대한침구의학회지 제32권 제1호 (2015년 3월) : 79-88
The Acupuncture Vol. 32 No. 1 March 2015 : 79-88
pISSN 1229-1137 eISSN 2287-7797
http://dx.doi.org/10.13045/acupunct.2015007

Original Article

사독의 인체 폐암세포(A549)에 대한 Natural Killer 세포 세포독성 촉진 효과※

이지인, 송호섭*

가천대학교 한의과대학 침구의학교실

[Abstract]

Snake Venom-enhanced Cytotoxic Effect of Natural Killer Cells on A549 Human Lung Cancer Cell Growth※

Ji In Lee and Ho Sueb Song*

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Orinetal Medicine, Gachon University

Objectives : The purpose of this research was to investigate the cytotoxic effect of Natural Killer(NK)-92 cell and Snake Venom, and to elucidate its mechanism on human lung carcinoma cell A549.

Methods : In order to figure out whether Snake Venom enhances the cytotoxic effect of NK-92 cell in A549 cell, Cell Viability Assay was conducted. Also, in order to observe the changes of Caspase-3 and Caspase-8, both of which are proteinases that advance apoptosis, and the changes of TNRF and DR3, which are Death Receptors of the extrinsic pathway of apoptosis, Western Blot Analysis was conducted. By conducting RT-PCR analysis, we have tried to confirm Perforin, Granzyme B, and GADPH, all of which are cytotoxic-related proteins. Lastly, in order to observe the effect of Snake Venom on NO formation within human lung carcinoma cells, NO determination was conducted.

Results : 1. After conducting Cell Viability Assay, Snake Venom enhanced the cytotoxic effect of NK-92 cell and inhibited the growth of A549.

2. Western Blot Analysis caused proteinases Caspase-3 and Caspase-8, which advance apoptosis, to increase in the combined treatment group, but not in treatment groups that focused only on either Snake Venom or NK-92 cell in A549 lung carcinoma cells.
3. Western Blot Analysis caused an expression of TNFR2 and DR3, both of which are Death Receptors of the apoptosis extrinsic pathway, in the combined treatment group, but not intreatment groups that focused only on either Snake Venom or NK-92 cell in A549 human lung carcinoma cells.
4. After conducting NO determination, NO formation within A549 cell showed no significant changes in both treatment groups that focused NK-92 cell and combined treatment group.
5. After conducting RT-PCR, the expression of Granzyme B and Perforin, which are cytotoxic-related proteins within A549 human lung carcinoma cells, showed growth in the combined treatment group, but not the treatment group that focused only on NK-92 cell.

Conclusion : It has been indicated that, when it comes to the A549 cell, Snake Venom enhances the increase of Death Receptor expression and continuous apoptosis reaction, leading to the enhancement of the cancer cell cytotoxic effect of the NK-92 cell. It is expected that Snake Venom can be used with the NK-92 cell for further lung cancer treatment.

Key words :
Snake venom;
Lung cancer;
A549;
NK-92;
Death receptor;
Nitric oxide

Received : 2015. 02. 13.
Revised : 2015. 02. 22.
Accepted : 2015. 02. 23.
On-line : 2015. 03. 20.

※ This research was supported by the Gachon University Research Fund in 2015

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Gil Oriental Medicine Hospital of Gachon University, 12, Dokjeom-ro 29beon-gil, Namdong-gu, Incheon, 405-835, Republic of Korea
Tel : +82-70-7120-5012 Email : hssong70@gachon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
The Acupuncture is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (http://www.TheAcupuncture.org)
Copyright © 2014 KAMMS. Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

Ⅰ. 서 론

2014년 미국 통계에 따르면 총 4명 중 1명이 암으로 사망한다고 했는데, 이 중 폐암은 유방암, 전립선암과 함께 발병률이 높은 질환 중 하나이다[1]. 폐암 치료는 비소세포암과 소세포암의 두 그룹으로 나누어 각 분류에서의 병기(病期), 환자의 건강상태 등 여러 요인에 따라 치료 방침을 결정하게 된다. 폐암의 기존 치료방법은 수술, 방사선요법, 화학요법으로 나눌 수 있다. 비소세포 폐암의 치료는 병기에 따라 여러 요법을 단독 혹은 병행하여 선택하게 되고, 소세포 폐암은 전이가 쉬워 몸 전체에 존재하는 암세포에 접근하기 위해 항암화학요법을 사용하는 것이 일반적이다[2,3].

항암화학요법은 암세포뿐 아니라 정상 세포 중 증식속도가 빠른 세포도 파괴하여 범혈구감소, 구내염, 상부 소화관 증상, 탈모 등 다양한 부작용을 유발할 뿐 아니라[3], 암세포가 항암화학요법에 내성이 생기면 암세포가 치료에 전혀 반응을 하지 않거나, 1차 치료에는 반응을 하나 재차 시행된 화학요법에는 반응하지 않기도 하여 치료 실패로 이어지는 사례가 많다[4]. 따라서 항암치료에서 항암화학요법 외의 대안적 치료 연구 필요성이 대두되고 있다.

현재 항암화학요법의 대안으로 부상하는 것은 면역요법(immunotherapy)으로, 면역요법은 항암작용을 하는 세포군(macrophage, NK cell, B cell)을 활성화시켜 종양세포에 대해서만 면역 반응을 유도하여 종양세포의 사멸이나 증식 억제를 기대하는 것이다. 또 하나의 기대효과는 암에 의해 생기는 면역부전 상태를 개선시키고 다른 치료요법과 병용하여 항종양 효과를 얻는 것이다. 이렇게 면역으로 인한 항암효과를 촉발하는 물질을 생체반응조절인자(biological response modifier, BRM)라 지칭한다[5,6].

