

인체 종양 세포에서 N-acetyl Phytosphingosine에 의한 세포사멸 및
방사선 민감도 증가

Apoptosis and Radiosensitivity Induced by N-acetyl
Phytosphingosine, in Human Cancer Cell Line

김윤화, 김기성, 한영수, 전수진, 송지영, 정인성, 홍성희, 박장서*, 윤연숙

원자력의학원

서울시 노원구 공릉동 215-4

*두산바이오텍

경기도 용인시 성북동 39-3

요 약

ceramide는 세포 내 성장, 분화 및 사멸 등의 신호전달에 중요한 지질 분자이다. 이온화 방사선에 의한 세포 사멸은 세포 내 ceramide의 축적과 밀접한 관련이 있고, 특히 sphingomyelinase가 결핍되면 세포는 방사선에 내성을 지니는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 N-acetyl-sphingosine (C₂-Ceramide) 및 그 유도체인 N-acetyl-phytosphingosine (NAPS)이 림프종인 Jurkat 세포와 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포를 사멸시키는 효능 및 작용 기전을 연구하고 NAPS에 의해 종양 방사선 민감도가 증가하는지 관찰하였다. NAPS 및 C₂-ceramide에 의한 세포사멸은 시간 및 농도 의존적으로 증가하며 caspase 3 및 8의 활성을 증가시켰다. 그러나 NAPS에 의한 세포사멸이 더욱 효과적이었으며 caspase의 활성 증가도 NAPS에 의해 더욱 효과적으로 유도되었다. 그 뿐 아니라 NAPS는 방사선을 조사한 세포의 colony 형성 능력을 더욱 감소시키고, 방사선에 의한 세포 사멸은 증가시켰으며 이러한 세포 사멸은 caspase의 활성 증가에 의한 것으로 생각된다. 그러므로 NAPS는 방사선에 의한 세포사멸을 증가시킬 수 있는 새로운 형태의 방사선 민감제 개발을 위한 선도물질로서 이용가능성을 지니고 있다.

Abstract

Ceramide is a key lipid molecule in signal transduction with a role in various

regulatory pathways including differentiation, proliferation and especially apoptosis. Ionizing radiation-induced apoptosis is associated with accumulation of ceramide, and the sphingomyelinase deficiency results in radioresistance. We investigated the exogenous treatment of N-acetyl-phytosphingosine (NAPS), an analogue of N-acetyl-sphingosine (C_2 -Ceramide), and C_2 -ceramide exert apoptotic effect on human T cell lymphoma Jurkat cells and breast cancer cell line MDA-MB-231. NAPS and C_2 -Ceramide has cytotoxic effect in time- and dose-dependent manner, and increased caspase-3, 8 activity. However, NAPS induced apoptosis more effectively, and increased caspase activity induced by NAPS is more higher than C_2 -ceramide. Moreover, NAPS decreased clonogenicity of irradiated cells and increased radiation-induced apoptosis significantly. Increased cell death by irradiation in the presence of NAPS is owing to the increase of caspase activity. These data suggest that NAPS might be used for lead as a new type of radiosensitizing agent increasing radiation-induced apoptosis.

1. 서론

세라마이드는 sphingolipid의 대사산물로서 세포의 증식, 분화, 사멸 등의 다양한 세포 조절 기전에서 중요한 역할을 하는 신호전달 물질로서(1,2), cytokine, 항암제, 방사선 등의 자극에 의하여 세포내에서 *de novo* pathway 혹은 sphingomyelinase (SMase)에 의하여 세포막의 sphingomyelin이 가수분해 되어 생성 된다 (3-6). 방사선에 의한 세포의 사멸은 DNA의 손상이 주요 원인이라고 생각되어 왔으나, 최근 방사선에 의하여 세포 내 생성되는 ceramide의 양과 세포의 방사선 민감도가 직접적인 관련이 있다는 것이 알려졌다 (7). 방사선에 내성이 있는 세포는 세라마이드 대사 경로 이상으로 세라마이드가 생성이 결핍되어 있거나 생성 양이 매우 적으면서 apoptosis가 유도되지 않는다고 알려져 있는데 (8), 이런 종양 세포의 경우 방사선에 의한 종양치료효능이 저조하다. 방사선을 이용한 종양치료 방법은 전체 종양치료법의 30-50%에 이르는 중요한 방법이므로 방사선에 의한 apoptosis를 촉진시킬 수 있는 방법을 찾아 종양 치료효율을 증가시키는 것은 방사선 치료효율을 증가시킬 수 있는 주요 방법이 될 수 있다 (8,9).

