

Interferon- γ 가 대장암세포주 HT-29의 Fas 매개 세포사멸에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실 및 소화기병연구소

김원호 · 하성호 · 강진경 · 박인서

= Abstract =

Effect of Interferon- γ on Fas-mediated Apoptosis of Colon Cancer Cell Line HT-29

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: 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. We, therefore, studied the functional role of Fas in apoptosis of colon cancer cell line HT-29. **Methods:** Cell surface Fas expression was measured by flow cytometry using IgM anti-Fas monoclonal antibody(CH-11). Fas 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:** Twenty to thirty percent of control HT-29 expressed Fas antigen on their surface. Nevertheless, Fas ligation by IgM anti-Fas monoclonal antibody(CH-11) failed to induce apoptosis in control HT-29. Fas protein as well as Fas mRNA expression was enhanced by IFN- γ . In addition, Fas ligation in IFN- γ pretreated HT-29 induced apoptosis dose-dependently. Cycloheximide and actinomycin D induced apoptosis in IFN- γ pretreated HT-29, whereas they failed to induce apoptosis independently. **Conclusions:** Fas antigen expressed on the surface of colon cancer cell line HT-29 is not sufficient to induce apoptosis. Cellular activation by IFN- γ not only enhances Fas expression but also sensitizes HT-29 to Fas-mediated apoptosis. Apoptosis inducing effect of IFN- γ pretreatment is complexly mediated by enhancing Fas expression as well as other mechanism yet undetermined. (Korean J Gastroenterol 1997; 29:620 - 631)

Key Words: Apoptosis, Fas, HT-29, IFN- γ

접수: 1997년 3월 28일, 승인: 1997년 4월 23일

본 논문은 1996년도 연세대학교 의과대학 일반과제(교수) 연구비 보조로 이루어졌음.

연락처: 김원호, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 내과학교실

서 론

세포사멸(apoptosis, programmed cell death)은 선택적인 세포 소실을 일으키는 생리적인 과정으로 세포내의 genomic DNA가 endonuclease에 의하여 약 180 염기 크기의 oligomer로 잘라지는 것이 사멸의 특징적인 소견이다. 사멸 과정 중의 세포는 괴사에 반하여 크기가 작고 chromatin과 세포질내의 소기관이 농축되어 막에 둘러싸인 사멸체(apoptotic body)를 형성하는데 이어 주위 세포에 의하여 신속하게 제거되는데 이 과정에서 원형질막은 파열되지 않으므로 세포내 물질이 세포 주위에 유출되지 않아 염증반응을 일으키지 않는다.^{1,2} 세포사멸은 ATP형태의 에너지를 필요로 하는 능동적인 과정으로서 자외선, 열, 세포성장인자의 결핍, 수용체에 대한 배위자(ligand)의 결합, 반응기 산소 대사물, DNA 손상 등 세포에 대한 여러 자극에 의하여 유발되는데, 사멸에 관여하는 세포내의 신호전달경로는 확실히 규명되지 않았으나 자극 및 세포의 종류에 따라 다양하리라고 추측되고 있다.^{3,5} 세포사멸의 역할에 대한 연구는 주로 발생학 및 면역학적인 측면에서 이루어져 왔으나 최근에는 상피세포계와 포피의 지속적인 molding 및 발암과정에도 관여함이 알려졌다.^{6,7} 상피세포 재생과정에서의 세포사멸은 정상적으로 일어나는 과정 중의 하나이지만 과도한 사멸은 병적이다.⁸⁻¹⁰ 위장관 상피세포의 과도한 사멸에 의한 질환의 예로는 이식편 대 숙주 질환(graft-versus-host disease: GVHD),¹¹ 비스테로이드성 소염제에 의한 장염,¹² 및 후천성 면역결핍증에 의한 장염¹³ 등을 들 수 있다.

상피세포의 사멸을 일으킬 수 있는 점막내 유발인자로는 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 Fas ligand(FasL) 등이 대표적이는데, TNF- α 는 활성화된 대식세포와 T-세포에 의해 분비되며, TNF- α 에 민감한 세포를 사멸 및 괴사의 두 가지 방법 모두를 통하여 죽일 수 있다.¹⁴ FasL는 최근에 clone되었는데 분자량이 약 40 kDa인 제 II형 막단백질로서 281개의 아미노산으로 구성되어 있으며 TNF- α 및 lymphotoxin- β 와 상당한 상동성을 가진다.¹⁵ FasL는 주로 세포독성 T-