자연살해세포(natural killer cell, NK cell)는 선천성 면역반응에 중추적인 역할을 하며, 세포 독성 림프구로 바이러스 감염 세포나 종양세포를 용해하거나 직접 세포독성 작용을 한다. 자연살해세포의 작용 기전 중 항종양효과와 관련 있다고 밝혀진 기전은 항체 의존성 세포 매개형 세포독성(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)과 자연세포독성 수용체(natural cytotoxicity receptors, NCRs)들에 의해 매개되는 자연살해 기전이다. 이러한 기전으로 인한 항암효과는 여러 연구에서 밝혀진 바 있다[7-9].

사독(snake venom)은 다양한 생물독(biotoxin) 중 하나로, 모든 생물독은 독성 효과뿐 아니라 약리학적인 반응을 통해 생체 내에서 다양한 반응을 유도하게 된다. 최근의 연구에 따르면 사독에서 분리된 여러 물질(acetylcholinesterase, L-amino acid oxidase, serine prostases, metalloproteinases, phospholipase-A2 등)이 단독으로 항암효과가 있는지에 대해 다양한 연구가 이루어졌다[10,11]. 이러한 연구들은 사독에서 추출된 특정 물질의 항암 효과를 연구한 것이 대부분으로, 사독이 인체 폐암세포에 대해 NK cell의 암세포 성장 억제 효과를 촉진하는지에 대해서는 현재까지 연구가 다양하게 이루어진 바 없다.

따라서 이번 연구에서는 사독이 인체 폐암 세포인 A549에서 NK-92 세포의 암세포 성장 억제 효과를 더욱 촉진시켜 면역반응을 활성화시키는 BRM으로서의 가능성이 있는지에 대해 알아보고, 암세포의 세포자멸사 기전 촉진에 있어서 어떠한 기전을 증강시키는지 밝혀 보고자 한다.

Ⅱ. 방 법

1. 재료

Vipera lebetina turanica로부터 추출한 사독은 Sigma Chemical Co(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Western blot analysis에 사용된 TNFR2, DR3, bax, caspase-3 and cleaved caspase-3, caspase-8 and cleaved caspase-8과 같은 이차항체들은 모두 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구매하였다. 달리 명시되지 않은 기타 시약은 Sigma Chemical Co에서 구입하였다. NK-92 자연살해세포, A549 폐암세포는 The American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Gibco Life Technologies(Grand Island, NY, USA)에서 RPMI 1640, MEM alpha, penicillin, streptomycin 및 fetal bovine serum (FBS)를 구매하여 연구에 활용하였다.

2. 세포 배양

NK-92세포의 처리는 20 % fetal bovine serum(FBS), 100 IU/㎖ penicillin, 100 ㎍/㎖ streptomycin 및 10 ㎍/㎖ intereukin-2(IL-2)를 포함하는 MEM alpha 배지에서 배양하였다. A549 세포는 37 ℃, 5 % CO_2 incubator 조건에서 10 % FBS, 100 IU/㎖ penicillin, and 100 ㎍/㎖ streptomycin을 함유한 RPMI 1640 배지 내에서 배양하였다. A549와 NK-92 세포를 공동 배양할 경우에는 MEM alpha와 RPMI 1640을 1:1로 혼합한 배지에서 배양하였고,

미세공 폴리카보네이트 막(porous polycarbonate membrane, pore size 0.4 ㎜ ; distance 6.5 ㎜)에 의해 세포 분리되는 trans-well system을 이용하였다. A549 세포(5×10^4 cells/well)를 하룻밤 동안 배양한 후 NK-92 세포(5×10^4 cells/well)를 동일 well에 첨가하여 배양하였다. 모든 세포의 배양은 Costar(Corning, NY, USA)사의 24-well plates를 활용하였다.

3. Cell viability assay

살아 있는 세포 수 확인을 위하여 A549 폐암 세포 및 NK-92와 공동 배양된 A549 세포를 24-well plates(5×10^4 cells/well)에 분주하였으며, 그 후 4 ㎍/㎖ 농도의 snake venom을 처리하여 배양하였다. 세포는 트립신 처리 후 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하고, 하층에 분리된 pellet에 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline) 10 ㎖를 부어 재현탁하였다. 암세포 현탁액(suspension) 각 0.9 ㎖에 0.2 % trypan blue 0.1 ㎖를 첨가하여 재부유 과정을 거쳤다. 현탁액 한 방울의 분량을 neubauer chamber에 채우고 살아 있는 암 세포를 감별하여 counting 하였다. Trypan blue를 흡수한 징후를 보이는 세포는 죽은 것으로, Trypan blue를 배제한 세포는 살아있는 세포로 간주하였다. 각 분석은 세 번 반복하여 오차를 줄이고자 하였다.

4. Western blot analysis

생화학적 면역 분석을 위해 세포는 lysis buffer(50 ㎛ tris, pH 8.0, 150 ㎛ NaCl, 0.02 % NaN_3, 0.2 % SDS, 1 ㎛ phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 l/㎖ aprotinin, 1 % igapel 630(Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), 10 ㎛ NaF, 0.5 ㎛ EDTA, 0.1 ㎛ EGTA, 0.5 % sodium deoxycholate)로 세포를 용해하였으며, 23,000 rpm의 속도로 1시간 동안 원심분리 처리를 거쳤다. 정량화된 단백질 시료(80 ㎍)를 SDS-12 % polyacrylamide gel 전기 영동법(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)으로 분리한 뒤, 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane(Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA)으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막을 0.05 % tween 20를 포함하는 tris buffered saline(10 ㎛ tris, pH 8.0, 150 ㎛ NaCl)으로 씻은 후 5 % (w/v) 탈지분유 액으로 실온에서 2시간 동안 blocking하였다. membrane은 뒤에 언급한 특이항체[caspase-3, -8, cleaved caspase-3, caspase-8에 직접 반응하는 rabbit polyclonal antibodies(1:1,000 비율로 희석하여 사용 ; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), Fas, TNFR2, DR3(1:500 비율로 희석하여 사용 ; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA)]와 5시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그 후 blot은 anti-rabbit과 anti-mouse immunoglobulin G-horseradish peroxidase(1:2,000 dilutions, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) 혼합액에서 배양하였다. Western blot 결과는 ECL western blotting detection system을 이용하여 가시화하였다.

