

Mouse Leukemia 세포에서 Adenosine 5'-triphosphate에 의한 Apoptosis

주난영 · 박규상 · 정해숙 · 공인덕 · 이종우

연세대학교 원주의과대학 생리학교실

Apoptosis Induced by Adenosine 5'-triphosphate in Mouse Leukemic Cells. Nan Young Joo, Kyu Sang Park, Hae Sook Chung, In Deok Kong, and Joong Woo Lee Department of Physiology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju 220-701, Korea

Extracellular ATP elicits various biological responses and plays a significant role in physiological regulation. Recently, ATP-induced growth inhibitions were reported in some tumor cell lines, but these effects and mechanisms are not well known. This study was conducted to investigate ATP-induced growth inhibition in mouse leukemic(P388D₁) cells. ATP inhibited cell growth in a dose-dependent manner as analyzed by MTS assay(IC₅₀: 33.1 μM). Nucleotides other than ATP, such as ADP(37.5 μM) and AMP(33.2 μM) had the same effects as ATP, but adenosine(57.8 μM) showed less effect than ATP. ATP attenuated the cells in G₀/G₁ and G₂/M phases, but increased those in S phase in flow cytometric analysis. Hypodiploid cells(A₀), the presumptive findings of apoptosis, were found among the ATP-treated cells. ATP induced DNA fragmentation into 180~200 bps as measured by electrophoresis. Some apoptotic cells were stained by TUNEL method. ATP increased the intracellular free Ca⁺⁺ concentration([Ca⁺⁺]_i) and the increment of [Ca⁺⁺]_i was caused by influx from the extracellular space. These results suggest that extracellular ATP induces growth inhibition through apoptosis.

Key Words: Adenosine 5'-triphosphate(ATP), Leukemic cells, Apoptosis, Intracellular free calcium concentration([Ca⁺⁺]_i).

서 론

세포내에 다량 존재하여 주요 에너지원으로 이용되는 ATP는 여러 자극에 의해 세포외로 방출되어(Gordon, 1986), 혈관계의 저항변화 및 조직대사의 변화(Lee & Filkins, 1988), 세포막의 투과도 변화(Rosengurt, 1970), 심근이나 평활근의 수축 혹은 이완(Olsson & Pearson, 1990), 혈소판 응집(MacFarlane & Mills, 1975), 신경세포의 흥분성 조절(Illes & Norenberg, 1993) 등 다양한 생물학적 작용을 나타낸다고 보고되어 왔다. 이러한 반응들은 세포막에 존재하는 퓨린 수용체(purinoceptor)의 활성화에 의한 것으로 밝혀지고 있으며(Burnstock, 1990), 이 과정에서 cAMP나 IP₃ 등의 세포내 신호전달 물질을 매개로

하거나 혹은 세포막의 이온통로(ionic channel)를 직접 조절함으로써 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Baron et al, 1984; Hallam et al, 1986). 퓨린 수용체는 크게 adenosine과 AMP의 작용이 우세한 P₁ 수용체와 ADP 및 ATP의 작용이 우세한 P₂ 수용체로 나뉘며, 이는 다시 효현제(agonist)의 효과 및 길항제(antagonist)의 선택성등을 기준으로 P₁은 A₁, A₂, A₃로 P₂는 P_{2X}, P_{2Y}, P_{2U}, P_{2Z} 및 P_{2T}로 세분되었다(Burnstock, 1990).

근래에는 ATP가 adenocarcinoma(Rapaport, 1983), breast tumor cell(Vandewalle et al, 1994), mastocytoma(Bronte et al, 1996) 등에서 세포성장 억제효과 및 항종양 효과를 나타냄이 보고되어 관심을 모으고 있다. 뿐만 아니라 ATP에 의해 유발되는 세포사멸은 흉선세포의 퇴화과정(Zheng et al, 1992)이나, T-lymphocyte의 세포매개성 세포독성(Di Virgilio et al, 1990) 등에서 중요한 생리적 역할을 담당할 것이라고 제시된 바 있다. 한편 세포사멸의 또 다

른 기전으로 알려진 apoptosis는 발생학적 기관발생 및 퇴화(Zheng et al, 1992), 종양억제 유전자와 관련된 세포사멸(Thompson, 1995), 면역세포조절(Ribeiro & Carson, 1993) 등에 관여하며, 이는 존재하고 있던 호르몬이나 성장인자의 농도에 변동이 있거나 이를 유발하는 물질의 존재시에 나타난다고 알려져 있다(Campton & Cidlowski, 1987; Araki et al, 1990). ATP에 의한 세포사멸 역시 이러한 apoptosis에 의한 것이라는 일부 보고가 있으나(Zheng et al, 1992), 구체적으로 확인된 것은 아니며 그 기전에 대해서도 알려진 바가 없다.

본 실험에서는 mouse leukemia 세포인 P388D₁을 이용하여 ATP의 성장억제 효과를 다른 adenine nucleotides 및 adenosine과 비교하며, 이에 의한 세포주기상의 변화를 관찰하였다. 또 이러한 과정이 apoptosis에 의한 것인지를 확인하며, 이와 관계하여 ATP에 의한 세포내 Ca⁺⁺ 농도의 변화를 확인함으로써, ATP의 암세포 성장억제 효과와 그 작용기전의 일부를 밝히고자 하였다.

