

사람 신경모세포종에서 fenretinide에 의한 세포자멸사의 유도기전

이재규^{1,3}, 송인환², 김성용¹

¹영남대학교 의과대학 생화학·분자생물학교실,

²영남대학교 의과대학 해부학교실, ³마산복음병원 신경외과

간추림 : 사람의 신경모세포종 세포주에 대한 합성 retinoid의 일종인 fenretinide의 세포성장 억제효과 및 세포자멸사를 확인하고, 세포신호전달 과정을 알아보고자 하였다.

Fenretinide의 신경모세포종 세포주에 대한 세포독성 정도와 세포 자멸사를 확인하기 위하여 MTT assay, cytoplasmic DNA fragmentation, TUNEL 염색, Western blot analysis 등을 시행하였다.

MTT assay 결과에서 신경모세포종은 10 μ M 농도의 fenretinide을 처리한 후 72시간 배양하였을 때의 세포생존율은 대조군에 비하여 CHP134는 47%, IMR32는 12%, SH-SY5Y는 53%를 보여 세포독성 효과를 나타내었으며 PC12에서는 fenretinide의 세포독성이 보이지 않았다. Fenretinide 처리 후 시간에 따라 cytoplasmic DNA fragmentation과 PARP 단백질 분해가 증가하였으므로 신경모세포종에 대한 fenretinide의 세포독성은 세포자멸사 과정의 유도에 인한 것을 확인하였다. Fenretinide에 의하여 SH-SY5Y의 경우에만 Bad가 시간이 지남에 따라 발현의 감소함이 확인되었으나 CHP134와 IMR32에서는 Bad의 변화를 관찰할 수 없었으며 Bcl-x의 발현 변화도 관찰되지 않았다. Fenretinide에 의한 MAP kinase의 활성변화 결과는 CHP134에서 JNK 인산화 감소와 p38 인산화 증가, IMR32에서 p38 인산화 감소, SH-SY5Y에서 ERK의 인산화 증가 등 다양한 변화를 보였으며 그 외에는 큰 변화가 없었다. ERK의 억제제인 PD98059, p38 억제제 SB203580, PI3 kinase 억제제 LY294002, protein tyrosine kinase 억제제 genistein 등을 전처리하였으나 fenretinide에 의한 PARP 단백질의 단백질분해에는 변화가 없었다

이상의 결과들로부터 fenretinide에 의한 신경세포암에서의 세포증식 억제는 세포자멸사 기전이 유도되어 나타나는 현상이며, 이는 MAP kinase 신호전달 과정이나 PI3 kinase, protein tyrosine kinase 등의 신호전달 과정과는 무관하게 PARP의 단백질분해를 통한 세포자멸사임을 확인할 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 세포자멸사, 사람 신경모세포종 세포주, fenretinide, MAP kinase, retinoids

서론

생물학적 활성이 강한 vitamine A (retinol)와 그 유도체인 retinal, retinoic acid (RA) 등은 건강의 유지와 생존에 꼭 필요한 물질이다. 자연계에 존재하

는 유도체와 인공적으로 합성된 유도 물질들을 통칭하여 retinoid라고 한다. Retinoid는 시각뿐만 아니라 생식에도 필요하며, 배아 발생 동안의 형태 결정 인자로 작용하여 성장과 분화의 조절에 중요한 역할을 한다 (Sporn 등 1992, Becherel 등 1994).

세포 증식에 미치는 retinoid의 영향에 대한 많은 연구들의 결과에 따라 다양한 동물 암 발생 모델을 대상으로 retinoid를 사용한 암의 치료와 예방에 대한 연구가 이루어지고 있다 (Moon 등 1977, Huang 등 1988, Barkley와 Holdener 1992, Lippman 등

*이 연구는 한국과학재단 연구비 (과제번호: R01-2005-000-10803-0)와 영남대학교 선도연구센터과제 (105682) 지원으로 이루어졌음.

교신저자: 김성용 (영남대학교 의과대학 생화학·분자생물학교실)
전자우편: seongyong@med.yu.ac.kr

1994). Retinoid의 항암 효과의 기전에 대해서는 아직 명확히 확립되어 있지 않으나 면역성의 증가 (Dillehay 등 1988), anti-promotion activity (Jiang 등 1992), 세포자멸사의 유도 등이 작용 기전으로 추정된다 (Martin 등 1990, Delia 등 1993, Wang과 Phang 1996). 항암제로 retinoid를 사용하기 위해서는 많은 양을 투여하여야 하므로 간 손상과 같은 독성을 보인다. 합성 retinoid인 N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (fenretinide)는 생물학적인 활성이 매우 뛰어나고 간에 대한 독성이 적어 매우 유용하며, 유방암의 예방을 목적으로 임상에서 시범적으로 사용되고 있다 (Moon 등 1979, Dowlatshahi 등 1989, Peng 등 1989, Decensi 등 2000).

Fenretinide에 의한 세포 사멸은 여러 가지 기전으로 설명할 수 있다. Fenretinide에 의한 활성 산소 (ROS: reactive oxygen species)의 생성 (Suzuki 등 1999, Hail와 Lotan 2001, Hursting 등 2002, You 등 2002), cyclooxygenase-2 유전자의 발현 억제 (Merritt 등 2001), caspase의 활성 증가 (Puduvalli 등 1999, You 등 2001), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 활성화 (Chen 등 1999) 등에 의한 세포자멸사 기전들이 알려져 있다.

신경모세포종에 대하여 fenretinide의 효과에 대해서는 세포자멸사가 유도된다는 보고들이 (Mariotti 등 1994, Di Vinci 등 1994, Rozzo 등 1997) 있으며, 항암제 (Lovat 등 2000a)와 ceramide의 modulator (Maurer 등 2000)와 같이 사용하면 세포자멸사에 상승효과를 나타낸다고 하였다. 그러므로 현재 임상에서도 신경모세포종의 치료에 사용되어지고 있다 (Garaventa 등 2003, Raffaghello 등 2003). 신경모세포종에 대한 fenretinide의 세포자멸사 효과에 대한 기전으로는 ceramide 증가 (Maurer 등 1999)와 free radical의 생성 (Lovat 등 2000b)이 관여하며 최근에는 전사인자 GADD153과 12-lipoxygenase가 관여한다는 보고 (Lovat 등 2002)도 있다. 그러나 아직 명확한 세포자멸사 기전은 아직 밝혀져 있지 않으며 세포자멸사의 신호전달 경로를 밝힌 연구도 아직 보고되지 않았다.