5. RT-PCR analysis

Total RNA는 RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 활용하여 추출하였다. 역전사반응은 RNA to cDNA kit(Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 template로 PCR을 시행하였는데, 96 ℃에서 1분간 변성시키고, 반응과정으로 각각 96 ℃에서 1분간, 60 ℃ 혹 63 ℃에서 1분간, 그리고 72 ℃에서 1분간 총 30 cycle을 수행하였다. 역전사 반응 후 polymerase chain reaction(PCR) 반응에 사용한 primer는 5'-3' GCCAACT TTGCAGCCCAG로 perforin을, granzyme B 분석에는 5'-3 TGCTTCCTGTAGTTAGTAGC 염기 서열을 이용하였다.

6. NO determination

상층액의 아질산성 질소 축적은 griess reaction을 활용하여 평가하였다. 각 50 ㎕의 배양 상층액을 동일한 양의 griess reagent과 혼합하여 10분 동안 실온에서 배양하였다. 마이크로플레이트 흡광 리더기(microplate absorbance reader)를 활용하여 540 ㎛에서 흡광도를 측정하였다. Griess 시약은 0.1 % N-(1-naphthyl)-ethylenediamine와 1 % sulfanilamide in 5 % phosphoric acid를 섞어 조제하였다.

7. 통계처리

Graphpad prism 4 ver. 4.03 소프트웨어(GraphPad

Software, La Jolla, CA)를 활용하여 데이터를 분석하였다. 데이터는 mean ± SD 형식으로 표기하였으며, 모든 데이터 수치 차이는 일원변량분석(one-way analysis)를 활용해 계산하였다. 분산분석에서 p-value가 통계적 유의성을 보일 때, Dunnett's test로 사후 검정하였다. p-value가 0.05 이하를 유의성이 있는 것으로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 사독과 NK-92 세포의 A549 성장 억제에 대한 촉진 효과

사독이 A549 인체 폐암 세포에서 NK-92의 성장억제 효과를 촉진하는지를 평가하기 위해 direct cell counting을 통해 세포 활성도를 분석하였다. A549 세포는 단독 배양하거나 NK-92세포와 공동으로 배양하였고, 사독을 처리하거나 혹은 처리하지 않은 상태로 24시간 동안 배양하였다.

Fig. 1에서 제시한 바와 같이, 사독 및 NK-92 cell은 인간 폐암세포 A549의 세포 증식을 각각 억제하였다. A549 세포를 단독으로 배양한 대조군과 비교하였을 때 NK cell과 사독을 공동 배양하였을 때 세포 수를 유의하게 감소시킨 것을 확인할 수 있었다. NK-92세포에 사독을 24시간 동안 처리하여 대조군과 비교하였을 때 세포 형태학적인 변화는 관찰되지 않았다

2. 사독과 NK-92세포가 세포사멸 수용체 및 세포자멸사 조절 단백질 발현에 미치는 영향

사독과 NK-92세포가 A549 인체 폐암세포에서 TNFR2, DR3와 같은 세포사멸 수용체와 대표적인 세포자멸 조절 단백질인 bax, caspase-3, caspase-8, cleaved caspase-3,

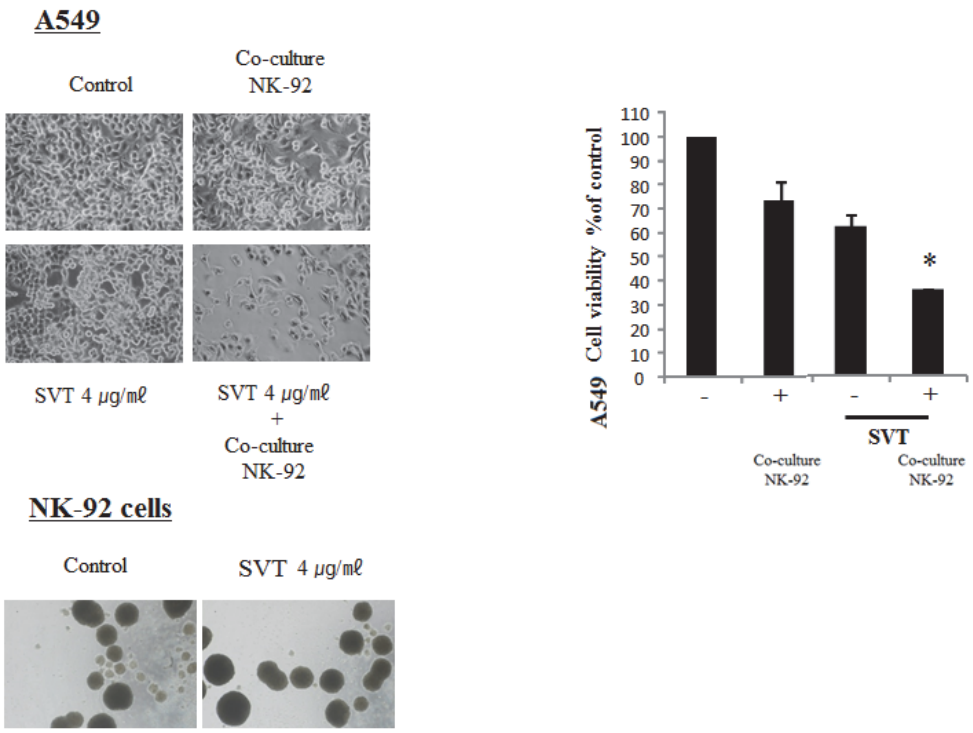

Fig. 1. Snake venom enhances cytotoxic effect of NK-92 cells on A549 human lung cancer cells

The A549 human lung cancer cells, and those co-cultured with NK-92 cells were seeded onto 24-well plates(5 × 10^4 cells/well) and subconfluent cells were subsequently treated with snake venom(4 ㎍/㎖) for 24 hrs. The cells were then harvested by trypsinization and stained with 0.2 % Trypan blue. Relative cell survival rate was determined by counting live and dead cells. The results were expressed as a percentage of viable cells. Columns, means of three experiments, with triplicates of each experiment; bars, SD.
* : $p<0.05$, significantly different from co-cultured with NK-92 cells.

cleaved caspase-8의 발현 증가를 촉진하는지 확인하고자 하였다.

