

대장암 세포주에서 Fas 매개 세포 사멸(apoptosis)의 분자적 조절기전 : 세포사멸관련 유전자 발현 및 Protein Kinase C와 Protein Phosphatase의 역할

연세대학교 의과대학 내과학교실 및 소화기병연구소

김원호 · 하성호 · 강진경 · 박인서

= Abstract =

Molecular Mechanism of Fas-mediated Apoptosis in Colon Cancer Cell Line HT-29 : Apoptosis-related Gene Expression and Role of Protein Kinase C and Protein Phosphatase

Won Ho Kim, M.D., Sung Ho Ha, M.S., Jin Kyung Kang, M.D.
and In Suh Park, M.D.

Department of Internal Medicine & Institute of Gastroenterology,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: Physiologic cell death occurs primarily through an evolutionary conserved form of cellular suicide termed apoptosis. Recent evidence suggests that alterations in regulation of apoptosis contribute to the pathogenesis of a number of human diseases, including cancer, viral infections, autoimmune diseases, degenerative diseases and inflammatory diseases. Fas antigen(APO-1, CD95) is a cell surface receptor protein that is broadly expressed in normal and neoplastic cells and can mediate apoptosis in susceptible cells. Fas is involved in immune-related apoptosis including T-cell selection in thymus, down regulation of immune response and cytotoxic T-cell mediated cytotoxicity. In contrast to immune system, little is known about the function of Fas antigen expressed on epithelial cells. Recently, however, it has been shown that Fas is also important for the pathogenesis of liver disease and inflammatory skin disease. We have recently reported that although colon cancer cells HT-29 express Fas antigen on their surface, Fas ligation using IgM anti-Fas monoclonal antibody(CH-11) is not sufficient to induce apoptosis. In addition, cellular activation by IFN- γ not only enhances Fas expression but also sensitizes HT-29 to apoptosis induced by Fas ligation as well as treatment with cycloheximide and actinomycin D. However, molecular mechanisms of Fas-mediated apoptosis are yet far from complete understanding. We, therefore, studied the functional role of Fas and apoptosis-related gene expression in apoptosis of colon

책임저자 : 김원호, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 내과학교실(우편번호: 150-752)
(Tel: 361-5410, Fax: 393-6884)

*본 논문은 1996년도 교육부 유전공학 연구비 보조로 이루어졌다.

cancer cell line HT-29 and signal transduction pathways including protein kinase C as well as protein phosphatase I and 2A.

Methods: Fas, Fas ligand and apoptosis related gene mRNA expression was measured by RT-PCR. Cytotoxicity and cell survival were assessed by LDH assay and MTT assay, respectively. Apoptosis was detected by confocal microscopic observation of chromatin condensation after DAPI stain and confirmed by demonstration of DNA fragmentation in agarose gel electrophoresis as well as TUNEL assay. DNA content was determined by flow cytometry after staining with propidium iodide and sub-G1 peak was considered as apoptotic cells.

Results: Fas ligation by IgM anti-Fas monoclonal antibody(CH-11) failed to induce apoptosis in control HT-29. However, Fas ligation in IFN- γ pretreated HT-29 induced apoptosis dose-dependently. HT-29 expressed very low level of bcl-2 mRNA, which was not changed by IFN- γ pretreatment. IFN- γ pretreatment did not alter the mRNA expression levels of bax, c-myc, p53, and caspases such as ICE, hich and CPP32. Protein kinase C inhibitor such as staurosporine and H7 did not inhibit Fas-mediated apoptosis of IFN- γ pretreated HT-29. Fas-mediated apoptosis of IFN- γ pretreated HT-29 was not suppressed as well by protein phosphatase 1 and 2A inhibitor calyculin A.

Conclusions: Colon cancer cell line HT-29 expresses Fas antigen on the surface which is not sufficient to induce apoptosis. IFN-g pretreatment sensitizes HT-29 to Fas-mediated apoptosis, but does not alter the expression of apoptosis-related genes including bcl-2, bax, p53 and caspases. Fas-mediated apoptotic signal in IFN- γ pretreated HT-29 maybe independent with protein kinase C as well as with protein phosphatase 1 and 2A.

Key Words: Apoptosis, Fas, HT-29, IFN-g, Signal transduction, bcl-2, Caspase

서 론

다세포 생물이 생존하고 항상성(恒常性, homeostasis)을 유지하기 위해서는 다양한 종류의 세포가 유지되고 재생되어야 하며 서로 협조하여 작용하여야 한다. 세포의 수는 세포증식(增殖)과 세포사(細胞死)의 균형에 의하여 유지되는데 세포증식은 수 많은 점검(點檢, check)과 균형에 의하여 고도로 조절되는 기전으로 세포 성장인자, 암유전자 또는 암억제유전자에 의한 세포주기의 조절 등 세포증식의 조절기전에 대하여 최근 많은 지식이 축적되었다. 그러나 세포사의 조절기전도 세포증식 조절기전 못지 않게 복잡하며 세포사의 중요성이 세포증식에 뒤지지 않는다는 사실이 널

리 인정된 것은 아주 최근의 일이다.

다세포 생물의 분화된 세포는 스스로 죽을 수 있는 능력을 가지는데 이는 내부에 존재하는 자살계획(suicidal program)에 의한다. 이 자살계획이 활성화되면 사멸(死滅, apoptosis, programmed cell death)이라 불리는 특징적인 형태의 세포사가 일어나는데 사멸은 세포 내부 또는 외부로 부터의 다양한 자극에 의하여 촉발될 수 있다^{1,2)}. 세포사멸은 ATP형태의 에너지를 필요로 하는 능동적인 과정으로서 여러 유전자 및 그 산물에 의하여 엄격하게 통제되며, 사멸에 관여하는 세포내의 신호전달경로는 확실히 규명되지 않았으나 자극 및 세포의 종류에 따라 다양하리라고 추측되고 있다^{3~5)}. 다양한 세포 종류에서 여러 자극이 사멸을 유발시킬 수 있지만 세포사를 일으키는 마지막

경로는 곤충으로부터 사람에 이르기 까지 진화 과정에서 잘 유지된 몇몇 유전자가 조절하는 것으로 알려져 있다. 세포사멸은 발생과정의 조직 재구성시 중요한 역할을 하며, 발생과정 이후에도 노화한 세포, 과다하게 생산된 세포, 적절하지 않게 분화한 세포 또는 유전적 손상을 받은 세포를 제거하기 위하여 필요하다. 세포사멸의 역할에 대한 연구는 주로 발생학 및 면역학적인 측면에서 이루어져 왔으나 최근에는 상피세포계와 표피의 재생 및 발암과정에도 관여함이 알려졌다^{6,7)}. 상피세포 재생과정에서의 세포사멸은 정상적으로 일어나는 과정으로 extrusion pattern과 engulfment pattern으로 나눌 수 있다. 즉, 선와(crypt) 아래쪽의 증식부에서 증식된 상피세포는 이동하여 융모에 다다르게 되는데 융모 끝의 분화된 상피세포는 사멸에 의하여 일정한 속도로 제거되며 (extrusion pattern), 선와 증식부의 상피세포에도 사멸이 일어날 수 있는데 이 부위의 사멸세포는 주위의 상피세포, 점막고유층의 대식세포 또는 상피내 림프구에 의하여 탐식된 후 제거된다(en-gulfment pattern). 따라서 소화관에서도 여러 질환이 세포사멸의 억제 또는 과다한 세포사멸과 연관된다^{8~13)}.

Fas(APO-1, CD95)는 325개의 아미노산으로 구성된 제 I형 막 단백질로서 Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 수용체(TNF-R1, TBF-R2), CD40, OX40, CD27, 4-1BB, CD30 및 low-affinity 신경성장인자 수용체 등과 함께 TNF- α 수용체족(TNF- α receptor family)에 속하며^{14~16)}, 약 70개의 아미노산으로 구성된 세포질내 아미노 말단은 사멸을 일으키는 신호를 전달하므로 "death domain"이라고도 불린다¹⁴⁾. Fas는 림프구 및 상피세포 등 기능적인 수용체를 가지고 있는 세포에서 사멸을 유발하며^{17,18)} T-세포 수용체에 대한 보조 자극인자(co-stimulating factor)로도 작용한다¹⁹⁾. Fas에 의한 세포사멸은 흥선에서의 T-세포의 선택, 면역반응의 감소(down-regulation) 및 T-세포에 의한 세포독성에 관여하며^{20~22)} Fas 유전자의 변이는 자가면역질환과 연관된다^{23~26)}. Fas는 면역세포 이외에도 상피세포

의 사멸을 일으킨다. 예를 들면 간세포는 Fas는 발현하고 있으며²³⁾, 마우스 복강내로 항Fas항체를 주입하면 간세포의 사멸이 유발되고²⁷⁾, 만성 간염에서 림프구가 침윤되는 부위의 간세포에 Fas발현이 증강된다는 점²⁸⁾ 등은 Fas가 간세포의 사멸 조절에 관여하리라 시사하는 소견이며^{29,30)}, 염증성 피부질환에서도 Fas매개 세포사멸의 역할이 중요시 되고 있다³¹⁾. TNF- α 투여 및 Fas Ag ligation은 중등도의 분화를 보이는 non-transformed 대장암 세포주인 HT-29에서 Interleukin-8(IL-8) 산생을 유도하므로^{17,32)} HT-29의 표면에 TNF- α 에 대한 수용체와 Fas Ag이 존재함을 알 수 있다. 한편 interferon- γ (IFN- γ)와 TNF- α 의 병합은 HT-29에 대한 세포증식 억제(cytostasis)와 세포독성의 상승작용을 보임이 알려져 있으며^{33,34)}, 이와 유사하게 HT-29을 IFN- γ 으로 전처치 한 후 Fas Ag에 대한 단일클론 항체인 CH-11을 처리하면 사멸이 일어난다는 사실이 보고되어 있다^{15,32,35)}. IFN- γ 에 의한 세포의 활성화 즉, 사멸 증강 효과는 IFN- γ 에 의한 Fas 발현 증가 뿐만 아니라 아직까지 밝혀지지 않은 다른 기전도 복합적으로 작용하여 유발되는 현상으로 생각되고 있지만³⁵⁾ Fas 매개 세포사멸의 분자적 기전은 아직까지 분명하지 않다.