본 연구는 사람의 신경모세포종 CHP134, IMR32, SH-SY5Y와 크롬친화세포종 PC12를 이용하여 fen-

retinide가 세포 성장을 억제하는 효과를 확인하고, 이러한 세포 독성이 세포 사멸에 기인하는지를 조사하였다. 또한 fenretinide에 의한 신경모세포종의 세포자멸사가 일어나는 세포신호전달 경로를 규명하기 위하여 세포의 성장과 사멸에 관여하는 세포신호전달 과정에 있는 단백질 mitogen-activated protein (MAP) kinases인 ERK, JNK, p38 등의 관여 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

신경모세포종 세포주인 CHP134, IMR32, SH-SY5Y와 크롬친화세포종 세포주 PC12 등을 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입하였다. 신경모세포종 CHP134, IMR32, SH-SY5Y 등은 10% Fetal calf serum (FCS) (Hyclone, Utah, USA)와 1% penicillin/streptomycin 용액이 섞인 RPMI1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 배양액을, 크롬친화세포종 PC12는 10% FCS과 5% horse serum, 1% penicillin/streptomycin 용액이 섞인 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 배양액을 사용하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다.

2. Fenretinide 준비 및 처치

Fenretinide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)는 가시광선에 쉽게 파괴되므로 노란빛 전등 밑에서 작업하였다. Fenretinide를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M 농도가 되도록 준비하고 세포에 처리할 때에는 배양액의 1/1,000 정도의 부피가 되도록 fenretinide를 처리하였다. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) assay의 경우에는 0, 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M 등의 농도가 되도록 fenretinide를 처리하고 72시간 배양하였다. Cytoplasmic DNA를 추출하기 위한 실험에는 10^{-5} M 농도를 처리하여 24, 48, 72시간 배양하였다. Western blot 실험에서 MAP kinase의 활성을 관찰하

기 위해서는 10^{-6} M 또는 10^{-5} M 농도를 처리하여 5 분간 처리하였으며 유전자 발현을 관찰하기 위해서는 10^{-6} M 또는 10^{-5} M 농도를 처리하여 8, 16, 24, 48, 72시간 배양하였다. 48시간 이상 처리할 경우에는 배양액을 교환하고 fenretinide을 새로 처리하였다. 세포신호전달과정에 대한 fenretinide의 영향을 확인하기 위하여 ERK 억제제 PD98059 (Calbiochem, USA)와 phosphoinositide-3 (PI3) kinase 억제제 LY294002 (Calbiochem, USA), p38 kinase 억제제 SB203580 (Calbiochem, USA), protein tyrosine kinase 억제제 genistein (Calbiochem, USA) 등을 사용하였다.

3. MTT assay

신경모세포종 세포들을 96 well plate에 well마다 5,000개가 되도록 분주한 후 24시간 배양하였다. Fenretinide를 농도별로 처리한 후 72시간 배양하고 phosphate buffered saline (PBS)에 녹인 50 mg/mL MTT용액 50 μ L를 각 well에 첨가한 후 이산화탄소 배양기에서 3시간 반응시켰다. 상청액을 조심스럽게 제거하고 DMSO 200 μ L를 첨가한 후 microplate reader (Biorad, Hercules, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Cytoplasmic DNA fragmentation 조사

Fenretinide를 처리한 IMR32와 PC12로부터 배양액을 제거한 후 200 μ L DNA 추출용액 (5 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF)를 넣고 얼음에서 30분간 방치하면서 5분마다 진탕하였다. 4°C, 15,000 rpm에서 20분 원심한 후 상청액을 다른 원심분리관에 옮겼다. 단백질 농도를 소 혈청알부민을 표준으로 해서 BCA 정량 kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 각 시료에서 동일 양의 단백질이 되도록 용액을 취해 tris-saturated phenol, phenol/chloroform, chloroform으로 순서대로 DNA를 추출하여 ethanol에 침전시켰다. 침전시킨 DNA를 RNase (1 mg/mL)가 포함된 10 μ L TE (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA)로 녹여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2%

agarose gel에서 전기영동하였다. Gel을 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator를 사용하여 DNA fragmentation을 관찰하였다.

5. TUNEL staining

Apoptosis Detection Kit (chemicon, ApopTag Peroxidase In Situ S7100, USA)를 이용하여 광학현미경 (Leica CTR5000, German) 상에서 apoptic cell를 관찰하였다.

신경모세포종 세포들을 coverslip 위에 50,000개/mL가 되도록 분주한 후 24시간 배양하였다. Fenretinide를 10^{-5} M 농도가 되도록 fenretinide를 처리하고 48시간 배양하였다. Coverslip의 세포는 PBS로 세척 후 3.7% PFA로 10분간 고정하였다. precooled 된 ethanol : acetic acid를 2 : 1로 섞어 -20°C에서 5분간 후고정하였다. 3% H₂O₂에 10분 처리 후 Equilibration Buffer로 최소 10초간 처리하였다. TdT 효소를 1시간동안 37°C에서 반응시킨 후 Stop/ Wash Buffer를 이용하여 정지시켰다. PBS로 여러번 세척 후 Anti-Digoxigenin peroxidase conjugate를 30분간 처리하고, 세척 후 peroxidase substrate를 처리하여 광학현미경상에서 관찰하면서 반응시켰다. counter staining은 Mayer's Hematoxylin으로 염색 후 mount 하여 Leica LAS Image organizer로 각각 촬영하였다.