세포자멸사 조절 단백질 및 세포사멸 수용체는 western blot analysis을 통해 확인하였다. TNFR2, DR3는 NK-92 세포만 단독으로 배양했을 때보다 사독을 처리하여 NK-92과 공동 배양하였을 때 발현이 두드러지게 증가하였다(Fig. 2). 동시에 bax, caspase-3, caspase-8, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8 또한 NK-92세포만 배양했을 때보다 사독을 처리하여 NK-92와 공동 배양하였을 때 발현이 증가하였다(Fig. 2).

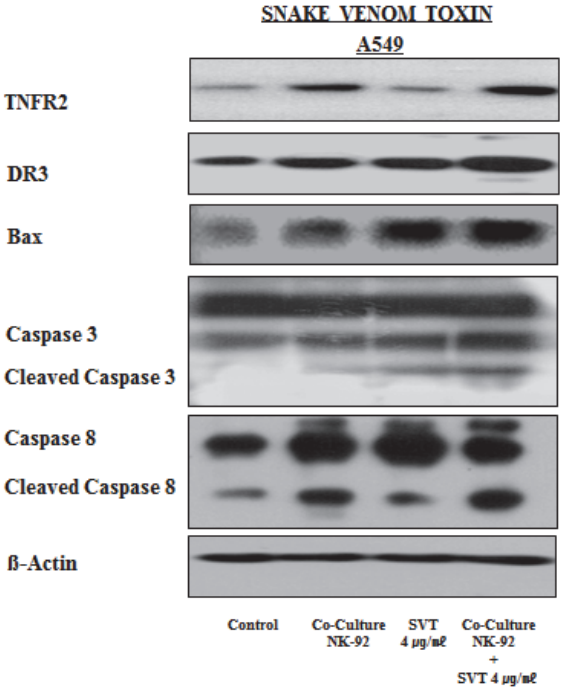

Fig. 2. Snake venom enhances the expression of death receptor and its related apoptotic proteins by NK-92 cells in A549 human lung cancer cells

Expression of death receptors such as TNFR2, DR3 and apoptosis regulatory proteins such as apoptosis regulatory proteins such as bax, caspase-3, caspase-8, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-8 was determined using western blot analysis.

A549 human lung cancer cells were co-cultured with NK-92 cells and subsequently treated with 4 ㎍/㎖ of snake venom for 24 hrs.

Equal amounts of total proteins(50 ㎍/lane) were subjected to 12 % or 8 % SDS- PAGE. Expression of TNFR2, DR3, Bax, caspase-3, caspase-8, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8 and β- actin was detected by western blotting using specific antibodies.

Each band is representative for three experiments.

3. 사독과 NK-92세포가 NO 생성에 미치는 영향

A549 인간 폐암 세포에서 NK-92 세포가 NO pathway를 통하여 세포 독성에 영향을 미치는지를 확인하기 위해, NK-92세포와의 배양 여부 및 사독 처리 여부에 따라 상층액의 아질산성 질소(nitrite) 축적 정도를 griess reaction으로 평가하였다. NK-92세포와 배양하거나 사독을 처리하여 공동 배양하였을 때, 대조군과 비교하여 상층액의 NO 정도는 거의 증가하지 않았다(Fig. 3). 두 가지 물질을 공동으로 배양하였을 때 시너지 효과 또한 관찰되지 않았다(Fig. 3).

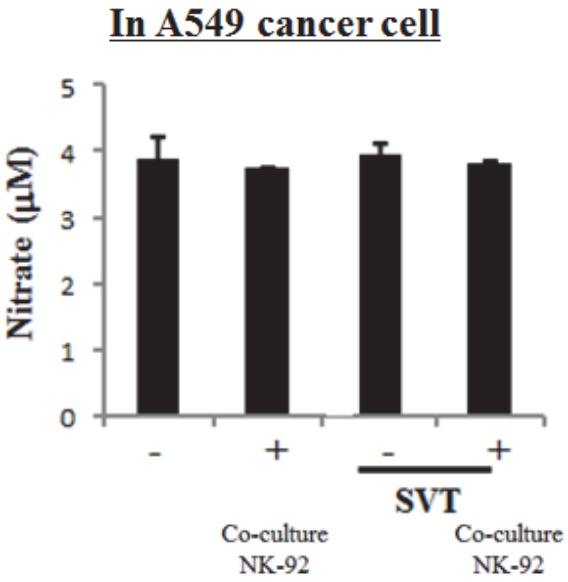

Fig. 3 Effect of co-culture of NK-92 cells on the level of NO in the A549 Human Lung Cancer Cells.

The cells were co-cultured with NK-92 cells and then treated with snake venom(4 ㎍/㎖) for 48 hrs. Thereafter, the nitrite release in the supernatant was assessed by griess reaction as described in Materials and methods. The figures are representatives of three experiments with replicates.

Values are mean ± SD of three experiments with replicates.