방 법

세포배양 및 실험약물

한국 세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 배양하고 있는 P388D₁ 세포를 10% heat-inactivated horse serum, penicillin(100U/μl), streptomycin(100 μg/ml), amphotericin-B(0.025 μg/ml)가 포함된 RPMI 성장배지(GIBCO BRL, NY, USA)로 37°C, 5% CO₂, 95% air 상태의 항온 항습기(1820IR, SHEL-LAB, USA)에서 배양하였다. 실험에 사용한 ATP, ADP, AMP 및 adenosine은 Sigma(Sigma Chemical Co., MO, U.S.A.)로부터, A23187, pluronic acid 및 fura-2/AM은 Molecular probes(Molecular probes Inc., OR, U.S.A.)로부터 구입하였다.

Adenine nucleotides 및 adenosine이 세포 성장에 미치는 영향

Adenine nucleotides 및 adenosine에 의한 세포 성장억제 효과는 1×10⁴ cells/well에 여러 농도(32, 100, 320, 1000 μM)의 ATP, ADP, AMP, adenosine을 처리한 다음 일정 시간 후 배양된 각 well에 MTS 용액(MTS:PMS=20:1, Promega, Co., WI, U.S.A.)을 20 μl씩 분주하고, 37°C 항온 항습기에서 1시간 동안 반응시킨 후 492 nm에서 ELISA 판독기(Elida-5, Physica Inc., NY, U.S.A.)로 흡광도를 측정하였으며, 이를 대조 well에 대한 백분율로 비교하였다. 세포성장 억제효과는 대조군의 50%를 억제시키는 약물의 농도(IC₅₀)를 기준으로 비교하였다.

Flow cytometer를 이용한 세포주기(cell cycle) 분석

지수증식기에 있는 5×10⁶ cells/ml의 세포에 1mM의 ATP를 처리하여 24 혹은 48시간 배양한 후, 4°C, 300×g로 10분간 원심분리하였다. 모아진 세포에 냉장 보관된 70% ethanol을 2 ml 넣은 후 4°C에서 60분간 방치하였다. 다시 원심분리하여 PBS로 세척한 후 0.5ml의 PBS에 부유시키고, 0.5 ml의 RNase(1mg/ml, Sigma)와 0.5 ml propidium iodide(200 μg/ml, Sigma) 용액을 가하여 염색한 후 빛을 차단하여 냉장 보관하였다. 세포주기의 분석은 FACScan flow cytometer(Becton Dickinson immunocytometry system, CA, U.S.A.)를 이용하였으며, 전체 세포중 각 세포주기상 비율은 planimeter(Koizumi type KP-26, Japan)로 면적을 측정된 뒤 전체세포에 대한 비율로 나타내었다.

전기영동을 이용한 DNA 분절 확인

2×10⁶ cells/ml에 ATP 처리 후 24, 48시간 동안 반응시킨 다음 DNA를 분리하였다. 먼저 900×g로 5분간 원심분리하여 세포를 모은 후 500 μl의 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), 1% SDS 5 μl, proteinase K(1 mg/ml, Sigma)와 혼합하여 37°C에서 12시간 이상 방치하였다. 이것을 phenol extraction(phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1), Sigma)한 다음 100% ethanol로 -20°C에서 DNA를 침전시켰다. 15000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액을 모두 제거하고 말린 다음 DNase free- RNase(10 mg/ml, Sigma)를 첨가한 후 37°C에서 30분간 녹여 DNA를 분리하였다. 전기영동은 1.5% agarose gel(1×TBE buffer, 20 ml, 0.3 g agarose)을 만들어서 100 V constant로 하여 30분~1시간 동안 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 자외선 광원 위에 두고 polaroid film이 들어 있는 SL5GD photographic system(Pharmacia)을 이용하여 254 nm에서 촬영하였다.

TUNEL 염색을 이용한 apoptosis 확인

먼저 ATP 1mM을 2×10⁶ cells/ml에 처리한 후, 24, 48시간 배양하였다. 이어 300×g로 4분간 원심분리하여 세포를 모은 후, 2×10⁷ cells/ml로 PBS에 부유시켰다. Poly-L-lysine coated slide위에 세포를 도말한 다음 4% formaldehyde에 4°C에서 25분간 고정시켰다. 이를 PBS로 세척한 다음 0.2% Triton-X 100 용액으로 5분간 침투시킨 후 다시 PBS로 세척하였다. TDT buffer(equilibration buffer 45 μl, nucleotide mix 5 μl, TDT enzyme 1 μl) 50 μl를 slide에 분주 후 cover slip으로 덮고 빛을 차단한 채 37°C 습윤 상태에서 60분간 반응시켰다. 2X SSC buffer에 15분간 담근 후 PBS로 세척하고, propidium iodide(1 μg/ml)로 대조 염색한 다음 520 nm에서 형광 현미경(Olympus,

Tokyo, Japan)으로 확인 후 촬영하였다.