Phytosphingosine (Phytoceramide)은 세라마이드와 구조적으로 매우 유사하지만 sphingosine backbone의 탄소원자 4-5번이 이중결합을 하고 있는 C_2 -ceramide와는 달리 4번 위치에 hydroxyl residue를 갖고 있다. 세라마이드에 비해 phytoceramide의 세포내 기능이 거의 알려지진 않았지만 최근 yeast *Saccharomyces cerevisiae*에서 세포성장과 stress반응에서 조절 매개체로서 작용한다고 알려지고 있고, mammalian cell에서 apoptosis를 유발시킨다는 보고가 있다. (6,10-12).

본 연구에서는 세라마이드와 유사한 물질로서 식물에서 분리한 phytosphingosine을 합성하여 만든 유도체인 NAPS (N-acetyl-Phytosphingosine)의 apoptosis 유도 효능을 C2-ceramide와 비교, 세포사멸을 일으키는 신호전달에 어떠한 차이를 보이는지 알아보고, NAPS를 처리함으로써 방사선에 의한 종양 살해능이 증가되는지 확인하고자 하였다.

2. 방 법

(1) 실험 재료

C₂-ceramide는 Alexis Biochemical에서 구입하였으며, C₆-phytoceramide, C₈-phyto-ceramide, C₂-phytosphingosine (NAPS)는 Doosan bio-tech.에서 공급받아 사용하였다. 세포사멸 정도측정을 위해 Annexin V-FITC apoptosis detection KIT I을 사용하였고 Caspase-3 Substrate I과 Caspase-8 Substrate I은 Colorimetric Caspase activity측정에 사용되었다. western blotting에서는 PARP(BD PharMingen)를 사용하였다.

(2) 세포배양

MDA-MB-231의 배양은 RPMI 1640 배지에 10%의 FBS를 첨가하여 사용하였으며 5 % CO₂, 37 °C에서 배양하였다. 세포에 NAPS, C₂-ceramide를 처리하는 경우 0.5 % FBS를 첨가한 배지를 사용하였다.

(3) 세포 생존률 및 세포 독성 측정

세포를 0.4 % trypan blue dye에 염색하여 세포를 세어주거나 세포의 미토콘드리아 내 succinate-tetrazolium reductase에 의해 용해성의 tetrazolium염이 불용성의 formazan침전물로 전환되는 특성을 이용한 MTT assay를 실시하였다.

(4) Colony 형성 실험(Clonogenic Assay)

6 cm 배양 접시에 세포를 접종 한 후 방사선 단독 조사, 방사선과 PS 유도체를 병용처리한 후 10 %의 RPMI 1640 배지에서 7-14일 동안 계속 배양한다. 그 후 0.1 % methylene blue로 염색하여 방사선에 의한 세포 증식 억제능을 측정한다.

(5) FACS에 의한 세포사멸 정도 측정

PI (Propidium Iodide) 5 μ l 와 Annexin V-FITC 5 μ l 을 첨가하여 flow cytometry (Becton Dickinson)로 세포를 분석한다.

(6) DAPI staining

cytospin을 이용하여 세포를 slide에 잘 부착하고 3.7 % formaldehyde 용액에 30분간 고

정시킨다. 이 세포를 암실에서 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 DAPI 용액에 염색한 후 형광 현미경으로 관찰한다.