4. 사독과 NK-92 세포가 perforin, granzyme B 발현에 미치는 영향

사독과 NK-92세포가 A549 인간 폐암 세포에서 NK-92 세포독성과 연관된 단백질인 perforin, granzyme B의 발현을 증강시키는지 알아보고자 하였다. Perforin, granzyme

B는 RT-PCR 분석을 통해 조사하였다. 결과적으로 NK-92세포에 사독을 처리하여 공동 배양하였을 때가 NK-92만 배양하는 것보다 perforin의 발현이 두드러지게 증가하였으며, granzyme B는 NK-92세포에 사독을 처리하여 공동 배양하였을 때가 NK-92만 배양하는 것에 비해 다소 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

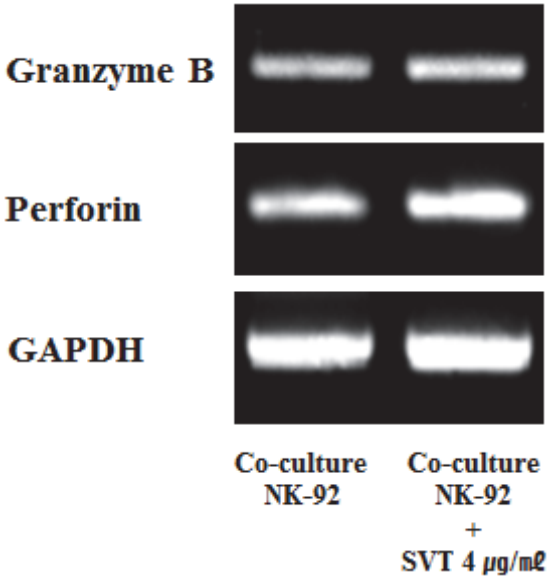

Fig. 4. Snake venom enhances the expression of NK-92 cell-related cytotoxic proteins in A549 human lung cancer cells

Expression of NK-92 cell related cytotoxic proteins such as perforin and granzyme B and GADPH was detected by RT-PCR analysis. GADPH protein was used as an internal control. Each band is representative for three experiments.

Ⅳ. 고 찰

폐암은 전체 암 중 유방암, 전립선암에 이어 세 번째로 발병률이 높으며 남녀를 불문하고 사망률 1위를 차지하는 질환이다. 따라서 조기 발견 및 효과적인 치료의 중요성이 대두되고 있다[1]. 폐암의 기존 치료 방법으로는 수술, 방사선요법 및 화학요법이 있으며, 병기 및 조직형(비소세포암, 소세포암)에 따라 단독 혹은 복합적으로 선택하여 치료하게 된다. 항암화학요법의 약리는 일반적으로 세포자멸사(apoptosis)를 유발하여 종양세포의 증식을 억제하는 것인데, 이는 정상세포 또한 파괴하여 다양한 부작용을 유발할 뿐 아니라 인체가 특정 항암제에 내성이 생길 때는 치료에 한계가 있다[3].

기존 항암화학요법의 한계를 극복하고자 현재 면역세포를 이용한 항암치료가 부각되고 있으며, 그 중 NK cell에 대한 연구 또한 진행되고 있다. NK cell은 과립성의 큰 세포독성 림프구로, 과립구나 대식세포 표면에 발현되는 FcrRⅢ(CD16)와 같은 IgG의 Fc 수용체를 가지고 있다. IFN-α, IFN-β, TNF-α 그리고 IL-2에 의해 분화가 촉진되어 림포카인활성 살생세포(lymphokine Activated killer cell, LAK cell)가 되어 결합된 목표세포의 표면에 세포 독성과립들을 방출하면, 과립에 포함된 효과단백은 세포막을 통과하여 programmed cell death를 유도한다. NK cell은 기능적으로 cytotoxic T lymphocyte(CTL)과 유사하지만 major histocompatibility complex(MHC) 제한 특성을 가지고 있지는 않으며, 주로 바이러스에 감염된 세포나 암세포 등을 제거한다. NK cell에 대한 감수성은 class Ⅰ MHC의 발현과 반비례하는데, 일반적으로 사람의 NK cell 표면의 killer inhibitory receptor(KIR)는 자기 class Ⅰ MHC 분자를 인식, 결합하여 자기세포에 대한 손상을 억제한다. 그러나 일부 바이러스에 감염된 세포나 암세포는 class Ⅰ MHC의 발현이 감소되기 때문에 NK cell에 의해 사멸될 수 있어, class Ⅰ MHC 결핍세포들이 세포독성 T 세포에 의해서는 제거되지 못하는 단점을 NK cell이 보완하는 것이다. NK cell의 특징적인 표식자는 CD56이며, CD16은 IgG가 결합된 표적세포를 인식하여 ADCC로 표적세포를 사멸시킨다. ADCC는 세포표면에 결합한 항체가 자연살해세포 표면의 Fc 수용체(FcrRⅢ, CD16)와 상호작용을 함으로써 시작되며 공격기전은 perforin과 granzyme들을 포함하는 세포질 과립을 분비하는 세포독성 T 세포와 아주 흡사하다[12,13].

BRM은 면역반응을 유도하는 물질을 총칭하는 것으로, 체내에서 생성될 수 있으나 박테리아, 곰팡이, 이끼, 광합성 식물, 동물 등 체외에서도 다양하게 합성될 수 있다. BRM은 잠재적으로 '숙주 대 암 반응(host versus tumor response)'을 증가시켜 결과적으로 암세포의 증식으로부터 숙주의 항병력이 증대되는 효과가 있다[5,6].

외인성 BRM은 핵산, 지방, 단백질, 다당류 등 다양한 물질이 될 수 있으며 보체, T-림프구, B-림프구, NK cell 등을 활성화시켜 결과적으로 바이러스, 박테리아, 기생충, 종양세포 등을 제거하도록 유도한다. BRM의 알려진 기전으로는 NK cell을 직접 활성화시키기도 하지만 DCs나 대식세포 등을 활성화시켜 IL-1과 같은 사이토카인 분비를 유도하고, 이러한 사이토카인이 보조 T 세포(helper T cell)를 자극하여 NK cell 등 림프구가 항원/ 종양세포를 제거하도록 유도하기도 한다. 가장 많은 연구가 이루어진 물질은 버섯 등에서 추출된 다당류로, 단독으로 항암 치료제로

활용한다는 보고는 많지 않으나 수술 이후 예후개선 및 화학요법 시행 시 보조적 치료로 유의미한 효과가 있다고 보고된 바 있으며 또한 암 환자의 생을 연장시키고 삶의 질(척도: 식욕, 수면, 오심/구토, 복통/설사)을 개선한다는 보고가 있다[14,15].

