitrophenylphosphate이 포함된 기질용액과 반응시켜 충분한 발색이 될 때까지 37°C에서 유지하였다. 생성되는 p-nitrophenol의 양을 microplate reader의 405 nm에서 측정하였고, 같은 용해액의 총 단백질 양으로 보정하였다.

4. MTT assay 및 세포생존율 측정

세포생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다.¹⁵ Caco-2 세포 (2×10⁵/mL)를 96-well plates에 배양하여, 실험에 따라 적절한 약제를 처리한 후 배양액을 제거하고 well당 50µL의 2µg/mL MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]용액 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 후 4시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 이어서 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 상층액을 제거하고 well당 50 µL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가한 후 10분간 진탕하고 590 nm에서의 optical density (OD)를 측정하였다.

5. 통계 분석

결과에서의 각 값은 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 통계분석은 Student's t-test를 이용하였다. 통계적으로 유의한 p 값은 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. 세포분화에 따른 alkaline phosphatase 활성 증가

세포 밀집에 의한 분화와 butyrate 처리에 의한 분화 방법을 이용하여 세포분화를 유도하였으며 두 가지 분화방법 모두에서 세포분화의 지표로서 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. 세포 밀집에 의한 분화는 배양 well 내에서 Caco-2 세포가 100% 포화(confluence)에 도달한 시기를 0일로 하여 그 후 3일, 5일 그리고 7일까지 배양하여 세포분화를 유도하였고, 분화의 지표로서 각 시기별로 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. 포화상태 0일째에 비해 포화상태 후 3일, 5일, 7일

째에 유의하게 alkaline phosphatase 활성의 증가를 관찰하였다(Fig. 1A). Butyrate 처리에 의한 분화는 배양 well에서 Caco-2 세포가 70% 포화도를 보이는 상태에서 sodium butyrate를 각각 0.5, 1.0, 2.0 mM씩 유지하도록 3일간 배양하여 분화를 유도하였고, 각 농도별로 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. 처리한 butyrate의 농도에 따라 유의하게 alkaline phosphatase 활성의 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 1B).

2. MMS, VP-16, indomethacin에 의한 세포사멸 확인

세포사멸 자극으로 이용한 MMS, VP-16, indometha-

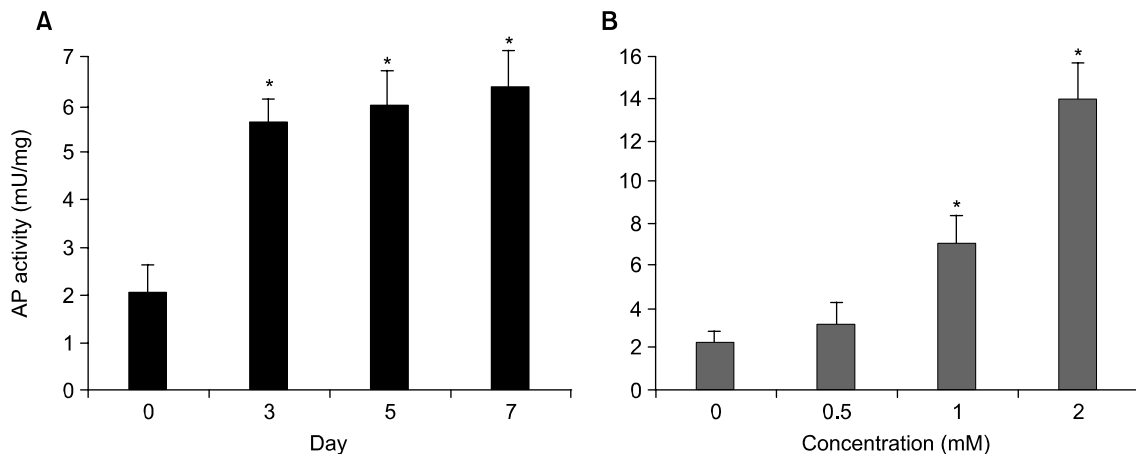


Fig. 1. Differentiation-induced activation of alkaline phosphatase (AP). (A) After reaching confluence, Caco-2 cells were cultured for up to 7 days with medium changes every 2 days. (B) Subconfluent Caco-2 cells with 70% confluence of cells were treated with butyrate (0-2 mM) for 3 days. AP activity in cell lysates was measured.

Values are presented as means±S.D. of three independent trials.

*corresponds to $p < 0.05$ versus control.

