

Transforming Growth Factor- β 1이 악성림프종과 백혈병 세포주의 성장, *c-myc* mRNA 발현, Telomerase 활성에 미치는 영향

조선대학교 의과대학 병리학교실¹, 혈액종양 내과학교실²

이주호¹ · 이미자¹ · 전호중¹ · 홍찬표² · 박치영² · 정춘해²

Effect on Cell Growth, *c-myc* mRNA Expression and Telomerase Activity by Transforming Growth Factor- β 1 in Malignant Lymphoma and Leukemia Cell Line

Zhuhu Li, M.D.¹, Mi-Ja Lee, M.D.¹, Ho-Jong Jeon, M.D.¹, Chan-Pyo Hong, M.D.²,
Chi-Young Park, M.D.² and Choon-Hae Chung, M.D.²

Departments of ¹Pathology and ²Hematology-Oncology Division of Internal Medicine, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

Background: Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is known to be a potent growth inhibitor of many cell types, including most epithelial cells. However, the mechanism of TGF- β 1 action on cell growth in lymphomas and leukemia still remains to be elucidated. *c-myc* is a central regulator of cell proliferation and apoptosis, and telomerase is believed to play an important role in carcinogenesis. The aim of the study was to determine the effects of cell growth, *c-myc* gene expression and telomerase activity due to TGF- β 1 and examine its mechanism of action in lymphomas and leukemia.

Methods: The cell growths of Jiyoye (Burkitt lymphoma), H9 (T cell lymphoma), and CCRF-CEM (acute lymphocytic leukemia, T cell) cell lines due to TGF- β 1 were measured using the MTT assay. RT-PCR was also performed to monitor the expression of the *c-myc* gene in these cells with the telomerase activity measured using a TRAP assay.

Results: There was significant inhibition of cell growth in TGF- β 1 (5ng/mL) treated Jiyoye cells. When treated with TGF- β 1, the Jiyoye cells exhibited marked decreases in the levels of *c-myc* RNA and telomerase activity. However, TGF- β 1 treated H9 and CCRF-CEM cells showed no cell growth inhibition or reductions in the levels of *c-myc* mRNA and telomerase activity. The effect of TGF- β 1 on cell growth was noted to closely correlate with *c-myc* mRNA expression and telomerase activity.

Conclusion: These results suggest that TGF- β 1 may inhibit cell growth in Jiyoye cells by a mechanism involving down-regulation of the *c-myc* gene, which in turn, reduces the telomerase activity. (*Korean J Hematol* 2005;40:149-158.)

Key Words: Cell growth, *c-myc* genes, Telomerase, TGF- β 1, Lymphoma, Leukemia

접수 : 2005년 6월 2일, 수정 : 2005년 8월 26일

승인 : 2005년 8월 26일

교신저자 : 전호중, 광주광역시 동구 서석동 375번지

☎ 501-759, 조선대학교 의과대학 병리학교실

Tel: 062-230-6341, Fax: 062-234-4584

E-mail: hjjon@chosun.ac.kr

이 논문은 2004년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

Correspondence to : Ho-Jong Jeon, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Chosun University

375 Seoseok-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea

Tel: +82-62-230-6341, Fax: +82-62-234-4584

E-mail: hjjon@chosun.ac.kr

서론

암전환 성장인자 β (transforming growth factor beta, TGF- β)는 분자량이 25KD인 단백질로 다양한 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 현재 사람을 포함한 포유동물에서는 TGF- β 1, β 2, β 3의 세가지 아형이 밝혀져 있으며 이 중 TGF- β 1이 가장 많이 발견되고 잘 알려져 있다.¹⁾

TGF- β 1은 대부분의 상피세포를 포함한 여러 종류 세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으며²⁾ 그 기전으로 *c-myc* 유전자의 전사 억제가 보고되기도 하였다.³⁾ 또한 발암과정에도 중요한 역할을 하는데 특히 급성 림프구성 백혈병 발생에 TGF- β 1 신호전달과정의 하부인자 중 하나인 Smad의 비정상적인 발현 또는 소실이 관여한다고 알려지기도 하였다.^{2,4,5)} 그러나 악성림프종과 백혈병에서 TGF- β 1의 세포 성장 억제 효과 및 작용기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

c-myc 유전자는 세포성장, 증식과 분화를 조절하는 기능을 가지고 있다. *c-myc* 유전자의 증폭 또는 *c-myc* 단백질 과발현은 종양세포의 성장을 촉진하고 종양의 침윤, 분화, 예후와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다.^{6,7)} 또한 *c-myc* 암 유전자의 과발현은 human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promotor의 E-box와 결합하여 hTERT의 전사를 촉진시켜 종말체 효소(telomerase)를 활성화 시킨다고 보고되고 있다.⁸⁾

종말체(telomere)는 염색체의 말단에 존재하는 특수 구조로서 10~15Kb의 TTAGGG 반복서열과 단백질로 구성되어 있다. 종말체는 주로 염색체의 안정성을 높이고 DNA의 재결합을 방지하며 염색체의 복제에 관여한다.⁹⁾ 정상세포에서 세포분열이 반복되면 종말체가 짧아지는데 어느 수준이하로 짧아지면 세포분열이 더 이상 일어나지 않게 되지만 암세포에서는 종말체 효소 활성화로 세포분열에 따른 종말체 단축이 일어나지 않기 때문에 암세포가 계속 분열 증식하여 죽지 않게 된다.¹⁰⁾ 종말체 효소는 RNA-dependent DNA polymerase로써 염색체의 말단에 반복되는 telomeric repeat를 합성함으로써 세포분열로 인하여 짧아진 종말체 길이를 연장시켜 주는 중요한 역할을 담당하고 있다.¹¹⁾ 일부 세포를 제외한 거의 모든 정상세포나 조직에서 종말체 효소는 비활성화 되어 있지만 종양에서는 85% 이상이 활성화 되어 있어 종양 표지자로 인정받고 있다.¹²⁾