ATP에 의한 세포내 Ca^{++} 농도 변화

지수증식기에 있는 세포들을 bovine serum albumin이 포함된 KRH buffer로 세척한 후 원심분리하여 5×10^6 cells/ml로 부유시켰다. 여기에 fura-2/AM을 $4 \mu M$ 이 되도록 가하고 $37^\circ C$ 항온 수조에서 빛을 차단한 채 분당 60회로 흔들어 주면서 40분간 loading 시켰다. 효과적인 loading을 위해 fura-2/AM에는 비이온성 계면활성제인 pluronic acid를 0.025%(W/V) 농도로 첨가하였으며, 약 30초간 초음파처리하여 세포내로의 loading이 용이하도록 한 뒤 사용하였다. Loading이 끝난 후 세포외액의 잔여 fura-2를 제거하기 위하여 KRH buffer로 충분히 세척하고 5×10^6 cells/ml의 세포부유액을 만들었다. 세포내 유리 Ca^{++} 농도는 fluorescence spectrophotometer(F-2000, Hitachi, Japan)의 intracellular cation measurement system을 이용하여 측정하였다. Fura-2가 loading된 세포부유액 400 μ l stirring bar가 들어 있는 quartz cuvette에 넣은 후 340, 380 nm의 파장에서 교대로(interval 0.5 sec) excitation 시킬 때 emission되는 fluorescence intensity를 510 nm의 파장에서 지속적으로 측정하였다. 그리고 측정 중인 세포부유액에 여러농도의 ATP를 가한 후 변화를 기록하였으며, 일부는 세포외액의 Ca^{++} 농도를 달리한 뒤 세포내 Ca^{++} 농도의 증가정도를 비교하여 그 경로를 확인하였다.

자료 분석

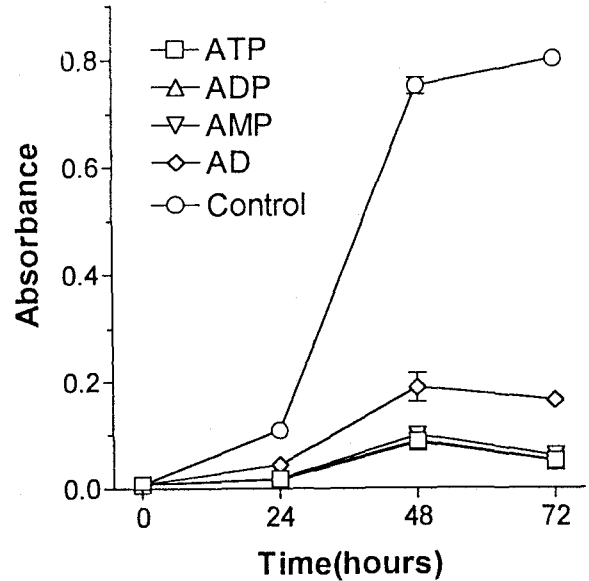
결과는 평균 \pm 표준오차(SEM)로 표시하였으며, adenine nucleotides 및 adenosine의 효과는 independent paired t-test를 시행하여 분석하였다. 이때 유의한 차이는 p-value가 0.05이하일 때를 한계로 삼았다.

결 과

1 mM의 adenine nucleotides 및 adenosine은 배양 24시간에서 이미 대조 well에 비해 현저히 세포 성장을 감소시켰으며(Fig. 1(a)), 48시간을 기준으로 비교했을때 ATP, ADP 및 AMP등은 성장을 85% 이상 억제시켰다. 여러 농도에서의 효과를 비교해 본 결과 ATP, ADP, AMP 및 adenosine의 IC_{50} 은 각각 33.1, 37.5, 33.2, 57.8 μM 로서, ATP, ADP, AMP의 효과는 유사하였고 adenosine만이 다소 작았다(Fig. 1(b)).

ATP에 의한 세포성장 억제효과와 관계하여 나타나는 세포주기상 변화 양상을 관찰하고자, 5×10^6 cells/ml의 세포에 1 mM ATP를 처리한 후 24 혹은 48시간 배양하면

(a)



(b)

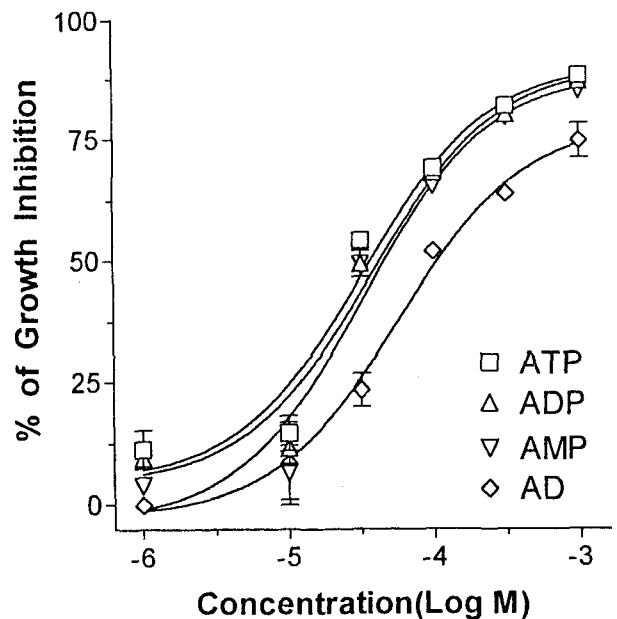
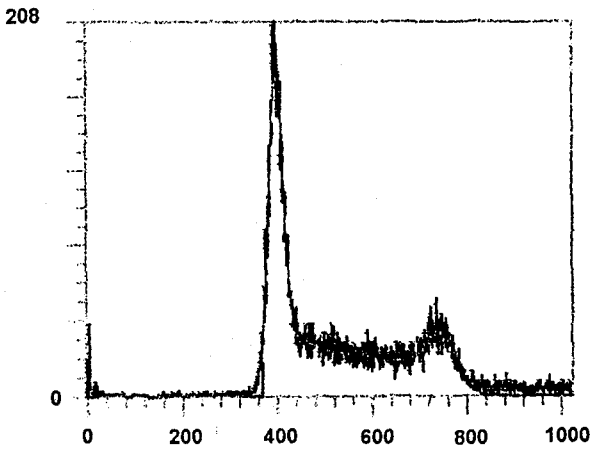
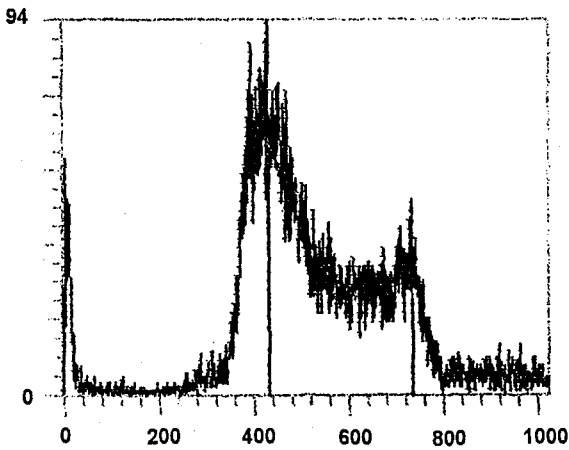


