

ToxiLight와 ViaLight Plus를 이용한 AK 및 ATP 모니터링

HUVEC에서 DNA Topoisomerase I 억제제인 Camptothecin의 영향 측정

Lonza Nottingham, Ltd

■ 소개

Camptothecin은 *Camptotheca acuminata*에서 추출한 것으로, *in vitro*에서 농도 의존적으로 apoptosis를 유도하여 세포 사멸을 유발하는데 일반적으로 사용되고 있다. Camptothecin은 DNA 합성의 필수효소인 DNA topoisomerase I을 저해하는 작용기전이 있다. 이 화합물의 유도체들은 현재 여러 암에 대한 잠재적인 화학치료요법으로 개발되고 있는 중이다.

■ 방법

HUVEC 세포(Clonetics, Lonza)는 endothelial EBM-2 배양액에 human endothelial growth factor (hEGF), hydrocortisone, GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B), fetal bovine serum (FBS), vascular endothelial growth factor (VEGF), human fibroblast growth factor (hFGF-B with heparin), R3-IGF-1 및 ascorbic acid를 첨가하여 배양하였다. 세포는 5% (v/v) CO₂, 37 °C 그리고 습한 상태에서 키웠다.

HUVEC (10⁵ cells/ml⁻¹) 세포를 96웰 플레이트 (white walled tissue culture plate)나 챔버 슬라이드에 접종하여, 일반적인 배양 조건에서 밤새 키웠다. Camptothecin (Calbiochem)을 0 nM-5000 nM 농도 범위로 희석하여 세포에 넣어 주었다. 플레이트와 슬라이드를 5%(v/v) CO₂, 37 °C 그리고 습한 상태에서 24시간 배양하였다. 배양 후, ToxiLight BioAssay Kit (Lonza)로 분석하기 위해 각 well로부터 20 µl 샘플(100% lysis control 포함)을 새로운 luminometer 플레이트로 옮겼다. 100 µl의 AKDR (Adenylate kinase detection reagent)을 각 well에 첨가하고, 상온에서 5분간 배양시켰다. 이를 일괄적으로 1초 동안 읽도록 프로그래밍한 Berthold Orion luminometer를 이용하여 측정하였다.

나머지 샘플은 ViaLight Plus BioAssay Kit (Lonza)를 이용하여 분석하였다. Cell Lysis Reagent 50 µl를 각 well에 첨가하고 10분 동안 상온에서 배양하였다. 100 µl의 AMR Plus (ATP Monitoring Reagent Plus)를 각 well에 첨가한 후에 시그널의 안정화를 위해서 2분 동안 배양한다. 이를 일괄적으로 1초 동안 읽도록 프로그래

밍한 luminometer를 이용하여 측정하였다. 챔버 슬라이드로부터 배양액을 제거하고, 새로 만든 live/dead staining solution (2 µM calcein

AM; 4 µM EthD-1 in PBS) 300 µl로 교환하였다. 샘플을 고정하기 전에 상온에서 30분 동안 배양하였다.

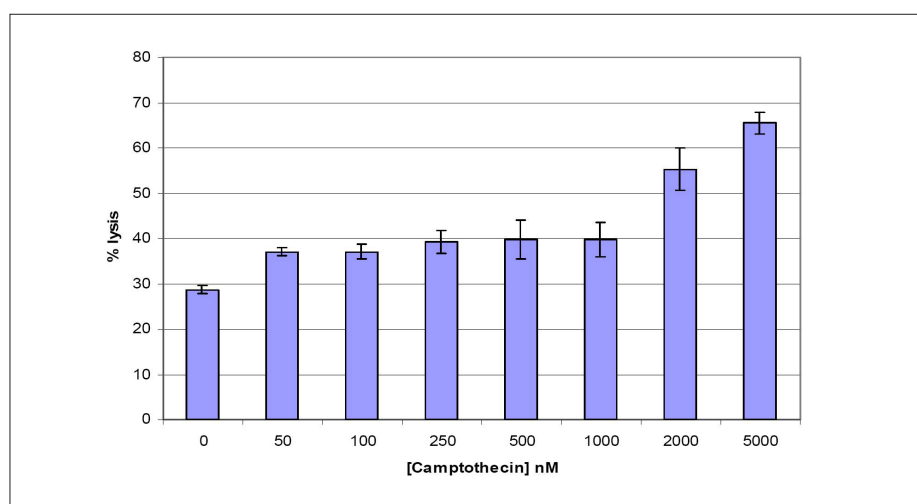


그림 1. HUVEC cells treated with camptothecin for 24h. Cells were assayed using the ToxiLight assay kit according to the manufacturer's instructions. The data produced was compared to a 100% lysed control sample and is expressed as a % lysis. The data is representative of the mean of 3 separate experiments (containing six replicates per dose) ±SEM