따라서 본 연구에서는 IFN- γ 전처치한 대장암 세포주인 HT-29에서 사멸 연관 유전자 발현의 변화를 알아보고 protein kinase C와 protein phosphatase 1 및 2A를 통한 신호가 Fas 매개 세포사멸에 관여하는지 알아보려 하였다.

대상 및 방법

1) 대상 세포 및 배양

ATCC(Rockville, MD)로부터 분양 받은 HT-29 을 2 μ mol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin 및 10% 혈액 비활성화 우태아혈청(fetal calf serum)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium(Gibco BRL, Grand Island, NY)으로 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

2) 세포 및 핵의 형태

세포의 형태는 위상차 현미경으로 관찰하였고 핵의 형태는 4',6'-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride(DAPI: Sigma, St. Louis, MO)로 염색한 다음 confocal microscopy(TCS NT, Leica Laser-technik GmbH, Heidelberg, Germany)로 관찰하였다.

3) 세포독성 및 생존률의 측정

96-well plate(Costar, Cambridge, MA)에 well당 10^4 개의 HT-29을 넣고 밤새 배양하여 세포가 부착되게 한 다음 40 ng/mL의 IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN)에 6시간 동안 노출시키고 세척한 후 다시 밤새 배양하였다. 이때 IFN- γ 대신 세포 배양액을 첨가하여 IFN- γ 전처치하지 않은 HT-29도 같은 조건으로 준비하였다. 여러 가지 농도의 mouse anti-human Fas IgM(CH-11: MBL, Nagoya, Japan)을 가하고 24시간 배양한 후에 lactate dehydrogenase(LDH assay)^{35~37)} 또는 MTT assay^{38,39)}로 세포독성 및 세포생존률을 측정하여 용량에 따른 효과 곡선을 얻었다. LDH assay는 적절한 자극을 가한 세포 배양 상층액을 취하여 96-well flat-bottom assay plate(Evergreen Scientific, Los Angeles, CA)에 넣고 50 mM L(+)-lactic acid(Sigma), 0.7 mM p-iodonitrotetrazolium violet(Sigma), 0.3 mM phenazine methosulfate 및 0.4 mM NAD(Sigma)를 0.2 M Tris buffer(pH 8.2)에 용해 시킨 substrate mixture를 가한 후 30분간 반응 시킨 다음 490 nm에서의 OD를 multiwell spectrophotometer(ELISA processor II; Behringerwerke, Marburg, W. Germany)를 이용하여 측정하였다. 이때 Triton X-100을 첨가하여 세포를 용해시킨 well의 OD를 total OD로 하였다. MTT assay는 96-well microtiter plate에 배양한 세포를 적절한 조건으로 자극한 후 배양액을 제거하고 well당 50 μ L의 2 μ g/mL MTT 용액(Sigma)을 첨가한 후 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 이어 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 상층액을 제거하고 well당 50 μ L의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가

한 후 10분간 진탕하고 570 nm에서의 OD를 측정하였다.

세포독성의 정도 및 생존률은 다음의 공식으로 산출하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{sample OD} - \text{spontaneous OD}}{\text{total OD} - \text{spontaneous OD}}$$

$$\% \text{ Survival} = \frac{\text{sample OD} - \text{total OD}}{\text{spontaneous OD} - \text{total OD}}$$

4) 신호전달경로 차단제가 Fas 매개 세포사멸에 미치는 영향의 평가

Fas 단일클론 항체를 첨가하기 30분전에 protein kinase C 억제제인 staurosporine(Sigma S-4400) 20 nM과 1-(5-isoquinoline-sulfonyl)-2-methyl piperezine dihydrochloride(H7: Calbiochem 371955) 10 nM 및 protein phosphatase 1 및 2A 억제제인 calyculin A(Calbiochem 208851) 10 nM을 넣고 LDH assay와 MTT assay를 시행하여 이를 신호전달경로가 Fas 매개 세포사멸에 연관되는지 알아보았다.

5) RT-PCR

세포를 500 μ L 용해액 [4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium acetate(pH 7.0), 0.5% sodium sarcosine, 100 μ M 2-ME]에 용해시킨 다음 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 94°C에 10 분간 방지하여 변성시킨 RNA를 모형으로 cDNA synthesis kit(Pharmacia Biotech)를 이용하여 cDNA를 얻었다. PCR 완충액 [10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin]에 100 μ M primer, 각 300 μ M dNTP 및 0.5 U의 Taq polymerase(Perkin-Elmer Cetus)를 첨가하고 94°C 1분, 59°C 1분, 및 72°C 1분으로 하여 thermal cycler(Perkin-Elmer)로 28회 반응 시켰다. 증폭산물은 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다.

Primer는 DNA 합성기로 제작하였는데 그 염기 서열은 다음과 같다.

β -actin(250 bp)³⁵⁾

5-sense

: 5'-CGTGGGCCGCCCCTAGGCACCA-3'

3-antisense

: 5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'

bcl-2(385 bp)^{40,41)}

5-sense

: 5'-ACTTGTGGCCCAGATAGGCACCCAG-3'

3-antisense

: 5'-CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG-3'

bax(540 bp)^{40,41)}

5-sense

: 5'-CAGCTCTGAGCAGATCATGAAGACA-3'

3-antisense

: 5'-GCCCATCTTCCAGATGGTGAGC-3'

c-myc(292 bp)^{40,42)}

5-sense

: 5'-TCGGAAGGACTATCCTGCTG-3'

3-antisense

: 5'-GCTTTGCTCCTCTGCTTGG-3'

p53(621bp)⁴³⁾

5-sense

: 5'-GGAAATTGCGTGTGGAG-3'

3-antisense

: 5'-ATGCGAATTCAAGGCTGTCAGTGGGG-3'

ICE(191 bp)⁴⁴⁾

5-sense

: 5'-ACCTTAATATGCAAGACTCTCAAGCAG -3'

3-antisense

: 5'-GCGGCTTGACTTGTCCATTATTGGATA -3'

ich-1(*Ich-1L*과 *Ich-1S* 각각 234 bp와 295 bp)⁴⁴⁾

5-sense

: 5'-GTTACCTGCACACCGAGTCACG -3'

3-antisense

: 5'-GCGTGGTTCTTCCATCTTGTGTTGGTCA -3'

cpp32(544 bp)⁴⁵⁾

5-sense

: 5'-ATGGAGAACACTGAAAACCTCAG -3'

3-antisense

: 5'-GTCATCATCAACACCTCAGTCT-3'

결 과

HT-29의 약 20~30%는 세포표면에 Fas단백을 발현하고 있으며 Fas mRNA와 단백 발현은 IFN- γ 전처리에 의하여 용량-의존적으로 증강된다³⁵⁾. 그러나 IFN- γ 전처리하지 않은 대조 HT-29에서는 IgM 항Fas 단일클론항체(CH-11)로 Fas를 ligation 하여도 세포독성 및 세포생존률의 변화가 뚜렷하