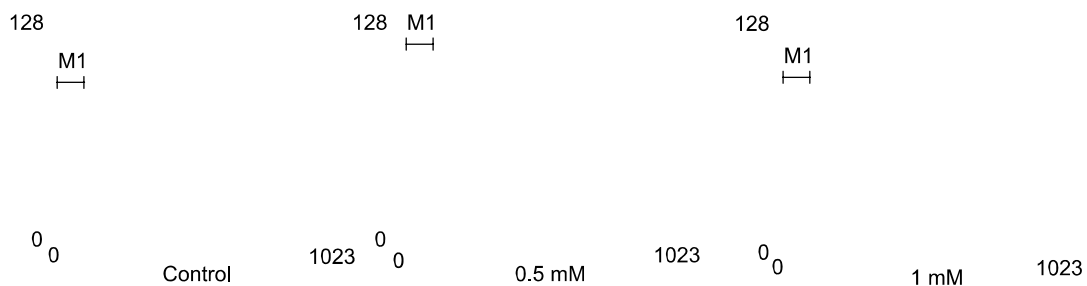


Fig. 2. DNA histogram for analysis of apoptosis. Caco-2 cells were treated with MMS (0.5, 1 mM) for 24 hr. Then cells were fixed with 70% ice-cold ethanol. After staining with 50µg/mL propidium iodide, the DNA content of the cells was analyzed by FACS analysis (M1, sub-G₁ content).

cin에 의한 세포사(cell death)가 세포사멸(apoptosis)에 의한 것인지를 확인하기 위해 propidium-iodide 염색 후 flow cytometry를 이용하여 세포사멸의 정도를 DNA histogram으로 비교하였다. MMS 0.5, 1.0 mM 처리 24 시간 후 DNA histogram상 sub-G1 peak의 증가로서 세포사멸의 유의한 증가를 관찰하였다(Fig. 2). VP-16 (1.0, 1.5 mM)과 indomethacin (0.5, 1.0 mM)도 24시간 처리하여 유사한 소견의 DNA histogram을 관찰할 수 있었다.

3. Caco-2 세포의 분화에 따른 MMS에 의한 세포사멸 민감도의 변화

MTT assay에 의한 세포생존을 분석을 통해 여러 조건에서의 세포사멸 민감도를 평가하였다. 배양 well 내 70% 포화도를 보인 때를 비포화상태(subconfluence)로서 미분화상태로 정의하였고, 처음 100% 포화도를 보인 0일 (0 day), 세포 포화 후 7일간 추가 배양한 7일 (7 day) 분화세포에 각각 MMS 0.5, 1.0 mM을 24시간 처리하였다. MTT 분석을 통해 세포사망과 세포생존율을 비교하였고, Caco-2 세포의 비포화상태에 비교하여 세포 포화 후 0일, 7일에 MMS에 대한 세포생존율이 유의하게 증가하였다(Fig. 3A). Butyrate에 의해 분화시킨 경우, 마찬가지로 70%의 포화도를 보인 때를 비포화상태(subconfluence), 즉 미분화상태로

정의하고, NaBT (sodium butyrate) 1.0, 2.0 mM을 유지하도록 3일간 배양하여 분화시킨 후 MMS를 24시간 처리하였다. Butyrate 1 mM로 분화시킨 후 MMS 1 mM을 처리한 경우에만 비포화상태에 비하여 유의하게 세포생존율이 증가하였으나, 다른 농도에서도 분화된 세포의 경우에 MMS 처리에 대한 세포생존율이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3B).

4. Caco-2 세포의 분화에 따른 VP-16에 의한 세포사멸 민감도의 변화

MMS를 처리한 실험과 동일하게 두 가지 방법으로 Caco-2 세포의 분화를 유도한 후, DNA 손상자극으로서 VP-16을 각각 1.0, 1.5 mM 씩 24시간 동안 처리하였다. Caco-2 세포 밀집에 의한 세포분화 방법의 경우, MTT 분석 결과에서 VP-16 1.0 mM 처리하였을 때 세포의 비포화상태에 비교하여 세포 포화 후 0일, 7일에 유의하게 세포생존율이 증가하였고, VP-16 1.5 mM을 처리한 경우에는 통계적으로 유의하지는 않았지만 유사한 경향을 보였다(Fig. 4A). Butyrate에 의해 분화시킨 경우에는 비포화상태에 비하여 분화된 세포 모두에서 VP-16에 의한 세포사망에 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4B).