생물독은 자연독(natural toxin)이라고도 지칭하며 살아있는 생물체(식물, 동물, 균류, 세균 등)로부터 유래된 독소 혹은 독을 의미한다. 자연독은 독성 효과뿐 아니라 약리학적인 작용이 있으며 다양하고 새로운 물질로 구성되어 있어 악성 종양과 같은 병태생리학적 문제를 해결하는 약물을 개발할 때 출발점이 되는 역할을 한다. 자연독 중 사독은 뱀 자신을 천적으로부터 보호하거나 먹이의 움직임을 제한하기 위해 침(saliva)이 변형되어 만들어진 것으로, polypeptide와 다양한 생리 활성물질이 혼합되어 있다. 사독의 구성 성분은 종(species), 성장완료 여부, 서식지에 따라 다르나 대체적으로 사독 건조중량의 90~95 %는 단백질로 구성되어 있으며, 이러한 단백질은 독성 혹은 비독성 물질들로 구성되어 있다. 생리활성 단백질 중 주요 성분은 acetylcholinesterase, L-amino acid oxidase, serine prostases, metalloproteinases, phospholipase-A2로 알려져 있다[10,11,16].

Vipera lebetina turanica 뱀에서 추출한 사독이 NK-92 세포의 항암효과에 어떠한 영향을 미치는지, 그 과정에서 어떤 기전이 관여되어 있는지 몇 가지 실험을 통해 분석하였다. A549 폐암 세포와 NK-92 세포를 공동 배양할 때와, A549와 SVT를 공동으로 배양하였을 때 A549 폐암 세포의 생존율이 낮아지는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 기존 연구 결과와 일치한다[17,18]. 나아가 본 연구에서는 A549 폐암 세포에 SVT와 NK-92세포를 함께 배양한 경우 A549 세포의 생존율을 현저히 낮추는 것을 확인하였다(Fig. 1). 또한 NK-92 세포를 SVT와 24시간 배양하였을 때 NK-92 세포가 형태학적으로 아무런 변화가 없어, 4 ㎍/㎖의 농도의 사독은 NK-92 세포 생존 여부에는 영향을 주지 않음을 시사하였다(Fig. 1).

NK-92 세포의 세포자멸사 기전은 기본적으로 세 가지로, 하나는 NK 세포 표면의 사멸수용체(TNF super-family[FasL/TNF])에 사멸인자(Fas/TNFR)가 결합하여 세포자멸사를 유도하는 기전이며, 다른 하나는 NK-92 세포에서 perforin과 granzyme B를 방출하여 세포자멸사를 일으키는 기전이다[19,20].

Perforin과 granzyme B 등 세포질 과립과 관련되지 않은 세포자멸사의 기전은 크게 외 · 내 경로로 나눌 수 있다. 외 경로는 막-세포사멸 수용체(membrane-Death Receptor) 매개에 의하여 세포자멸사를 유도하는 경로이며, 내 경로는 미토콘드리아가 매개된 과정이다. 외 경로는 세포 외막에 존재하는 세포사멸 수용체에 사멸인자가 결합하는, 외부 자극에 의해 세포자멸사가 진행되는 특성이 있다[21]. 세포사멸 수용체(death receptor, DR)는 TNF receptor gene superfamily에 속하며 대략 30여 가지로 알려져 있다[22]. DR은 세포질 death domain(DD) 유무에 따라 나눌 수 있는데, DD는 세포사멸 수용체가 세포자멸사를 유발하는 일련의 과정에서 신호로 작용하며 DD가 없는 세포사멸 수용체 또한 세포자멸 신호를 중재할 수 있다[24]. DD가 있는 세포사멸 수용체는 여섯 가지로 알려져 있으며 각기 다른 리간드에 의해 세포사멸 수용체가 활성화되어 FasL은 DR1에, TNF는 DR2에, VEGI는 DR3에, TRAIL은 DR4와 DR5에 각각 부착하여 세포자멸을 유도하는 신호로서 작용하게 된다[22]. 이번 연구에서 western blot analysis을 통해 확인된 바와 같이, 세포사멸 수용체인 TNFR2, DR3가 NK-92세포 단독으로 배양했을 때보다 사독을 처리하여 NK-92세포와 공동 배양하였을 때 발현이 증가하였다(Fig. 2). 이는 4 ㎍/㎖ 농도의 사독이 NK-92세포의 세포자멸 외인성 경로를 촉진하였음을 입증하는 것이다.