세포에 발현되나 최근에는 호중구에서도 FasL가 발현되고 호중구의 autocrine death를 유발할 수 있다는 사실이 밝혀졌다.¹⁶ FasL 유전자는 약 8 kb의 크기로 5개의 exon으로 구성되어 있으며, 사람 염색체 1q23에 위치한다.¹⁷ Fas(APO-1, CD95)는 325개의 아미노산으로 구성된 제 I형 막단백질로서 사람에게 있어서 Fas 유전자는 10번 염색체의 장완에 위치하며,¹⁸ 약 70개의 아미노산으로 구성된 세포질내 아미노 말단은 사멸을 일으키는 신호를 전달하므로 "death domain"이라고도 불린다. Fas는 두가지의 TNF 수용체(TNF-R1, TNF-R2), CD40, OX40, CD27, 4-1BB, CD30 및 low-affinity 신경성장인자 수용체 등과 함께 TNF- α 수용체족(TNF- α receptor family)에 속하는데,¹⁸⁻²⁰ 세포의 domain에 3~6곳의 cysteine이 풍부한 부분이 존재하는 점이 TNF- α 수용체족의 구조적인 특징이다.¹⁹ Fas는 림프구 및 상피세포 등 기능적인 수용체를 가지고 있는 세포에서 사멸을 유발하며^{21,22} T-세포 수용체에 대한 보조 자극인자로도 작용한다.²³ 면역계에 있어서 Fas 및 FasL에 의한 세포사멸은 흉선에서의 T-세포의 선택, 면역반응의 감쇠(down-regulation) 및 T-세포에 의한 세포독성에 관여한다.²⁴⁻²⁶ 최근에는 *lpr/lpr*(lymphoproliferation) 및 *gld/gld*(generalized lymphoproliferative disease) 마우스에서의 자가면역질환은 자가항원에 반응하는 T-세포가 Fas에 의한 사멸로 제거되지 않아 축적됨에 의한다는 것이 알려졌고 이는 각각 Fas 및 FasL 유전자의 돌연변이에 의한다는 것이 밝혀졌으며²⁷⁻²⁹ 사람의 자가면역질환을 동반한 lymphoproliferative syndrome에서도 Fas 유전자의 돌연변이가 관찰되었다.³⁰

몇몇 위장관 질환에서 사이토카인 및 세포매개성 점막손상의 중요성이 알려져 있다. 태아 소장 장기 배양시 pokeweed mitogen이나 항CD3 항체로 점막 고유층 림프구를 활성화시키면 선와세포 증식(crypt cell hyperplasia), 용모 위축 및 점막의 궤양이 발생하며,³¹ 생쥐 GVHD 모델에서 TNF- α 를 한번 주사하면 24시간 내에 용모 위축과 선화 증식이 나타나는데 이러한 현상은 interferon- γ (IFN- γ)에 의하여 악화된다.³² 또한 활동성 크론병 환자 점막생검 조직에서 TNF- α 를 분비하는 세포의 수가 증가되어 있는데

cyclosporine A(CsA) 치료 후 정상화된다는 보고^{33,34}와 chimeric 항TNF- α 항체의 투여가 크론병 및 류마치스관절염에서 관해를 유발한다는 임상보고³⁵는 TNF- α 의 병인론적 역할을 보여주는 좋은 예가 된다.

면역계 세포에 있어서 TNF- α 및 Fas Ag ligation의 효과에 대한 연구는 많으나 상피세포에 대한 효과는 거의 알려져 있지 않다. Interferon- γ (IFN- γ)와 TNF- α 의 병합은 HT-29에 대한 세포종식 억제(cytostasis)와 세포독성의 상승작용을 보임이 알려져 있다.^{36,37} 또한 TNF- α 투여 및 Fas Ag ligation은 HT-29의 IL-8 산생을 유도하므로²¹ HT-29의 표면에 TNF- α 에 대한 수용체와 Fas Ag이 존재함을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 대장암 세포주인 HT-29에서 발현되는 Fas가 세포의 사멸에 기능적으로 관여하는지를 알아보고 Fas가 HT-29에서 사멸을 유발한다면 IFN- γ 전처치가 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 세포 및 배양

ATCC(Rockville, MD)로 부터 분양 받은 HT-29을 2 μ mol/L glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin 및 10% 열 비활성화 우태아혈청(fetal calf serum: FCS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)으로 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

2. 세포 및 핵의 형태

세포의 형태는 위상차 현미경으로 관찰하였고 핵의 형태는 propidium iodide(PI) 또는 DAPI로 염색한 다음 형광현미경 또는 confocal microscopy로 관찰하였다.

3. 세포독성 및 생존률의 측정

96-well plate에 well당 10⁴개의 HT-29을 넣고 밤새 배양하여 세포가 부착되게 한 다음 40 ng/mL의 IFN- γ 에 6시간 동안 노출시키고 세척한 후 다시 밤새 배양하였다. 이때 IFN- γ 대신 세포배양액을 첨가하여 IFN- γ 전처치지 않은 HT-29도 같은 조건으

로 준비하였다. 여러 가지 농도의 CH-11(mouse anti-human Fas IgM)을 가하고 24시간 배양한 후에 Lactate dehydrogenase(LDH assay)^{38,39} 또는 MTT assay^{40,41}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, St. Louis, MO), 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 측정하였다. 이때 Triton X-100을 첨가하여 세포를 용해시킨 well의 OD를 total OD로 하였다. MTT assay는 96-well microtiter plate(Costar, Cambridge, MA)에 배양한 세포를 적절한 조건으로 자극한 후 배양액을 제거하고 well당 50 μ L의 2 μ g/mL MTT용액(Sigma)을 첨가한 후 4 시간 동안 37°C에서 배양하였다. 이어 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 상층액을 제거하고 well당 50 mL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가한 후 10분간 진탕하고 570 μ m에서의 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. DNA fragmentation의 분석

세포를 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.2% SDS 및 200 μ g/mL proteinase K로 구성된 용해완충액으로 밤새 42°C에서 용해 시킨 후 4°C 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 취한 상층액으로 부터 phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25:24:1, Sigma)을 이용하여 저분자량 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 0.3 M NaOAc가 포함된 ethanol로 침전 시킨 후 원심분리하여 얻은 DNA 침사를 0.2 U