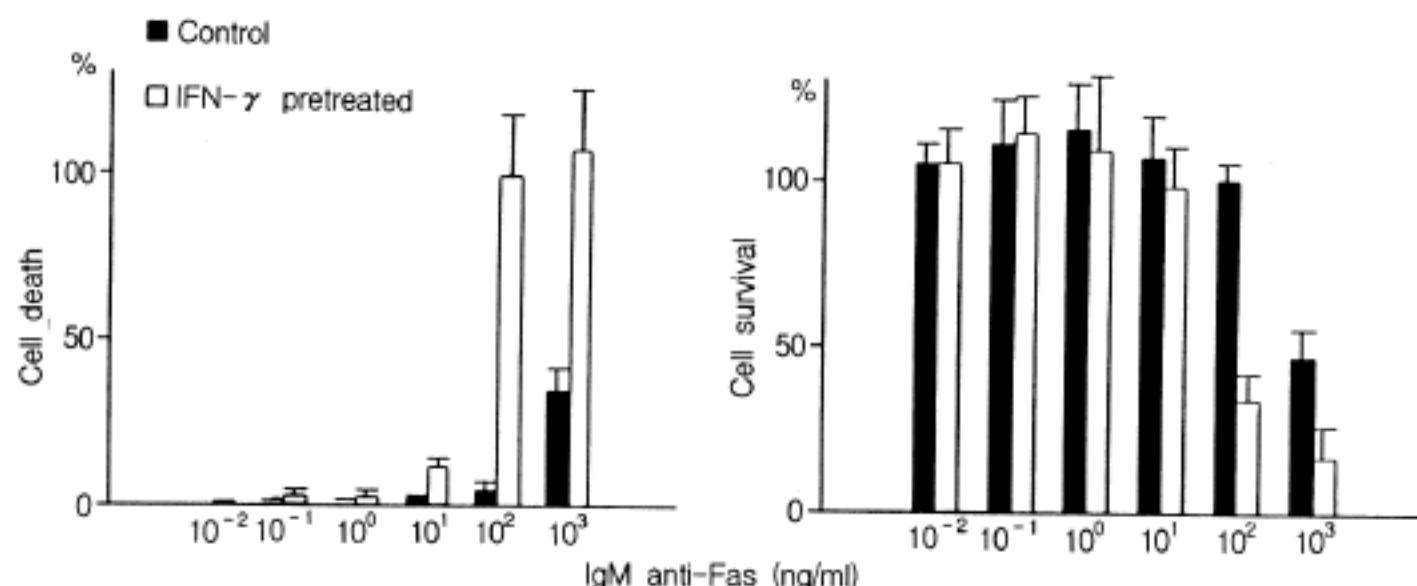


Fig. 1. Fas-mediated cell death measured by LDH assay (A) and effect of Fas ligation on the cell survival measured by MTT assay(B). For LDH assay, various doses of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody were added to control and IFN- γ pretreated(40 ng/ml) HT-29 cells for 24 hours and then LDH in the culture media was measured. For MTT assay, various doses of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody were added to control and IFN- γ pretreated(40 ng/ml) HT-29 cells for 24 hours and then cell survival was measured with tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay.

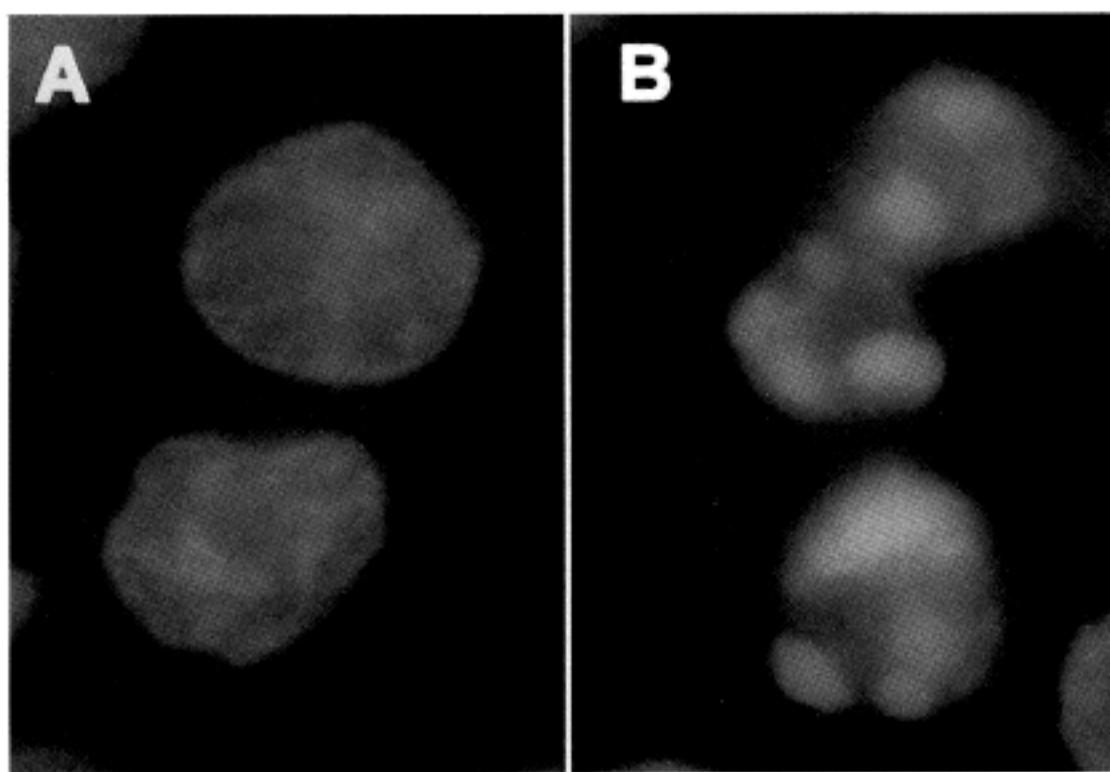


Fig. 2. Nuclear morphology of control and apoptotic HT-29 cells observed by confocal microscopy after staining with DAPI(x 1,000). (A) Control HT-29. (B) HT-29 cells were pretreated with 40 ng/ml IFN- γ for 6 hours and incubated overnight with fresh media. On the following day, cells were incubated with 50 ng/ml of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody for 24 hours.

지 않은 반면 IFN- γ 전처치한 HT-29에서는 항체의 용량에 비례하여 LDH assay로 측정한 세포독성이 증가하고 MTT assay로 측정한 세포생존률이 감소하였다(Fig. 1). IFN- γ 전처치한 HT-29에서 세포독성의 증가 또는 생존률의 감소는 세포사멸에 기인하였다. 즉, IFN- γ 전처치한 HT-29에서 30 ng/mL의 IgM 항Fas 단일클론항체로 Fas를 ligation하여 사멸을 유도한 세포는 대조세포에 비하여 DAPI염색에서 크로마틴이 농축되어 핵막쪽으로 모인 형태를 보였으며(Fig. 2), DNA fragmentation(Fig. 3), TUNEL assay 및 PI 염색 후 세포내의 DNA 양을 유세포분석기로 측정하여 사멸을 확인하였다³²⁾.

HT-29은 매우 적은 양의 *bcl-2* mRNA를 발현하고 있었으며 *bcl-2* mRNA는 IFN- γ 전처치에 의하여 변화하지 않았으나 저자등이 이미 보고한 바와 같이 Fas mRNA 발현은 IFN- γ 전처치에 의하여 증강되었다(Fig. 4). 그러나 *bcl-2*와 함께 사멸을 조절하는데 관여하는 것으로 알려진 *bax*, *c-myc* 및 *p53* mRNA 발현은 IFN- γ 전처치에 의하여 변화하지 않았다(Fig. 4). IFN- γ 전처치 전후

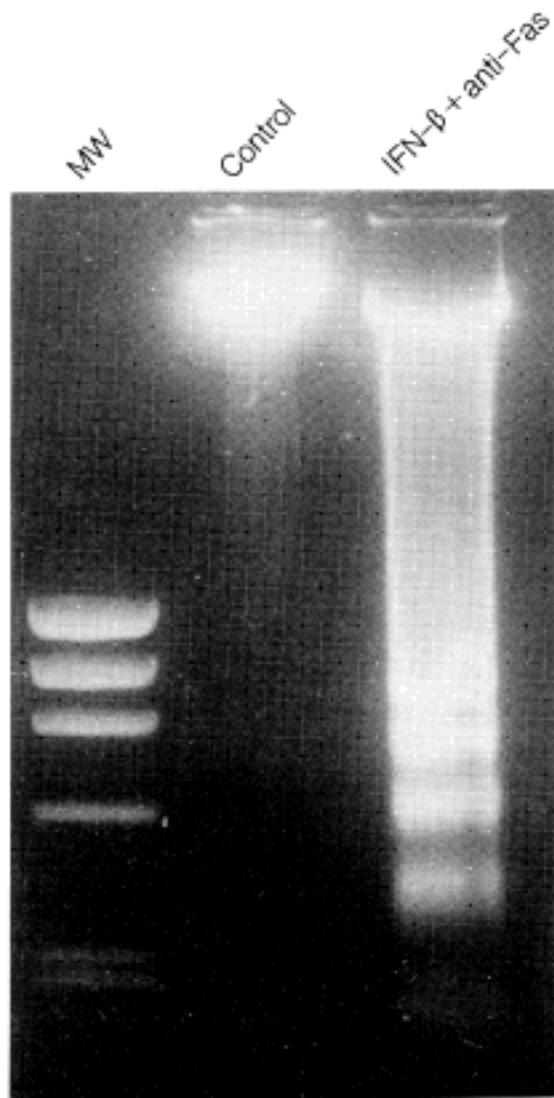


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from control and apoptotic HT-29 induced by Fas ligation in IFN- γ pretreated cells.