Fig. 1. Inhibitory effects of adenine nucleotides and adenosine on cell growth. (a) P388D₁ cells were treated with adenine nucleotides and adenosine (1 mM) for 1~3 days. Viability was assessed by MTS assay. (b) Growth inhibitions induced by adenine nucleotides and adenosine (for 48 hrs) were compared to each other. Values represented the means \pm SEM.

(a) Control



(b) 24hr ATP(1mM)



(c) 48hr ATP(1mM)

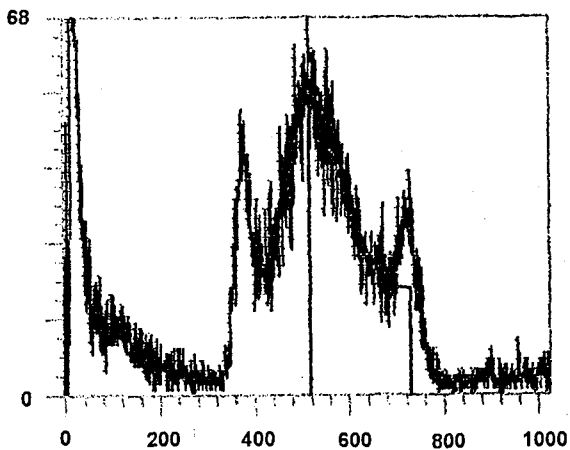


Fig. 2. Representative data of cell cycle changes induced by ATP. (a) control group, (b) after 24 hrs (c) after 48 hrs treated with 1 mM ATP.

Table 1. The proportion of cell number in each cell cycle phase treated with ATP for 24 hrs and 48hrs. Values represented the means \pm SEM

Cell cycle	Control group	Elapsed time(1 mM ATP)	
		24hrs	48hrs
A ₀	1.92 \pm 0.01	4.39 \pm 1.34	19.31 \pm 3.17
G ₀ /G ₁	47.98 \pm 0.24	37.32 \pm 5.93	18.57 \pm 4.45
S	31.06 \pm 0.96	43.68 \pm 6.10	44.37 \pm 4.42
G ₂ /M	19.04 \pm 0.73	14.61 \pm 1.17	17.74 \pm 3.14

1 2 3 4 5 6 7

200bp →
100bp →

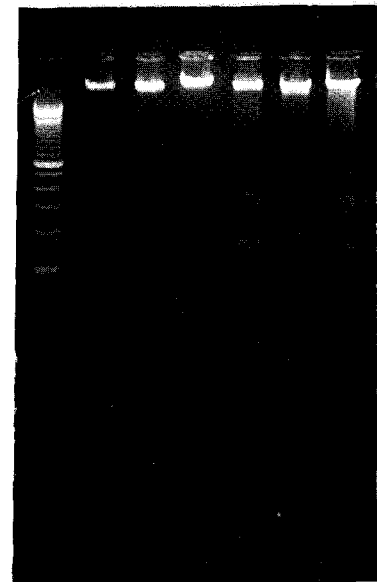


Fig. 3. DNA fragmentation after treatment with ATP. Lane 1: 100 bp DNA marker, Lane 2: control(24 hrs), Lane 3: 1 mM ATP(24 hrs), Lane 4: control(48 hrs), Lane 5: 1 mM ATP(48 hrs), Lane 6: 1 μ M A23187(4 hrs), Lane 7: 1 μ M A23187(6 hrs).

서 SFIT program을 이용한 flow cytometer로 DNA분석을 하였다. ATP처리 후 24, 48시간 모두에서 대조군에 비해 S phase의 세포가 증가되었고, G₀/G₁ 이나 G₂/M phase의 세포 비율은 감소됨을 볼 수 있었다(Fig. 2, Table 1). 뿐만 아니라 G₀/G₁ phase 앞쪽으로 hypodiploid cell(A₀)들이 약물 처리시간에 따라 점차 증가하였는데, 이는 DNA가 분절되어 나타나는 것으로 apoptosis를 암시하는 객관적인

증거의 하나이다.