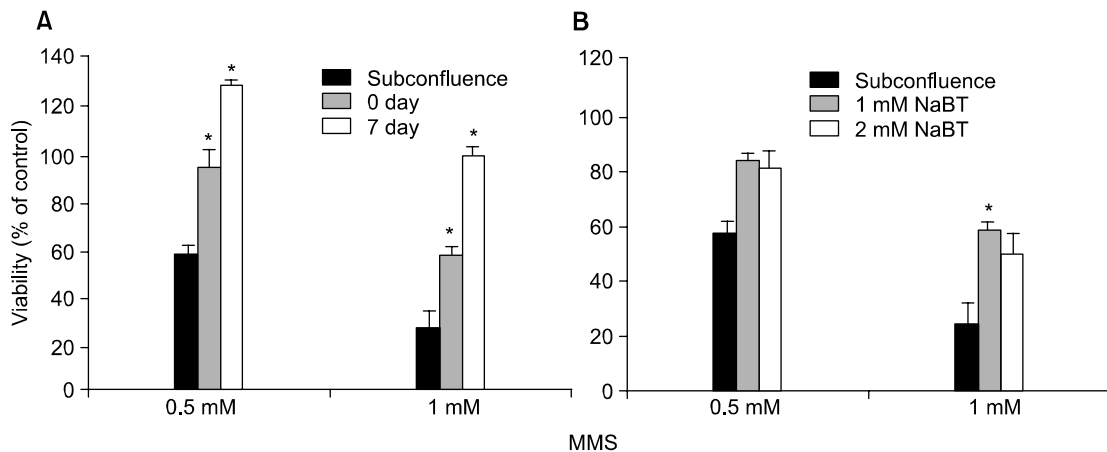


Fig. 3. Differential cell death response to MMS, based on the degree of differentiation of Caco-2 cells. (A) Caco-2 cells were differentiated by post-confluent culture or (B) sodium butyrate (NaBT) treatment. Sub-confluent and differentiated Caco-2 cells were treated with MMS (0.5, 1.0 mM) for 24hr. After that, the cell viability was measured by MTT assay. Amounts are expressed as a relative percentage of MMS-untreated control.

Values are presented as means±S.D. of three independent trials.

*corresponds to p<0.05 versus subconfluence.

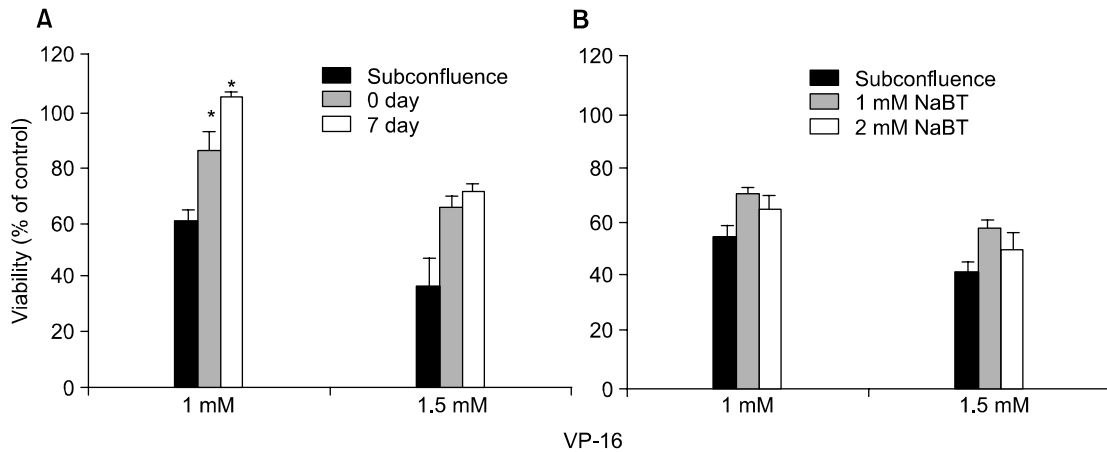


Fig. 4. Differential cell death response to VP-16, based on the degree of differentiation of Caco-2 cells. (A) Caco-2 cells were differentiated by post-confluent culture or (B) sodium butyrate (NaBT) treatment. Sub-confluent and differentiated Caco-2 cells were treated with VP-16 (1.0, 1.5 mM) for 24hr. After that, the cell viability was measured by MTT assay. Amounts are expressed as a relative percentage of VP-16-untreated control. Values are presented as means±S.D. of three independent trials. *corresponds to $p < 0.05$ versus subconfluence.