또한 Fig. 4의 결과에서 RT-PCR 분석 결과 세포독성 매개 단백인 granzyme B, perforin의 발현이 NK-92 단독처리군에 비해 사독 동시 처리군에서 유의하게 증가됨을 알 수 있으며, 특히 granzyme B에 비하여 perforin이 두드러지게 증가하였음을 관찰할 수 있다. Perforin은 NK 세포에서 cytoplasmic granules에 저장되어 있다가 표적세포와 접촉 등의 자극으로 세포 상해성 림프구와 표적세포 간의 간극에 방출되며, 방출된 perforin 단위체가 표적세포의 원형질막에 삽입되어 집합체로 중합한 결과 구멍(pore)을 형성하게 된다. 이러한 구멍으로 삼투성 용해를 유도하고 표적 세포에 granzyme들이 침투할 수 있도록 유도하여 결과적으로 세포자멸을 촉진시키는 역할을 한다[23,24]. Granzyme B는 perforin에 의해 만들어진 pore을 통하여 세포질 내로 유입하여 caspase 의존 경로와, 미토콘드리아가 관여된 caspase 비의존 경로를 통해 해당 세포를 파괴하는 기전의 촉진제로서 작용하게 된다[25]. Caspase 의존 경로에서 granzyme B는 procaspase-3를 caspase-3로 활성화시키고 활성화된 caspase-3는 폴리(ADP-리보오스)중합효소[poly(ADP-ribose)polymerase, PARP]를 절단하여 세포의 세포자멸사를 유도하게 된다[26]. Granzyme B는 또한 caspase 비의존 경로를 통해 세포의 necrosis를 유도하기도 하는데, 이 기전은 granzyme B가 표적세포 세포질의 bid를 쪼개어 truncated bid(tBid)를 형성하고, 이는 Bax와 함께 미토콘드리아 내로 이동하여 cytochrome C를 방출케 한다[27]. Cytochrome C는 직접적으로 세포의

necrosis를 유도하며 동시에 이와 별개로 apoptotic protease-activating factor(APAF-1)을 자극하여 caspase-9를 활성화시키고 활성화된 caspase-9에 의해 연쇄적으로 caspase-3이 활성화되어 세포자멸사를 유도하기도 하여 결과적으로 caspase 의존 세포자멸사 경로에 관여한다[25]. 따라서 위 연구 결과로서 4 ㎍/㎖ 농도의 사독이 NK-92세포에서 perforin 및 cranzyme B 과립의 방출을 유도하여 과립을 매개로 한 세포자멸 효과를 촉진하며, 그 중 perforin의 방출 촉진이 더욱 두드러져 세포에 pore형성을 유도하는 작용이 뚜렷함을 확인할 수 있었다.

TNFR2와 DR3의 활성화는 NK cell 세포자멸사 기전의 외 경로(receptor mediated pathway)와 관계가 있으며 perforin 및 granzyme B의 발현 증가는 NK cell의 과립 매개(granule-mediated) 기전과 관계가 있다. 그러나 bax 및(cleaved) caspase-3, caspase-8은 과립 매개 기전과 수용체 매개 기전 모두에서 활성화되기 때문에 이들 물질의 증가는 NK cell에 의해 세포자멸사 기전이 유도되었는지 여부를 반영한다 할 수 있다. 이번 연구에서 활용된 caspase-8은 NK cell이 유발하는 apoptosis의 두 가지 주요 경로인 DR 매개 경로에서 일련의 caspase 중 최초로 활성화되어 그 자체로 외 경로를 활성화시키기도 하고, 활성화된 caspase-8이 세포질 내 bid를 절단하여 내 경로를 활성화시키는데 일조하여 결과적으로 내 경로와 외 경로를 연결해주는 고리 역할을 한다[20,22]. Caspase-3는 NK cell의 과립에서 방출된 granzyme B에 의해 직접 활성화되어 세포자멸사를 유도하기도 하고[28], 사멸 수용체 매개 외 경로에서 caspase-8에 의해 연속으로 활성화되거나 혹은 미토콘드리아 매개 내 경로에서 caspase-9에 의해 활성화되어 세포독성 효과를 유도하게 된다[22]. Bax는 Bcl-2계 중 하나이며, 세포자멸사 과정 중 미토콘드리아가 관여된 기전(과립 매개, 혹은 내 경로)에서 tBid와 함께 미토콘트리아 외부막과 결합해 cytochrome C 방출을 유도하는데 일조한다[22,29]. 이번 연구에서 A549 단독 배양한 군에 비하여 NK-92세포와 공동 배양한 군이 bax, cleaved Caspase-3 및 cleaved Caspase-8이 유의하게 증가하였으며, 더불어 사독처리 시 해당 물질들이 더욱 증가함을 확인할 수 있다(Fig. 2). 이는 NK-92 세포가 A549 세포의 세포자멸사 반응을 유도하는 데에 SVT가 해당 반응을 촉진암을 의미한다.

NK-92 세포의 세포자멸사 기전으로 알려진 또 다른 하나는 nitric oxide가 관여되는 nitric oxide pathway이다. NK 세포핵에서 NO의 영향으로 interferon-γ(IFN-γ) 등 cytokine을 생성하게 되어 이 물질이 육종(sarcoma)세포 억제 및 암세포 전이를 억제하는 세포자멸 유도기전으로 밝혀지고 있다[30,31]. 본 실험에서 NO determination 결과 NK-92 세포 단독처리군과 사독 및 NK-92 세포 동시처리군 모두에서 NO의 유의한 변동은 없었다(Fig. 3). 이는 사독을 처리하였을 때 나타나는 A549 세포 수 감소가 NK-92세포의 세포자멸사 기전 중에서 nithric oxide pathway와는 연관이 없음을 의미한다.

따라서 위 연구 결과로 사독이 NK-92세포의 세포독성 작용을 유의하게 증가시키며, 세포독성 작용이 NO 생성 증가와는 무관하게 세포자멸 기전의 내 · 외인 기전을 촉진시킴으로써 유도된다는 것을 확인할 수 있었다. 현재 암세포 치료의 대안으로 떠오르는 면역치료에서 사독이 효과적인 BRM으로 활용될 것이라 기대한다.