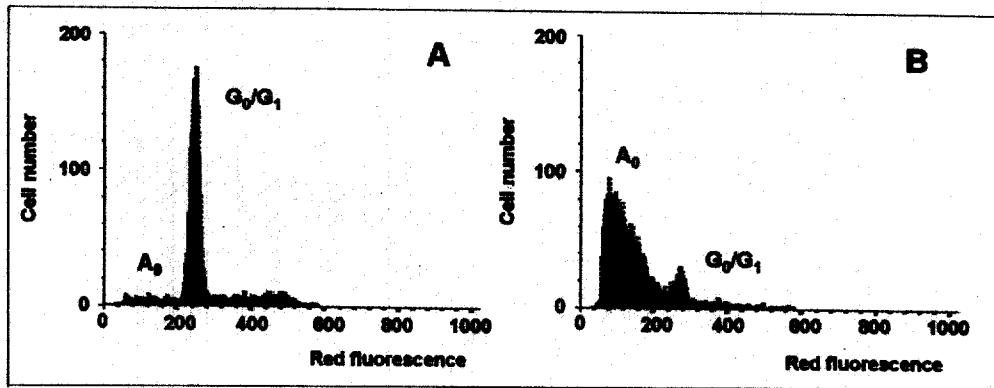


Fig. 1. DNA histogram of colon cancer cell line HT-29 stained with propidium iodide. (A) Control HT-29. (B) HT-29 was pretreated with 40 ng/mL IFN- γ for 6 hours and cultured overnight with fresh media. On the following day, cells were incubated with 50 ng/mL of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody for 24 hours. Samples were analyzed on a FACStar fluorescence-activated flow cytometer(Becton Dickinson). DNA fluorescence(red) of propidium iodide is shown with excitation at 488 nm and detection at 620~700 nm for 10,000 events per histogram.

RNase A(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)를 첨가한 10 mM Tris, 1 mM EDTA(pH 8.5) 용액에 녹인 다음 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide 로 염색하여 관찰하였다.

5. *In situ* end labeling을 이용한 사멸 측정 (TUNEL)

세포사멸의 특징적인 소견인 DNA fragmentation 은 조각난 DNA의 3'-OH 말단에 terminal deoxy-nucleotidyl transferase(TdT)를 이용하여 FITC가 표지된 nucleotide(dUTP)를 부착시킨 후 유세포분석기를 이용하거나 형광현미경으로 찾아내는 TUNEL assay로 확인하였다. 요약하면 적절한 조건으로 자극한 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 세포를 수거하여 PBS로 세척한 후 1% formaldehyde가 포함된 PBS로 고정하였다. 2.5 mM CoCl₂가 포함된 TdT 완충액에 2 μ L의 Biotin-16 dUTP와 0.2 μ L의 TdT를 첨가하여 50 μ L가 되게 한 다음 30분간 37°C에서 반응시켰다. 세포를 세척하고 5 X SSC, 5% BLOTTO, 0.1% Triton x-100 및 Avidin-FITC 1.4 μ L가 포함된 염색완충액 100 μ L에 넣은 후 실온, 암소에서 30분간 반응시키고 PBS에 부유시켜 형광현미경으로 관찰하거나 유세포분석기로 형광을 측정하였다.

6. 유세포분석(flow cytometry)

세포내 DNA의 양을 측정하기 위해서는 세포를 methanol로 고정 시키고 50 μ g/mL의 PI, 0.05% Triton X-100, 1.8 mg/mL EDTA 및 100 U/mL의 RNase가 포함된 PBS에 부유시켜 30분간 반응시킨 다음 유세포분석기로 관찰하였다. 이때 세포내 DNA의 양이 G1기의 세포 보다 작으면("sub-G₁ peak", "A₀ 세포") 세포사멸로 판단하였다(Fig. 1).⁴²

세포표면의 Fas 발현을 측정하기 위하여는 먼저 2% FCS와 0.1% sodium azide가 포함된 PBS(PBS-FCS)에 부유시킨 세포를 항Fas 항체(CH-11)와 4°C에서 20분간 반응시킨 후 0.2% sodium azide가 포함된 PBS로 세척하였다. 이어 FITC가 표지된 anti-mouse IgM과 반응시킨 다음 세척하고 유세포분석기로 형광을 관찰하였다.⁴³

7. RT-PCR

세포를 500 μ L 용해액 [4 M guanidine thiocyanate, 25 μ M sodium acetate(pH 7.0), 0.5% sodium sarcosine, 100 mM 2-ME]에 용해시킨 다음 guanidium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용하여 total RNA를 추출하였다.⁴⁴ 94°C에 10분간 방치하여 변성시킨 RNA를 모형으로 cDNA synthesis kit(Phar-