6. Western blot 분석

Fenretinide를 처리한 세포들로부터 배양액을 제거한 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF)로 용해하고 원심하였다. 상청액에 존재하는 단백질을 정량하여 일정량의 단백질을 8~12% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였다. Gel에서 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane에 옮기고 P38 항체 (New England BioLab, MA, USA), extracellular signal-regulated kinase (ERK)항체 (Cell Signaling technology, USA), JNK항체와 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)항체 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Bcl-x, Bad 항체, cyclin A, cyclin D3, (BD Bioscience, San Diego, CA, USA)등의 1차 항체를 1/1,000~1/5,000 비율로

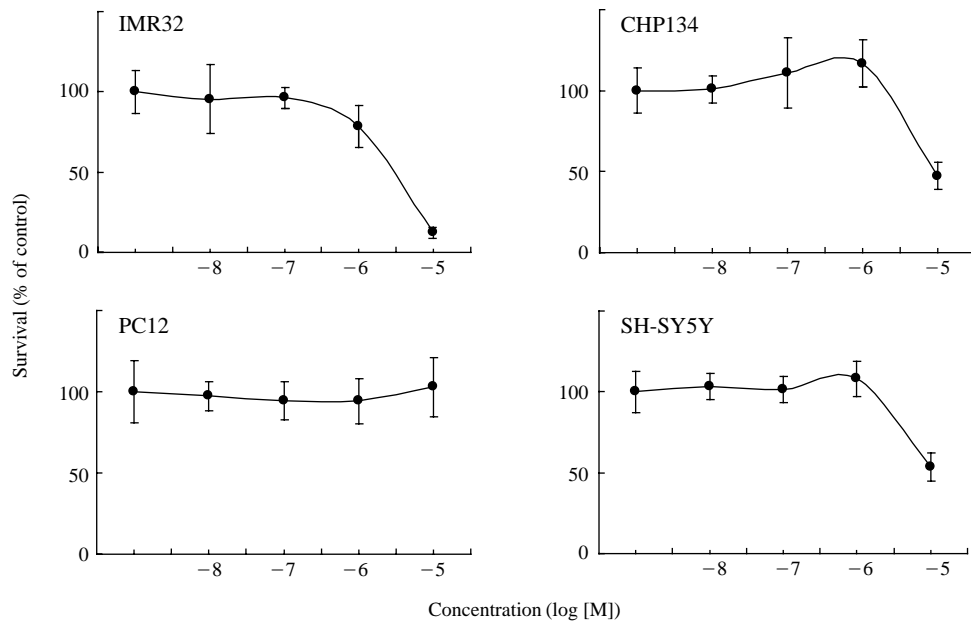


Fig. 1. Effect of fenretinide on cell viability. Cells were treated with increasing concentrations of fenretinide for 72 h. Cell viability was measured by MTT assay. Values are mean \pm SD of triplicates of three individual experiments.

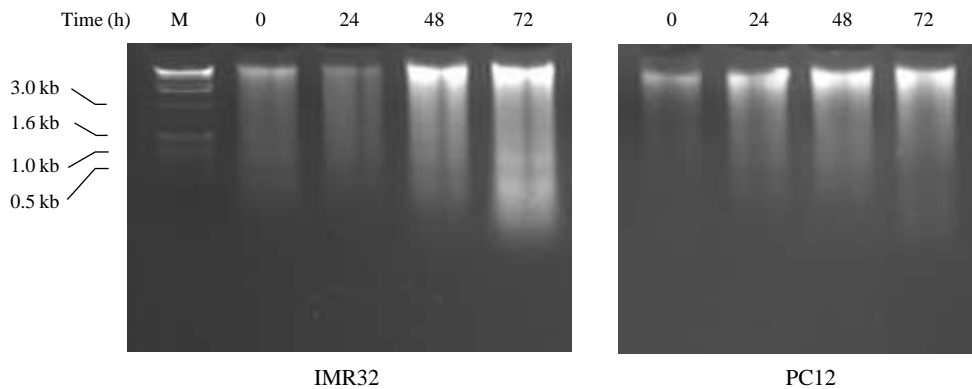


Fig. 2. Effect of fenretinide on cytoplasmic DNA fragmentation in IMR32 and PC12 cells. Cells were treated with 10^{-5} M fenretinide for the indicated times. Cells were harvested and extracted cytoplasmic DNAs. The DNAs were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. M, 1 Kb DNA size marker.

회석하여 2시간 반응시켰다. TTBS 완충액 (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20)으로 10분간 3회 세척하여 1차 항체를 제거한 후 peroxidase가 부착되어 있는 2차 항체를 1시간 반응

시켰다. 다시 TTBS 완충액으로 10분간 3회 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) kit (NEN, Boston, USA)을 사용하여 항체와 결합한 단백질을 필름에 감광시켜서 결과를 관찰하였다.

결 과

1. 사람 신경모세포종에서 fenretinide에 의한 세포생존율의 변화

신경모세포종의 생존에 fenretinide이 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 암세포들을 well당 5,000개의 세포가 되도록 96 well plate에 분주를 하고 24시간 배양한 후 fenretinide를

10^{-5} M 농도로 처리하였다. Fenretinide 처리 후 72시간 때의 세포생존율은 처리하지 않은 군에 비하여 CHP134는 47%, IMR32는 12%, SH-SY5Y는 53%로 세포독성효과를 나타내었다. 그러나 PC12의 경우 fenretinide의 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 1).

