

□ 원 저 □

인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주 세포독성의 기전

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

오연목 · 유철규 · 정화순* · 김영환 · 한성구 · 심영수

= Abstract =

The Mechanism of Interferon- γ Induced Cytotoxicity on the Lung Cancer Cell Line, A549

Yeon Mok Oh, M.D., Chul Gyu Yoo, M.D., Hee Soon Chung, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D. and Young Soo Shim, M.D.

Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Interferon- γ has various biologic effects, including antiviral effect, antitumor proliferative effect, activation of macrophage and B lymphocyte, and increased expression of major histocompatibility complex. Especially, antitumor proliferative effect of interferon- γ has already been proved to be important in vivo as well as in vitro. And, clinical studies of interferon- γ have been tried in lung cancer patients. However, the mechanism of antitumor effect of interferon- γ has not yet been established despite of many hypotheses.

"Necrosis" is a type of cell death which is well known to occur in the circumstances of severe stresses. In contrast, "apoptosis" is another type of cell death which occurs in such biological circumstances as embryonic development, regression of organs, and self-tolerance of lymphocytes. And, apoptosis is an active process of cell death in which cells are dying with fragmentations of their cytoplasm and nuclei. And, in the process of apoptosis the DNAs of cells are cleaved between nucleosomes by unidentified endonuclease and therefore DNAs of apoptotic cells result in a typical electrophoresis pattern known as DNA ladder pattern.

Recently it has been suggested that cytotoxic effect of interferon- γ occurs via apoptosis. To elucidate the mechanism of antitumor cytotoxic effect of interferon- γ , we microscopically observed a lung cancer cell line, A549 which was treated with interferon- γ . We observed A549 treated with interferon- γ was dying fragmented. And so, we performed this study to find out that the mechanism of antitumor cytotoxic effect of interferon- γ be apoptosis.

Method: We treated A549, human lung cancer cell line with various concentration of interferon- γ and quantified its cytotoxic effect of various periods, 24 hours, 72 hours and, 120 hours by

본 논문은 1995년도 서울대학교병원 지정진료연구비의 보조로 이루어 졌음.

*현재 서울 시립 보라매병원 내과 근무

MTT(dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide) bioassay. Also, after we treated A549 with 100 units/ml of interferon- γ for 120 hours, we observed the pattern of cell death with inverted microscope and we extracted DNAs from the dead A549 cells and observed the pattern of 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining.

Result:

1) Cytotoxic effect of interferon- γ on A549: For the first 24 hours, there was little cytotoxic effect and for between 24 hours and 72 hours, there was the beginning of cytotoxic effect and for 120 hours there was increased cytotoxic effect.

2) Pattern of A549 cell death by interferon- γ : We observed with inverted microscope that A549 cells were dying fragmented.

3) DNA ladder pattern of gel electrophoresis: We observed DNA ladder pattern of gel electrophoresis of extracted DNAs from dead A549 cells.

Conclusion: We concluded that the mechanism of interferon- γ induced cytotoxicity on lung cancer cell line, A549 be via apoptosis.

Key Words: Interferon- γ , A549 and apoptosis

서 론

인터페론감마(interferon- γ)는 항바이러스 효과로 처음 알려지기 시작하였으나, 그외 여러가지 다른 생물학적인 효과가 있음이 알려져 있다. 예를 들면, 암세포의 항증식 효과, 대식세포 및 B 림프구의 활성화, 주면역 복합체(major histocompatibility complex) 항원 발현의 증가 등이 있다¹⁾. 특히, 많은 사람이 관심을 가지고 있는 인터페론감마의 항암효과는 이미 생체내외에서 입증되어 실제 폐암환자에 대한 임상 연구가 시도되고 있다^{2~5)}. 그러나, 인터페론감마의 항암효과 기전에 대해서는 여러가지 가설이 제기되고 있지만, 아직 확립되지 않았다⁶⁾.