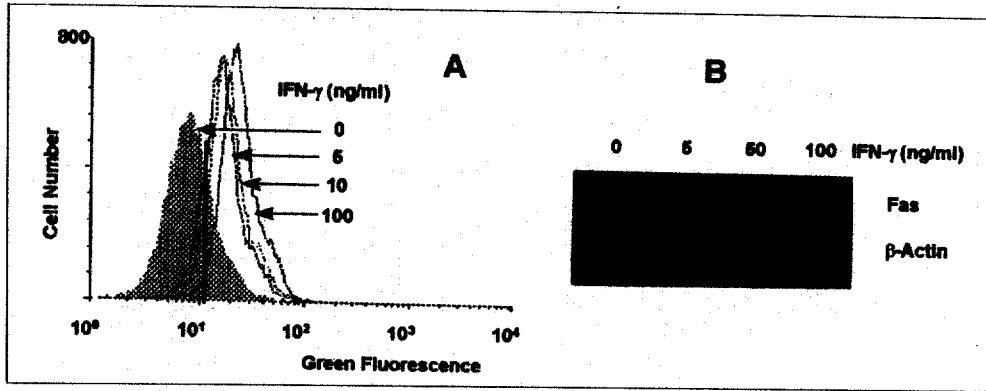


Fig. 2. Histogram analysis of Fas protein expression (A) and RT-PCR for Fas mRNA expression of HT-29 treated with IFN- γ (B). HT-29 was treated with 40 ng/mL IFN- γ for 6 hours and cultured overnight with fresh media. On the following day, cell surface Fas protein expression was flow cytometrically measured using mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody and FITC-conjugated goat IgG anti-mouse IgM antibody. Shaded area represents control HT-29. Vertical bar denotes separation between Fas expressing HT-29 from non-expressing cells. Fas mRNA expression of HT-29 was assessed by RT-PCR. HT-29 was treated with various doses of IFN- γ for 4 hours and total RNA was extracted which was reverse transcribed and amplified.

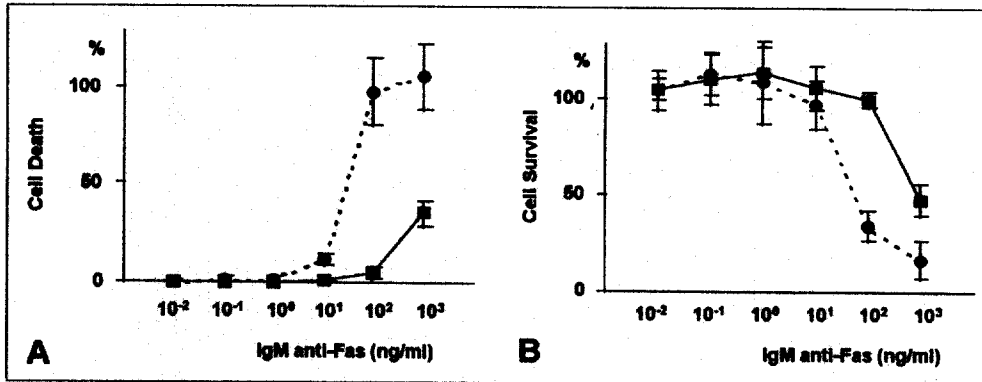


Fig. 3. Fas-mediated cell death measured by LDH assay (A) and effect of Fas ligation on the cell survival measured by MTT assay (B). For LDH assay, various doses of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody were added to control and IFN- γ pretreated HT-29 for 24 hours and then LDH in the culture media was measured. For MTT assay, various doses of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody were added to control and IFN- γ pretreated HT-29 for 24 hours and then cell survival was measured with tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay.

macia 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 $^{\circ}$ C 1분, 59 $^{\circ}$ C 1분, 및 72 $^{\circ}$ C 1분으로 하여 thermal cycler(Perkin-Elmer)로 28회 반응시켰다. 증폭산물은 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다.

Primer는 DNA 합성기로 제작하였는데 그 염기서열은 다음과 같다.

Fas(400 bp)

5'-CGGAGGATTGCTCAACAAC-3'

5'-TTGGTATTCTGGGTCCG-3'

β -Actin(250 bp)

5'-CGTGGGCCCGCCCTAGGCACCA-3'

5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'

Fig. 4. Cell and nuclear morphology of control and apoptotic cells observed by phase contrast microscopy (A, C; $\times 200$), fluorescent microscopy after staining with propidium iodide(B, E; $\times 400$), and confocal microscopy after staining with DAPI (C, F; $\times 1,000$). (A, B, C) Control HT-29. (D, E, F) HT-29 was 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.

결 과

1. IFN- γ 전처치에 의한 HT-29의 Fas 발현 증감

항Fas 단일클론항체(CH-11)와 유세포분석기를 이용하여 세포표면의 Fas 발현을 측정한 결과 IFN- γ 전처치하지 않은 대조 HT-29의 약 20~30%는 세포표면에 Fas단백을 발현하고 있었으며 IFN- γ 전처치에 의하여 용량 의존적으로 Fas단백 발현이 증강되었다(Fig. 2A). RT-PCR로 측정한 Fas mRNA도 같은 양상을 보였는데 IFN- γ 전처치하지 않은 대조세포도 Fas mRNA를 발현하고 있었고 이는 IFN- γ 전처치에 의하여 용량 의존적으로 증강되었다(Fig. 2B).

2. IFN- γ 전처치에 의한 HT-29의 Fas 매개 세포독성 및 세포생존률 변화

IFN- γ 전처치한 HT-29에서는 IgM 항Fas 단일클론항체(CH-11)로 Fas를 ligation하면 항체의 용량에

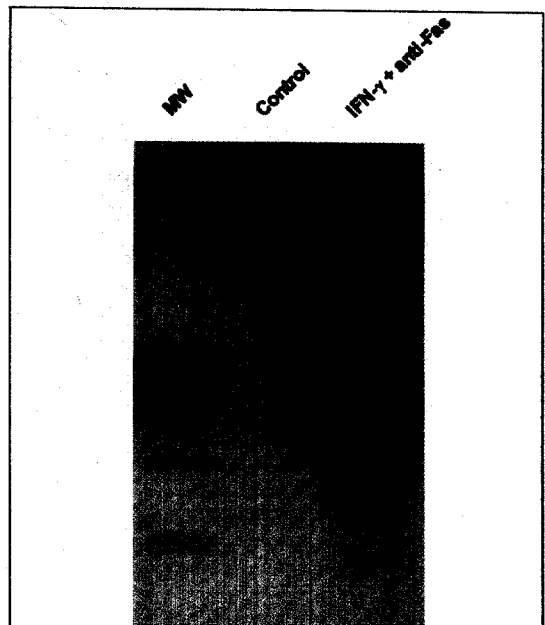


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from control and apoptotic HT-29 induced by Fas ligation in IFN- γ pretreated cells.