세포주기 분석상 ATP가 apoptosis를 유발한다는 증거를 일부 얻었으므로, 이를 확인하기 위하여 apoptosis에 특징적인 DNA 분절을 전기영동을 통해 관찰하였다. 이미 apoptosis를 일으킨다고 알려진 Ca^{++} ionophore(A23187)를 양성대조로 하여, ATP 1 mM을 처리후 24, 48시간뒤 DNA분절을 측정하였다(Fig. 3). 1 mM ATP를 24시간 처리했을 경우에 희미한 분절을 보이기도 했지만, 48시간

의 경우 가장 현저한 180~200 bps ladder pattern의 분절을 보였다.

Apoptosis를 일으킨 세포의 분절된 DNA에 선택적 *in situ* 염색법인 TUNEL 방법(Gavrieli et al, 1992)을 통해 ATP에 의한 apoptosis를 형광 현미경으로 확인하였다. 대조군의 경우 대조염색인 propidium iodide에 의해서만 염색된 반면(Fig. 4(a)), 1 mM의 ATP를 처리한 경우 apoptosis를 일으킨 세포의 분절된 DNA에 결합된

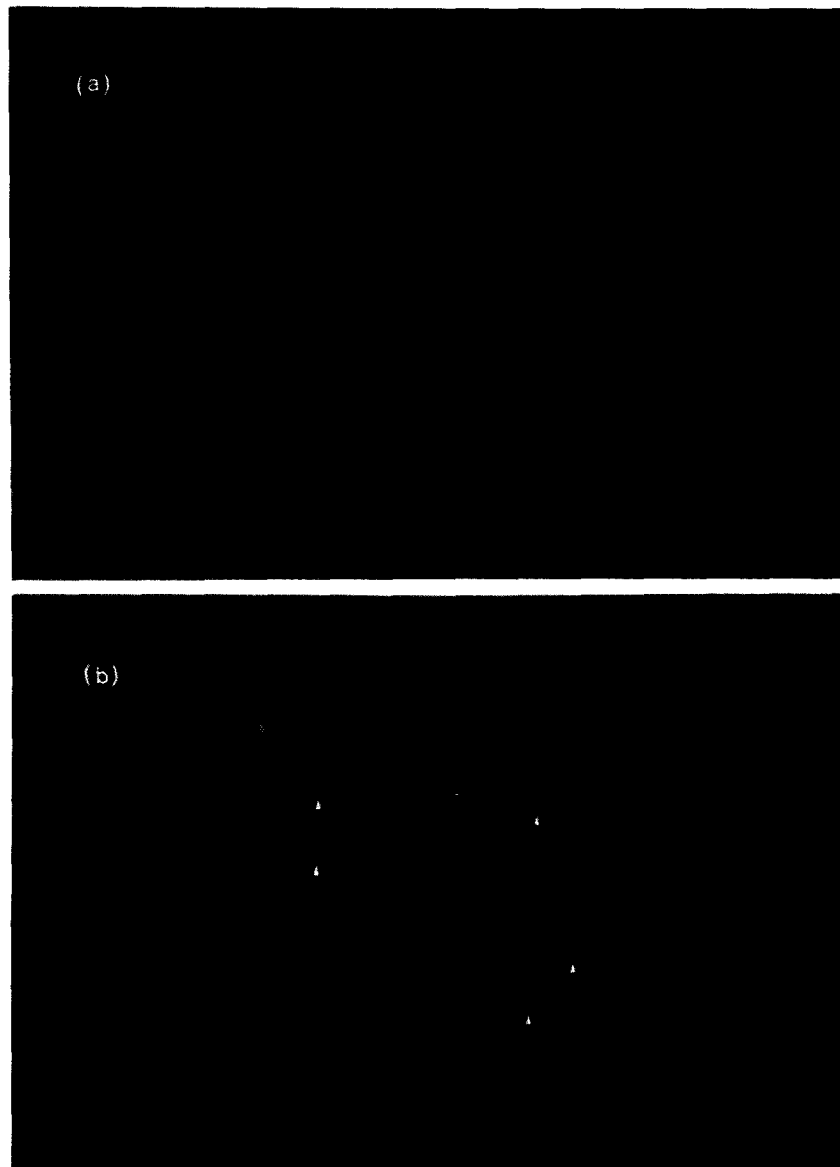


Fig. 4. *In situ* staining of apoptotic cells using the TUNEL method. (a) control, (b) after treatment with 1mM ATP(48 hrs). Apoptotic cells were stained as bright green color by flourescein and normal cells were stained as red color by propidium iodide.

fluorescein에 의해 밝은 초록빛으로 염색된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4(b)).

Apoptosis를 유발시키는 endonuclease에는 세포내 $[Ca^{++}]_i$ 증가에 의해 활성화되는 것이 가장 널리 알려져 있으므로, ATP에 의한 $[Ca^{++}]_i$ 변화를 측정하여 apoptosis와의 관련 가능성을 살펴보고자 하였다. 세포가 안정되도록 5분간 incubation한 후 여러 농도의 ATP를 처리하여 이에 의한 $[Ca^{++}]_i$ 변화를 측정하였는데, ATP는 $1\mu M$ 에서 2 mM 까지 농도의존적으로 $[Ca^{++}]_i$ 을 증가시켰으나(Fig. 5(a)), 2

mM 이상의 농도에서는 더 이상의 $[Ca^{++}]_i$ 증가가 없었다(Fig. 5(b)). ATP에 의한 $[Ca^{++}]_i$ 증가가 어떠한 경로를 통해 나타나는지 확인하기 위하여, 세포외액의 Ca^{++} 농도를 달리한 후 ATP에 의한 $[Ca^{++}]_i$ 변화를 비교하였다. ATP에 의한 $[Ca^{++}]_i$ 증가는 세포외액의 Ca^{++} 농도를 감소 시킴에 따라 비례하여 감소하였으며, Ca^{++} free인 상태에서는 오히려 ATP에 의해 $[Ca^{++}]_i$ 이 감소함을 나타내었다(Fig. 6). 이를 통해 ATP에 의한 $[Ca^{++}]_i$ 변화는 주로 세포