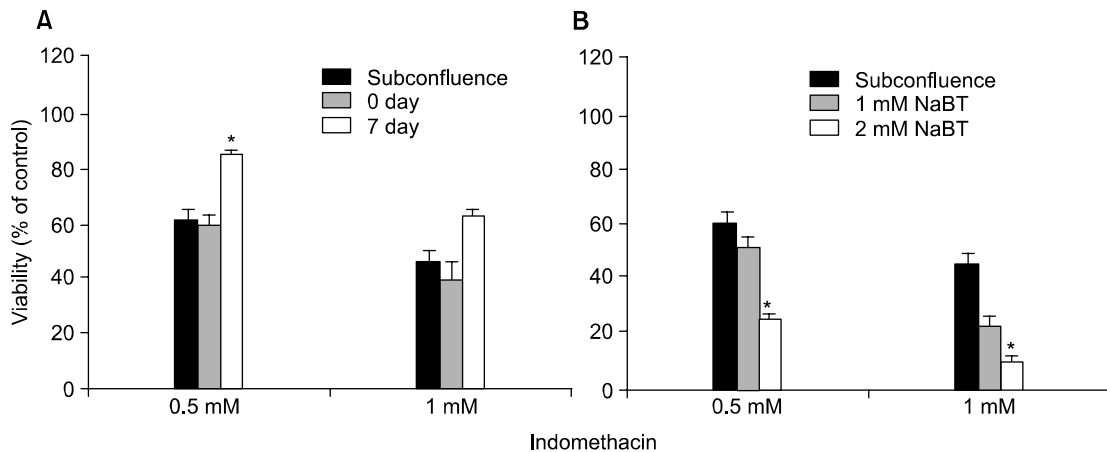


Fig. 5. Differential cell death response to indomethacin, based on the degree of differentiation of Caco-2 cells. (A) Caco-2 cells were differentiated by post-confluent culture or (B) sodium butyrate (NaBT) treatment. Sub-confluent and differentiated Caco-2 cells were treated with indomethacin (0.5, 1.0 mM) for 24 hr. After that, the cell viability was measured by MTT assay. Amounts are expressed as a relative percentage of indomethacin-untreated control. Values are presented as means±S.D. of three independent trials. *corresponds to $p < 0.05$ versus subconfluence.

5. Caco-2 세포의 분화에 따른 indomethacin에 의한 세포사멸 민감도의 변화

동일하게 두 가지 방법으로 Caco-2 세포의 분화를 유도한 후, 세포사멸자극의 하나로서 indomethacin을 각각 0.5, 1.0 mM씩 24시간 동안 처리하였다. Caco-2 세포 밀

집에 의한 세포분화 방법의 경우, MTT 분석 결과에서 indomethacin 0.5 mM 처리하였을 때 세포의 비포화상태에 비교하여 세포 포화 후 7일의 Caco-2 세포에서 유의하게 세포생존율이 증가하였고, indomethacin 1.0 mM을 처리한 경우에는 통계적으로 유의하지는 않았지만 유사한 경향을 보였다(Fig. 5A). Butyrate에 의해 분화시킨

경우에는 미분화상태에 비하여 indomethacin에 의한 세포사망을 전체적으로 오히려 증가시켰으며, 2 mM의 butyrate로 분화시킨 Caco-2 세포에서 indomethacin에 의한 세포사망은 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 5B).

고 찰

점막상피세포의 증식, 분화 그리고 사멸의 과정은 점막기능의 항상성을 유지하기 위해 균형을 이루고 있으며, 과도한 증식과 함께 적절한 분화와 사멸과정이 억제되는 경우 암화과정에 이르게 된다. 특히 DNA 손상 후 회복이 안 되는 경우 세포사멸과정이 제대로 일어나지 않으면 유전자 손상에 의한 암억제 유전자의 변이가 축적되어 결국 암에 이르게 된다.

암화과정의 중요한 표적세포가 될 수 있는 선와 하부의 줄기세포와 증식세포는 미분화세포로서 DNA 손상에 대해 예민한 세포사멸 반응이 있어야 암화과정의 억제에 효과적일 것이다. 반대로 세포증식 없이 세포사멸이 예정되어 있는 분화된 장상피세포에서는 DNA 손상을 포함한 여러 자극에 대해 지나치게 예민한 세포사멸 반응을 보이면 물리적 보호장벽으로서의 장상피세포의 역할에 문제가 발생할 수 있으므로 분화세포에서는 세포사멸 자극에 대한 반응이 적절히 조절되어야 한다.