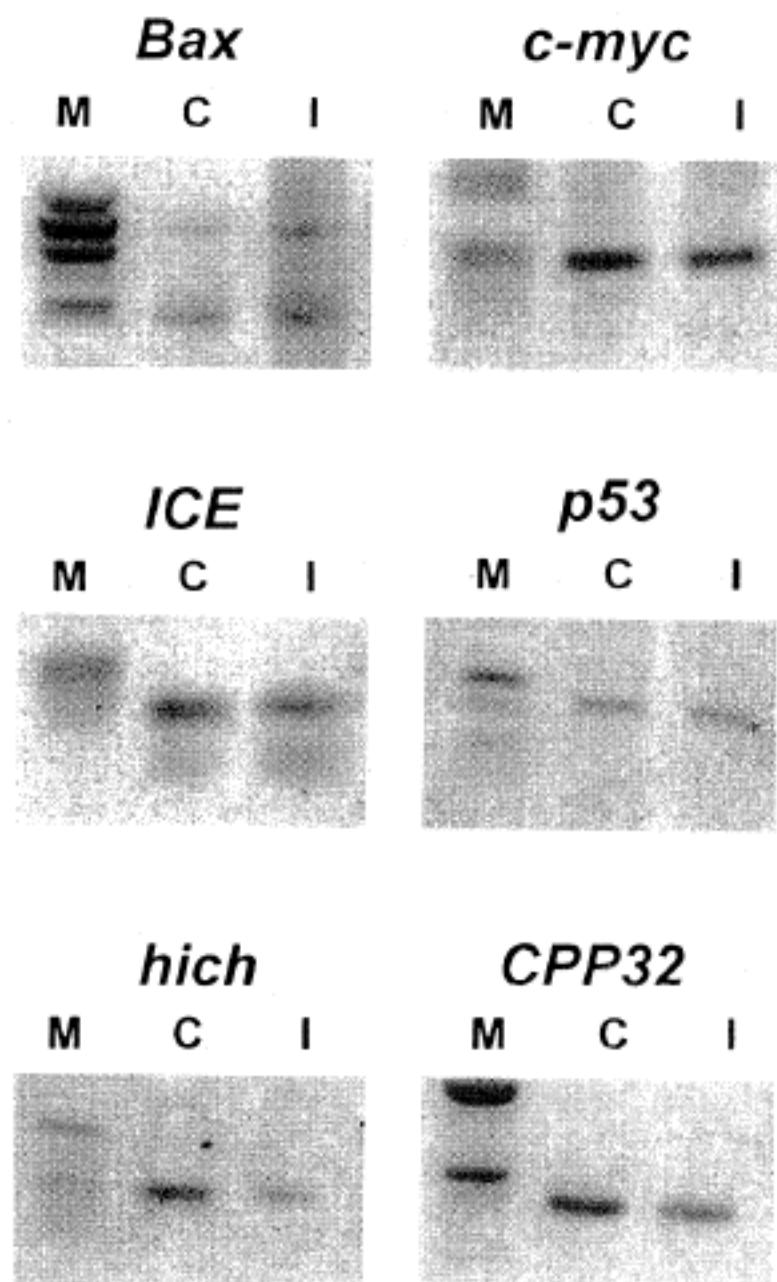


Fig. 4. mRNA expressions of apoptosis-related genes and caspases measured by RT PCR. HT-29 cells were treated with 40 ng/ml IFN- γ for 4 hours and total RNA was extracted which was reverse transcribed and amplified. M: marker, C: control HT-29, I: IFN- γ pretreated HT-29

의 HT-29에서 ICE, hich 및 cpp32 등 세포사멸에서 죽음의 실행 단계에 작용하는 caspase 유전자의 mRNA 발현 또한 차이가 없었다(Fig. 4).

Protein kinase C 억제제인 staurosporine과 H7은 그 자체가 사멸을 유발하지 않았으며 IFN- γ 전처치한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸을 억제하거나 촉진하지 않았다(Fig. 5, 6).

또한 protein phosphatase 1 및 2A 억제제인 calyculin A도 그 자체가 사멸을 유발하지 않았으며 IFN- γ 전처치한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸을

변화시키지 않았다(Fig. 7).

고 찰

Fas를 발현하고 있는 세포라 할지라도 Fas에 의한 사멸이 꼭 일어나는 것은 아니고 감수성이 있는 세포에서만 사멸이 유발되는데 감수성을 가름하는 인자는 아직까지 분명하지 않다. 예를 들면 HA22T/VGH, HuH6, Huh7, PLC/PRF/5, HepG2, 2.2.15 등 여러 종류의 간암 세포주는 모두 Fas를 발현하고 있지만 Fas ligation에 의한 세포사멸은 PLC/PRF/5에서만 일어난다²⁹⁾. 대장암 세포주인 HT-29에서도 마찬가지로 HT-29은 세포표면에 Fas를 발현하고 있지만 Fas ligation에 의한 사멸이 유발되지 않는 반면 IFN- γ 전처치한 HT-29에서는 투여한 IgM 항Fas항체의 농도에 비례하여 사멸이 유발된다^{32,35,46)}. Fas를 발현하고 있는 대조 HT-29에 항Fas항체로 Fas를 ligation하면 사멸은 유발되지 않으나 IL-8 산생은 유도되며³²⁾, Fas ligation이 T-세포 수용체에 대한 보조자극인자로 작용한다는 사실은 비록 사멸을 유발하는 신호는 아니지만 Fas를 통한 어떤 기능적인 신호가 세포내로 전달됨을 의미한다. IFN- γ 전처치가 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸을 증강시키는 이유 또한 불분명하다. 가능한 설명으로는 첫째, IFN- γ 가 Fas 발현을 증강시키므로 Fas를 통한 신호의 강도가 증대되어 사멸이 일어날 수 있는 역치를 넘게 된다고 생각할 수 있고, 둘째, IFN- γ 에 의하여 활성화된 세포에서는 Fas를 통한 신호의 질적 변화가 초래된다고 볼 수도 있으며, 셋째, IFN- γ 에 의한 세포의 어떤 다른 변화가 Fas 매개 세포사멸에 대한 감수성을 증강시킨다고 가정할 수도 있다. 저자들은 IFN- γ 전처치에 의하여 HT-29의 Fas 단백질과 mRNA 발현이 증강되며(Fig. 4), 대조 HT-29은 세포표면에 Fas를 발현하고 있지만 Fas ligation에 의한 사멸이 유발되지 않는 반면 IFN- γ 전처치한 HT-29에서는 사멸이 유발된다 는 사실을 보고한 바 있다³⁵⁾. 본 연구에서도 대조 HT-29에서는 Fas ligation에 의하여 세포사멸이 유

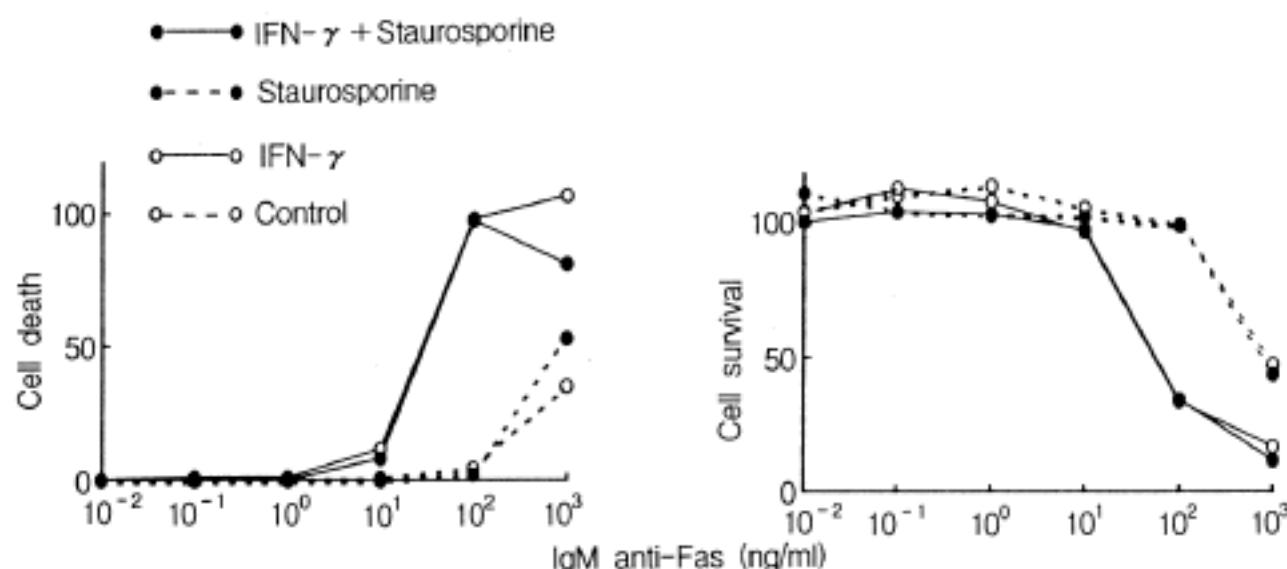


Fig. 5. Effect of protein kinase C inhibitor, staurosporine, on Fas-mediated apoptosis of control and IFN- γ pretreated(40 ng/ml) HT-29 cells. Fas antigen was ligated with various doses of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody for 24 hours with or without staurosporine(20 nM). Cell death and cell survival was measured by LDH assay and MTT assay, respectively.