2. 사람 신경모세포종에서 fenretinide에 의한 세포자멸사의 증가

신경모세포종에 대한 fenretinide의 독성효과가 세

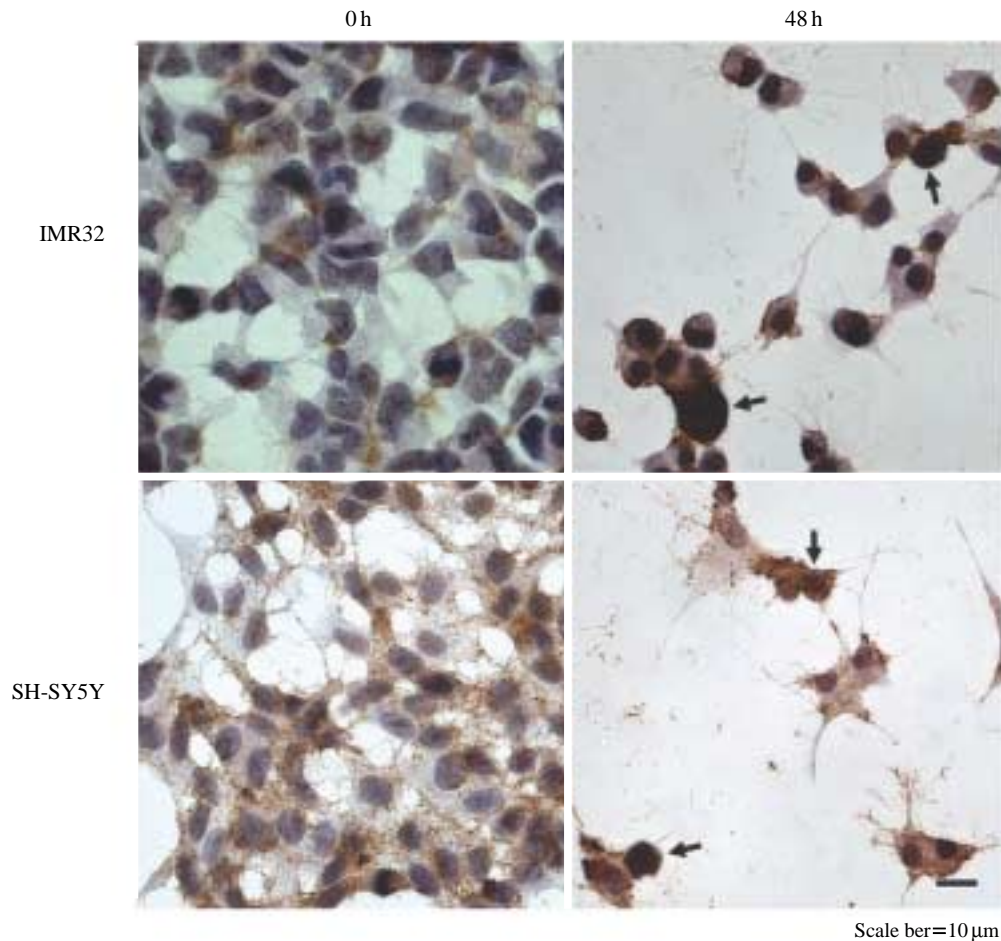


Fig. 3. Fenretinide induced apoptosis was evaluated by TUNEL staining. IMR23 and SHSY5YS were treated with 10^{-5} M fenretinide for 0 and 48 h. Counter staining is Hematoxylin. The cells maintain their normal features at 0 h. But at 48 h, cells with morphologically condensed nucleus are TUNEL positive (arrow) and robust cell loss is seen due to apoptosis. 400× magnification, scale=10 μm.

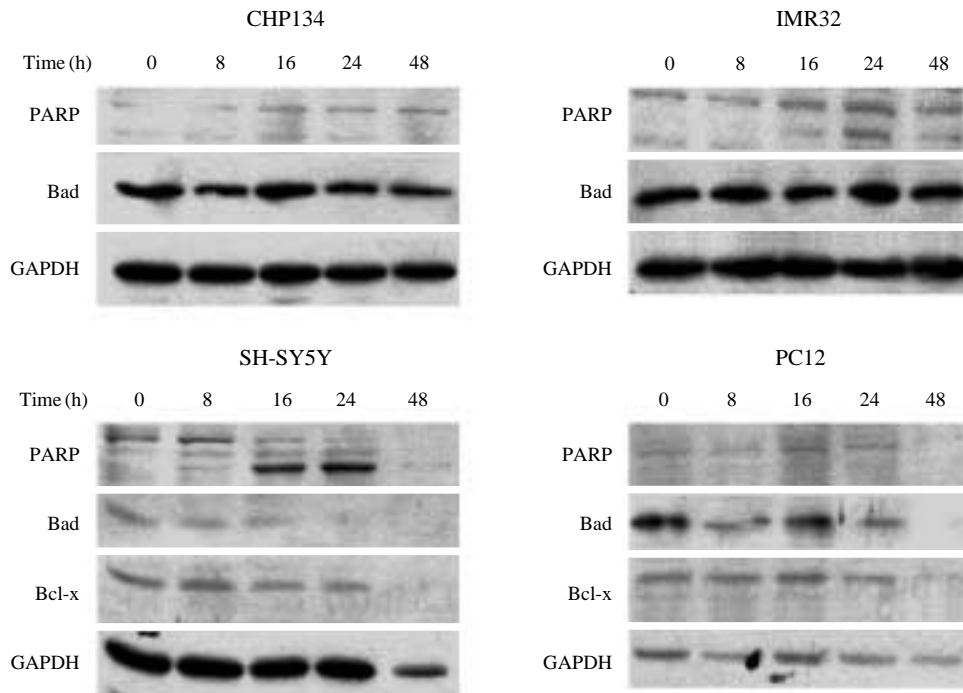


Fig. 4. Effect of fenretinide on the Bcl family expression and cleavage of PARP. Cells were treated for the indicated times with 10^{-5} M fenretinide. The expressions of Bad and Bcl-x, and the cleavage of PARP were measured by Western blotting. GAPDH represents the amount of loaded protein.