이와 같은 배경에서 여러 자극에 대해 세포사멸을 포함한 세포반응이 미분화세포와 분화세포 사이에 다를 것으로 추정되며, 본 연구의 결과에서도 비분화상태의 미분화세포일수록 MMS와 VP-16의 DNA 손상자극에 대한 세포사멸 반응이 더 예민하였고, 분화된 세포일수록 세포사멸 반응이 억제되었다. 그러나 이러한 차이가 세포 밀집에 의해 자연 분화된 세포에서는 뚜렷하였으나 butyrate에 의해 분화된 세포에서는 대부분 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 이런 차이점은 세포 분화 방법에 의한 것으로 생각되며 생체 내 분화과정과 다른 조건에서 분화된 *in vitro* 실험의 한계로 생각된다. 본 연구에서는 대표적으로 알려져 있는 세포분화 모델로서 대장암세포주인 Caco-2 세포의 밀집(confluence)에 의한 자연 세포분화 유도방법과 sodium butyrate를 처리하여 분화를 유도하는 방법을 모두 사용하였다.^{12,13} 이 두 가지 방법은 일반적으로 잘 확립되어 있는 방법이지만 두 가지 방법에 의해 유도된 분화된 세포 사이에는 여러 특징의 차이가 있다. 공통적으로 alkaline phosphatase 등의 분화관련 효소의 활성화는 두 가지 방법에서 모두 보이는 소견이지만, butyrate 처리는 세포 분화와 더불어 여러가지 세포사멸 관련 분자를 활성화시키는 것으로 알려져 있어 암억제 작용에 대한 여러

보고가 있다.¹⁶ Butyrate는 대장 내 세균의 섬유소 분해에 의해 발생하는 단쇄지방산으로 세포분화 외에도 세포사멸에 의한 종양억제작용, 항염증작용 등이 알려져 있다.¹⁶

이와 같은 차이에 따라 본 연구에서도 일부 결과는 분화방법에 따라 다른 결과를 보였고, 반대의 결과를 보이기도 하였다. MMS 또는 VP-16을 처리한 경우, 세포밀집에 의해 유도된 분화세포의 경우에 보였던 유의한 세포사멸 감소 효과가 butyrate 처리에 의해 분화를 유도한 세포에서는 뚜렷한 차이가 없었고, indomethacin을 처리한 경우에는 세포밀집에 의해 유도된 분화세포의 경우에 보였던 세포사멸 감소 효과와 반대로 butyrate 처리에 의해 분화를 유도한 세포에서는 오히려 세포사멸을 증가시켰다. 이러한 차이는 butyrate 처리에 의한 효과가 세포분화 효과뿐만 아니라 세포사멸 관련 분자의 활성화 등이 관여할 수 있기 때문일 것이다.¹⁶ 본 연구결과에서도 butyrate 처리에 의해 분화된 세포의 경우, 자연 분화된 세포와 비교할 때 대부분 전반적인 세포사멸 반응을 증가시키는 결과를 보이고 있다. 세포분화의 과정을 보면 결국 세포사멸 과정을 거치게 되므로 분화할수록 세포사멸에 대한 민감도가 증가할 것으로 생각되지만 butyrate에 의한 분화모델에서 butyrate의 처리 양이나 시간에 따라 정상분화과정 이상으로 세포사멸 작용이 활성화되어 여러 결과를 왜곡시킬 수 있을 것이다. 이것을 고려하면 연구의 목적에 따라 다르겠지만 butyrate에 의한 세포분화 모델 보다는 세포 밀집에 의해 유도된 자연 분화모델이 생체 내 분화형태에 더 가까울 것으로 생각되며, 본 연구와 같은 세포사멸에 관련된 분화관련 연구에서는 Caco-2세포의 세포밀집에 의한 자연 분화모델이 보다 적합할 것으로 생각된다.