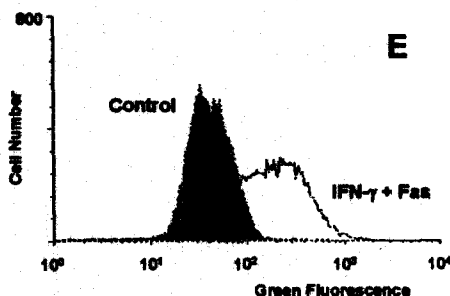


Fig. 6. Phase contrast (A, C) and fluorescent microscopic (B, D) appearances and histogram analysis of DNA fragmentation of control and apoptotic cells after TUNEL stain (E). (A, B) Control HT-29. (C, D) HT-29 was pretreated with 40 ng/mL IFN- γ for 6 hours and cultured overnight with fresh media. On the following day, cells were incubated with 50 ng/mL of mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody for 24 hours. For flow cytometric analysis of TUNEL assay, FITC-conjugated dUTP was nick labeled with terminal deoxynucleotidyl transferase and green fluorescence was measured with a FACStar fluorescence-activated flow cytometer(Becton Dickinson). Shaded area represents control HT-29.

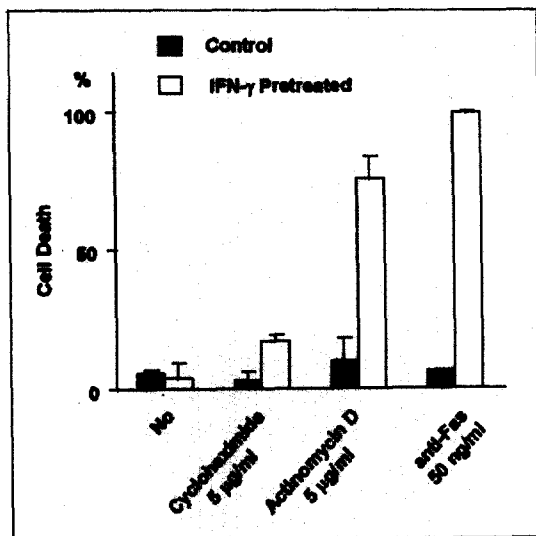


Fig. 7. Effect of cycloheximide and actinomycin D on cell death of control and IFN- γ pretreated HT-29. Cycloheximide(5 mg/mL), actinomycin D(5 mg/mL), or mouse IgM anti-human Fas monoclonal antibody(50 ng/mL) was added to control and IFN- γ pretreated HT-29 for 24 hours and cell death was measured by trypan blue dye exclusion assay.

비례하여 LDH assay로 측정된 세포독성이 증가하였으나 IFN- γ 전처치하지 않은 대조 HT-29에서는 세포독성을 거의 보이지 않았다(Fig. 3A). MTT assay

로 측정된 세포생존률도 같은 양상으로, IFN- γ 전처치한 HT-29에서는 항체의 용량에 비례하여 세포생존률이 감소하였으나 IFN- γ 전처치하지 않은 대조 HT-29에서는 생존률이 거의 감소하지 않았다(Fig. 3B).

3. Fas ligation에 의한 HT-29의 사멸 유도

세포생존률의 감소 또는 세포독성의 증가가 세포의 사멸에 의하는지 알아보기 위하여 세포 및 핵의 형태와 DNA fragmentation 여부를 관찰하였다. 위상차현미경으로 세포의 형태를 관찰하면 IFN- γ 전처치한 HT-29에서 30 ng/mL의 IgM 항Fas 단일클론항체(CH-11)로 Fas를 ligation하여 사멸을 유도한 세포는 대조세포에 비하여 세포의 크기가 작고 모양이 둥글며 부유세포가 많았다(Fig. 4A, D). PI염색에서 사멸세포는 핵이 작고 fragmentation되어 있었으며(Fig. 4B, E), DAPI염색에서 크로마틴이 농축되어 핵막쪽으로 모인 형태를 잘 관찰할 수 있었다(Fig. 4C, F). 그러나 IFN- γ 처치 또는 Fas ligation 단독은 사멸을 유발하지 않았다.

세포로부터 추출한 DNA를 agarose gel에 전기영동한 결과 Fas를 ligation하여 사멸을 유도한 세포에서는 DNA가 180 bp의 배수인 oligomer로 절단되어 특징적인 사다리 형태를 보였다(Fig. 5). TUNEL

assay에서도 같은 양상으로 형광현미경으로 관찰하였을 때 대조세포에는 형광이 표지되지 않았으나 (Fig. 6A, C) 사멸세포의 상당수에서 형광이 표지되었으며 (Fig. 6B, D), 유세포분석기로 측정하였을 때 대조세포에 비하여 사멸세포의 평균형광강도가 높았다 (Fig. 6E).