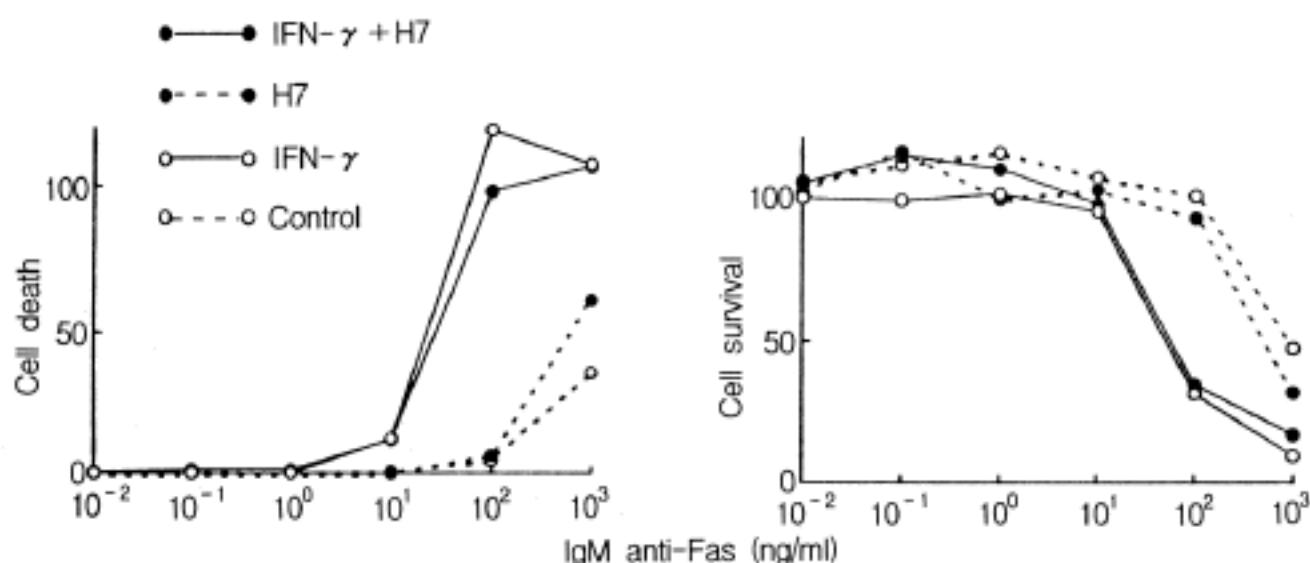


Fig. 6. Effect of protein kinase C inhibitor, H7, on Fas-mediated apoptosis of control and IFN- γ pretreated(40 ng/ml) HT-29 cells. Fas antigen was ligated with various doses of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody for 24 hours with or without H7(10 nM). Cell death and cell survival was measured by LDH assay and MTT assay, respectively.

발되지 않는 반면 IFN- γ 전처치한 HT-29에서는 용량-의존적인 Fas 매개 세포사멸이 유발됨을 확인하였다(Fig. 1). 그러나 IFN- γ 전처치한 HT-29에 단백질 합성을 억제하는 cycloheximide 또는 mRNA 전사를 억제하는 actinomycin D를 첨가하여도 사멸이 유발되는 것으로 보아 IFN- γ 전처치로 Fas 발현이 증강되고 이에 따라 Fas를 통한 신호의 강도가 증대되어 사멸이 일어날 수 있는 역치를 넘게 된다는 가능성을 배제할 수 있다³⁵⁾.

그러나 cycloheximide는 단백질 합성을 억제할 뿐만 아니라 세포내 신호전달경로를 활성화시키는 기능도 가지므로²⁹⁾ 사멸 보조자극인자(apoptotic co-stimulator)라고도 불린다는 사실을 감안하면 IFN- γ 전처치한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸이 유발되는 이유에 대한 설명 중 IFN- γ 에 의하여 활성화된 세포에서는 Fas를 통한 신호의 질적 변화가 초래된다는 가설 또한 배제할 수 없다. 따라서 IFN- γ 전처치한 HT-29에서 Fas 매개 세포사

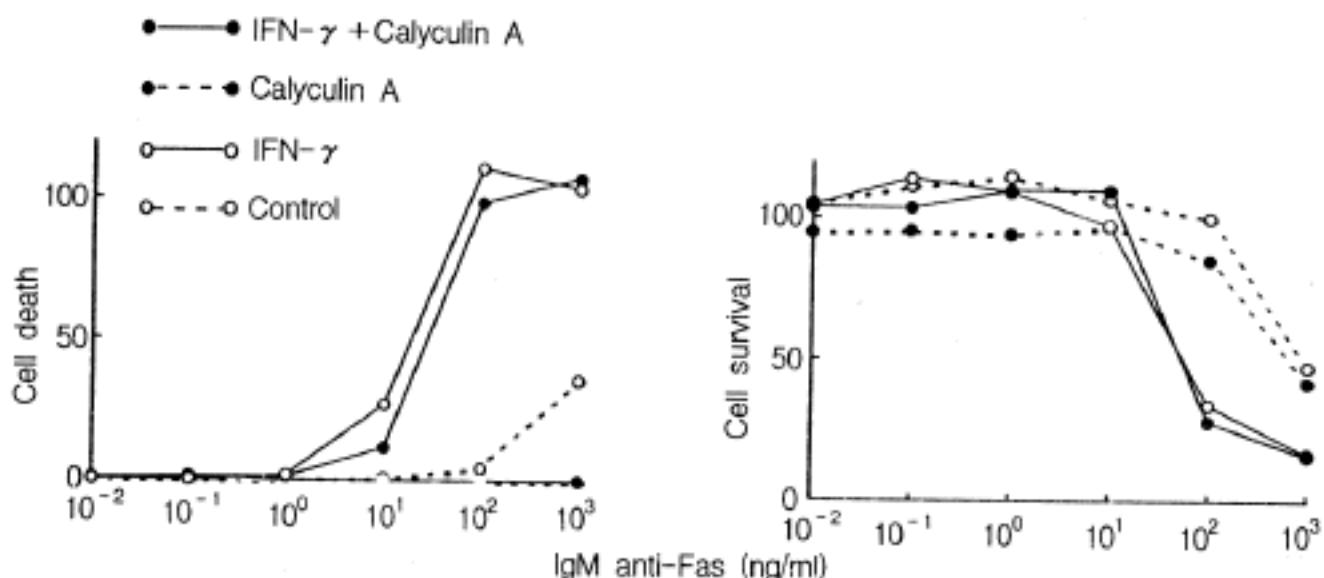


Fig. 7. Effect of protein phosphatase 1 and 2A inhibitor, calyculin A, on Fas-mediated apoptosis of control and IFN- γ pretreated(40 ng/ml) HT-29 cells. Fas antigen was ligated with various doses of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody for 24 hours with or without calyculin A(10 nM). Cell death and cell survival was measured by LDH assay and MTT assay, respectively.

멸이 유발되는 이유는 IFN- γ 에 의한 Fas 매개 신호의 양적 또는 질적인 변화 보다는 IFN- γ 에 의한 HT-29 세포의 활성화가 Fas 매개 세포사멸에 대한 감수성을 증가시키기 때문이라 할 수 있다.

활성화된 T-세포 및 NK세포에 의하여 생성되는 IFN- γ 는 다양한 기능을 가진 사이토카인으로서 단핵구 및 대식세포 등 여러 종류의 면역세포를 활성화시켜⁴⁷⁾ 염증반응을 일으킨다. IFN- γ 는 또한 T-세포, 단핵세포, 및 상피세포에서 HLA DR, platelet-activating factor receptor 및 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) 등의 여러 가지 표면항원의 발현을 증강시킨다⁴⁸⁾. 대장암 세포주 HT-29에서 IFN- γ 가 Fas 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 Fas 매개 세포사멸도 증강시킨다는 사실은 IFN- γ 가 증가하는 염증성장질환의 병태생리에 Fas 매개 세포사멸이 관여할 가능성을 시사한다.