(7) Caspase 활성화 측정

세포에 Lysis buffer [100 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH7.5), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 % CHAPS]를 첨가하여 얼음에서 20분간 용해시켰다. 12,000 rpm으로 원심분리 후 상층액을 취하여 2 mM Caspase-3 Substrate(Ac-DEVD-pNA), 또는 Caspase 8 Substrate (Ac-IETD-pNA)을 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하면서 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(8) Western blotting

NAPS에 의한 세포 활성화 조절 단백질의 발현을 조사하기 위하여 배양 세포에 Lysis buffer [100 mM NaCl, 50 mM HEPES (PH 7.5), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 % CHAPS]를 넣고 20분간 얼음에서 용해한 뒤 12,000 rpm으로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리하여 상층액을 취하고 단백질 정량 kit (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 정량하였다. 각 well 당 30 μg 의 일정량의 단백질에 TNN buffer [40 mM Tris, 120 mM NaCl, 0.1 % NP-40 (pH 8.0)]와 5 \times sample buffer [60 mM Tris (pH6.8), 0.05 % 2-mercaptoethanol, 2 % SDS, 0.1 % Bromophenol blue, 25 % Glycerol]를 섞어 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 약 5분간 가열한 후 loading한다. Tris sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동하고 electrotransfer를 이용하여 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech., England)에 전이시켰다. Membrane을 TBS-T [150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.2 % tween-20 (pH7.5)]로 세척한 후 5 % skim milk로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 Blocking 하였다. Membrane을 실온에서 일차 항체 용액에 1시간 동안 처리하고 TBS-T buffer로 세척한 후, 이차 항체 용액에서 1시간 동안 처리한 후 TBS-T buffer로 세척하고 ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech., England)을 이용하여 단백질 발현을 조사하였다.

3. 결과

(1) MDA-MB-231에서 ceramide와 PS의 처리에 따른 세포 생존률

세라마이드와 Phytosphingosine은 sphingosine backbone에 붙어 있는 지방산의 탄소수에 따라 C₂, C₆, C₈ 등으로 나눌 수 있다. 이러한 phytosphingosine 유도체들의 종양세포 살해능을 알아보기 위해서 MTT Assay를 실행하였다. MDA-MB-231 세포에서 20 μM 의 농도에서 C₆-PS와 C₈-PS은 약 80 % 이상의 생존률을 보이는 반면 NAPS는 3 %의 생존률을 보임을 확인하였다 (Fig.1). 이 결과를 볼 때 아미노기에 붙은 탄소의 길이가 짧은 NAPS의 세포독성이 가장 큰 것을 알 수 있었다. 세포독성이 가장 큰 NAPS와 구

조적으로 유사한 C₂-ceramide의 생존률을 trypan blue exclusion assay를 통해 시간별로 비교하였다. 15 μM에서 3시간 후 NAPS는 30 % C₂-ceramide는 70 %의 생존률을 보이며 6시간 후 NAPS는 10 % C₂-ceramide는 30 %의 생존률을 보인다. 그러나 24시간 이후에는 두 가지 물질의 세포독성이 거의 비슷하였다 (Fig.2). 구조적인 유사성에도 불구하고 짧은 시간에서 이러한 세포독성에 차이가 나는 이유는 NAPS는 sphingosine backbone의 탄소 4-5번 위치에 이중결합 대신 hydroxyl group과의 단일결합을 하는 구조적인 차이에서 비롯된다고 여겨진다. 이 결과에서 C₂-ceramide뿐만 아니라 NAPS도 MDA-MB-231 세포에서 세포죽음에 중요한 매개체로 작용한다는 것을 알 수 있다.

(2) NAPS와 C₂-ceramide의 세포사멸 정도의 비교

Annexin V와 PI로 double staining하거나 DAPI로 염색하여 세포의 apoptosis를 관찰한 결과 NAPS에 의하여 농도별, 시간별로 apoptosis가 증가함을 알 수 있었다. 24시간동안 NAPS와 C₂-Ceramide를 농도별로 처리하여 본 결과 10 μM에서 20 %, 15 μM에서 40-50 %, 30 μM에서 60 % 이상의 세포사멸을 보였다 (Fig.3).

(3) NAPS에 의한 Caspase 활성화 및 PARP cleavage

NAPS와 C₂-ceramide를 처리한 세포의 caspase-3 및 caspase-8 활성을 substrate를 이용하여 측정하였다. 6시간 동안 처리한 결과 caspase-3의 활성화는 NAPS가 대조군에 비해 30 μM에서 5배까지 증가하며 C₂-ceramide는 대조군에 비해 30 μM에서 2.5배 증가함을 확인하였다 (Fig.4). 이 결과 NAPS는 C₂-ceramide에 비해 약 2배 caspase-3의 활성화가 증가함을 확인하였다. Caspase-8의 활성화는 30 μM에서 NAPS가 대조군에 비해 3배가 증가하였고, C₂-ceramide는 대조군보다 2배 정도 높았음을 확인하였다 (Fig.5). apoptosis 결과 caspase 활성화의 정도로 판단하건데 NAPS가 C₂-ceramide보다 apoptosis를 유도할 수 있는 성질이 더 뛰어남을 알 수 있었다. Caspase-3는 PARP의 윗 단계이므로 PARP의 잘림을 보기 위해서 western blotting을 이용한 결과 NAPS에 의해서 농도 의존적인 PARP 잘림을 관찰할 수 있었다 (Fig.6).