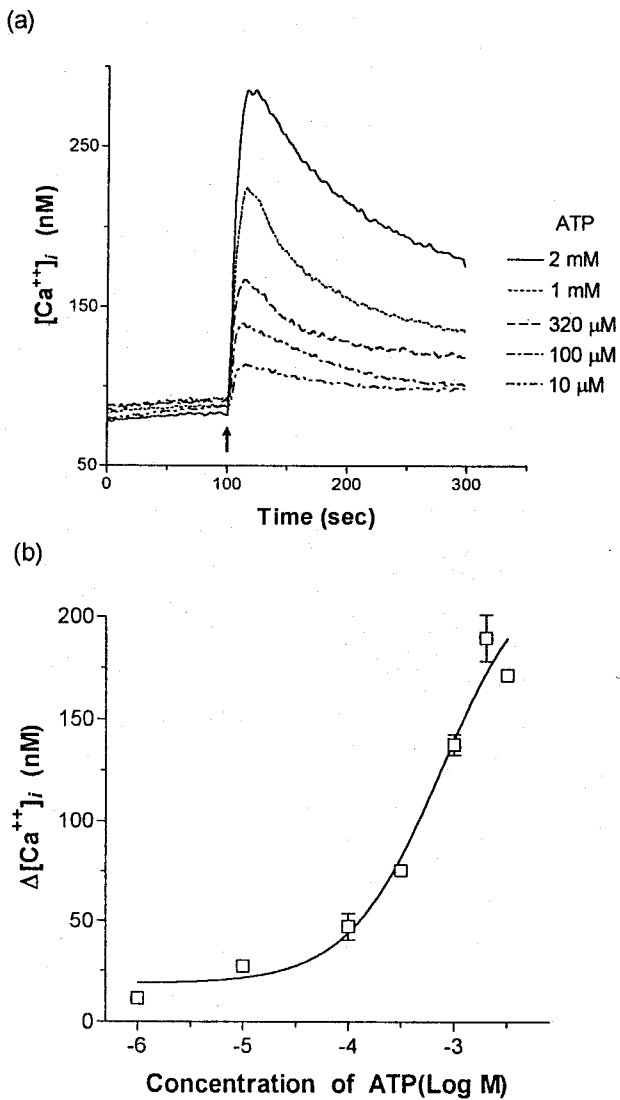


Fig. 5. Effects of ATP on intracellular Ca^{++} concentration($[Ca^{++}]_i$). (a) Representative tracings of $[Ca^{++}]_i$ increases induced by ATP, (b) dose response relationship between concentration of ATP and increment of $[Ca^{++}]_i$. Values represented the means \pm SEM.

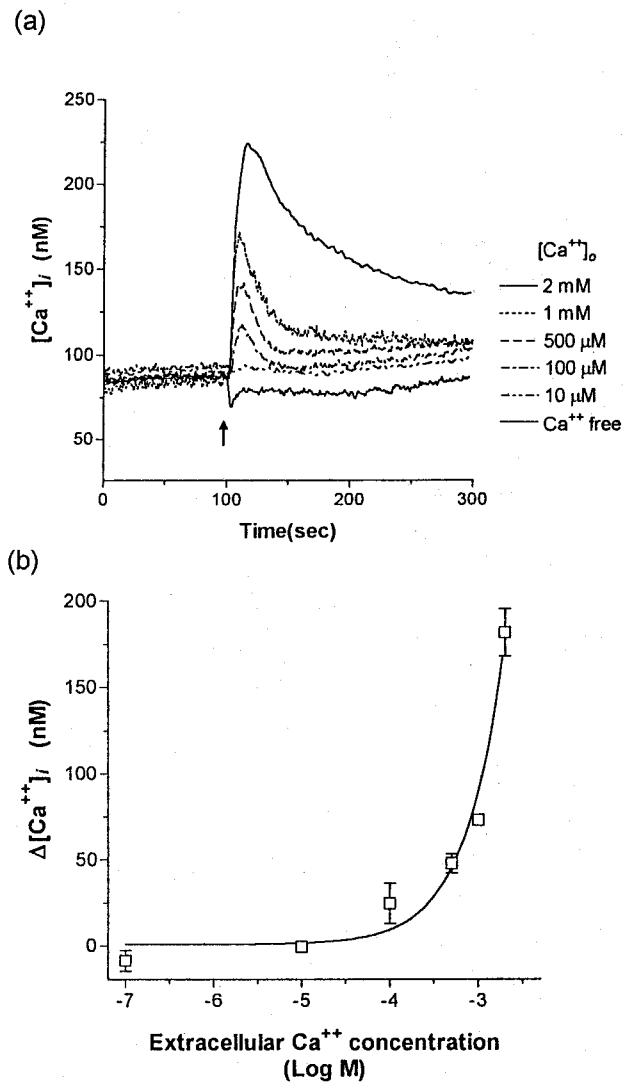


Fig. 6. Effects of extracellular $[Ca^{++}]_o$ on intracellular $[Ca^{++}]_i$ increases induced by ATP. (a) Representative tracings of $[Ca^{++}]_i$ increases induced by ATP(1 mM) at different concentration of extracellular $[Ca^{++}]_o$, (b) relationship between $[Ca^{++}]_i$ changes induced by ATP and extracellular $[Ca^{++}]_o$. Values represented the means \pm SEM.