세포의 유전형 및 표현형이 연속적으로 변화하여 이루어지는 발암과정은 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression) 등의 단계로 나누어 볼 수 있는데, 최근에 이르러 발암과정에 있어서 과도한 세포의 축적은 촉진 및 진행단계에서 세포 증식의 증가 뿐만 아니라 세포사(cell death)가 감소함에도 기인하고⁴⁹⁾, 세포사를 조절하는 유전자는 암의 분자생물학적 병태기전에 있어서 암

유전자(oncogene) 및 암억제유전자(tumor-suppressor gene)에 필적할 만한 중요성을 가진다는 사실이 알려지게 되었다. 세포 사멸의 유전적 조절은 그 산물이 사멸을 유발하고 사멸시 발현이 증가하는 유전자(death gene)와 증식을 유발하고 사멸을 억제하는 유전자(proto-oncogene)의 상반된 작용의 균형에 의하여 이루어진다는 것이 일반적인 시각이다. 그러나 이러한 이분법은 너무 단순하여 생체내의 현상을 모두 대변할 수는 없는데 *c-myc* 등 어떤 성장촉진 유전자는 사멸도 유발한다. 세포가 증식하기 위해서는 competence signal과 progression signal이 필요하다. Competence signal은 세포의 증식과 사멸에 있어서 공통적으로 필요한 대사를 개시하고 progression signal은 세포의 증식과 사멸을 가름한다. 즉, competence signal에 의하여 활성화된 세포는 progression signal에 의하여 증식하는데 DNA 복제과정에서 check point를 넘지 못하거나 progression signal에 이상이 있으면 사멸에 의하여 제거된다. *bcl-2* 유전자는 생리적 및 병적 상태에서 사멸에 관여하는 중요한 조절 인자로서 *bcl-2*를 과발현시키면 세포의 증식에는 변화가 없으나 사멸을 억제하여 세포의 생존을 연장시킨다⁴¹⁾. *bcl-2*의 작용기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않으며 *bcl-2* 유전자에는 신호전달에

관여하는 물질에 대한 염기서열이 포함되어 있지 않으나 *bcl-2*가 세포내 칼슘 또는 신호전달을 조절함으로써 세포 사멸을 억제하리라 유추되고 있다⁵⁰⁾. 그러나 세포독성 T림프구(cytotoxic T lymphocyte; CTL) 매개 사멸 등의 경우에는 *bcl-2* 유전자 산물이 세포를 사멸로부터 보호하지 못하므로⁵¹⁾ *bcl-2*의 사멸 억제효과는 보편적이라고 할 수는 없다. 최근 *bcl-xL*, *bcl-xS*, *bax*, *mcl-1* 및 *Alt*, *bad*, *bag-1* 등 *bcl-2*와 유사한 *bcl-2*족 유전자들이 clone되었다. *c-myc* 유전자는 세포 주기의 S기에 진입하는데 작용함으로써 세포의 성장 및 증식을 조절하며 최근에는 *c-myc*이 세포 사멸에도 관여한다는 사실이 알려졌다. 즉, *c-myc*이 발현되면 세포의 증식과 사멸이 활발한 high turnover 상태가 되는데 ras, *bcl-2* 등의 암유전자가 동시에 발현되거나 암억제 유전자가 억제되면 세포의 증식이 과다하게 된다⁴²⁾. *c-myc*과 유사하게 *p53* 또한 사멸 유도에서 중요한 역할을 담당한다^{43,52)}. *P53*은 DNA 결합단백으로 전사활성인자(transcriptional activator)인데 세포 주기 G1기의 점검점(check point)을 통제하여 S기에 진입하기에 앞서 DNA의 상태를 감시한다. DNA가 손상된 세포에서 *P53*에 의하여 p21(*WAF1*, *Cip1* 또는 *sdi1*)의 전사가 증가하는데 p21이 G1기에는 cyclin E-*cdk2*와 결합하며 S기에는 PCNA(proliferating-cell nuclear antigen)와 결합함으로써 세포주기의 진행을 차단한다⁵³⁾. *p53* 결실 마우스에서 방사선 조사 또는 etoposide에 의한 사멸은 억제되지만 다른 자극에 의한 사멸은 영향을 받지 않는 것으로 보아 *p53*의 존성 사멸은 DNA가 손상된 세포를 제거하는 역할을 수행함을 알 수 있다^{54,55)}. 즉, *p53*은 DNA가 손상된 세포의 사멸을 유발하는 유전자(apoptogene)로서 정상적인 DNA를 유지시키는데 중요한 역할을 하므로 “Guardian of the Genome”이라 불린다⁵⁶⁾.

여러 가지 자극에 의해 다양한 세포에 유발되는 사멸에 있어서 사멸 연관 유전자의 역할을 규명하는 것은 세포사멸의 기전을 밝히기 위한 기대되는 연구과제 중의 하나이다. 따라서 본 연구

에서는 사멸 연관 유전자 발현의 변화가 IFN- γ 전처치에 의한 세포사멸 감수성 증가의 원인이 되는지 알아보기 위하여 IFN- γ 처치 전후의 HT-29에서 *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, *p53* 등의 사멸 조절에 관여하는 유전자의 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. HT-29은 매우 적은 양의 *bcl-2* mRNA를 발현하고 있었으며 *bcl-2* mRNA는 IFN- γ 전처치에 의하여 변화하지 않았다. 또한 *bax*, *c-myc* 및 *p53* mRNA 발현도 IFN- γ 전처치에 의하여 변화하지 않았다(Fig. 4).

세포의 사멸은 화학적 자극, 방사선 조사, virus 감염, 생존에 필요한 신호의 소실 및 세포표면 수용체를 통한 신호 등 다양한 자극에 의하여 유발될 수 있다. 이러한 다양한 자극은 세포질내 Ca⁺⁺의 상승, cAMP의 측적, protein kinase C⁵⁷⁾ 및 tyrosine kinase 활성도의 변화, oxidative stress, ceramide 및 nitric oxide의 생성 등을 포함하는 다양한 신호전달 경로를 활성화시킨다⁵⁸⁾. 그러나 다양한 자극에 의한 다양한 신호는 궁극적으로 한가지의 경로로 집약되어 사멸이라는 공통적인 생화학적 및 형태학적 반응을 유발한다고 생각되고 있다. 이러한 공통적인 반응 경로에서 사멸을 조절하는 기전과 연관된 유전자를 찾으려는 시도의 결과 nematode인 *Caenorhabditis elegans*에서 사멸에 영향을 미치는 몇몇 유전자가 알려지게 되었는데, *ced-3*(ced; cell death defective)와 *ced-4*는 세포가 죽는데 관여하고 *ced-9*은 사멸로부터 세포를 보호하는 기능이 있으며 *Bcl-2*와 유사한 단백질을 만들어 낸다⁵⁹⁾. 사멸이 가장 활발한 *C. elegans*의 발생기에 *ced-3* 발현이 가장 높고⁶⁰⁾ Rat-1 세포에 *ced-3*를 과발현시키면 사멸이 일어난다는 사실은 사멸 과정에서 *ced-3*가 중요한 역할을 수행한다는 사실을 보여준다⁶¹⁾. *ced-3* 유전자 산물과 유사한 포유류의 단백질은 여러가지가 clone되었으며^{62~64)} 이들은 31 kDa의 pro-interleukin-1 β (pro-IL-1 β)를 17.5 kDa의 활성화 IL-1 β 로 전환시키는 interleukin-1 β -converting enzyme(ICE)와 상동성이 높은 cysteine protease임이 밝혀졌고^{60,65)}, 최근 caspase라 명명되었다^{66,67)}. *Ced-3*와 ICE 사이의

아미노산 상동성은 약 28%이지만 효소 활성부의 상동성이 가장 높고 중요한 부분의 분자 결정 구조가 동일한 것으로 보아 *C. elegans*에서 *Ced-3*과 같이 ICE 또는 ICE족(family) cysteine protease 즉, caspase가 포유류의 세포에서 사멸에 관여하는 중요 물질임이 분명하다. 현재 알려져 있는 caspase에는 Nedd2/Ich-1⁴⁴⁾, p1ICE(protease resembling ICE), CPP32/Yama/apopain^{45,68~70)}, TX/Ich-2/ICE_{rel}II^{63,71)}, ICE_{rel}III⁷¹⁾, Mch-2⁷²⁾ 및 Mch-3등이 있으며 다양한 자극에 의한 다양한 세포의 사멸에서 caspase의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서도 IFN- γ 전처리에 의한 세포사멸 감수성 증가의 기전을 규명하기 위하여 IFN- γ 처리 전후의 HT-29에서 ICE, hich 및 cpp32 등 caspase 유전자 발현의 변화를 RT-PCR로 측정하였는데 IFN- γ 전처리 전후의 HT-29에서 ICE, hich 및 cpp32 등 세포사멸에서 죽음의 실행단계에 작용하는 caspase 유전자의 mRNA 발현 또한 차이가 없었다(Fig. 4).

전술한 바와 같이 사멸을 유발하는 다양한 자극은 세포질내 Ca⁺⁺의 상승, cAMP의 축적, protein kinase C⁵⁷⁾ 및 tyrosine kinase 활성도의 변화, oxidative stress, ceramide 및 nitric oxide의 생성 등을 포함하는 다양한 신호전달 경로를 활성화시키며⁵⁸⁾. 사멸 신호의 전달경로는 자극의 종류 및 세포의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 생각되고 있다. Protein kinase C는 diacyl glycerol 형성을 유도하는 자극에 의하여 활성화되는 신호전달경로로서 자극의 종류 및 작용하는 동기효소에 따라 세포사멸을 촉진하기도 하고 억제하기도 하는 것으로 알려져 있다^{73~75)}. IFN- γ 처리한 keratinocyte의 Fas 매개 세포사멸은 protein kinase C 활성인자인 TPA에 의하여 증강되는데 protein kinase C 억제제인 H7은 TPA에 의한 사멸 증강을 억제하지만 Fas 매개 사멸 그 자체를 억제하지는 않는다⁷⁶⁾. 한편 phorbol ester 및 zymosan에 의하여 유발되는 대식세포 사멸과 마우스 섬유아세포에서 topoisomerase II 억제제인 etoposide에 의하여 유발되는 세포사멸은 protein kinase C 억제제인 staurosporine에 의

하여 억제되는 반면⁷⁷⁾ protein kinase C 억제제 자체가 사멸을 유발하거나 다른 자극에 의한 사멸을 촉진시키기도 한다^{78~80)}. 본 연구에서는 protein kinase C 억제제인 staurosporine과 H7은 그 자체가 사멸을 유발하지 않았으며 IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸을 억제하거나 촉진하지 않았다(Fig. 5, 6).