(4) NAPS와 방사선의 복합처리에 의한 방사선민감도 증진

MDA-MB-231 세포에 NAPS를 농도별로 처리했을 때 방사선 민감효과를 보기 위해서 clonogenic survival assay를 수행하였다. 방사선 2, 4, 6 Gy와 NAPS 2.5, 5, 8, 10 μM을 복합처리하여 방사선 민감효능을 보았다. 방사선 4 Gy를 단독으로 처리했을 때 Survival fraction=0.95 이고 NAPS를 농도별로 함께 처리하면 Survival fraction= 0.9, 0.7, 0.3, 0.1로 NAPS에 의해 최대 10배의 방사선 민감도가 증가하는 것을 관찰하여 NAPS가 종양세포의 방사선 민감도를 증가시킴을 확인할 수 있었다. (Fig.7).

(5) NAPS와 방사선의 복합처리에 의한 apoptosis 증가 및 caspase 3 활성화

MDA-MB-231 세포에 NAPS와 방사선 15 Gy를 복합처리 하였을 때 NAPS 15 μ M에서 방사선 단독보다 1.5배, NAPS 단독보다 1.5배 증가하였고, 30 μ M에서는 방사선 단독보다 3배, NAPS 단독보다 1.5배 증가하는 것을 확인하였다 (Fig.8). 또한 Caspase-3 활성은 NAPS단독처리 했을 때 보다 NAPS와 방사선 복합처리 했을 때 그 활성도가 더 증가했다. NAPS 10, 15 μ M에서 모두 NAPS 단독보다 방사선 15 Gy와 함께 처리했을 때 약 1.5배 caspase-3 활성도가 증가함을 관찰하여 NAPS를 처리한 후 방사선을 조사하면 cell death의 많은 부분이 apoptosis에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

세포증식과 사멸의 조절에 세라마이드가 중요한 역할을 한다고 많이 알려져 왔으나 효모 및 식물에 많이 분포한 phytosphingosine 유도체가 포유동물의 세포에 어떤 영향을 미치며 기능을 하는지에 대해서는 아직 알려지지 않았다.

NAPS는 세라마이드와 비교하여 sphingosine backbone의 탄소 4-5번 위치에 이중결합 대신 수소결합을 하고 있다. 이러한 이유로 CHO 세포에 대한 세포독성이 더 강하다는 보고가 있는 반면 (10) 다른 구조를 가졌음에도 불구하고 SK-N-BE(2)C 세포의 세포독성에서는 큰 차이가 나지 않는다는 보고도 있다 (6). 본 실험에서 사용한 MDA-MB-231 세포에서는 C₂-Ceramide와 NAPS가 세포독성 및 caspase 활성화 효능에 차이가 있었다. NAPS의 경우 caspase-3 활성도는 6시간만에 6배가 증가하고 caspase-8은 3배 정도 증가하는 것을 볼 수 있었으나 C₂-ceramide를 처리한 경우 Caspase 3, 8의 활성이 NAPS의 절반 이하로 나타나 caspase-3, 8의 활성이 C₂-ceramide에 의한 것보다 NAPS에 의해 훨씬 효과적으로 유도됨을 알 수 있었다.