세포의 괴사(necrosis)는 여러가지의 심한 외부의 스트레스에 의해서 발생하는 세포사망의 형태로 잘 알려져 있다. 생명현상중 괴사와는 전혀 다른 세포사망의 과정으로 아포프토시스(apoptosis)가 있다⁷⁾. 아포프토시스는 개체의 발생 과정과 장기의 퇴행(regression), 그리고 림프구의 self-tolerance 등의 여러 생명활동 과정에서 발생한다. 뿐만 아니라, 아포프토시스는 생체내에서 장기(organ)나 조직(tissue)의 평형상태 (homeo-

stasis of volume) 유지에 필수 불가결한 기본적인 생명 현상으로서 체세포분열(mitosis)과는 상반된 역할을 한다. 아포프토시스 과정은 세포질 및 핵이 분절화(fragmentation)되어 죽어가는 능동적 사망 과정으로 광학 현미경으로 관찰시 세포의 괴사 과정과는 달리 세포막이 터지지않고 세포질이 여러개로 조각조각 나누어짐을 확인할 수 있다. 또한, 아포프토시스에서는 수동적으로 죽어가는 괴사에서 볼 수 없는 DNA 분절화가 특징적으로 관찰된다. 즉, 아포프토시스 과정의 세포에서 DNA를 추출하여 전기영동하면 DNA의 뉴클레옴들 사이사이가 끊겨서(internucleosomal DNA cleavage) 생기게 된 DNA ladder pattern이 관찰된다⁸⁾.

최근, Novelli 등의 연구⁹⁾에 의하면 인터페론감마를 악성 T-림프구 세포주에 처치하여 아포프토시스가 일어남을 확인하였으며, 따라서 인터페론감마에 의한 암세포의 항증식 기전에 아포프토시스가 관여 할 것이라 시사하였다.

이에 저자들은 인체 폐암세포주에 대한 인터페론감마의 항암기전으로서 아포프토시스의 가능성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 폐암 세포주 배양 및 인터페론감마에 의한 세포독성 검사

폐암 세포주는 A549(ATCC CCL185)를 이용하였다. A549를 RPMI 배지에 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 인터페론감마는 Genzyme사 제품을 이용하여 최종농도가 0, 1, 10, 100, 1,000 unit/ml 되도록 하였고 처리 시간은 24시간, 72시간, 120시간으로 다양하게 A549 폐암세포주에 처리하였다. 그리고, 인터페론감마에 의한 A549 세포독성 효과는 MTT(dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide) bioassay¹⁰⁾를 이용하여 정량화하였다. MTT bioassay는 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 96well plate에 well 당 5천 개의 세포를 심고 인터페론감마를 처리한 A549 폐암 세포를 계획된 기간 배양 후, well 당 0.1 mg(50 ul of 2 mg/ml) MTT 용액을 추가하였다. 그리고, 4시간 동안 37℃에서 배양 후, 200 g에서 5분간 원심한 다음, 상층액을 버리고 건조 시켰다. 그리고 나서, DMSO(dimethyl sulfoxide)를 150 ul/well 씩 넣고 빛을 차단하면서 15분간 섞은 다음 밤새 배양하였다. 다음날 아침 microplate 판독기(Molecular Devices사, 모델명 Thermo-max)로 490 nm에서 optical density(OD)를 재어서 아래와 같이 세포 사망률을 구하였다.

세포 사망률(%) = $100 - (\text{OD with interferon-}\gamma / \text{OD without interferon-}\gamma) \times 100$

2. 인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주의 세포 사망양상 관찰

A549 폐암 세포주에 인터페론감마를 최종농도 100 unit/ml 되도록 120시간 처리 후, 광학 현미경(Helmut Hund사, 제품명 Wilovert)을 이용하여 $\times 100$, $\times 200$ 확대하여 인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주의 세포 사망 양상을 관찰하여 아포프토시스의 중요한 지표인 세포의 분절화가 일어나는지 평가하였다. 그리고, 인터페론감마에 의해 사망한 A549 폐암 세포중 세포가 분절화되면서 사망한 세포의 비율을 $\times 200$ 확대 촬영한 사진을 이용하여 구하였다.