본 연구에서 일차적으로 알고자 했던 DNA 손상자극에 대한 미분화세포와 분화세포의 세포사멸 반응의 차이와 더불어 암예방 효과로 잘 알려진 비스테로이드성 항염증제(NSAID)에 의한 세포사멸 반응도 세포분화 정도의 차이에 따라 차이를 보이는지 알아보려고 하였다. 비스테로이드성 항염증제(NSAID)는 암발생의 화학적 예방제로서 널리 알려져 있으며 그 기전에 대해서 cyclooxygenase (COX)-2 억제를 포함한 여러 세포사멸 기전의 활성화가 잘 알려져 있다.¹¹ 위에서 언급한 미분화세포와 분화세포에서의 세포사멸의 차이를 고려한다면 비스테로이드성 항염증제에 의한 세포사멸도 미분화세포에서 더 예민한 세포사멸 효과를 보여야 보다 효과적이라고 할 수 있다. 본 연구 결과에서는 세포분화 방법에 따라 반대의 결과를 보였지만 butyrate에 의한 세포

사멸 활성화의 특이성을 고려한다면 세포밀집에 의한 분화세포에서의 결과가 더 적절할 것으로 생각한다. 따라서 미분화된 세포일수록 비스테로이드성 항염증제에 대한 세포사멸 반응도 더 예민할 것으로 추정되며, 암 예방효과와 점막상피세포 손상의 양쪽 측면을 모두 고려한다면 전반적인 동일한 세포사멸 반응보다는 미분화세포에 보다 선택적인 반응이 더 효율적이라고 생각한다. 그러나 본 연구 결과에서 세포분화도에 따른 세포사멸 민감도의 차이가 DNA 손상 자극에 의한 반응이 indomethacin에 대한 결과보다 더 뚜렷하게 나타나므로 자극의 종류에 따라라도 세포분화에 따른 세포사멸의 민감도에 차이가 있을 것으로 생각된다. 따라서 수용체에 의한 세포사멸 등의 다른 자극에 대한 세포사멸 반응에서도 미분화세포와 분화세포 사이에 유의한 차이가 있는지는 추가로 확인해야 할 부분이다.

세포의 분화에 따른 세포사멸 반응의 차이에 대한 기전은 몇몇 다른 장기에서 보고된 바 있다. 유방암 세포의 3차원 분화 모델에서는 integrin-cytoskeleton의 상호 관련으로서 lamin- β 4 integrin에 의한 NF κ B 활성화를 분화에 의한 세포사멸 저항성의 기전으로 설명하였고,¹⁷ 단핵구 분화 모델에서는 Akt 활성화에 의한 세포질 내 p21^{cip1/WAF1} 발현 활성화가 분화에 의한 세포사멸 저항성에 관여하는 것으로 보고하고 있다.^{18,19} 장관의 점막 상피세포에서 분화에 따른 세포사멸 반응의 차이에 대해서 아직 그 기전에 관련된 보고는 없지만, 세포 간 접합인자나 세포 외 기질과 세포 간의 상호 작용이 상피세포 분화에 따라 변하는 주요 분자 중의 하나이며 세포성장과도 관련되어 있으므로 세포사멸에 대한 저항성에서도 중요한 역할을 할 것으로 생각한다.^{20,21}

본 연구의 결과가 이미 확립된 상피세포 분화 모델을 이용한 결과이지만 대장암 세포주를 이용한 결과라는 점에서 많은 제한점이 있으므로 선와와 용모에서 분리된 생체 세포를 이용하거나 동물모델을 이용한 추가적인 연구결과가 있어야 할 것이다.²² 이와 더불어 DNA microarray 등의 방법으로 분화세포와 미분화세포 사이에 세포사멸 관련인자들의 발현 차이점에 대한 연구 또한 향후 분화과정의 이해와 더불어 암화과정의 이해에도 도움이 될 것이다.²³

요 약

목적: 소화관의 상피세포는 점막 표면의 선와구조를 형성하면서 기저부의 미분화된 세포에서 상부로 점차 이동하면서 세포분화의 과정을 거치며, 결국 세포사멸