방사선에 의해서 apoptosis 유도가 용이한 세포가 apoptosis가 일어나지 않는 세포보다 방사선에 대한 민감도가 훨씬 크므로 중량의 apoptosis 효율을 증가시켜 방사선 민감도를 증가시키는 것은 방사선 치료효율을 증가시킬 수 있는 방법이다 (13). NAPS의 apoptosis 유도 능력이 C₂-ceramide보다 우수하다는 것을 방사선에 내성이 크다고 알려져 있는 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에서 확인하고 NAPS의 처리와 함께 방사선을 조사한 결과 apoptosis가 NAPS 혹은 방사선 단독조사 시 보다 더욱 증가하였다. 효모를 통하여 대량생산이 가능한 NAPS를 선도물질(lead)로 하여 방사선 치료효율을 증가시킬 수 있는 약물 개발에 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

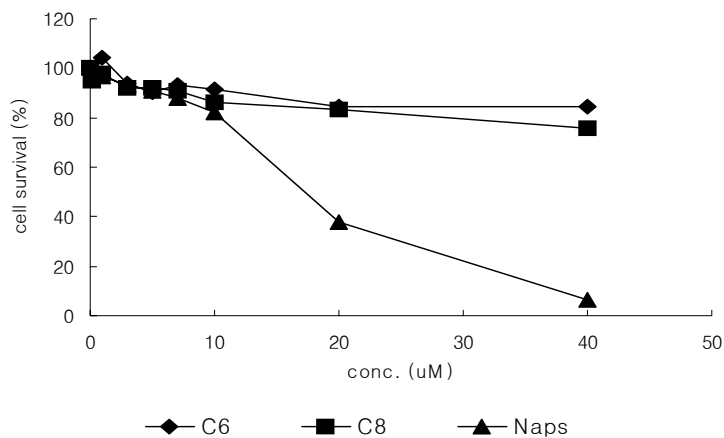


Fig.1. Various phytosphingosine analogues showed the cytotoxic effects in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were treated with indicated dose of ceramide analogues and cytotoxicity was measured by MTT assay after 2 days of treatment. Error bars represent standard error of the mean of three experiments.

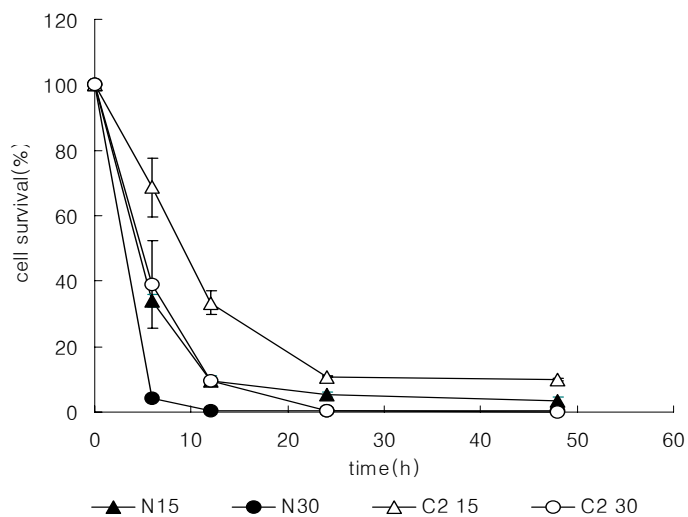


Fig.2. The cell viability is reduced by NAPS or C₂-ceramide dose and time dependently. MDA-MB-231 cells were treated with 15, 30 μ M of NAPS or C₂-ceramide and then harvested at 6, 12, 24 and 48 h for trypan blue dye exclusion assay. Error bar represent standard error of the mean of three experiments