포자멸사과정을 통해서 나타나는지를 조사하였다. 신경모세포종 세포를 24시간동안 혈청이 없는 배양액에서 배양한 후 fenretinide을 10^{-5} M 농도로 처리하고 0, 24, 48, 72시간 배양하여 cytoplasmic DNA를 분리하였다. Agarose gel에서 전기영동을 시행하여 DNA fragmentation을 조사하였다. IMR32에서는 시간이 지남에 따라 DNA fragmentation을 나타내는 200 base pair ladder의 증가가 관찰되었으나, 세포독성이 일어나지 않은 PC12에서는 처리시간에 관계없이 아주 미미한 DNA fragmentation만이 관찰되었다 (Fig. 2). TUNEL 염색을 시행한 결과에서 fenretinide을 10^{-5} M 농도로 처리한 후 0시간에서는 IMR32와 SH-SY5Y은 형태변화가 없었으나 48시간째에는 핵에서 TUNEL 염색이 강하게 나타남을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

Fig. 4와 Fig. 5에서는 세포자멸사와 관련 있는 단

백질들의 변화를 Western blot으로 조사하였다. CHP134는 fenretinide 처리 24시간 이후부터, IMR32와 SH-SY5Y는 16시간 이후부터 116 kd과 85 kd 크기의 단백질을 보이는 PARP 단백분해를 관찰할 수 있었으며, PC12의 경우에는 PARP의 단백분해를 관찰할 수 없었다. Bcl family에 속하는 Bad와 Bcl-x의 발현은 CHP134, IMR32, SH-SY5Y, PC12 모두에서 fenretinide 처리 후 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 4). 세포분열시에 관찰되는 cyclin A와 cyclin D3의 발현은 fenretinide의 처리 유무에 관계없이 큰 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 5).

3. Fenretinide에 의한 세포 신호전달의 활성변화

MAP kinase인 ERK, JNK, p38들의 인산화정도를 Western blot 법을 이용하여 관찰하였다. CHP134는

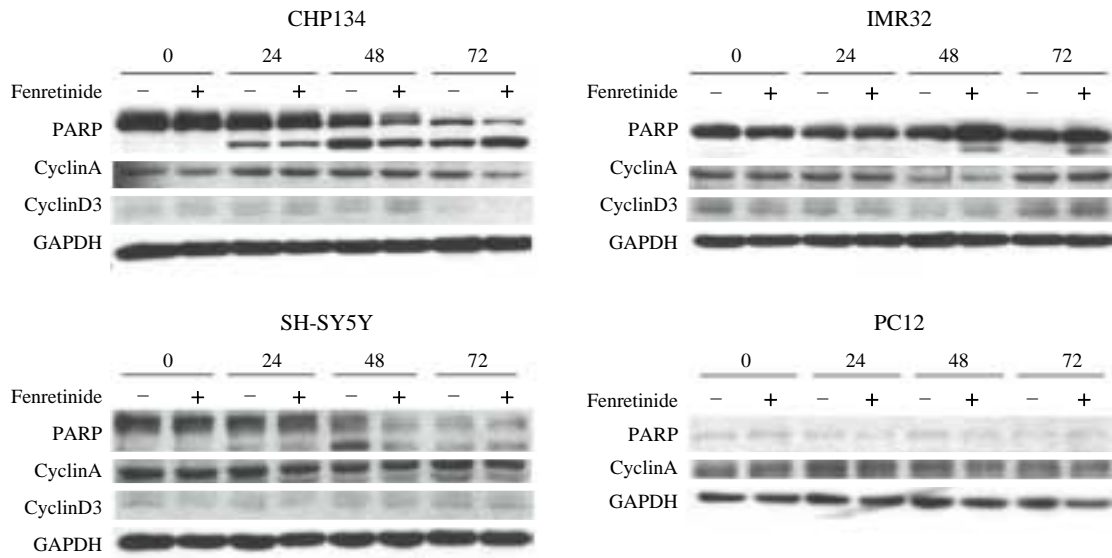


Fig. 5. Effect of fenretinide on expression of cyclin and cleavage of PARP. Cells were treated for the indicated times with 10^{-5} M fenretinide. The expressions of cyclin A and cyclin D3 and the cleavage of PARP were measured by Western blotting.

p38의 인산화는 조금 증가하였으나 JNK의 인산화는 변화가 없었다. IMR32는 p38의 인산화가 조금 감소하였으며 JNK의 인산화는 변화가 없었다. SH-SY5Y는 ERK의 인산화는 조금 증가하였고 JNK의 인산화는 변화가 없었다. PC12에서는 ERK와 JNK 모두에서 인산화의 변화는 없었다(Fig. 6).

Fenretinide에 의한 세포자멸사에 관여하는 세포 신호전달 과정을 알아보기 위하여 ERK 억제제 PD98059, p38 억제제인 SB203580, PI3 kinase 억제제인 LY294002, protein tyrosine kinase 억제제인 genistein 등을 전처치한 후 PARP 단백분해를 관찰하였다. CHP134, IMR32, SH-SY5Y 모두에서 fenretinide에 의한 PARP의 단백분해는 위의 억제제들에 영향을 받지 않았다. 또한 PC12에서는 PARP 단백분해는 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

고찰

Retinoid는 생명체의 성장과 분화의 조절에 중요한 역할을 한다. 이러한 retinoids의 생물학적인 효과

는 RA 수용체 (RARs)와 retinoid X 수용체 (RXRs)라고 알려진 핵수용체와의 결합을 통해서 나타나게 되며 이들 수용체들은 스테로이드 호르몬 수용체, thyroid 수용체, vitamin D3 수용체 등을 포함하는 ligand-유도 전사조절인자의 superfamily에 속한다. RARs와 RXRs는 retinoid에 반응하는 유전자의 promoters에 존재하는 polymorphic cis-acting responsive elements인 RA responsive elements (RAREs)와 retinoid X responsive elements (RXREs)를 통하여 그 작용이 이루어진다(Gigure 1994, Chambon 1996).

최근에는 세포증식에 미치는 retinoid의 영향으로 인하여 암의 예방과 치료에 응용하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있다. Retinoid의 항암효과의 기전에 대해서는 아직 명확히 확립되어 있지 않으나 항암 면역성을 증가시키거나 세포자멸사를 유도함으로써 항암효과를 나타낸다고 추정하고 있다. Fenretinide는 신경모세포종, 폐암, 악성 흑색종, 전립선암, 대장암, 유방암, 췌장암 등 여러 가지 암세포주에 대하여 세포독성을 나타낸다(Maurer 등 2000, Merritt 등 2001).