3. 인터페론감마에 의해서 사망한 A549 세포에서 DNA Ladder 확인

A549 폐암 세포주에 인터페론감마를 최종농도 100 unit/ml 되도록 120시간 처리 후, 배지에 죽어서 떠있는 세포로부터 아래와 같은 방법으로 DNA를 추출하였다.

인터페론감마 처리 120시간 후, 배양 중인 A549 폐암 세포주의 배지를 원심(500 g, 10분)하여 죽은 A549 세포를 얻었다. 여기에 lysis buffer(10 mM Tris, pH 8.0, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA) 3.6 ml, 10% SDS(sodium dodecyl sulfate) 0.4 ml, proteinase K(최종농도 250 $\mu\text{g/ml}$)를 첨가한 다음, 55℃ 수조에 37℃에서 밤새 배양하였다. 그런 다음, 포화 NaCl(5M 이상임) 1 ml 첨가하여 단백질을 침강시킨 후, 원심하였다(1,200 g, 20분). 상층액만을 얻은 후, -20℃로 냉각한 100% ethanol을 2 volume 첨가하여 -20℃에서 5일 처리하였다. 이렇게 한 다음, 원심하여(1,200 g, 15분, 4℃) 침강물에 -20℃ 70% ethanol로 씻은 후 한번 더 원심하였다(microcentrifuge, 1,200 g, 15분, 4℃). 그런 다음, RNase를 최종농도 20 $\mu\text{g/ml}$ 되도록 하여 37℃에서 1시간 처리하였다.

이상과 같이 DNA를 추출한 후, 1.5% agarose gel에 전기영동(80 volt, 100 A, 2시간) 하였고 ethidium bromide(0.5 $\mu\text{g/ml}$)로 염색 후, UV lamp로 관찰하였다.

결 과

1. 인터페론감마의 A549 폐암세포주에 대한 세포독성의 효과

1) 인터페론감마를 24시간 처리

인터페론감마를 24시간 처리하였을 경우, A549의 세포 사망률은 인터페론감마의 농도 0, 1, 10, 100, 1000 unit/ml에 따라 각각 0%, 0%, 0%, 0%, 7% 이었다(Fig. 1).

2) 인터페론감마를 72시간 처리

인터페론감마를 72시간 처리하였을 경우, A549의 세포사망률은 인터페론감마의 농도 0, 1, 10, 100, 1,000 unit/ml에 따라 각각 0%, 25%, 31%, 31%, 34%

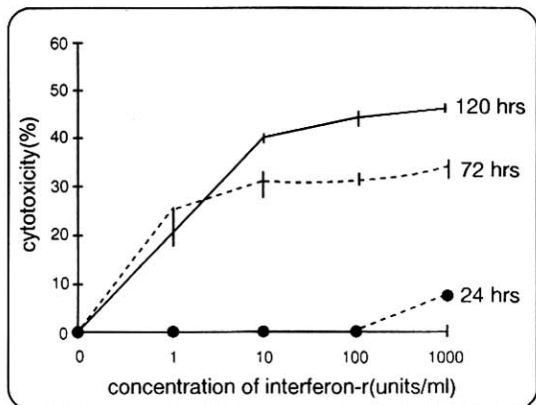


Fig. 1. Lung cancer cell line, A549 was treated with various concentrations of interferon- γ for 24, 72, and 120 hours. And, the cytotoxicities of A549 cells by interferon- γ were shown by line-graphs.