Protein phosphatase 1 및 2A 억제제인 okadaic acid와 calyculin A는 glucocorticoid와 CD3 ligation에 의한 T세포의 사멸 및 heat shock과 방사선 조사에 의한 B세포의 사멸을 억제하므로 신호전달 단백의 탈인산화(dephosphorylation)는 사멸이 일어나기 위하여 꼭 필요한 단계로 생각되고 있다^{81~83)}. 신호전달단백의 인산화 정도는 세포의 대사조절, 활성화, 성장 및 분화에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그러나 종양촉진인자의 하나인 okadaic acid와 calyculin A는 높은 농도에서는 그 자체가 세포사멸을 일으키기도 하므로^{84,85)} 신호전달단백의 인산화 정도가 사멸과정에서 어떤 의의를 갖는지 아직까지 분명하지 않다고 할 수 있다. 본 연구에서는 protein phosphatase 1 및 2A 억제제인 calyculin A는 그 자체가 사멸을 유발하지 않았으며 IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸을 변화시키지 않았다(Fig. 7). 따라서 IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas에 의한 사멸 신호는 protein kinase C 또는 protein phosphatase 1 및 2A 경로와는 독립적으로 전달되리라 생각하였다.

소화관의 상피세포는 염증반응에 의하여 사멸이 일어나는 표적조직 중의 하나이다. 활성화된 T-세포 및 NK세포에 의하여 산생되는 IFN- γ 가 대장암 세포주인 HT-29의 Fas 발현을 증가시킬 뿐 아니라 Fas 매개 세포사멸에 대한 감수성을 증가시킨다는 본 연구의 결과는 염증반응에 의한 사멸기전에서 Fas의 역할을 시사한다.

결 론

Fas(APO-1, CD95)는 세포표면에 발현되는 수용

체로서 감수성이 있는 세포에서 사멸을 유발하는 신호를 전달한다. 본 연구에서는 IFN- γ 전처리한 대장암 세포주인 HT-29에서 사멸 연관 유전자 발현의 변화를 알아보고 protein kinase C와 protein phosphatase를 통한 신호가 Fas 매개 세포사멸에 관여하는지 알아보고자 하였다. 세포독성과 세포생존률은 각각 LDH assay와 MTT assay로 측정하였으며 세포사멸은 DAPI 염색 후 confocal microscopy로 관찰한 핵의 형태변화로 확인하였고 DNA fragmentation과 TUNEL assay 및 세포내 DNA 양의 감소를 관찰함으로써 검증하였다. 사멸과 연관되는 유전자 및 caspase mRNA의 발현은 RT-PCR로 측정하였다. IFN- γ 전처리하지 않은 대조 HT-29에서는 IgM 항Fas 단일클론항체(CH-11)로 Fas를 ligation하여도 세포독성 및 세포생존률의 변화가 뚜렷하지 않았으나 IFN- γ 전처리한 HT-29에서는 항체의 용량에 비례하여 LDH assay로 측정한 세포독성이 증가하고 MTT assay로 측정한 세포생존률이 감소하였으며 세포독성의 증가 또는 생존률의 감소는 세포사멸에 기인하였다. HT-29은 매우 적은 양의 bcl-2 mRNA를 발현하고 있었으며 bcl-2 mRNA는 IFN- γ 전처리에 의하여 변화하지 않았으나 Fas mRNA 발현은 IFN- γ 전처리에 의하여 증강되었다. bax, c-myc 및 p53 등의 사멸 연관 유전자와 ICE, hich 및 cpp32 등의 caspase 유전자 mRNA 발현 또한 IFN- γ 전처리에 의하여 변화하지 않았다. IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸은 protein kinase C 억제제인 staurosporine과 H7에 의하여 억제되지 않았으며 protein phosphatase 1 및 2A 억제제인 calyculin A도 IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸을 변화시키지 않았다. 이상의 결과로 HT-29이 발현하고 있는 Fas는 세포사멸을 유발하기 위한 충분한 조건이 되지 못하고 Fas 매개 상피세포 사멸이 일어나기 위해서는 IFN- γ 에 의한 상피세포의 활성화를 요한다는 사실을 알 수 있었다. IFN- γ 전처리에 의한 세포활성화 즉, 사멸 증강 효과는 IFN- γ 에 의한 Fas 발현 증가 뿐만 아니라 다른 기전도 복합적으로

작용하여 유발되는 현상이지만 bcl-2, bax, c-myc, p53, p21, ICE, Ich, CPP32 등 사멸과 연관된다고 알려진 유전자의 발현이 변화하여 일어나는 현상은 아님을 알 수 있었다. 또한 IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas에 의한 사멸 신호는 protein kinase C 또는 protein phosphatase 1 및 2A 경로와는 독립적으로 전달되리라 생각하였다.

색인단어: 세포사멸, Fas, HT-29, IFN- γ , 신호 전달경로, Caspase

REFERENCES

- 1) 김원호: 세포사멸과 질병. *Med Postgraduate* 24(6): 275, 1996
- 2) Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445, 1995
- 3) Rouvier E, Luciani MF, Golstein P: *Fas involvement in Ca²⁺-dependent T cell-mediated cytotoxicity*. *J Exp Med* 177: 195, 1993
- 4) Oshimi Y, Miyazaki S: *Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic Ca²⁺ level*. *J Immunol* 154: 599, 1995
- 5) Mountz JD, Zhou T, Wu J, et al: *Regulation of apoptosis in immune cells*. *J Clin Immunol* 15: 1, 1995
- 6) Schwarz LM, Osborne BA: *Programmed cell death, apoptosis and killer genes*. *Immunol Today* 14: 582, 1993
- 7) Haake AR, Polakowska RR: *Cell death by apoptosis in epidermal biology*. *J Invest Derm* 101: 107, 1993
- 8) Schulte-Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grasl B, et al: *Programmed cell death and its protective role with particular relevance to apoptosis*. *Toxicol Lett* 64-65: 569, 1992
- 9) Thompson CB: *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*. *Science* 267: 1456, 1995
- 10) Watson AJM: *Necrosis and apoptosis in the gastrointestinal tract*. *Gut* 37: 165, 1995
- 11) McDonald GB, Shulman HM, Sullivan KN, et al: *Intestinal and hepatic complications of human bone marrow transplantation*. *Gastroenterology* 90: 460, 1986
- 12) Lee FD: *Importance of apoptosis in the histopathology of drug related lesions in the large intestine*. *J Clin Pathol* 46: 118, 1993