이에 본 연구에서는 악성림프종과 백혈병 세포주에

서 TGF- β 1이 세포성장과 종말체 효소 활성화에 미치는 영향과 *c-myc* 유전자와의 상관관계를 연구함으로써 TGF- β 1의 작용 기전을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 악성림프종과 백혈병 세포주 배양 및 형태학적 검색

Burkitt 림프종 세포주 Jiyoye, T세포 림프종 세포주 H9와 급성 T림프구성 백혈병 세포주 CCRF-CEM은 모두 한국세포주은행에서 분양받아 계대 배양을 통해 저장한 것을 사용하였다. 이 세포주들은 10%의 fetal bovine serum (FBS) (JBI, Daegu, Korea)과 1× antibiotic-antimycotic을 첨가한 RPMI 1,640 (GIBCO, Grand Island, NY) 배지로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

계대 배양으로 인한 악성림프종과 백혈병 세포주의 초기 형태학적 변화가 관찰되는지 확인하기 위해 전자현미경 검색을 시행하였다. 세포주를 원심분리하여 pellet을 만든 후 4°C phosphate buffered saline (PBS)으로 제작한 3% glutaraldehyde에 24시간동안 1차고정한 다음 4°C 1% osmium tetroxide (OsO₄)에서 1시간동안 이차고정하였다. 계열별 알코올로 탈수 후 epoxy resin에 포매하여 초미세 박절편을 제작하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 Hitachi H-7,600 (Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

2. TGF- β 1이 세포성장에 미치는 영향

Human TGF- β 1 (Biovision, Mountain View, CA)이 종양세포의 성장에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, St. Louis, MO] 측정방법을 이용하였다. 지수 증식기의 세포들을 96 well plate에 2×10⁴개/well씩 분주하고 다양한 농도의 human TGF- β 1 (5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005ng/mL)으로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 각각 24시간, 48시간 및 72시간 배양하였다. 시간별로 PBS로 녹인 5mg/mL MTT 시약을 각각의 well에 10 μ L씩 첨가하여 5시간동안 반응시킨 후 0.04N HCl (5N HCl : Isopropyl Alcohol=1 : 125)을 100 μ L씩 넣어 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장에 가장 큰 영향을 주는 TGF- β 1의 농도를 얻어 아래의 실험에 사용하였다. 세포생존율(%)은 다음 공식에 의하여 계산하였다.

$$\text{세포 생존율} = \frac{\text{Mean optical density in test well}}{\text{Mean optical density in control well}} \times 100 (\%)$$

3. *c-myc* mRNA 측정

1) 세포주에서 **total RNA** 분리: 1×10^6 개의 악성림프종과 백혈병 세포주를 100 ϕ T/C dish에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 5ng/mL의 TGF- β 1으로 처리하여 24시간, 48시간, 72시간 배양하였다. 대조군은 배양액만 넣어 주고 같은 시간동안 배양하였다. 각 시간별로 세포를 수거하고 PBS (pH 7.4)로 세 번 세척한 후 trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 1mL 넣고 상온에서 5분간 배양하였다. 200 μ L의 chloroform를 넣어 잘 섞어준 후 3분간 상온에서 반응시켰다. 13,200rpm에서 15분간 원심 분리하여 생긴 상층액을 새 튜브로 옮겨 isopropyl alcohol을 500 μ L 첨가하여 흔들어 준 후 10분간 상온에 반응시켰다. 13,200rpm에서 10분간 원심 분리하여 생긴 침전물에 75% 알코올 1mL을 넣어 섞은 후 13,200rpm에서 5분간 원심 분리하여 알코올을 제거하고 공기 중에 건조시켰다. 각 튜브에 35 μ L의 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수를 첨가하여 항온수조에서 녹인 후 260nm 파장에서 정량하였다.

2) **cDNA**의 합성: cDNA의 합성은 oligo (dT) primer (Invitrogen)를 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 2.5 μ g의 total RNA에 1 μ L oligo (dT) primer, 1 μ L dNTP Mix (2.5mM each)를 첨가하고 0.1% DEPC로 처리된 증류수를 넣어 12 μ L되게 한 다음 65°C에서 5분간 가열처리 한 후 빠르게 얼음에 방치하였다. 수거한 내용물을 짧게 원심분리하고 4 μ L의 5 \times First-Strand Buffer, 2 μ L의 0.1M DTT, 1 μ L의 40Units/ μ L RNase-OUTTM (TaKaRa, Shiga, Japan)를 넣고 가볍게 섞은 후 42°C에서 2분간 배양하였다. 1 μ L의 200Units/ μ L SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen)를 넣고 잘 섞어주고 42°C에서 50분간 반응시켜 cDNA를 합성한 다음 최종으로 70°C에서 15분간 가열처리하여 비활성화 시켰다. 반응이 종료된 후 합성된 cDNA는 20°C에 보관하면서 증합효소연쇄반응(PCR)에 사용하였다.

3) **Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**: 합성된 cDNA로부터 *c-myc*을 증폭시키기 위하여 2 μ L의 cDNA, 각각 1 μ L의 10 μ M 5'과 3' primer, 0.25 μ L의 5Units/ μ L Ex TaqTM (TaKaRa), 5

μ L의 10 \times Ex TaqTM Buffer (20mM Mg²⁺ 포함), 4 μ L의 2.5mM each dNTP를 잘 섞고 증류수로 전체를 50 μ L로 맞추고 다음 Thermal Cycler를 이용하여 PCR를 시행하였다. *c-myc* primer (sense: 5'-CTCCAGCGCCTT-CTCTCCGT-3', antisense: 5'-GAGCCTGCCTCTTTTC-CACAG-3')를 합성하여 PCR에 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 처리하고 94°C 30초, 60°C 45초, 72°C 45초로 총 26주기 시행하고 72°C에서 10분간 반응시켰다. 내인성 대조군으로 GAPDH primer (sense: 5'-GAGAAGGCTGGGGCTCATTT-3', antisense: 5'-C-AGTGGGGACACGGAAGG-3')를 합성하여 PCR에 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 2분간 처리하고 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 60초로 총 23주기 시행하고 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR 반응산물은 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 밴드를 확인하였다.