외액으로부터 세포막 이온통로를 통한 유입 및 유출에 의해서 이루어짐을 알 수 있었다.

고 찰

ATP는 세포막에 존재하는 퓨린 수용체를 매개로 한다고 알려져 있으며, 퓨린 수용체의 성질을 규명하는 과정에서 여러가지 nucleotide들이 이용되고 있다. 일부 P₂ 퓨린 수용체의 경우 몇가지 실험에서 그 효과의 강도가 ATP > ADP > AMP > adenosine 순으로 나타나 adenine 기에 붙어 있는 phosphate수에 비례함이 알려져 있다(Lee & Filkins, 1988). 본 실험에서는 adenine nucleotides의 효과들이 거의 유사하였으나 adenosine의 효과보다는 크게 나타났으므로, 주로 P₂ 수용체를 매개로 할 것이라 추측할 수 있었다. P₂ 퓨린 수용체는 P_{2X}, P_{2Y}, P_{2Z}, P_{2U}, P_{2T} 등으로 분류되는데(Burnstock, 1990), 이 중 특히 mast cell, monocyte, macrophage 등의 혈액세포에서 P_{2Z} 퓨린수용체의 존재가 확인 되었다(Di Virgilio, 1995). P_{2Z} 퓨린 수용체는 세포막의 pore를 열어 세포내 유리 칼슘농도 ([Ca⁺⁺]_i)를 증가시킨다고 알려져 있으며(Pizzo et al, 1992), 이와 같이 외부유입을 통한 [Ca⁺⁺]_i 증가는 본 실험과도 일치하는 결과이다. 따라서 본 실험에서 ATP의 효과는 P_{2Z} 퓨린 수용체와 관계있을 것이라 추측해 볼 수도 있겠으나, 보다 자세한 수용체 규명을 위한 실험을 진행하지 못하였다.

ATP에 의한 세포 성장억제 효과와 관계하여 세포 주기상에 미치는 효과를 관찰하고자, ATP를 일정시간 처리 후 flow cytometer를 이용하여 분석하였다. P388 세포는 전형적인 G₀/G₁, S, G₂/M기 순의 크기를 보였으나, ATP 처리 후 24시간이 지나면서부터 G₀/G₁ 및 G₂/M기가 줄어들면서 S기가 늘어나기 시작했다. 특히 이와 함께 apoptotic area의 hypodiploid cell(A₀)들이 상당히 늘어났다. 세포는 arrest가 일어나는 순간부터 apoptosis가 시작되나, 이를 유발하는 약물에 따라 혹은 세포마다 arrest가 일어나는 시기가 달라질 수 있다(Steven & Robert, 1995). 본 실험에서의 S기 증가 및 A₀의 위치는 S기에서 apoptosis가 일어났을 때의 전형적인 양상과 유사하였다.

일련의 과정을 거쳐서 apoptosis가 일어나게 되면 핵소체 사이의 DNA가 잘리어 180~200 bps 정도의 분절을 형성하는 것이 가장 특징적이다. Ca⁺⁺ ionophore인 A23187은 세포막에 pore를 형성하여 세포내 Ca⁺⁺ 유입 증가로 DNA 분절을 일으키는 것이 확인 되었으므로(Barry & Eastman, 1992), 이를 양성대조로 하여 ATP를 flow cytometer에서 확인된 농도로 처리한 후의 변화와 비교하였

다. 세포의 DNA를 분리한 후 전기영동을 실행한 결과, A23187과 동일한 ladder pattern의 분절을 보였다. 분절된 DNA에 선택적 반응을 나타내는 TUNEL 염색에서도 1 mM ATP 처리군의 전체 세포 중 상당부분(63.2±7.8 %)이 염색반응을 나타내었다. 앞서 관찰된 세포성장 억제 효과(88.2%)에 비해 apoptotic 세포비율이 작게 나타났던 것은 apoptosis가 일어난 세포는 이후 세포증식이 정지되기 때문으로 생각된다. 본 실험에서는 ATP에 의한 apoptotic 변화의 농도-반응 관계를 확인하지 못하였으나, 이후 여러 농도로 ATP를 가하여 변화를 관찰할 필요가 있겠다.

Apoptosis에 의한 DNA분절은 세포내에 위치한 endonuclease의 활성화에 의해 초래된다고 알려져 있다. 이러한 endonuclease는 활성화되기 위한 기전등의 차이를 기준으로 endonuclease I 과 II가 잘 알려져 있는데, endonuclease I은 세포내 Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺의 증가에 의해 활성화되고(Jones et al, 1989; Lohmann & Beyersmann, 1993), endonuclease II는 세포내 pH 변화에 의해 활성화된다고 알려져 있다(Barry & Eastman, 1993). 예를들어 간세포에서의 apoptosis는 세포내 Ca⁺⁺ 증가에 의해 유발되며, 이 과정에서 calmodulin등이 관여하여 endonuclease를 활성화시킨다고 알려져 있다(Ray et al, 1993). 하지만 세포마다 특성 및 분포에 차이가 있어서 정확한 기전을 이해하는데 어려움이 있다(Duke et al, 1983; Arends et al, 1990). 본 실험에서 ATP는 일시적이지만 비교적 농도 의존적으로 [Ca⁺⁺]_i를 증가시켰으며, 이러한 [Ca⁺⁺]_i 증가는 여러 과정을 거쳐 endonuclease를 활성화 시키는데 관여했을 것으로 추측되어 진다. 하지만 이에 관한 구체적인 증거가 아직 없는 상태이다.