- 13) Kotler DP, Weaver SC, Terzakis JA: *Ultrastructural features of epithelial cell degeneration in rectal crypts of patients with AIDS*. Am J Surg Pathol 10: 531, 1986
- 14) Behrmann I, Walczak H, Krammer PH: *Structure of the human APO-1 gene*. Eur J Immunol 24: 3057, 1994
- 15) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al: *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell 66: 233, 1991
- 16) Oehm A, Behrmann I, Falk W, 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 267: 10709, 1992
- 17) 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 169: 1747, 1989
- 18) Richardson BC, Lalwani ND, Johnson KJ, et al: *Fas ligation triggers apoptosis in macrophage but not endothelial cells*. Eur J Immunol 24: 2640, 1994
- 19) Alderson M, Armitage RJ, Maraskovsky E, et al: *Fas transduce activation signals in normal human T lymphocytes*. J Exp Med 178: 2231, 1993
- 20) Ju ST, Cui H, Panka DJ, et al: *Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4⁺ Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells*. Proc Natl Acad Sci USA 91: 4185, 1994
- 21) Vignaux F, Golstein P: *Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway*. Eur J Immunol 24: 923, 1994
- 22) Nagata S, Golstein P: *The Fas death factor*. Nature 267: 1449, 1995
- 23) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, et al: *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature 356: 314, 1992
- 24) Gillete-Ferguson I, Sidman CL: *A specific intercellular pathway of apoptotic cell death is defective in the mature peripheral T cells of autoimmune lpr and gld mice*. Eur J Immunol 24: 1181, 1994
- 25) Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, et al: *gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas*. Eur J Immunol 24: 928-933, 1994
- 26) Rieux-Lauca F, Le Deist F, Hivroz C, et al: *Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity*. Science 268: 1347, 1994
- 27) Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al: *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. Nature 364: 806, 1993
- 28) Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, et al: *Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C*. Hepatology 19: 1354, 1994
- 29) Natoli G, Ianni A, Costanzo A, et al: *Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells*. Oncogene 11: 1157, 1995
- 30) Higaki K, Yano H, Kojiro M: *Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues*. Am J Pathol 149: 429, 1996
- 31) Matsue H, Kobayashi H, Hosokawa T, et al: *Keratinocytes constitutively express the Fas antigen that mediates apoptosis in IFN-γ-treated cultured keratinocytes*. Arch Dermatol Res 287: 315, 1995
- 32) Abreu-Martin MT, Vidrich A, Lynch DH, et al: *Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-α and ligation of Fas antigen*. J Immunol 155(9): 4147, 1995
- 33) Deem RL, Shanahan F, Targan SR: *Triggered human mucosal T cells release tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma which kill human colonic epithelial cells*. Clin Exp Immunol 83: 79, 1991
- 34) Ruggiero V, Tavernire J, Fiers W, et al: *Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-γ*. J Immunol 136: 2445, 1986
- 35) 김원호, 하성호, 강진경, 박인서: *Interferon-γ가 대장암 세포주 HT-29의 Fas 매개 세포사멸에 미치는 영향*. 대한소화기학회지 29(5): 620, 1997
- 36) Korzeniewski C, Callewaert DM: *An enzyme-release assay for natural cytotoxicity*. J Immunol Methods 64: 313, 1983
- 37) Decker T, Lohmann-Matthes ML: *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor(TNF) activity*. J Immunol Methods 15: 61, 1988
- 38) 김원호, 이관식, 문영명, 등: *폐양된 위암세포에 대한 desferrioxamine 및 항암제의 병합효과*. 대한소화기학회지 25: 46, 1993
- 39) Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, et al: *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing*. Cancer Res 47: 936, 1987
- 40) Kim WH, Hong SP, Ha SH, Park IS: *Molecular mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drugs induced apoptosis of colon cancer cells*. Yonsei Med

- J(submitted)
- 41) Oltavi Z, Milliman C, Korsmeyer S: *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.* Cell 74: 609, 1993
 - 42) Cherney BW, Bhatia K, Tosato G: *A role for deregulated c-Myc expression in apoptosis of Ebstein-Barr virus-immortalized B cells.* Proc Natl Acad Sci USA 91: 12967, 1994
 - 43) Clarke AR: *Murine models of neoplasia: functional analysis of the tumour suppressor genes Rb-1 and p53.* [Review] Cancer Met Rev 14(2): 125, 1995
 - 44) Wang L, Miura M, Bergeron L, et al: *Ich-1, and Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death.* Cell 78: 739, 1994
 - 45) 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 269(49): 30761, 1994
 - 46) O'Connell J, Bennett B, O'Sullivan GC, et al: *Molecular mechanisms of Fas resistance and sensitivity of colonic epithelia.* Gastroenterology 112(4): A1053, 1997
 - 47) Trinchieri G, Perussia B: *Immune interferon: a pleiotrophic lymphokine with multiple effects.* Immunol Today 6: 131, 1985
 - 48) Oullet S, Müller E, Rola-Pleszczynski M: *IFN- γ up-regulates platelet-activating factor receptor gene expression in human monocytes.* J Immunol 152: 5092, 1994
 - 49) Schulte-Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grasl B, et al: *Programmed cell death and its protective role with particular relevance to apoptosis.* Toxicol Lett 64-65: 569, 1992
 - 50) Reed J: *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.* J Cell Biol 124: 1, 1994
 - 51) Aten J, Prigent P, Poncet P, et al: *Mercuric chloride-induced programmed cell death of a murine T cell hybridoma.* Cell Immunol 161: 98, 1995
 - 52) Clarke AR, Gledhill S, Hooper ML, et al: *p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation.* Oncogene 9(6): 1767, 1994
 - 53) Gotz C, Montenarh M: *p53: DNA damage, DNA repair, and apoptosis.* [Review] Rev Physiol Biochem Pharmacol 127: 65, 1996
 - 54) Liebermann DA, Hoffman B, Steinman RA: *Molecul-*
lar controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. [Review] Oncogene 11(1): 199, 1995
 - 55) Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, et al: *The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice.* Cancer Res 54(3): 614, 1994
 - 56) Lee JM, Bernstein A: *Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene.* [Review] Cancer Metastasis Rev 14(2): 149, 1995
 - 57) Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, et al: *Proteolytic activation of protein kinase C δ by an ICE-like protease in apoptotic cells.* EMBO J 14(24): 6148, 1995
 - 58) Zhu H, Fearnhead HO, Cohen GM: *An ICE-like protease is a common mediator of apoptosis induced by diverse stimuli in human monocytic THP.1 cells.* FEBS Lett 374(2): 303, 1995
 - 59) Hengartner MO, Horvitz HR: *Programmed cell death in Caenorhabditis elegans.* [Review] Curr Opin Genet Dev 4(4): 581, 1994
 - 60) Yuan J, Shaham S, Ledoux S, et al: *The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme.* Cell 75: 641, 1993
 - 61) Miura M, Zhu H, Rotello R, et al: *Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3.* Cell 75(4): 653, 1993
 - 62) Alnemri ES, Fernandes-Alnemri T, Litwack G: *Cloning and expression of four novel isoforms of human interleukin-1 beta converting enzyme with different apoptotic activities.* J Biol Chem 270(9): 4312, 1995
 - 63) Faucheu C, Diu A, Chan AW, et al: *A novel human protease similar to the interleukin-1b converting enzyme induces apoptosis in transfected cells.* EMBO J 14(9): 1914, 1995
 - 64) Schlegel J, Peters I, Orrenius S: *Isolation and partial characterization of a protease involved in Fas-induced apoptosis.* FEBS Lett 364(2): 139, 1995
 - 65) Miura M, Friedlander RM, Yuan J: *Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway.* Proc Natl Acad Sci USA 92(18): 8318, 1995
 - 66) Spector MS, Desnoyers S, Hoeppner DJ, et al: *Interaction between the C. elegans cell death regulators CED-9 and CED-4.* Nature 385(6617): 653, 1997
 - 67) Van de Craen M, Vandencabbel P, Declercq W, et al: *Characterization of seven murine caspases family members.* FEBS Lett 403(1): 61, 1997

- 68) Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, et al: Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371(6495): 346, 1994
- 69) Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, et al: Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81(5): 801, 1995
- 70) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [see comments]. *Nature* 376(6535): 37, 1995
- 71) Munday NA, Vaillancourt JP, Ali A, et al: Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICErelII and ICErelIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 270(26): 15870, 1995
- 72) Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES: Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Res* 55(13): 2737, 1995
- 73) Ikemoto H, Tani E, Matsumoto T, et al: Apoptosis of human glioma cells in response to calphostin C, a specific protein kinase C inhibitor. *J Neurosurgery* 83(6): 1008, 1995
- 74) Suzuki K, Azuma Y, Onishi Y, et al: Biphasic effect of staurosporine on thymocyte apoptosis. *Biochem Mol Biol Internat* 35(5): 1085, 1995
- 75) Perez-Sala D, Mollinedo F: Inhibition of N-linked glycosylation induced early apoptosis in human promyelocytic HL-60 cells. *J Cell Physiol* 163(3): 523, 1995
- 76) Takahashi H, Kobayashi H, Hashimoto Y, et al: Interferon-dependent stimulation of Fas antigen in SV40-transformed human keratinocytes: modulator of the apoptotic process by protein kinase C. *J Invest Dermatol* 105: 810, 1995
- 77) Munn DH, Beall AC, Song D, et al: Activation-induced apoptosis in human macrophage: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon- γ . *J Exp Med* 181(1): 127, 1995
- 78) Jarvis WD, Turner AJ, Povrik LF, et al: Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res* 54(7): 1707, 1994
- 79) Bertrand R, Solary E, O'Connor P, et al: Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* 211(2): 314, 1994
- 80) Ni R, Tomita Y, Matsuda K, et al: Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp Cell Res* 215(2): 332, 1994
- 81) Ohoka Y, Nakai Y, Mukai M, et al: Okadaic acid inhibits glucocorticoid-induced apoptosis in T cell hybridomas at its late stage. *Biochem Biophys Res Comm* 197(2): 916, 1993
- 82) Baxter GD, Lavin MF: Specific protein dephosphorylation in apoptosis induced by ionizing radiation and heat shock in human lymphoid tumor lines. *J Immunol* 148(6): 1949, 1992
- 83) Song Q, Lavin MF: Calyculin A, a potent inhibitor of phosphatase-1 and -2A, prevents apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 190(1): 47, 1993
- 84) Weller M, Malipiero U, Groscurth P, et al: T cell apoptosis induced by interleukin-2 deprivation or transforming growth factor- β 2: modulation by the phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin a. *Exp Cell Res* 221(2): 395, 1995
- 85) Lerga A, Belandia B, Delgado MD, et al: Down-regulation of c-Myc and Max genes is associated to inhibition of protein phosphatase 2A in K562 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Comm* 215(3): 889, 1995