본 연구에서는 배양 중인 신경모세포종 세포에

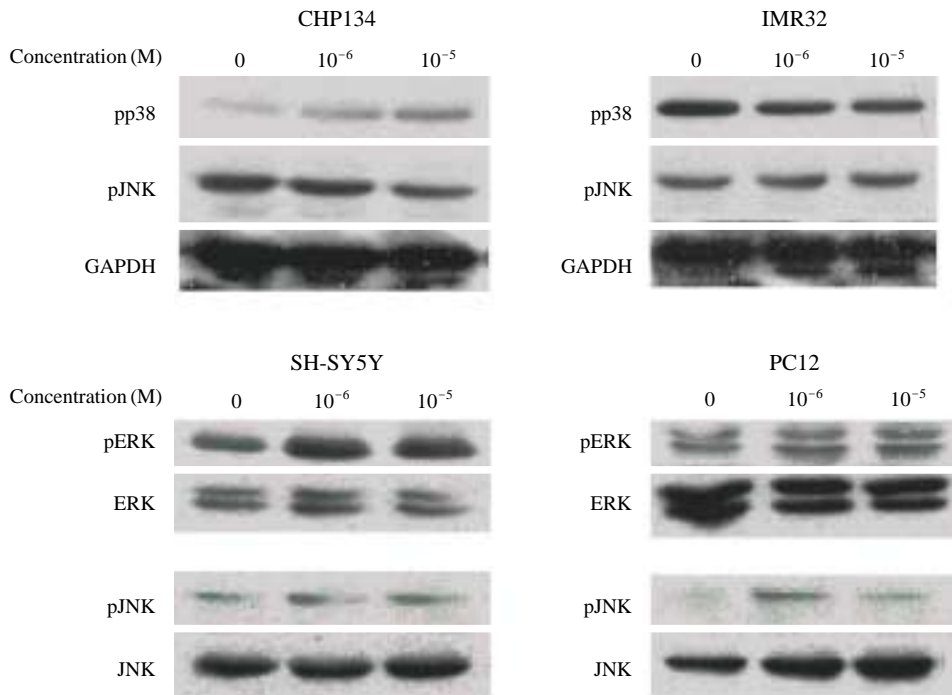


Fig. 6. Effect of fenretinide on the phosphorylation of MAP kinases. Cells were treated for 5 minutes with 10⁻⁶ or 10⁻⁵ M concentration of fenretinide. The phosphorylations of ERK, JNK and p38 were measured by Western blotting. GAPDH represents amount of loaded protein.

fenretinide을 처리했을 때 CHP134, IMR32, SH-SY5Y의 경우에는 10⁻⁵ M 농도에서 살아있는 세포 수가 대조군에 비하여 감소하였다. 이러한 세포수의 감소는 DNA fragmentation의 증가와 PARP 단백질의 단백질분해 등의 결과로 세포자멸사 유도에 의한 것임을 알 수 있다.

Bcl-2 family에는 Bcl-2와 Bcl-x와 같은 antiapoptotic 단백질과 Bad, Bax, Bak 등과 같은 proapoptotic 단백질로 분류할 수 있다. 일반적으로 Bcl-2 또는 Bcl-x가 증가하면서 Bax와 Bak 등의 증가가 보이지 않는다면 세포자멸사에 대하여 내성을 보이게 된다. Antiapoptotic 단백질이 증가하게 되면 proapoptotic 단백질과의 dimerization이 유도되며(Sedlak 등 1995), 이어서 heterodimeric 복합체를 형성하여 downstream에 존재하는 caspase활성으로 이어지는 세포자멸사과정을 차단한다(Ibrado 등 1996). 이와

같은 현상의 결과로 proapoptotic 단백질과 antiapoptotic 단백질의 양적인 균형에 따라 세포자멸사가 결정되어진다.

본 연구에서는 SH-SY5Y의 경우에만 Bad가 시간이 지남에 따라 발현의 감소가 확인되었으며 CHP134와 IMR32에서는 Bad의 변화를 관찰할 수 없었고 Bcl-x의 발현 변화도 관찰되지 않았다. 이 결과만을 가지고는 proapoptotic 단백질과 antiapoptotic 단백질의 양적인 비교와 fenretinide에 의하여 세포자멸사가 유도에 관련유무를 결론지을 수는 없다.

신경교종 세포에서는 fenretinide에 의하여 caspase-3가 활성화 되고 PARP의 단백질분해를 나타내며(Puduvalli 등 1999), 사람 자궁 경부암에서도 fenretinide에 의한 세포자멸사에 caspase-3의 활성이 증가하였다(Suzuki 등 1999)는 보고들이 있다. 반면 You 등(2001)의 연구에 따르면 Fas 결손 간암 세포

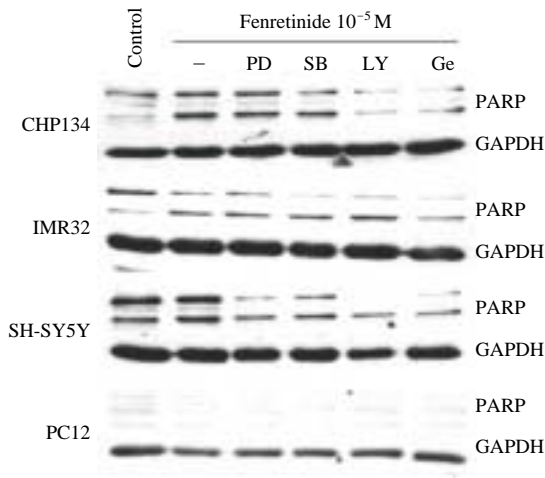


Fig. 7. Effects of inhibitors on the fenretinide-induced PARP cleavage. Cells were pretreated with PD98059 (PD), SB203580 (SB), LY294002 (LY) or genistein (Ge) for 1 h and then treated with 10^{-5} M fenretinide for 48 h. GAPDH represents amount of loaded protein.

에서는 caspase-8가 활성화 되는 것이 fenretinide에 의한 세포자멸사에서 관찰된다.