4. 종말체 효소 활성 측정

종말체 효소 활성은 Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)을 이용한 TRAP^{EZE}[®] ELISA Telomerase Detection Kit (Chemicon International, Temecula, CA)를 사용하여 분석하였다.

1) **종말체 효소 분리와 단백질 농도 측정**: 1×10^6 개의 악성림프종과 백혈병 세포주를 100 ϕ T/C dish에 분주하고 24시간 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 5 ng/mL의 TGF- β 1으로 처리하고 24시간, 48시간, 72시간 배양하였다. 대조군은 배양액만 넣어주고 같은 시간으로 배양하였다. 각 시간별로 세포를 수거하고 PBS로 세척한 후 1 \times CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate) 용해완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1 mM Benaxmidine, 5mM β -mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% Glycerol) 200 μ L으로 처리하고 얼음 위에서 30분간 방치한 후 12,000rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 단백질 농도 측정은 Bio-Rad Protein Assay로 정량하고 모든 추출액을 500ng/ μ L되게 희석하여 사용하였다.

2) **TRAP 분석**: 각 시료 2 μ L를 5 \times TRAP 반응 혼합액 [100mM Tris buffer; primers: biotinylated TS primer (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') and RP primer; dNTPs: dGTP, dATP, dTTP and DNP-dCTP; oligomer mix for amplification of 36bp internal control band] 10 μ L, Taq polymerase (5Units/ μ L) 0.4 μ L을 증류수 37.6 μ L에 넣어 총 50 μ L 반응 혼합액을 만들었다. 같

은 방법으로 미리 준비한 종말체 효소 양성 세포주 2 μ L, PCR/ELISA 양성 대조군(TSR8)을 위한 8개의 종말체 반복을 갖고 있는 synthetic oligonucleotide 용액 1 μ L, 음성 대조군(1 \times CHAPS 완충액) 및 85°C에서 10분간 가열 처리한 불활성화 대조군 2 μ L을 각각 혼합하였다. 반응은 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 각각의 혼합액을 30°C에서 30분간 반응시키고 두 번째부터 94°C 30초, 55°C 30초씩 33주기 PCR을 수행하였다.

3) ELISA 검출: Streptavidin-coated microtiter plate well에 blocking/dilution 완충액을 250 μ L씩 넣고 parafilmTM으로 덮은 후 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 세척 완충액 300 μ L로 한번 각 well을 세척하였다. blocking/dilution 완충액 100 μ L씩 각 well에 넣고 TRAP 반응산물을 5 μ L를 넣어 잘 혼합시킨 후 parafilmTM으로 덮고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 1 \times 세척 완충액 300 μ L로 5회 세척한 후 anti-DNP antibody-HRP conjugation을 100 μ L 넣고 parafilmTM으로 덮고 상온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 항체 용액을 완전히 제거하고 각각의 well을 세척 완충액 300 μ L로 5회 세척하였다. TMB (tetramethylbenzidine) substrate 100 μ L를 넣고 상온에서 10분간 반응시켰다. 이때 반응성분을 균일하게 혼합시키기 위해 well을 1~2분에 한번씩 가볍게 흔들어 주었다. 발색 후 stop solution 100 μ L를 넣어 혼합시켰다. 반응 종료 후 30분 이내에 microtiter plate reader로 690nm의 파장을 참고 파장 길이로 삼아 450nm에서 시료의 흡광도를 측정하고 아래와 같은 공식으로 흡광도 단위(Absorbance unit)를 계산하였다.

$$\text{Absorbance (units)} = A_{450} - A_{690}$$

4) 결과분석: TRAP^{EZE} ELISA telomerase detection kit의 편람에 따라 음성 대조군의 흡광도는 0.2 이하, 양성 대조군의 흡광도는 0.8 이상, 가열 처리한 대조군의 흡광도는 0.25 이하라는 대조군의 조건이 만족될 때 TRAP assay가 잘 된 것으로 보고 결과를 분석하였다. 종말체 효소 활성의 양성 판정은 원 시료와 85°C에서 10분간 가열처리한 시료의 흡광도의 차($\Delta A = A_{\text{sample}} - A_{\text{heat-treated sample}}$)가 0.15 이상일 경우를 양성으로 판정하였다.

5) Polyacrylamide gel 전기영동: 흡광도 증가분에 따라 종말체 효소의 활성 양성, 음성이 판정된 결과를 재확인하기 위하여 PCR 생성물 16 μ L을 12.5% polyacrylamide gel에 분주한 후 200V에서 2시간 전기영동

하였고 ethidium bromide로 20분간 염색한 후 자외선 투과기에서 판독하였다. 이때 50bp로부터 6bp 간격으로 반복되는 종말체 효소 ladder signal이 관찰되면 종말체 효소 활성이 있다고 판정하였다.

5. 통계학적 분석

통계학적 분석은 Chi-Square test를 이용하였고 통계검증은 P 값이 0.05 이하 일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1. 악성림프종과 백혈병 세포주의 초미세 형태학적 소견

세포주들은 날개로 떨어져 있었으며 모두 높은 핵-세포질 비율을 보였다. 세포질내 소기관은 발달이 미약하였으며 계대배양에 따른 특이한 형태학적 변화는 없었다.

2. TGF- β 1이 악성림프종과 백혈병 세포주의 성장에 미치는 영향

각 세포주에게 다양한 농도의 TGF- β 1을 투여하고 MTT를 시행한 결과 세포 성장에 가장 큰 영향을 주는 TGF- β 1 농도는 5ng/mL였다. 5ng/mL의 TGF- β 1을 투여한 Jiyoye 세포주는 24시간에 88.5%가 생존하였고, 48시간에 70.5%, 72시간에 56.4%가 생존하여 시간이 지남에 따라 생존율이 낮아졌으며 대조군에 비해 명확히 억제되었다(Fig. 1).

H9 세포주는 24시간에 73.4% 생존하였고, 48시간에 85.1%, 72시간에 93.4% 생존하여 시간이 지남에 따라 생존율이 높아졌으며 대조군에 비해 억제되었지만 48시간부터 점차 높아지는 양상을 보였다.