지금까지 암세포 성장을 억제하는 많은 약물이 개발되어 사용되고 있지만, 대개의 약물들은 치료 효과에도 불구하고 독성 때문에 사용에 제한을 받고 있다. 그러나 ATP와 같은 내인성 nucleotide는 체내에 존재하는 물질이며, 사용된 후에 세포외액에 있는 nucleotidase에 의하여 AMP 및 adenosine으로 분해되어 세포내로 흡수되므로(Lee et al, 1995) 독성이 적을 것으로 예상된다. 따라서 ATP와 관계된 P₂ 퓨린 수용체의 종류 및 이에 의한 apoptosis의 기전에 관한 연구가 진행된다면 ATP의 작용이 해 및 임상적 활용의 폭을 넓힐 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 연세대학교 교수 연구비의 지원으로 이루어 졌음.

참 고 문 헌

- Araki S, Simada Y, Kaji K, Hayashi H: Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 172(3): 1081–1085, 1990
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH: Apoptosis; The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136: 593–608, 1990
- Baron CB, Cunningham M, Strauss III JF, Coburn RF: Pharmacomechanical coupling in smooth muscle may involve phosphatidylinositol metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6899–6903, 1984
- Barry MA, Eastman A: Endonuclease activation during apoptosis; The role of cytosolic Ca^{++} and pH. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 782–789, 1992
- Bronte V, Macino B, Zambon A, Rosato A, Mandruzzato S, Zanovello P, Collavo D: Protein tyrosine kinases and phosphatases control apoptosis induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 344–351, 1996
- Burnstock G: Overview: Purinergic mechanism. *Ann New York Acad Sci* 603: 1–17, 1990
- Campton MM, Cidlowski JA: Identification of a glucocorticoid-induced nuclease in thymocytes. *J Biol Chem* 262(17): 8288–8292, 1987
- Di Virgilio F: The P_{2z} purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunol Today* 16(11): 524–528, 1995
- Di Virgilio F, Pizzo P, Zanobello P, Bronte V, Collavo D: Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 11(8): 274–277, 1990
- Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ: Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: An early event in cell-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6361–6366, 1983
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3): 493–501, 1992
- Gordon JL: Extracellular ATP: Effects, sources and fate. *Biochem J* 233: 309–319, 1986
- Hallam TJ, Pearson JD: Exogenous ATP raises cytoplasmic free calcium in fura-2 loaded piglet aortic endothelial cells. *FEBS* 207: 95–99, 1986
- Illes P, Norenberg W: Neuronal ATP receptors and their mechanism of action. *Trends Pharmacol Sci* 14: 50–54, 1993
- Jones DP, McConkey DJ, Nicotera P, Orrenius S: Calcium activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *J Biol Chem* 264: 6398–6403, 1989
- Lee JW, Jeon SJ, Kong ID, Jeong SW: Identification of adenosine 5'-tetraphosphate in rabbit platelets and its metabolism in blood. *Kor J Physiol* 29(2): 217–223, 1995
- Lee JW, Filkins JP: Exogenous ATP and hepatic hemodynamics in the perfused rat liver. *Circ Shock* 24: 99–110, 1988a
- Lohman RD, Beyersmann D: Cadmium and zinc mediated changes of the Ca^{2+} dependent endonuclease in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 1097–1103, 1993
- MacFarlane DE, Mills DCB: The effects of ATP on platelets evidence against the central role of released ADP in primary aggregation. *Blood* 46: 309–320, 1975
- Olsson RA, Pearson JD: Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761–845, 1990
- Pizzo P, Murgia M, Zambon A, Zanobello P, Bronte V, Pietrobon D, Di Virgilio F: Role of P_{2z} purinergic receptors in ATP-mediated killing of tumor necrosis factor(TNF)-sensitive and TNF-resistant L929 fibroblast. *J Immunol* 149: 3372–3378, 1992
- Rapaport E: Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol* 114: 279–283, 1983
- Ray SD, Kamendulis LM, Gurule MW, Yorkin RD, Corcoran: Ca^{++} antagonist inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *FASEB J* 7: 453–463, 1993
- Ribeiro JM, Carson DA: Ca^{++}/Mg^{++} dependent endonuclease from human spleen; Purification, properties and role in apoptosis. *Biochemistry* 32: 9129–9136, 1993
- Rosengurt E, Heppel LA, Friedberg I: Effect of exogenous ATP on the permeability properties of transformed cultures of mouse cell lines. *J Biol Chem* 252: 4548–4590, 1970
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48(17): 4827–33, 1988
- Steven WS, Robert TS: Cell cycle analysis of apoptosis using flow cytometry. *Meth Cell Biol* 46: 91, 1995
- Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456–61, 1995
- Vandewalle B, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J: Effect of extracellular ATP on breast tumor cell growth, implication of intracellular calcium. *Cancer Lett* 85: 47–54, 1994
- Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JDE: Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* 112: 279–288, 1992