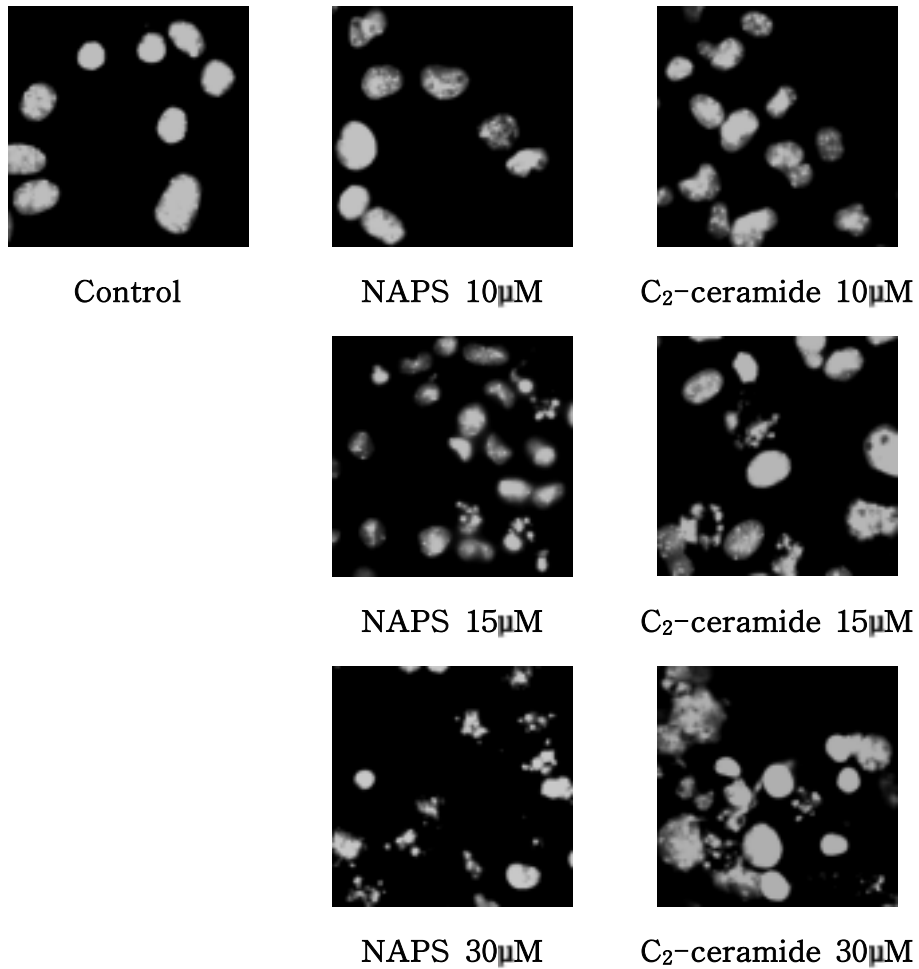


Fig.3. Apoptotic effect in MDA-MB-231 cells treated with 10, 15, 30 μM of NAPS or C₂-Ceramide. MDA-MB-231 cells were treated with various doses of NAPS or C₂-Ceramide. After 24 h, cells were harvested and stained with DAPI staining.

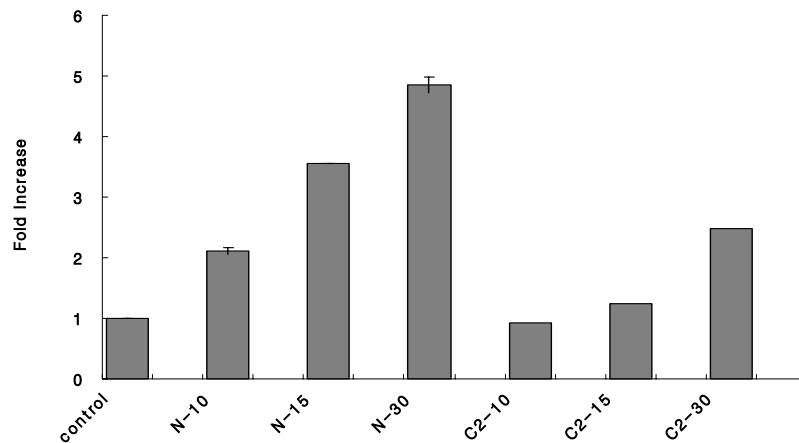


Fig.4. Caspase-3 activity increased by NAPS or C₂-Ceramide treatment. MDA-MB-231 cells were treated for 6 h with 10, 15, 30 μ M of NAPS or C₂-Ceramide. Lysated cells were prepared, and equal amounts of proteins were activated by caspase-3 substrate. Similar results were obtained in three independent experiments.