CCRF-CEM 세포주는 24시간에 세포생존율이 72.9%였고, 48시간에 100%, 72시간에 114.1%로 시간이 지남에 따라 생존율이 높아졌고 48시간 이후로는 대조군보다 더 높아졌다.

이를 통계 분석한 결과 세포생존율이 Jiyoye 세포주는 24시간, 48시간 및 72시간 모두 대조군에 비해 유의한 차이를 보였고, 72시간 실험군의 생존율이 24시간 실험군에 비해서도 유의한 차이를 보였다($P < 0.005$, Table 1). H9 세포주는 24시간과 48시간에서 대조군에 비해 유의한 차이를 보였고, CCRF-CEM 세포주는 24시간에 대조군에 비해 유의한 차이를 보였으나 48시간과 72시간에는 통계학적 의미가 없었다.

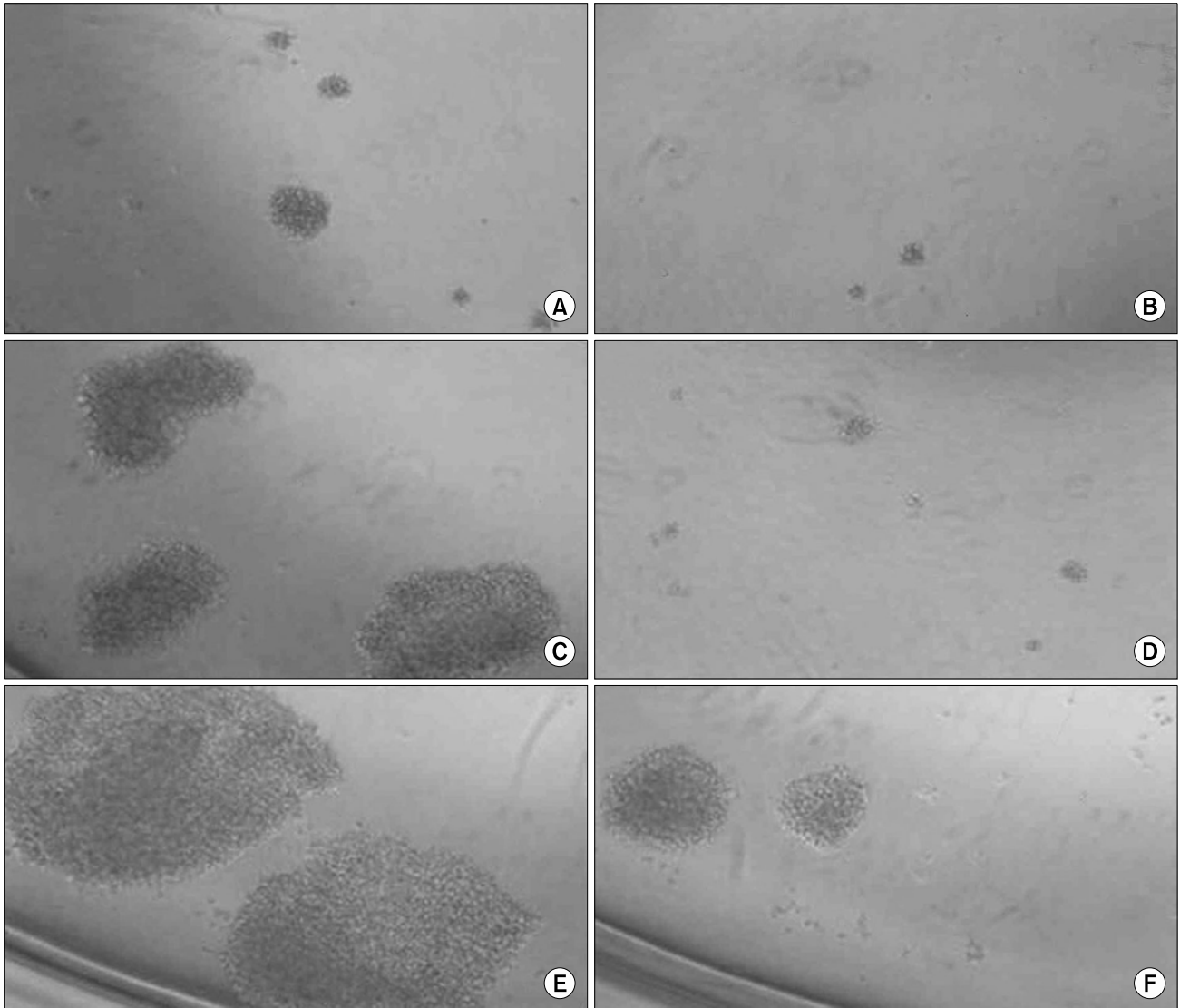


Fig. 1. Effect of TGF- β 1 treatment on Jiyoye cell growth. (A) Control cell after 24 hours, (B) 24 hours after treatment of TGF- β 1. (C) Control cell after 48 hours, (D) 48 hours after treatment of TGF- β 1. (E) Control cell after 72 hours, (F) 72 hours after treatment of TGF- β 1.

Table 1. Effect on cell growth by TGF- β 1 in Jiyoye, H9 and CCRF-CEM cell lines

	Cell survival ratio (%)			<i>P</i> value
	24 hours	48 hours	72 hours	
Control	100	100	100	<0.005
Jiyoye	88.5	70.5	56.4	
H9	73.4	85.1	93.4	
CCRF-CEM	72.9	100	114.1	

3. TGF- β 1이 악성림프종과 백혈병 세포주의 *c-myc* mRNA 발현에 주는 영향

각 시간별로 대조군과 실험군에서 RNA를 분리하고 RT-PCR 방법을 이용하여 *c-myc* mRNA 발현을 관찰한 결과 TGF- β 1으로 처리한 실험군이 대조군에 비하여 Jiyoye 세포주에서 *c-myc* mRNA 발현이 시간이 지남에 따라 더욱 명확하게 억제되었다. H9 세포주에서는 대조군의 *c-myc* mRNA 발현 및 GAPDH에 비해서 볼 때 시간이 지남에 따른 *c-myc* mRNA 발현 억제효과와는 없었다. CCRF-CEM 세포주도 실험군과 대조군의 *c-myc* RNA 발현에 큰 차이가 없었고 GAPDH에 비