의 과정으로 점막에서 탈락하게 되는데, 이러한 분화, 증식, 사멸의 균형을 통한 항상성에 결함이 생기게 되면 암을 포함한 여러 질환이 발생하게 된다. 이러한 분화과정에서 미분화된 세포와 분화된 세포 사이에는 여러 가지 생물학적 특성에 차이가 있다. 본 연구에서는 분화를 유도한 대장암세포주를 이용하여 세포사멸과정에서 그 분화정도에 따른 세포사멸의 감수성에 차이가 있는지 알아보려고 하였다. **대상 및 방법:** 대장암세포주인 CaCo-2를 이용하였고, sodium butyrate를 처리하여 분화를 유도하거나 세포의 밀집(confluence)에 의한 자연적인 세포분화를 유도하였다. 세포사멸을 위한 자극으로는 비스테로이드성 소염제인 indomethacin과 DNA 손상약제인 MMS(methyl methane-sulfonate)와 VP-16을 이용하였다. 세포분화의 정도는 alkaline phosphatase assay를 이용하여 측정하였으며, 세포생존율과 세포사멸은 MTT assay와 flow cytometry를 이용하여 측정하였다. **결과:** Sodium butyrate를 처리하거나 세포 밀집에 의한 자연적 분화유도 상태 모두에서 alkaline phosphatase 활성이 의미있게 증가하였다. MMS 또는 VP-16을 처리한 세포군에서는 세포가 분화됨에 따라 세포사멸률이 감소되어 미분화된 세포일수록 세포사멸에 대한 감수성이 높았다. Indomethacin을 처리하였을 때는 sodium butyrate에 의한 세포분화의 경우 분화도가 높을수록 세포사멸에 민감하였으나, 자연분화를 유도한 경우에는 미분화된 세포일수록 세포사멸에 민감하였다. **결론:** 이상의 실험결과로 세포분화 유도 방법에 따라 일부 차이는 있었지만 전반적으로 미분화세포일수록 DNA 손상 자극과 indomethacin에 의한 세포사멸 자극에 대해 세포사멸의 민감성을 보였고, 이러한 현상은 DNA 손상 자극에서 더욱 뚜렷하였다.

색인단어: 세포분화, 세포사멸, Caco-2, MMS

참고문헌

1. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001-20.
2. Potten CS. Epithelial cell growth and differentiation. *Am J Physiol* 1997;273:G253-G257.
3. Bocker U, Schottelius A, Watson JM, et al. Cellular differentiation causes a selective down-regulation of IL-1beta-mediated NFkappaB activation and IL-8 gene expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:12207-12213.
4. Babbs CF. Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radic Biol Med* 1990;8:191-200.

5. Kaufmann WK, Paules RS. DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J* 1996;10:238-247.
6. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000;407:777-783.
7. Lamprecht SA, Lipkin M. Migrating colonic crypt epithelial cells: primary targets for transformation. *Carcinogenesis* 2002; 23:1777-1780.
8. Lawley P. Carcinogenesis by alkylating agents. *Chemical Carcinogens* 1976;173:83-244.
9. Suh Y, Lee KA, Kim WH, Han BG, Vijg J, Park SC. Aging alters the apoptotic response to genotoxic stress. *Nature Med* 2002;8:3-4.
10. Osborn MT, Chambers TC. Role of stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *J Biol Chem* 1996;271:30950-30955.
11. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *New Engl J Med* 2000;342:1960-1968.
12. Mariadason JM, Velcich A, Wilson AJ, Augenlicht LH, Gibson PR. Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. *Gastroenterology* 2001;120:889-899.
13. Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* 1982;42:65-82.
14. Buras RR, Shabahang M, Davoodi F, et al. The effect of extracellular calcium on colonocytes: evidence for differential responsiveness based upon degree of cell differentiation. *Cell Prolif.* 1995;28:245-262.
15. Kim WH, Lee KS, Moon YM, et al. Combined effect of desferrioxamine and anticancer drug on cultured gastric cancer cell. *Korean J Gastroenterol* 1993;25:46-60.
16. Williams EA, Coxhead JM, Mathers JC. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proc Nut Soc* 2003;62:107-115.
17. Weaver VM, Lelievre S, Lakins JN, et al. Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2002;2:205-216.
18. Asada M, Yamada T, Ichijo H, et al. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* 1999;18:1223-1234.
19. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee M, Hung M. Cytoplasmic localization of p21 WAF1/CIP1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001;3:245-252.
20. Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* 1999;274:19347-19351.
21. Clatworthy JP, Subramanian V. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev* 2001;101:3-9.
22. Del Buono R, Lee CY, Hawkey CJ, Wright NA. Isolated crypts form spheres prior to full intestinal differentiation when grown as xenografts: an *in vivo* model for the study of intestinal differentiation and crypt neogenesis, and for the abnormal crypt architecture of juvenile polyposis coli. *J Pathol* 2005;206:395-401.
23. Tabuchi Y, Arai Y, Kondo T, Takeguchi N, Asano S. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293: 1287-1294.