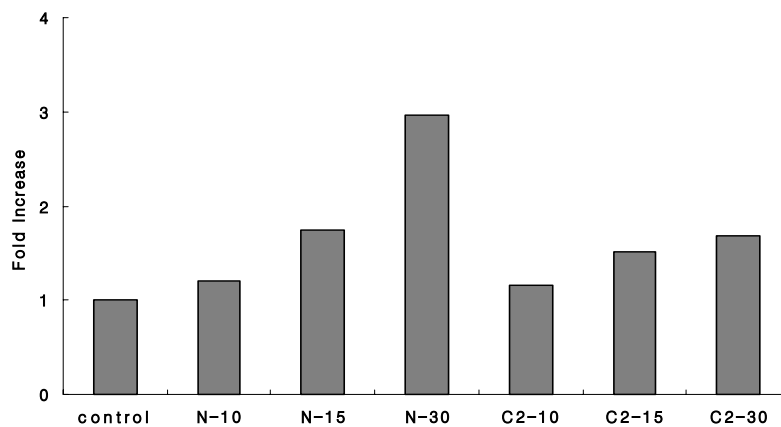


Fig.5. Caspase-8 activity increased by NAPS or C₂-Ceramide treatment. MDA-MB-231 cells were treated for 6 h with 10, 15, 30 μ M of NAPS or C₂-ceramide. Cell lysates were prepared, and equal amounts of proteins were activated by caspase-8 substrate. Similar results were obtained in three independent experiments.

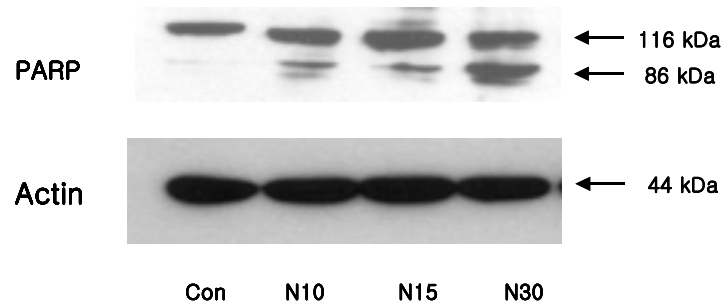


Fig.6. Western blotting for PARP in MDA-MB-231 cells treated with NAPS. MDA-MB-231 cells were treated 6 h with 10, 15, 30 μ M of NAPS. And then cell lysates were prepared and equal amounts of proteins were immunoblotted with anti-PARP antibody after separation SDS-PAGE (7.5% gels). Similar results were obtained in three independent experiments.

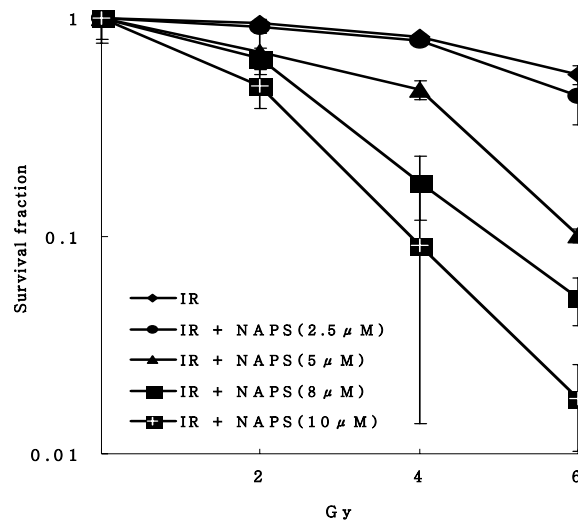


Fig.7. The Colony-forming ability of MDA-MB-231 cells after γ -irradiation is significantly decreased by the pretreatment with NAPS. NAPS was added into culture medium 18 h before irradiation, and colonies are stained with 1 % methylene blue in absolute methanol after 10 days of irradiation.

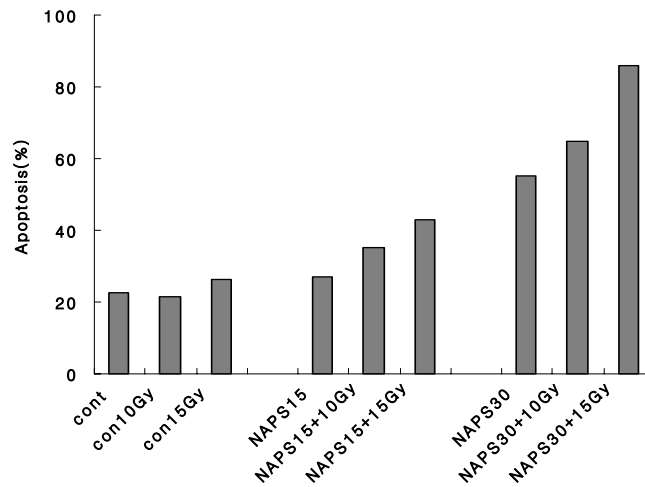


Fig.8. The pretreatment of NAPS increased sensitivity of MDA-MB-231 cells to radiation-induced apoptosis. MDA-MB-231 cells were grown, treated with or without 15, 30 μ M of NAPS, respectively, for 18 hr, and then incubated for another 6hr following 10, 15 Gy of irradiation. Cells were stained with propidium iodide and Annexin V, and then cells were analyzed by a fluorescence-activated cell sorter (FACS).