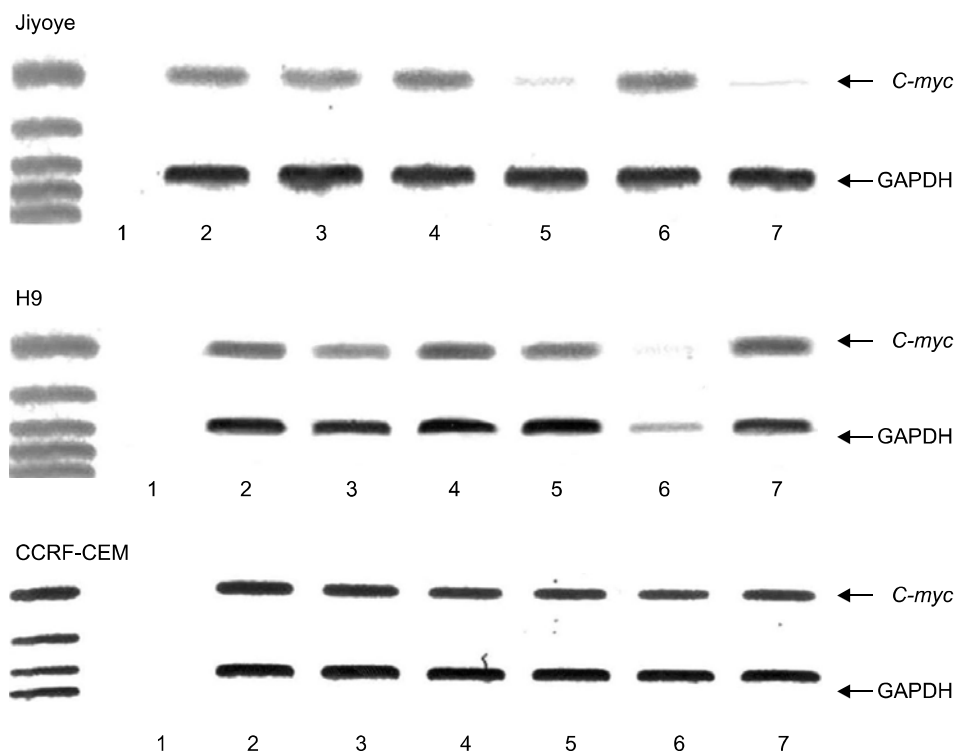


Fig. 2. Effect of TGF- β 1 treatment on *c-myc* RNA expression in Jiyoye cell line, H9 cell line, and CCRF-CEM cell line. 1, negative control; 2, control after 24 hours; 3, 24 hours after treatment of TGF- β 1; 4, control after 48 hours; 5, 48 hours after treatment of TGF- β 1; 6, control after 72 hours; 7, 72 hours after treatment of TGF- β 1.

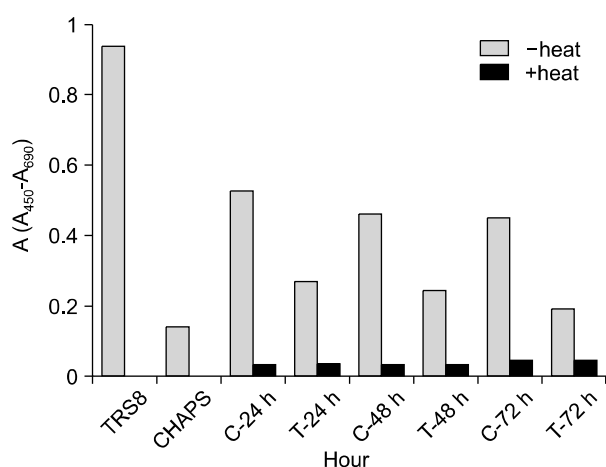


Fig. 3. Absorbance units ($A_{450}-A_{690}$) of Jiyoye cell line for telomerase activity. TRS8, positive control; CHAPS, negative control; C, control; T, TGF- β 1 treated.

해서도 차이가 없었다(Fig. 2).

4. 종말체 효소 활성

양성 대조군의 흡광도는 0.934, 음성 대조군의 흡광도는 0.139로 나타났고 가열처리한 대조군의 흡광도는 모두 0.25 이하로 나타났다(Fig. 3~5).

Jiyoye 세포주의 흡광도 차(ΔA)는 24시간에 대조군 0.499, 실험군 0.230으로 종말체 효소 활성이 대조군과

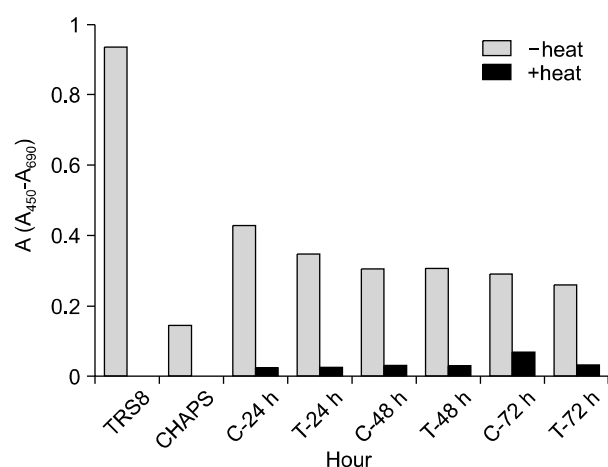


Fig. 4. Absorbance units ($A_{450}-A_{690}$) of H9 cell line for telomerase activity. TRS8, positive control; CHAPS, negative control; C, control; T, TGF- β 1 treated.

실험군 모두에서 양성이었고 48시간에 대조군 0.428, 실험군 0.211로 모두 양성이었으며 72시간에 대조군은 0.404로 양성, 실험군은 0.146으로 음성을 보였다. 이는 시간이 지남에 따라 TGF- β 1으로 처리한 실험군의 종말체 효소 활성이 대조군에 비해 점차 낮아졌고 72시간에는 완전히 억제되었음을 시사한다(Table 2).