Ⅴ. 결 론

인체의 폐암 세포 A549 세포주에서 사독이 NK-92 세포의 암세포 성장 억제를 더욱 효과적으로 유도하는지에 대하여 실험하였으며 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1. Cell viability assay를 시행한 결과 사독은 NK-92 세포의 세포독성효과를 촉진시켜 폐암세포 A549의 증식을 억제하였다. 또한 NK-92세포와 사독을 24시간 공동 배양하여도 사독은 NK-92 세포에 형태학적 변화를 유발하지 않았다.
2. Western blot analysis 시 A549 폐암세포에서 사독이나 NK-92 세포 단독처리군에 비해 사독 및 NK-92 세포 동시 처리군에서 세포자멸사를 진행시키는 단백분해효소인 caspase-3, 8이 증가하였다.
3. Western blot analysis 시 A549 폐암세포에서 사독 및 NK-92 세포 단독처리군에 비해 사독 및 NK-92 세포 동시 처리군에서 세포자멸사 외인성 경로의 death receptor인 TNFR2, DR3 발현이 증가하였다.
4. NO determination 시 A549 세포에서의 NO 생성은 NK-92 세포 단독처리군과 사독 및 NK-92 세포 동시처리군 모두에서 유의한 변화가 나타나지 않았다.
5. RT-PCR 시 A549 폐암세포에서 세포독성 매개 단백인 granzyme B, perforin의 발현은 NK-92 단독처리군에 비해 사독 및 NK-92 세포 동시처리군에서 유의하게 증가하였다.

Ⅵ. References

1. Rebecca S, Jiemin M, Zhaohui Z, Ahmedin J. Cancer statistics, 2014. A Cancer J Clin. 2014 ; 64(1) : 9-29.
2. Department of Internal Medicine The Catholic University of Korea College of Medicine. Current principles and clinical practice of internal medicine 2nd ed. Seoul : Koonja Publishing Company. 2008 : 692-701.
3. Murakawa Y.(New) Steps to internal medicine 4. pulmonology. Seoul : Jungdam Publishing Company. 2007 : 147-62.
4. Scagliotti GV, Novello S, Sevaggi G. Multidrug resistance in none small cell lung cancer. Ann Oncol. 1999 ; 10(5) : 583-6.
5. Kim KT, Lee IS, Sun K, Park JH, Kim HM. Prognostic factors in the treatment of lung cancer related to postoperative radiochemoimmunotherapy - brm therapy(ps-k) of lung cancer followed by surgery -. Korean J Thoracic Cardiovas Surg. 1993 ; 26(1) : 47-53.
6. Fisher M, Yang LX. Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K(PSK): implications of cancer immunotherapy. Anticancer Research. 2002 ; 22(3) : 1737-54.
7. Hanna N. Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. Cancer and Metastasis Reviews. 1982 ; 1(1) : 45-64.
8. Warren HS, Smyth MJ. NK cells and apoptosis. Immunology and Cell Biology. 1999 ; 77(1) : 64-75.
9. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. Advances in Cancer Research. 2003 ; 90(1) : 127-56.
10. Liu CC, Yang H, Zhang LL, Zhang Q et al. Biotoxins for cancer therapy. Asian Pac J Cancer Prev. 2014 ; 15(12) : 4753-8.
11. Jain D, Kumar S. Snake venom: a potent anti-cancer agent. Asian Pac J Cancer Prev. 2012 ; 13(10) : 4855-60.
12. Pyo SN, Sohn EH. Introduction to immunology. Seoul : Shinilbooks. 2012 : 186-7.
13. Murphy K, Travers P, Walport M(Trans. Kim HJ, Park SK, Seo YH, Lee KK et al). Janeway's Immunobiology 7th ed. Seoul : E * Public. 2008 : 91-103, 400.
14. Leung MYK, Liu C, Koon JCM, Fung KP. Polysaccharide biological response modifiers. Immunology letters. 2006 ; 105(2) : 101-14.
15. Oldham RK. Biological response modifiers. J Natl Cancer Inst. 1983 ; 70(5) : 789-96.
16. Kang TS, Georgieva D, Genov N, Murakami MT et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. FEBS J. 2011 ; 278(23) : 4544-76.
17. He S, Yin T, Li D, Gao X et al. Enhanced interaction between natural killer cells and lung cancer cells: involvement in gefitinib-mediated immunoregulation. J of Translational Medicine. 2013 ; 11(8) : 186-96.
18. Kollipara PS, Won DH, Hwang CJ, Jung YY et al. Enhanced anti-cancer effect of snake venom activated NK cells on lung cancer cells by inactivation of NF-κB. Biomol Ther. 2014 ; 22(2) : 106-13.
19. Warren HS, Smyth MJ. NK cells and apoptosis. Immunology and Cell Biology. 1999 ; 77(1) : 64-75.
20. Lauren P. Morecular biology of cancer(mechanisms, targets, and therapeutics) 2nd ed. Seoul : Hanmi Medical Publishing Co. 2008 : 157-82, 313.
21. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochem Pharmacol. 2003 ; 66(8) : 1403-8.
22. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. Life Sci. 2001 ; 69(25-26) : 2957-64.
23. Stepp SE, Mathew PA, Bennett M, St Basile G. Perforin: more than just an effector molecule. Immunology Today. 2000 ; 21(6) : 254-6.
24. Liu CC, Walsh CM, Young JDE. Perforin: structure and function. Immunology Today. 1995 ; 16(4) : 194-201.
25. Lord SJ, Rajotte RV, Korbutt GS, Bleackley RC. Granzyme B: a natural born killer. Immunol Rev.

2003 ; 193(1) : 31-8.
26. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature. 1995 ; 376(6535) : 37-43.
27. Heibein JA, Goping S, Barry M et al. Granzyme B-mediated cytochrome C release is regulated by the Bcl-2 family members bid and bax. JEM. 2000 ; 192(10) : 1391-402.
28. Atkinson EA, Barry M, Darmon AJ, Shostak I et al. Chris bleackley cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide caspase-3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. J Biol Chem. 1998 ; 273(33) : 21261-6.
29. Wei MC, Zong WX, Cheng EHY et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science. 2001 ; 292(5517) : 727-30.
30. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. Nat Rev Cancer. 2002 ; 2(11) : 850-61.
31. Cifone MG, Ulisse S, Santoni A. Natural killer cells and nitric oxide. International Immunopharmacology. 2001 ; 1(8) : 1513-24.