본 연구에서 CHP134는 fenretinide 처리 24시간 이후부터, IMR32와 SH-SY5Y는 16시간 이후부터 PARP의 단백질분해를 관찰할 수 있었다. 이것은 신경모세포종에서 fenretinide에 의한 세포자멸사 과정에 caspase-3의 활성증가에 기인하여 일어난 것을 추측할 수 있다.

본 연구에서 fenretinide에 의한 MAP kinase의 활성변화 결과는 CHP134에서 JNK의 인산화가 오히려 약간 감소하는 경향을 보였으며 IMR32와 SH-SY5Y에서는 변화를 관찰할 수 없었다. p38의 인산화는 CHP134에서 약간 증가하였으며 IMR32는 약간 감소하는 결과를 보였다. ERK의 인산화는 SH-SY5Y에서만 인산화가 약간 증가하였다. 이러한 MAP kinase 인산화의 다양한 결과에도 불구하고 ERK 억제제 PD98059와 p38 억제제 SB203580를 전처리하였을 때 fenretinide에 의한 PARP 단백질의 단백질분해에 아무런 변화를 보이지 않은 것은 ERK 또는 p38 MAP kinase 신호전달과정이 fenretinide에 의한 신경암 세포의 세포자멸사 기전에는 관여하지

않음을 시사한다. LY294002 또는 genistein을 전처리한 결과에서도 PARP 단백질의 단백질분해의 변화가 없으므로 PI3 kinase 신호전달과정과 protein tyrosine kinase 신호전달 과정들도 신경암 세포에서의 fenretinide에 의한 세포자멸사 기전에는 관여하지 않음을 추정할 수 있다.

결과를 종합하면 CHP134, IMR32, SH-SY5Y 등과 같은 신경모세포종에서 유래한 세포주에서는 fenretinide에 의하여 세포자멸사가 유도되었으며 신경모세포종에서 유래한 PC12에 대하여는 세포의 사멸에는 영향을 미치지 않았다. Fenretinide에 의한 신경모세포종의 세포자멸사는 대장암세포 또는 위암 세포에서 ERK, JNK, 또는 PI3 kinase 세포신호전달 과정이 세포자멸사에 관여한다는 연구와는 다르게 MAP kinase, PI3 kinase, protein tyrosine kinase 등의 세포신호전달 과정과는 무관하게 PARP 단백질은 단백질분해를 통하여 세포자멸사가 일어난다.

참고 문헌

- Barkley W, Holdener E : Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann Oncol* 3: 513-526, 1992.
- Becherel CO, Mossalayi MD, Le Goff L, Frances C, Chosidow O, Debre P, Arock M : Mechanism of antiinflammatory action of retinoids on keratinocytes NO-synthase activation. *Lancet* 344: 1570-1571, 1994.
- Chambon P : A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10: 940-954, 1996.
- Chen YR, Zhou G, Tan TH : c-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *Mol Pharmacol* 56: 1271-1279, 1999.
- Decensi A, Bonanni B, Guerrieri-Gonzaga A, Torrisi R, Manetti L, Robertson C, De Palo G, Formelli F, Costa A, Veronesi U : Chemoprevention of breast cancer: the Italian experience. *J Cell Biochem Suppl* 34: 84-96, 2000.
- Delia D, Aiello A, Lombardi L, Pelicci PG, Grignani F, Formelli F, Menard S, Costa A, Veronesi U, Pierotti MA : N-(4Hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer Res* 53: 6036-6041, 1993.
- Di Vinci A, Geido E, Infusini E, Giaretti W : Neuroblastoma

- cell apoptosis induced by the synthetic retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Int J Cancer* 59: 422-426, 1994.
- Dillehay DL, Walia AS, Lamon EW : Effects of retinoids on macrophage function and IL-1 activity. *J Leukocyte Biol* 44: 353-360, 1988.
- Dowlatshahi K, Mehta RG, Thomas CF, Dinger NM, Moon RC : Therapeutic effect of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide on N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary cancer. *Cancer Lett* 47: 187-192, 1989.
- Garaventa A, Luksch R, Piccolo MS, Cavadini E, Montaldo PG, Pizzitola MR, Boni L, Ponzoni M, Decensi A, Bernardi BD, Bellani FF, Formelli F : Phase I trial and pharmacokinetics of fenretinide in children with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 9: 2032-9, 2003.
- Gigure V : Retinoic acid and receptors and cellular retinoid binding proteins: Complex Mori H: Chemoprevention of azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis by a novel synthesized retinoidal butenolide, 5-hydroxy-4-(2-phenyl-(E)-ethenyl)-2(5H)-furanone, in rats. *Carcinogenesis* 16: 795-800, 1995.
- Hail N Jr, Lotan R : Mitochondrial respiration is uniquely associated with the prooxidant and apoptotic effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *J Biol Chem* 276: 45614-45621, 2001.
- Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhou L, Gu HT, Wang ZY : Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567-572, 1988.
- Hursting SD, Shen JC, Sun XY, Wang TT, Phang JM, Perkins SN : Modulation of cyclophilin gene expression by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide; association with reactive oxygen species generation and apoptosis. *Mol Carcinog* 33: 16-24, 2002.
- Ibrado AM, Huang Y, Fang G, Liu L, Bhalla K : Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res* 56: 4743-4748, 1996.
- Jiang XL, Dillehay DL, Everson MP, Tilden AB, Lamon EW : Potentiation of IL-2-induced t-cell proliferation by retinoids. *Int J Immunopharmacol* 14: 195-204, 1992.
- Lippman SM, Benner SE, Hong WK : Retinoid chemoprevention studies in upper aerodigestive tract and lung carcinogenesis. *Cancer Res* 54: 2025-2028, 1994.
- Lovat PE, Ranalli M, Bernassola F, Tilby M, Malcolm AJ, Pearson AD, Piacentini M, Melino G, Redfern CP : Synergistic induction of apoptosis of neuroblastoma by fenretinide or CD437 in combination with chemotherapeutic drugs. *Int J Cancer* 88: 977-985, 2000a.
- Lovat PE, Ranalli M, Annichiarico-Petruzzelli M, Bernassola F, Piacentini M, Malcolm AJ, Pearson AD, Melino G, Redfern CP : Effector mechanisms of fenretinide-induced apoptosis in neuroblastoma. *Exp Cell Res* 260: 50-60, 2000b.
- Lovat PE, Oliverio S, Ranalli M, Corazzari M, Rodolfo C, Bernassola F, Aughton K, Maccarrone M, Hewson QD, Pearson AD, Melino G, Piacentini M, Redfern CP : GADD153 and 12-lipoxygenase mediate fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma. *Cancer Res* 62: 5158-5167, 2002.
- Mariotti A, Marcora E, Bunone G, Costa A, Veronesi U, Pirotti MA, Della Valle G : N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: a potent inducer of apoptosis in human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 86: 1245-1247, 1994.
- Martin SJ, Bradley JG, Cotter TG : HL60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol* 79: 448-453, 1990.
- Maurer BJ, Metelitsa LS, Seeger RC, Cabot MC, Reynolds CP : Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* 91: 1138-1146, 1999.
- Maurer BJ, Melton L, Billups C, Cabot MC, Reynolds CP : Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and modulators of ceramide metabolism. *J Natl Cancer Inst* 92: 1897-1890, 2000.
- Merritt G, Aliprandis ET, Prada F, Rigas B, Kashfi K : The retinoid fenretinide inhibits proliferation and downregulates cyclooxygenase-2 gene expression in human colon adenocarcinoma cell lines. *Cancer Lett* 164: 15-23, 2001.
- Moon RC, Grubbs CJ, Sporn MB, Goodman DG : Retinyl acetate inhibits mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Nature* 267: 620-621, 1977.
- Moon RC, Thompson HJ, Becci PJ, Grubbs CJ, Gander RJ, Newton DL, Smith JM, Phillips SL, Henderson WR, Mullen LT, Brown CC, Sporn MB : N-(4-Hydroxy-phenyl)retinamide a new retinoid for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res* 39: 1339-1346, 1979.
- Ortiz MA, Lopez-Hernandez FJ, Bayon Y, Pfahl M, Piedrafi-