H9 세포주의 흡광도는 24시간에 대조군 0.399, 실험군 0.324로 나타났고, 48시간에 대조군 0.296, 실험군

0.272로 나타났으며, 72시간에 대조군 0.222, 실험군 0.227로 나타나 종말체 효소 활성이 대조군과 실험군 모두에서 양성을 나타냈다.

CCRF-CEM 세포주의 흡광도는 24시간에 대조군 0.556, 실험군 0.360로 나타났고, 48시간에 대조군 0.554, 실험군 0.451로 나타났으며, 72시간에 대조군 0.467, 실험군 0.467로 나타나 실험군과 대조군에서 종말체 효소 활성이 모두 양성을 나타냈다.

흡광도 차에 의한 종말체 효소 활성의 양성, 음성의 결과를 재확인하기 위하여 polyacrylamide gel 전기영동을 시행한 결과 양성인 경우 50bp로부터 6bp간격으로 반복되는 밴드가 확인되었고 모든 예에서 흡광도 측정 결과와 일치하였다.

고 찰

정상세포에서의 TGF- β 1의 역할은 세포의 성장과 분

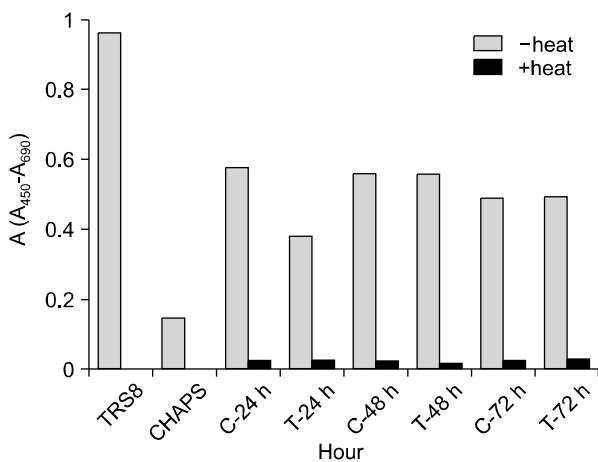


Fig. 5. Absorbance units ($A_{450}-A_{690}$) of CCRF-CEM cell line for telomerase activity. TRIS8, positive control; CHAPS, negative control; C, control; T, TGF- β 1 treated.

화, 세포자멸사, 세포의 부착과 이동 및 세포의 기질 합성, 면역세포의 조절 등에 있어 중요한 조절인자로 작용하고 있다. 그러나 그 기능이 완벽하게 밝혀지지 않았는데 그 이유는 TGF- β 1에 의한 신호전달이 세포 및 조직의 종류에 따라 또는 주위환경에 따라 반응 정도 및 결과가 달라지기 때문이다. 예를 들면 상피세포의 경우 TGF- β 1은 세포의 성장을 억제시키지만 반면, 섬유모세포의 경우는 성장을 촉진시킨다. 암세포에서는 TGF- β 1 신호전달체계의 손상 또는 TGF- β 1 수용체의 발현 감소나 돌연변이 등으로 인하여 암세포의 성장 억제 실패로 계속 증식하게 되며 혈관신생을 촉진하여 전이를 유도하고 면역세포에 작용하여 암세포 제거능력을 억제한다.^{2,3,13,14)}

본 연구에서는 Burkitt 림프종 세포주인 Jiyoye에서 TGF- β 1이 세포성장을 억제하였고 시간이 지남에 따라 억제작용이 더 명확하였다. T세포 림프종 세포주인 H9과 T세포 급성 림프구성 백혈병 세포주인 CCRF-CEM에서 TGF- β 1이 시간이 지남에 따라 세포성장에 대한 억제작용이 대조군에 비해 큰 차이가 없었다.

세포성장을 억제하는 TGF- β 1의 작용 기전에 대해서는 아직까지 명확히 알려져 있지 않다. TGF- β 1이 세포 내에서 억제작용을 나타내려면 먼저 세포표면에 존재하는 TGF- β 1 수용체와 결합하여 세포의 신호를 세포 내로 전달함으로써 가능하게 된다.¹⁵⁾ 세포 내로 들어간 TGF- β 1은 *c-myc* 유전자 산물과 세포주기에 필수적인 cyclin과 cyclin-dependent kinase (CDK)의 조절작용을 통하여 세포증식을 억제하는 것으로 보고되고 있다.^{16,17)} B세포 림프종 세포주에서 TGF- β 1이 세포성장에 주는 영향과 그 기전을 알아본 연구에서 TGF- β 1은 주로 cyclin A의 억제를 통하여 세포가 S기로 진행하는 것을 차단함으로써 세포성장을 억제한다고 하였다.¹⁸⁾ 또한 Burkitt 림프종 세포주에서 TGF- β 1이 caspase 8 활성화를 통해 세포자멸사를 유도하여 세

Table 2. Telomerase activity in Jiyoye, H9 and CCRF-CEM cell lines

	Telomerase activity (ΔA^*)					
	24 hours		48 hours		72 hours	
	Control	TGF- β 1	Control	TGF- β 1	Control	TGF- β 1
Jiyoye	+ (0.499)	+ (0.230)	+ (0.428)	+ (0.211)	+ (0.404)	- (0.146)
H9	+ (0.399)	+ (0.324)	+ (0.296)	+ (0.272)	+ (0.222)	+ (0.227)
CCRF-CEM	+ (0.556)	+ (0.360)	+ (0.554)	+ (0.541)	+ (0.467)	+ (0.467)

* ΔA , $A_{\text{sample}} - A_{\text{heat-treated sample}}$; -, negative; +, positive for telomerase activity.