4. IFN- γ 전처리한 HT-29의 Fas 매개 사멸에서 macromolecule 합성의 필요성

Fas에 의한 세포사멸에서 macromolecule의 합성이 필요한지를 알아보기 위하여 CH-11 투여 30분 전에 5 μ g/mL의 cycloheximide 및 actinomycin D를 첨가하고 trypan blue 배제법으로 사멸을 측정한 결과 IFN- γ 전처리한 HT-29에서는 각각 17%와 76%의 세포가 죽었으나 IFN- γ 전처리 않은 세포에서는 cycloheximide 및 actinomycin D를 첨가하여도 세포가 죽지 않았다 (Fig. 7).

고 찰

Fas는 T- 및 B-세포, 섬유아세포, 흉선, 간, 폐, 심장 및 난소 등의 정상 세포 및 조직과 여러 종류의 암세포에서 발견되는데 감수성이 있는 세포에서 사멸을 유발하는 신호를 전달한다. 면역계에 있어서 Fas 및 FasL에 의한 세포사멸은 흉선에서의 T-세포의 선택, 면역반응의 감쇠(down-regulation) 및 T-세포에 의한 세포독성에 관여하므로,²²⁻²⁴ Fas 및 FasL에 의한 세포사멸에 장애가 생기면 자가항원에 반응하는 T-세포가 제거되지 않고 축적되므로 자가면역 질환이 발생하게 된다.^{27,30,45} 최근에는 Fas를 통한 신호가 T-세포 수용체를 통한 자극 대한 보조자극인자로도 작용하여 T-세포의 활성화와 증식을 유발함이 보고되어 Fas의 생리적 기능은 사멸을 유발하는 효과에 국한되지 않고 세포 활성화에도 관여한다는 사실이 알려지게 되었다.²³ Fas 및 FasL에 의한 세포사멸은 면역계 이외의 조직에서도 사멸의 조절에 관여한다. 예를들면 간세포는 Fas를 발현하고 있으며,²⁷ 마우스 복강내로 항Fas항체를 주입하면 간세포의 사멸이 유발되고,⁴⁶ 만성간염에서 림프구가 침윤되는 부위에 Fas발현이 증가된다는 점⁴⁷ 등은 Fas가

간세포의 사멸조절에 관여하리라 시사하는 소견이며,^{48,49} 염증성 피부질환에서도 Fas매개 세포사멸의 역할이 중요시 되고 있다.⁵⁰

면역계 세포에 비하여 상피세포에서 Fas에 대한 연구는 아직까지 미미한데 대장암세포주인 HT-29에서 Fas를 ligation하면 IL-8 산생을 유도하므로²¹ HT-29의 표면에 Fas가 발현되고 있다는 사실은 분명하다. 본 연구에서도 유세포분석기로 측정한 결과 IFN- γ 전처리하지 않은 대조 HT-29의 20~30%는 세포표면에 Fas단백을 발현하고 있었으며 Fas mRNA도 발현하고 있었다 (Fig. 2A). Fas 발현은 IFN- γ 에 의하여 증강된다는 사실이 알려져 있는데,^{19,21,50,51} 본 연구에서도 IFN- γ 에 의하여 Fas단백과 mRNA 발현이 모두 증강되었다 (Fig. 2A, B).

Fas를 발현하고 있는 세포라 할지라도 Fas에 의한 사멸이 꼭 일어나는 것은 아니고 감수성이 있는 세포에서만 사멸이 유발되는데 감수성을 가름하는 인자는 아직까지 분명하지 않다. 예를들면 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 일어난다.⁴⁸ 본 연구에서도 IFN- γ 전처리하지 않은 대조 HT-29에서는 Fas ligation에 의한 사멸이 유발되지 않았으나, IFN- γ 전처리한 HT-29에서는 투여한 IgM 항Fas항체의 농도에 비례하여 사멸이 유발되었다 (Fig. 3). Fas를 발현하고 있는 모든 세포에서 Fas 매개 세포사멸이 유발되지 않는 이유는 분명하지 않다. 전술한 바와 같이 Fas를 발현하고 있는 대조 HT-29에 항Fas항체로 Fas를 ligation하면 사멸은 유발되지 않으나 IL-8 산생은 유도되며, Fas ligation이 T-세포 수용체에 대한 보조자극인자로 작용함은 비록 사멸을 유발하는 신호는 아니지만 Fas를 통한 어떤 기증적인 신호가 세포내로 전달됨을 의미한다. 같은 맥락으로 IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸이 유발되는 이유 또한 불명하다. 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.

세포사멸의 기전 및 조절에 대한 지식이 급속하게 축적되고 있음에도 불구하고 세포내의 생화학적 변화에 대하여 알려진 바는 미미하다. 과거 cycloheximide나 actinomycin D 등의 macromolecule 합성 억제제에 의하여 세포사멸이 예방 또는 지연된다는 관찰에 근거하여 사멸을 유발하는 특이한 유전자가 존재할 것이라는 가설이 성립되었으나 이후의 연구에서 사멸은 macromolecule의 합성 없이도 일어날 수 있고 심지어 어떤 경우에는 macromolecule 합성 억제제가 사멸을 유발할 수도 있다는 사실이 알려졌다. 따라서 최근에는 사멸을 유발하기 위하여 세포내에서 macromolecule 합성을 필요로 하는지의 여부에 따라 세포사멸을 유도경로(induction pathway), 유리경로(release pathway) 및 전달경로(transduction pathway)로 나누고 있다.⁵² 새로운 유전자가 발견되고 단백질이 합성되어야 세포사멸이 일어나는 것을 유도경로라 하는 한편 단백질이나 mRNA 합성을 억제할 때 사멸이 유발되는 현상을 유리경로라고 부른다. 후자의 경우에는 사멸을 유발시키는 경로는 항상 발현되어 있는데 이는 수명이 매우 짧은 억제자에 의하여 정지되어 있다가 macromolecule 합성 억제제에 의하여 사멸 억제자가 소멸되면 사멸이 유발되는 것을 말한다. 마지막의 전달경로는 macromolecule 합성의 억제 여부와 무관한 세포사멸을 일컫는데 세포독성 T세포 매개 사멸이 그 예이다.