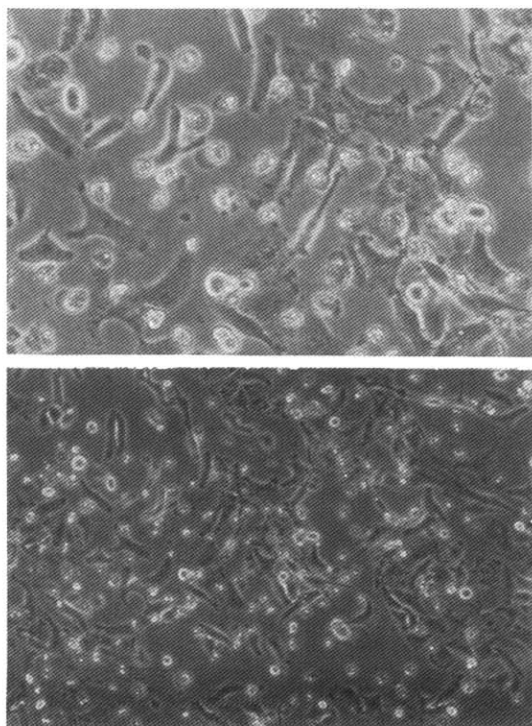


Fig. 2. After a lung cancer cell line, A549 was treated with interferon- γ (100 units/ml) for 120 hours, the cell deaths of A549 cells were photographed with magnification of 100 times(upper one) and 200 times(lower one) by light microscope.

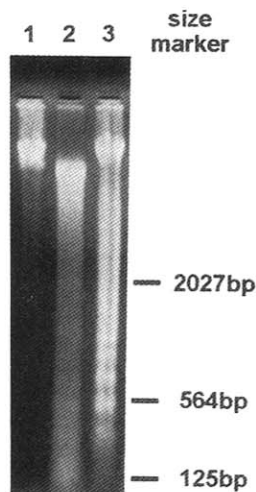


Fig. 3. After a lung cancer cell line, A549 was treated with interferon- γ (100 units/ml) for 120 hours, the DNAs extracted from A549 cells were electrophoresed on agarose gel. Lane 1 shows negative control which was DNAs extracted from A549 cells without any treatment, lane 2 shows DNA ladder pattern which was cleaved DNAs from dead A549 cells treated with interferon- γ , and lane 3 cycloheximide (25 μ g/ml) for 18 hours.

이었다.

3) 인터페론감마를 120시간 처리

인터페론감마를 120시간 처리하였을 경우, A549의 세포사망률은 인터페론감마의 농도 0, 1, 10, 100, 1,000 unit/ml에 따라 각각 0%, 21%, 40%, 44%, 46%이었다.

이상으로 인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주의 세포독성 효과는 24시간에는 거의 없다가 24시간부터 72시간 사이에 나타나기 시작하여 120시간에는 더 증가하였다.

2. 인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주의 세포사망의 양상

인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주의 세포사망의 양상을 광학현미경으로 관찰한 결과, A549 폐암세포주가 인터페론감마에 의해서 세포들이 작은 분절로 나뉘면서 죽는 모양을 보였다(Fig. 2).

그리고, 광학현미경 관찰상 전체 사망 세포 중 분절

화되면서 사망한 세포의 비율은 $86.2 \pm 7.1\%$ 이었다.

3. DNA Ladder 양상

인터페론감마에 의해 사망한 A549 세포주의 DNA를 추출하여 전기영동 시킨 결과, 사다리 모양의 DNA 밴드들이 나타났다(Fig. 3).