5. 참고 문헌

1. M. Macchia, S. Bertini, S. Fogli, E. Giovannetti, F. Minutolo, Simona Rapposelli, Rapposelli, Romano Danesi "Ceramide analogues in apoptosis: a new strategy for anticancer drug development." *Il Farmaco*. 58, 205-211 (2003).
2. M. Selzner, A. Bielawska, M. A. Morse, H. A. Rudiger, D. Sindram, Y. A. Hannun, and P. Clavien "Induction of Apoptotic Cell Death and prevention of Tumor Growth By Ceramide Analogues in Metastatic Human Colon Cancer." *Cancer Research* 61, 1233-1240 (2001).
3. M. Sawada, S. Nakashima, Y. Banno, H. Yamakawa, K. Takenaka, J. Shinoda, Y. Nishimura, N. Sakai, Y. Nozawa, "Influence of Bax of Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells." *Oncogene* 19, 3508-3520 (2000).
4. X. Wang, K. Ohnishi, A. Takahashi, T. Ohnishi, "Poly(ADP-ribosyl)ation is

- required for p53-dependent signal transduction induced by radiation." *Oncogene* 17, 2819-2825 (1998).
5. Y. A. Hannun "The Sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide." *The journal of Biological Chemistry* 269(5), 3125-3128 (1994).
 6. O. Hwang, G. Kim, Y. Jang, S. Kim, G. Choi, H. Choi, S. Jeon, D. Lee, and J. Lee "Synthetic phytoceramides induce apoptosis with higher potency than ceramides." *Mol Pharmacol.* 59(5), 1249-1255 (2001).
 7. V.E. Nava, O. Cuvillier, L. C. Edsall, K. Kimura, S. Milstien, E.P. Gelmann, and S. Spiegel "Sphingosine Enhances Apoptosis of Radiation-resistant Prostate Cancer Cells." *Cancer Research* 60, 4468-4474 (2000).
 8. A.P. Bruno, G. Laurent, D. Averbeck, C. Demur, J. Bonnet, A. Bettaieb, T. Levade, J.P. Jaffrezou "Lack of ceramide generation in TF-1 human myeloid leukemic cells resistant to ionizing radiation." *Cell death and differentiation* 5, 172-182 (1998).
 9. J.M. Michael, M.F. Lavin, D.J. Watters "Resistance to Radiation-induced apoptosis in Burkitt's Lymphoma cells is associated with defective ceramide signaling." *Cancer research* 57, 3600-3605 (1997).
 10. J.S. Lee, D.S. Min, C.S. Park, C.S. Park, and N.J. Cho "Phytosphingosine and C₂-Phytoceramide induce cell death and inhibit carbachol-stimulated phospholipase D activation in Chinese hamster ovary cells expressing the *Caenorhabditis elegans* muscarinic acetylcholine receptor." *FEBS letters* 499, 82-86 (2001).
 11. M.T. Park, J.A. Kang, J.A. Choi, C.M. Kang, T.H. Kim, S.W. Bae, S.M. Kang, S.J. Kim, W.I. Choi, C.K. Cho, H.Y. Chung, Y.S. Lee, and S.J. Lee "Phytosphingosine induces apoptotic cell death via caspase 8 activation and Bax translocation in human cancer cells." *Clinical cancer research* 9, 878-885 (2003).
 12. W.S. Han, J.Y. Yoo, S.W. Youn, D.S. Kim, K.C. Park, S.Y. Kim, K.H. Kim "Effects of C₂-Ceramide on the Malme-3M melanoma cell line." *Journal of Dermatological Science* 30, 10-19 (2002).
 13. E.J. Hall, *Radiobiology for the radiologist*, 5th ed., p. 44, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, (2000)