본 연구에서 IFN- γ 전처리한 HT-29에 단백질 합성을 억제하는 cycloheximide 또는 mRNA 전사를 억제하는 actinomycin D를 첨가하면 사멸이 유발되어(Fig. 7) 유리경로의 가능성이 제시되었으며 IFN- γ 전처리로 Fas 발현이 증강되고 이에 따라 Fas를 통한 신호의 강도가 증대되어 사멸이 일어날 수 있는 역치를 넘게 된다는 가능성을 배제할 수 있었다. 그러나 cycloheximide는 단백질 합성을 억제할 뿐만 아니라 세포내 신호전달경로를 활성화시키는 기능도 가지므로⁴⁸ 사멸 보조자극인자(apoptotic costimulator)라고도 불린다는 사실을 감안하면 IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸이 유발되는 이

유에 대한 설명 중 IFN- γ 에 의하여 활성화된 세포에서는 Fas를 통한 신호의 질적 변화가 초래된다는 가설 또한 배제할 수 있다. 따라서 IFN- γ 전처리한 HT-29에서 Fas 매개 세포사멸이 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. 그러나 IFN- γ 에 의하여 세포가 활성화되면 구체적으로 어떤 변화가 일어나는지 또한 그 중 어떤 변화가 Fas 매개 세포사멸에 대한 감수성을 증가시키는지는 추후 규명하여야 과제인데, IFN- γ 가 HT-29에서 c-myc 등 사멸과 연관된 유전자 또는 bcl-2 등 사멸 억제 유전자의 발현에 미치는 영향이 그 중 한 분야이다.

활성화된 T-세포 및 NK세포에 의하여 생성되는 IFN- γ 는 다양한 기능을 가진 사이토카인으로서 단핵구 및 대식세포 등 여러 종류의 면역세포를 활성화 시켜⁵³ 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 증강시킨다.⁵⁴ 대장암세포주 HT-29에서 IFN- γ 가 Fas 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 Fas 매개 세포사멸도 증강시킨다는 본 연구의 결과는 IFN- γ 가 증가하는 염증성장질환의 병태생리에 Fas 매개 세포사멸이 관여할 가능성을 시사한다. 상피세포와 상피세포의 염증성 질환에서 Fas와 FasL의 생리적 기능에 대한 이해를 넓히기 위해서는 Fas와 FasL에 대한 추후의 연구가 기대된다.

요 약

목적: 다세포 생물의 항상성은 세포의 증식과 사멸의 균형에 의하여 유지된다. Fas(APO-1, CD95)는 세포표면에 발현되는 수용체로서 감수성이 있는 세포에서 사멸을 유발하는 신호를 전달한다. 면역계에서 Fas 매개 세포사멸에 대한 연구는 많으나 상피세포에 대한 효과는 거의 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 대장암 세포주인 HT-29에서 발현되는 Fas가 세포의 사멸에 기능적으로 관여하는지를 알아

보고 Fas가 HT-29에서 사멸을 유발한다면 IFN- γ 전처치가 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 세포표면의 Fas 단백 발현과 Fas mRNA 발현은 각각 유세포분석과 RT-PCR로 측정하였으며 세포독성과 세포생존률은 각각 LDH assay와 MTT assay로 정량하였다. 세포의 형태는 위상차 현미경으로 관찰하였고 핵의 형태는 PI 및 DAPI 염색 후 형광현미경 또는 confocal microscopy로 관찰하였다. 세포사멸의 특징인 DNA fragmentation은 agarose gel 전기영동과 TUNEL assay로 확인하였으며 세포내의 DNA 양은 PI 염색 후 유세포분석기로 측정하였다. **결과:** 대조 HT-29은 Fas 단백질과 mRNA를 발현하고 있었으나 IgM 항Fas항체로 Fas를 ligation하여도 사멸이 유발되지 않았다. IFN- γ 전처치에 의하여 Fas 단백질과 mRNA 발현이 증가되었으며, 용량 의존적인 Fas 매개 세포사멸이 유발되었다. IFN- γ 전처치한 HT-29에서는 항Fas항체 뿐만 아니라 cycloheximide와 actinomycin D에 의해서도 사멸이 유발되었다. **결론:** HT-29이 발현하고 있는 Fas는 사멸을 유발하기 위한 충분조건이 되지 못하고 Fas 매개 사멸이 일어나기 위해서는 IFN- γ 에 의한 세포의 활성화가 필요하다. IFN- γ 에 의한 세포의 활성화 즉, 사멸 증가 효과는 IFN- γ 에 의한 Fas 발현 증가 뿐만 아니라 아직까지 밝혀지지 않은 다른 기전도 복합적으로 작용하여 유발되는 현상이다. 상피세포에서 Fas 매개 세포사멸의 생리적 기능에 대한 이해를 넓히기 위한 추후의 연구가 기대된다.