포성장을 억제한다고 하였다.¹⁹⁾

c-myc 유전자와 그의 생성물인 *c-myc* 단백질은 DNA 복제를 촉진하고 G1 세포주기, 세포성장, 증식, 분화를 조절하는 기능을 가지고 있다.^{16,20)} *c-myc* 유전자 증폭, 또는 단백질 과발현은 악성림프종(특히 Burkitt 림프종) 및 백혈병, 폐암, 위암, 자궁경부암, 대장암 등 많은 악성종양에서 나타나고 있다.²¹⁻²⁵⁾ Mulder 등은 처음으로 대장암 배양세포에서 TGF- β 1의 세포성장 억제와 *c-myc* mRNA의 억제를 보고하였고,²⁶⁾ Rama 등은 용모암종 세포주인 BeWo 세포주에서 10ng/mL의 TGF- β 1을 투여한 결과 48시간부터 *c-myc* mRNA가 억제되었고 12시간부터 *c-myc* 단백질 발현이 억제됨을 보고하였다.²⁷⁾ Chen 등은 유방암 세포주에 TGF- β 1을 투여한 결과 *c-myc* mRNA의 증폭이 현저하게 억제되었다고 하였다.²⁸⁾ 악성림프종과 백혈병에서 TGF- β 1의 세포성장 억제에 관한 연구는 많지 않으며 TGF- β 1이 악성림프종과 백혈병세포 성장억제와 *c-myc* 유전자와의 관계에 관한 연구는 매우 드물다.

본 연구에서는 악성림프종과 백혈병 세포주에 5ng/mL의 TGF- β 1을 투여하여 24시간, 48시간, 72시간 배양하고 RT-PCR법을 이용하여 *c-myc* RNA의 발현을 관찰한 결과 Jiyoye 세포주에서 *c-myc* RNA의 발현이 대조군에 비해 시간이 지남에 따라 억제작용이 명확하였다. H9 세포주에서는 대조군의 *c-myc* mRNA 발현 및 GAPDH에 비해서 볼 때 시간이 지남에 따른 *c-myc* mRNA 발현 억제효과는 없었다. CCRF-CEM 세포주도 실험군과 대조군의 *c-myc* RNA 발현에 큰 차이가 없었고 GAPDH에 비해서도 차이가 없었다. 즉, TGF- β 1이 Burkitt 림프종 세포주의 *c-myc* RNA의 발현은 억제하나 T세포 림프종과 급성 T림프구성 백혈병 세포주의 *c-myc* RNA의 발현은 억제하지 못하였다.

종말체는 세포 염색체의 말단에서 염색체의 안정성을 높이고 DNA의 재결합을 방지하며 염색체의 복제에 관여하는 핵산과 단백질로 구성된 복합체이다.⁹⁾ 정상세포에서는 세포분열 때마다 종말체에 50~200개의 핵산염이 소실됨으로써 그 길이가 점점 짧아지게 되어 결국 G0 또는 G1기에 세포분열이 정지되면서 세포노화와 세포자멸사를 일으키게 된다.¹⁰⁾ 암세포에서는 종말체 효소의 활성으로 세포분열에 따른 종말체의 단축이 일어나지 않기 때문에 암세포가 계속 분열 증식하여 죽지 않게 된다. Tarasawa 등은 악성난소종양 49예에서 종말체 효소 활성을 조사한 결과 95%에서 양성 있었고,²⁹⁾ Huang 등은 39예 간암조직에서 24예가 종말체

효소 활성을 보였다고 하였다.³⁰⁾ Kumaki 등은 115예 폐암에서 109예(93%)가 활성을 보였다고 하였다.³¹⁾ Kim 등은 백혈병에서 급성기, 재발한 경우, 항암치료를 받지 않은 경우에 높은 활성도를 나타낸 반면, 완전관해에 도달한 경우와 만성 백혈병에서는 낮은 종말체 효소 활성을 나타내어 백혈병의 진행 정도와 종말체 효소 활성 사이에 밀접한 관련이 있음을 시사하였다.³²⁾ 그러므로 종말체 효소 활성 억제는 악성종양 치료에 있어 아주 중요한 작용을 할 것으로 생각한다.

본 연구에서 종말체 효소 활성을 측정한 결과 악성림프종과 백혈병 세포주 모두에서 종말체 효소 활성이 양성을 나타냈으며 TGF- β 1을 처리한 후 종말체 효소 활성 측정 결과 Jiyoye 세포주에서는 대조군에 비해 시간이 지남에 따라 낮아졌고 72시간에는 완전히 억제되었다. 즉, TGF- β 1이 B세포 림프종인 Jiyoye 세포주의 종말체 효소 활성을 억제하지만 T세포 계열인 H9와 CCRF-CEM 세포주에서는 종말체 효소 활성은 억제하지 못하였다.

종말체 효소 활성은 여러 가지 암 유전자와 종양억제 유전자와 연관되어 있다. 그 중 *c-myc* 유전자 과발현은 종말체 효소를 활성화시키므로⁸⁾ *c-myc* 유전자가 종말체 효소 활성에 있어 중요한 작용을 한다는 것을 알 수 있다. Cerezo 등은 상피세포에서 hTERT를 과발현시켰을 때 종말체 효소가 활성화 되었지만 세포증식은 일어나지 않았고 *c-myc* 유전자를 과발현시킨 결과 hTERT 발현과 세포증식이 모두 일어났다고 하였다.³³⁾ 본 연구에서도 TGF- β 1은 Jiyoye 세포주의 *c-myc* RNA 발현을 억제하고 종말체 효소 활성도 억제하였으며 세포성장도 억제한 반면 H9 세포주와 CCRF-CEM 세포주에서는 *c-myc* RNA 발현과 종말체 효소 활성을 억제하지 못했으며 또한 세포 성장도 억제하지 못하였다. 이러한 결과는 Fujimoto 등의 결과와 유사한데 백혈병 세포주인 HL-60 세포주에 TGF- β 1을 투여하여 *c-myc* RNA의 발현과 종말체 효소 활성을 관찰한 결과 *c-myc* RNA의 발현과 종말체 효소 활성을 억제하지 못하나 U937 세포주(조각구성 림프종)에 TGF- β 1을 투여하였을 때 세포성장이 억제되었고 *c-myc* RNA의 발현과 종말체 효소 활성도 억제되었다고 하였다.³⁴⁾

따라서 *c-myc* 유전자가 종말체 효소 활성과 세포증식에 있어 중요한 조절인자라는 것을 알 수 있으며 앞으로 더 많은 연구를 통해 그 기전이 더 명확히 밝혀져야 할 것으로 생각한다.