고 찰

인터페론은 항바이러스 효과를 갖는 물질로 알려진 이래, 면역 조절(immune modulation)과 항암 효과(antitumor effect) 등이 있음이 밝혀졌다. 뿐만 아니라, 임상적으로도 인터페론의 항암효과에 대한 연구가¹²⁾ 진행되고 있다. 특히, 인터페론의 항암효과를 나타내는 기전에 대해서 다음과 같은 가설들이 제기되고 있다. 첫째, 인터페론을 암세포에 처치하면 세포가 G_0 phase에 있는 비율을 증가시켜서 항암효과를 나타낼 것이다. 둘째, 인터페론은 oligoadenylate synthetase의 활성화를 통해서 endoribonuclease를 활성화 시킴으로써 세포의 RNA를 분해(cleavage)시켜 항암효과를 나타낼 것이다. 셋째, 인터페론은 *myc*, *ras* 같은 암유전자 발현을 down-regulation하여 항암효과를 나타낼 것이라는 주장들이 있으나 아직 확실히 밝혀져 있지 않다. 뿐만 아니라, 최근 Shinagawa 등의 연구¹²⁾에 의하면 쥐의 간세포를 일차배양(primary culture)하여 인터페론감마를 처치하였을 경우 아포프토시스가 일어남을 보고하였다. 또한, Novelli 등도 인터페론감마가 interleukin-7 dependent pre-B cell proliferation을 억제하여 아포프토시스를 일으킴을 증명하였다¹³⁾. 이런 연구들을 토대로 저자는 폐암세포주에 인터페론감마가 어떤 영향을 미치는지 연구하게 되었다. 그 결과, 광학현미경상 폐암세포인 A549가 인터페론감마에 의해 분절화되면서 사망함을 관찰하였고, 사망한 A549 세포에서부터 DNA를 추출하여 전기영동시켜 DNA ladder 양상을 확인하였다. 이러한 소견은 인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주의 사망 기전에 아포프토시스가 역할을 할 것임을 시사해주고 있다. 인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주 세포독성 기전이 아포프토시스를 통해서 일어난다는 것이 앞에서 언급한 여러가지 가설들과 모

순, 배치되는 것은 아니다. 예를 들면, 인터페론감마가 *myc* 암유전자의 발현을 down-regulation 시켜서 아포프토시스가 일어나게 하고 그 결과 항암효과가 나타날 것이라고 설명할 수 있기 때문이다. *myc* 암유전자의 발현과 아포프토시스와는 밀접한 관련이 있음은 이미 알려져 있다¹⁴⁾. 그렇지만, 인터페론감마가 A549 폐암세포주의 *myc* 암유전자 발현을 down-regulation 시키는지는 보다 더 연구가 필요하겠다.

폐암에 대한 전신적 화학요법이 효과적인 치료 성과를 거두지 못하고 있는 상태에서 인터페론감마 등의 cytokine 유전자를 이용한 유전자 요법이 시도되고 있다. 저자들의 본 연구는 인터페론 유전자를 이용한 유전자 요법의 항암 기전을 이해하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 인터페론감마(interferon- γ)는 항바이러스 효과, 암세포의 항증식 효과, 대식세포 및 B 림프구의 활성화, 주면역복합체(MHC) 항원 발현의 증가 등의 생물학적 효과를 나타낸다. 특히, 인터페론감마의 항암 효과는 이미 생체 내에서 입증되어 실제 폐암 환자에 대한 임상 연구가 시도되고 있다. 그러나, 인터페론감마의 항암효과 기전은 여러가지 가설이 제시되기는 하고 있지만 아직 확립된 것이 없다.

세포의 괴사(necrosis)는 심한 외부의 스트레스에 의해 발생하는 세포 사망의 형태로 잘 알려져 있다. 생명현상 중 괴사와는 전혀 다른 세포 사망의 과정으로 아포프토시스(apoptosis)가 있다. 아포프토시스는 조직의 항상성(homeostasis of tissue volume), 개체의 발생 과정, 장기의 퇴행(regression), 그리고 림프구의 self-tolerance 등의 여러 생명 활동 과정에서 발생하는 세포 사망의 과정으로서, 세포질 및 핵이 분절화(fragmentation)되어 죽어가는 능동적 사망과정으로 알려져 있다. 아포프토시스에서는 수동적으로 죽어가는 괴사에서 볼 수 없는 DNA 분절화(DNA ladder pattern)가 특징적으로 관찰된다.