색인 단어: 세포사멸, Fas, HT-29, IFN- γ

참 고 문 헌

1. 김원호 세포사멸과 질병. Med Postgraduates 1996; 24:275-288.
2. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 1995;267:1445-1449.
3. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca^{2+} -dependent T cell-mediated cytotoxicity. J Exp Med 1993;177:195-200.
4. Oshimi Y, Miyazaki S. Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic Ca^{2+} level. J Immunol 1995;154:599-609.
5. Mountz JD, Zhou T, Wu J, Wang W, Su X, Cheng J. Regulation of apoptosis in immune cells. J Clin Immunol 1995;15:1-16.
6. Schwarz LM, Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol Today 1993; 14:582-590.
7. Haake AR, Polakowska RR. Cell death by apoptosis in epidermal biology. J Invest Derm 1993;101:107-112.
8. Schulte-Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grasl B, Oberhammer F, Wagner A. Programmed cell death and its protective role with particular relevance to apoptosis. Toxicol Lett 1992;64-65:569-574.
9. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-1462.
10. Watson AJM. Necrosis and apoptosis in the gastrointestinal tract. Gut 1995;37:165-167.
11. McDonald GB, Shulman HM, Sullivan KN, Spencer GD. Intestinal and hepatic complications of human bone marrow transplantation. Gastroenterology 1986; 90:460-477.
12. Lee FD. Importance of apoptosis in the histopathology of drug related lesions in the large intestine. J Clin Pathol 1993;46:118-122.
13. Kotler DP, Weaver SC, Terzakis JA. Ultrastructural features of epithelial cell degeneration in rectal crypts of patients with AIDS. Am J Surg Pathol 1986;10:531-538.
14. Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. J Immunol 1988;141:2629-2634.
15. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell 1993;75:1169-1178.
16. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas(CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implication for the regulation of apoptosis in

- neutrophils. *J Exp Med* 1996;184:429-440.
17. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 1994;6:1567-1574.
 18. Behrmann I, Walczak H, Krammer PH. Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol* 1994;24:3057-3062.
 19. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233-243.
 20. 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* 1992; 267:10709-10715.
 21. 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;169:1747-1756.
 22. Richardson BC, Lalwani ND, Johnson KJ, Marks RM. Fas ligation triggers apoptosis in macrophage but not endothelial cells. *Eur J Immunol* 1994;24:2640-2645.
 23. Alderson M, Armitage RJ, Maraskovsky E, et al. Fas transduce activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 1993;178:2231-2235.
 24. Ju ST, Cui H, Panka DJ, Ettinger R, Marshak-Rothstein A. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4⁺ Th1 and CD8⁺ cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4185-4189.
 25. Vignaux F, Golstein P. Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway. *Eur J Immunol* 1994;24:923-927.
 26. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Nature* 1995;267:1449-1456.
 27. Watanabe-Fukunaga R, Branman CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;356:314-317.
 28. 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* 1994;24:1181-1185.
 29. Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Tough TW, Alderson MR, Lynch DH. *gld/gld* mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol* 1994;24:928-933.
 30. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1994; 268:1347-1349.
 31. Lionetti P, Breese E, Braegger Cp, Murch SH, Taylor J, MacDonald TT. T-cell activation can induce either mucosal destruction or adaptation in cultured human fetal small intestine. *Gastroenterology* 1993;105:373-381.
 32. Garside P, Bunce C, Tomlinson RC, Nichols BL, Mowat AM. Cytokine analysis of enteropathy induced by tumor necrosis factor alpha. *Cytokine* 1993;5:24-30.
 33. Plevy SE, Targan SR, Andus T, Toyoda H. TNF- α mRNA levels differentiate mucosal inflammation in Crohn's disease from ulcerative colitis. *J Immunol* 1993;150:10A.
 34. Breese E, Michie CA, Nicholls SW, et al. Tumor necrosis factor- α producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106:1455-1466.
 35. Derkx B, Taminiou J, Radema S, et al. Tumor necrosis factor antibody treatment in Crohn's disease. *Lancet* 1993;342:173-174.
 36. 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* 1991;83:79-84.
 37. Ruggiero V, Tavernire J, Fiers W, Baglioni C. Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon- γ . *J Immunol* 1986;136:

2445-2450.

38. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983;64:313.
39. 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* 1988;15:61-69.
40. 김원호, 이관식, 문영명, 등. 배양된 위암세포에 대한 desferrioxamine 및 항암제의 병합효과. *대한소화기병학회지* 1993;25:46-60.
41. Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47:936-945.
42. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:795-808.
43. Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, et al. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992;149:3753-3758.
44. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 1987; 162:156-159.
45. Adachi M, Suematsu S, Suda T, et al. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2131-2136.
46. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993;364:806-809.
47. Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1994;19:1354-1359.
48. Natoli G, Ianni A, Costanzo A, et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Oncogene* 1995;11:1157-1164.
49. 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;149:429-437.
50. Matsue H, Kobayashi H, Hosokawa T, Akitaya T, Ohkawara A. Keratinocytes constitutively express the Fas antigen that mediates apoptosis in IFN- γ -treated cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1995;287:315-320.
51. Takahashi H, Kobayashi H, Hashimoto Y, Matsuo S, Iizuka H. Interferon- γ -dependent stimulation of Fas antigen in SV40-transformed human keratinocytes: modulation of the apoptotic process by protein kinase C. *J Invest Dermatol* 1995;105: 810-815.
52. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995;21:1725-1741.
53. Trinchieri G, Perussia B. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 1985;6:131-136.
54. Oullet S, Müller E, Rola-Pleszczynski M. IFN- γ up-regulates platelet-activating factor receptor gene expression in human monocytes. *J Immunol* 1994; 152: 5092-5099.