요 약

배경: TGF- β 1은 대부분의 상피세포를 포함한 여러 종류 세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으나 악성림프종과 백혈병에서 세포 성장에 대한 작용기전은 잘 알려져 있지 않다. *c-myc* 유전자의 과발현은 세포증식과 세포자멸사를 조절하며 종말체 효소는 암의 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 악성림프종과 백혈병 세포주에서 TGF- β 1이 세포성장과 종말체 효소 활성화에 미치는 영향과 *c-myc* 유전자와의 상관관계를 통해 TGF- β 1의 작용 기전을 알아보고자 하였다.

방법: Burkitt 림프종 세포주(Jiyoye), T세포 림프종 세포주(H9)와 급성 T림프구성 백혈병 세포주(CCRF-CEM)를 사용하였으며 TGF- β 1이 세포성장에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT법을 이용하였다. TGF- β 1을 투여한 후 *c-myc* 유전자 변화를 관찰하기 위하여 RT-PCR법으로 *c-myc* RNA의 발현을 측정하였고 종말체 효소 활성화는 TRAP (telomeric repeat amplification protocol)을 이용하여 분석하였다.

결과: 세포성장에 대한 영향을 알아본 결과 TGF- β 1 (5ng/mL)을 투여한 후 Jiyoye 세포주는 대조군에 비해 시간이 지남에 따라 세포성장이 억제되었다($P < 0.005$). *c-myc* mRNA 발현과 종말체 효소 활성화는 TGF- β 1으로 처리한 Jiyoye 세포주에서 시간이 지남에 따라 유의하게 억제되었다. 그러나 H9와 CCRF-CEM 세포주에서는 TGF- β 1으로 처리한 후 세포성장 억제, *c-myc* mRNA 감소, 종말체 효소 활성화 억제가 관찰되지 않았다. 즉 TGF- β 1에 의한 세포성장은 *c-myc* mRNA 발현, 종말체 효소 활성화는 서로 밀접한 상관관계를 보였다.

결론: TGF- β 1은 Burkitt 림프종 세포주인 Jiyoye의 세포성장을 억제하는데 이는 TGF- β 1이 *c-myc* mRNA의 발현 억제를 통하여 종말체 효소의 활성을 억제하여 일어나는 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massague J. Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 1990;265:20533-8.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-8.
- Claassen GF, Hann SR. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor-beta induced cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9498-503.
- Wolfrim LA, Fernandez TM, Mamura M, et al. Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:552-9.
- Downing JR. TGF-beta signaling, tumor suppression, and acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:528-30.
- Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, Golijow CD. The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. *Mutat Res* 2004;557:151-8.
- Blancato J, Singh B, Liu A, Liao DJ, Dickson RB. Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer* 2004;90:1612-9.
- Wu KJ, Grandori C, Amacker M, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 1999;21:220-4.
- Lundblad V. DNA ends: maintenance of chromosome termini versus repair of double strand breaks. *Mutat Res* 2000;2:227-40.
- Rhyu MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:884-94.
- Autexier C, Greider CW. Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem Sci* 1996;21:387-91.
- Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett* 2003;194:221-33.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;2:117-29.
- Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295-309.
- Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 1994;4:172-8.
- Amati B. Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell cycle control. *Nat Cell Biol* 2001;3:112-3.
- Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW, Moses HL. Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3758-62.
- Djaborkhel R, Tvrdik D, Eckschlagel T, Raska I, Muller J. Cyclin A down-regulation in TGFbeta1-arrested follicular lymphoma cells. *Exp Cell Res* 2000;261:250-9.

- 19) Inman GJ, Allday MJ. Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent. *J Immunol* 2000;165:2500-10.
- 20) Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys* 2003;2:416:29-36.
- 21) Koo SH, Kwon KC, Shin SY, et al. Genetic alterations of gastric cancer: comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;2:97-103.
- 22) Zajac-Kaye M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. *Lung Cancer* 2001;2:S43-6.
- 23) Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, Golijow CD. The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. *Mutat Res* 2004;557:151-8.
- 24) Augenlicht LH, Wadler S, Corner G, et al. Low level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53 independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi institutional trial. *Cancer Res* 1997;57:1769-75.
- 25) Mathew S, Lorsbach RB, Shearer P, Sandlund JT, Raimondi SC. Double minute chromosomes and c-MYC amplification in a child with secondary myelodysplastic syndrome after treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14:1314-5.
- 26) Mulder KM, Brattain MG. Effects of growth stimulatory factors on mitogenicity and c-myc expression in poorly differentiated and well differentiated human colon carcinoma cells. *Mol Endocrinol* 1989;3:1215-22.
- 27) Rama S, Suresh Y, Rao AJ. TGF-beta1 induces multiple independent signals to regulate human trophoblastic differentiation: mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol* 2003;206:123-36.
- 28) Chen CR, Kang Y, Massague J. Defective repression of c-myc in breast cancer cells: a loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:992-9.
- 29) Terasawa K, Sagae S, Takeda T, Ishioka S, Kobayashi K, Kudo R. Telomerase activity in malignant ovarian tumors with deregulation of cell cycle regulatory proteins. *Cancer Lett* 1999;142:207-17.
- 30) Huang GT, Lee HS, Chen CH, et al. Telomerase activity and telomere length in human hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 1998;34:1946-9.
- 31) Kumaki F, Kawai T, Hiroi S, et al. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol* 2001;32:188-95.
- 32) Kim MY, Lee JN. Pattern of telomerase activities in acute leukemias and chronic myeloid leukemia. *Korean J Hematol* 2001;36:189-96.
- 33) Cerezo A, Kalthoff H, Schuermann M, Schafer B, Boukamp P. Dual regulation of telomerase activity through c-Myc-dependent inhibition and alternative splicing of hTERT. *J Cell Sci* 2002;115:1305-12.
- 34) Fujimoto K, Takahashi M. Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against c-myc mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:775-81.