인터페론감마의 암세포에 대한 세포독성 기전을 연구하기 위해서 인터페론감마를 폐암세포주인 A549 세포에 처치한 후 현미경(inverted microscope)으로

A549의 변화를 관찰하였는데 A549세포가 분절화되면서 죽어가는 것을 관찰할 수 있었다.

저자들은 인터페론감마의 항암기전으로서 아포토시스의 가능성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

방법: 폐암세포주인 A549세포를 대상으로 하였다. A549세포에 여러 농도의 인터페론감마를 투여하고 24시간, 72시간, 120시간 후에 MTT(dimethylthiazolyl diphenyltetrazolium bromide) bioassay법으로 세포독성을 정량화하였다. 그리고, 100 unit/ml의 인터페론감마를 A549 세포에 120시간 처치 후, 광학 현미경으로 세포 사망의 양상을 관찰하였다. 또한, 100 unit/ml의 인터페론감마를 투여하고 120시간이 경과한 후 사망 세포의 DNA를 추출하여 1.5% agarose gel에서 전기영동을 시행하고 ethidium bromide로 염색 후 DNA ladder pattern 유무를 관찰하였다.

결과:

1) 인터페론감마에 의한 A549 폐암세포주의 세포독성 효과는 24시간에는 거의 없다가 72시간부터 120시간 사이에 나타나기 시작하여 120시간에는 더 증가하였다.

2) 인터페론감마에 의한 A549 세포의 사망 양상은 광학현미경상 A549 세포들이 작은 분절로 나뉘면서 사망하였다.

3) 인터페론감마를 A549 폐암세포주에 처치 후 죽어가는 세포의 DNA를 추출하여 전기영동시킨 결과 아포토시스(apoptosis)에서 특징적으로 보이는 DNA ladder pattern을 관찰할 수 있었다.

결론: 인터페론감마(interferon- γ)의 A549 폐암세포주에 대한 세포독성의 기전은 아포토시스 과정을 통해서 일어난다.

참 고 문 헌

- 1) Pestka S, Langer JA: Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* **56**:727, 1987
- 2) Lopez M, et al: Adoptive immunotherapy with activated macrophages grown in vitro from blood monocytes in cancer patients: A pilot study. *J Immunother* **11**:209, 1992

- 3) Mattson K, Niiranen A, et al: Natural interferon alfa as maintenace therapy for small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **28A**(8-9):1387, 1992
- 4) Jansen RL, Slingerland R, Goey SH, et al: Interleukin-2 and interferon-alpha in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Immunotherapy* **12**:70, 1992
- 5) Maasilta P, Holsti LR, Halme M, Kivisaari L, et al: Natural alpha-interferon in combination with hyperfractionated radiotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **23**:863, 1992
- 6) Perry MC: The chemotherapy source book 1st ed. pp144-161 Williams & Wilkins, Baltimore.
- 7) Kerr JFR, et al: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239, 1972
- 8) Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**:555, 1980
- 9) Novelli F, et al: Environmental signals influencing expression of the IFN- γ receptor on human T cell control whether IFN- γ promotes proliferation or apoptosis. *J Immunology* **152**:496, 1994
- 10) Toda H, Shioho O, Kuroshima KI, et al: An improved colimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* **93**:157, 1986
- 11) Melin SA, Ozer H: Biologic response modifiers: principles of immunotherapy. *The Chemotherapy Source Book* 1st ed. Williams & Wilkins pp144-161, Baltimore
- 12) Shinagawa T, Yoshioka K, Kakumu S, et al: Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effect of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Pathology* **165**:247, 1991
- 13) Novelli F, et al: Environmental signals influencing expression of the IFN- γ receptor on human T cell control whether IFN- γ promotes proliferation or apoptosis. *J Immunology* **152**:496, 1994