- ta FJ : Retinoid-related molecules induce cytochrome c release and apoptosis through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinases. *Cancer Res* 61: 8504-8512, 2001.
- Peng Y-M, Dalton WS, Alberts DS, Xu M-J, Lim H, Meyers FL : Pharmacokinetics of N-4-hydroxyphenyl-retinamide and the effect of its oral administration on plasma retinol concentrations in cancer patients. *Int J Cancer* 43: 22-26, 1989.
- Puduvalli VK, Saito Y, Xu R, Kouraklis GP, Levin VA, Kyritsis AP : Fenretinide activates caspases and induces apoptosis in gliomas. *Clin Cancer Res* 5: 2230-2235, 1999.
- Raffaghello L, Pagnan G, Pastorino F, Cosimo E, Brignole C, Marimpietri D, Montaldo PG, Gambini C, Allen TM, Bogenmann E, Ponzoni M : *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of liposomal Fenretinide targeted to human neuroblastoma. *Int J Cancer* 104: 559-567, 2003.
- Rozzo C, Chiesa V, Caridi G, Pagnan G, Ponzoni M : Induction of apoptosis in human neuroblastoma cells by abrogation of integrin-mediated cell adhesion. *Int J Cancer* 70: 688-698, 1997.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ : Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7834-7838, 1995.
- Sporn MB, Rogers AB, Goodman DS : *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. 2nd ed, Raven Press, New York, 1992.
- Suzuki S, Higuchi M, Proske RJ, Oridate N, Hong WK, Lotan R : Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Oncogene* 18: 6380-6387, 1999.
- Wang TTY, Phang JM : Effect of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide on apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Lett* 107: 65-71, 1996.
- You KR, Shin MN, Park RK, Lee SO, Kim DG : Activation of caspase-8 during N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in Fas-defective hepatoma cells. *Hepatology* 34: 1119-1127, 2001.
- You KR, Wen J, Lee ST, Kim DG : Cytochrome c oxidase subunit III: a molecular marker for N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced oxidative stress in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277: 3870-3877, 2002.

Abstract

Fenretinide Induced Apoptosis in Human Neuroblastoma Cell Lines

Jae-Kyu Lee^{1,3}, In-Hwan Song², Seong-Yong Kim¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology,

²Department of Anatomy, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu,

³Department of Neurosurgery, Masan Bokeum Hospital

Retinoids play an important role in growth, reproduction and differentiation. Recently, retinoids have been used to both protect and treat from various animal models of carcinogenesis. In this study the effect of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (fenretinide) on viability of human neuroblastoma cell lines were evaluated.

For the evaluation of apoptosis of human neuroblastoma cell lines by fenretinide. MTT assay, cytoplasmic DNA fragmentation, TUNEL stain, and Western blot analysis were performed.

In MTT assay, fenretinide inhibited the proliferation of CHP134, IMR32 and SH-SY5Y but not in PC12 cells. Cytoplasmic DNA fragmentation was induced by treatment of fenretinide (10 μ M) for 48 h in IMR32 cells. PARP cleavage was detected by Western blot analysis after 16 h of treatment of fenretinide in CHP134, IMR32 and SH-SY5Y. These fenretinide effects on growth inhibition and increased apoptosis followed to the time dependent manner. The fenretinide treatment did not affect the phosphorylation of MAP kinases (ERK, JNK, p38). There was no change of Bcl-x and Bad expression after treatment of fenretinide (1 μ M) in neuroblastoma cell lines. Pretreatment of PD98059, SB203580, LY294002, or genistein also did not affect fenretinide-induced PARP cleavage in neuroblastoma cell lines.

From these results, the fenretinide-induced apoptosis is due to the PARP cleavage which occurred MAP kinase signal cascades independently.

Key words : Apoptosis, Fenretinide, Human neuroblastoma cell line, MAP kinase, Retinoids