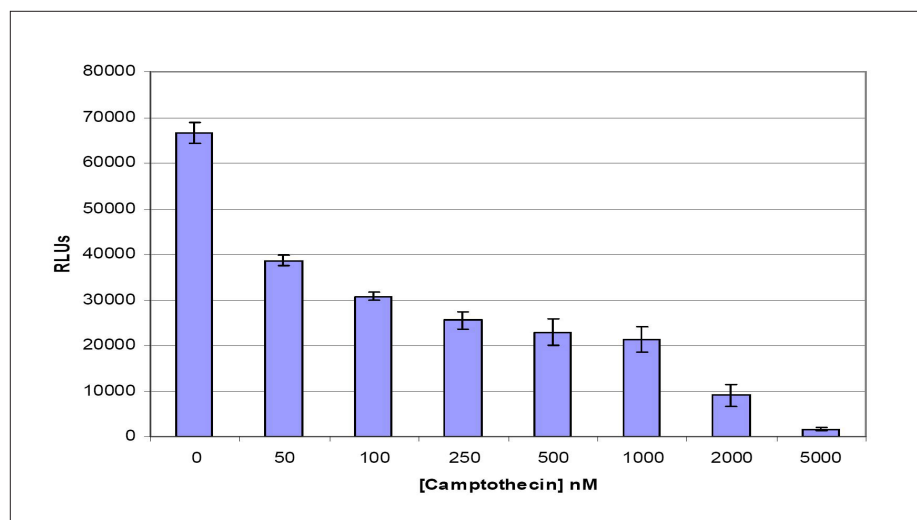


그림 2. ATP levels in HUVEC cells treated with camptothecin for 24h. Cells were assayed using the ViaLight Plus bioassay kit according to the manufacturer's instructions. The data is representative of the mean of 3 separate experiments (containing six replicates per dose) ±SEM

continued...

■ 결과

세포 막으로부터 억제되었던 adenylate kinase의 방출은 cytolysis 검출의 확실한 방법이다. ToxiLight BioAssay Kit를 사용하여 분석한 샘플은 ToxiLight 100% Lysis Reagent로 준비한 lysate와 비교하였고, 세포용해된 정도를 백분율로 나타내었다 (그림 1).

그림 1에서 보여진 대로 이 primary human cell line의 cytolysis 백그라운드 레벨은 약 27%이다 (cultured cell line에서는 보통 5~8%). 고농도의 camptothecin을 처리한 샘플에서는 세포 사멸의 현저한 증가와 함께 농도 의존적으로 cytolysis 레벨이 증가한다.

세포사멸이 유도되면, 웰에서 보이는 ATP 레벨이 급격히 감소한다. Camptothecin을 처리한 세포는 ViaLight Plus를 사용하여 분석하였고, 각 웰의 ATP 레벨은 세포 생존을 지표로 평가된다 (그림 2).

그림 2와 같이, camptothecin 농도가 증가하면 ATP의 레벨은 농도에 의존하여 떨어지게 된다.

두 실험의 결과를 직접적으로 비교해보면 (그림 3), 이미 cytolysis가 유도되었기는 하지만 어느 정도의 농도에서 세포 생존에 영향을 끼치는지 평가가 가능하다. Camptothecin이 세포 사멸을 유도한다고 알려진 것처럼, 적은 양의 camptothecin 투여에서 ATP가 감소된 것으로 사실상 apoptosis에 이른 것이라는 가정을 할 수 있지만, 여전히 세포 내부의 AK를 유지하는 손상되지 않은 세포막은 존재한다.

세포 생존을 측정하기 위해 두가지 dye를 사용하는 live/dead cytotoxicity assay를 이용하여 camptothecin을 처리한 세포들을 분석하였다. 살아있는 세포는 non-fluorescent Calcein AM을 높은 green fluorescent Calcein으로 전환할 수 있는 esterase를 포함한다. 손상된 막이 존재하

는 세포는 EthD-1 dye가 침투하여 붉은 형광을 띤다 (그림 4).

■ 결론

발표된 결과들로부터 camptothecin은 HUVEC 세포에서 농도 의존적으로 세포 사멸을 유도한다. ViaLight Plus와 ToxiLight BioAssay Kit의 bioluminescent 방법의 조합으로부터, 하나의 샘플에서 ATP 레벨과 AK 레벨을 측정할 수 있고 그 결과를 조합하면 세포에 대한 camptothecin의 효과를 전체적으로 파악할 수 있다. 이 경우 낮은 농도의 camptothecin 으로 ATP 레벨에 대한 현저한 효과를 낼 수 있지만 그에 부합하는 AK 레벨의 증가는 없다. 이는 세포가 세포사멸을 진행하는 동안 세포막이 손상되는 지점까지는 아직 이르지 않았다는 것을 나타낸다. Live dead cytotoxicity 염색을 사용하면 형광현미경을 통해 시각적인 결과를 얻을 수 있다.

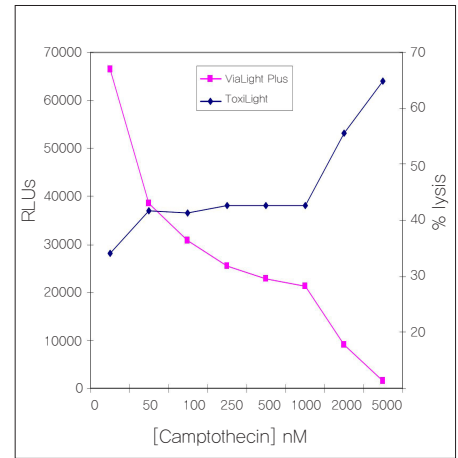


그림 3. Comparison of ViaLight Plus and ToxiLight Assays using HUVECS dosed with camptothecin. The ATP levels indicated by the ViaLight Plus RLUS reduce steadily in a dose dependent manner. At the lower drug doses the AK released from the cells is relatively low compared with that of the control only increasing dramatically at the highest drug doses.

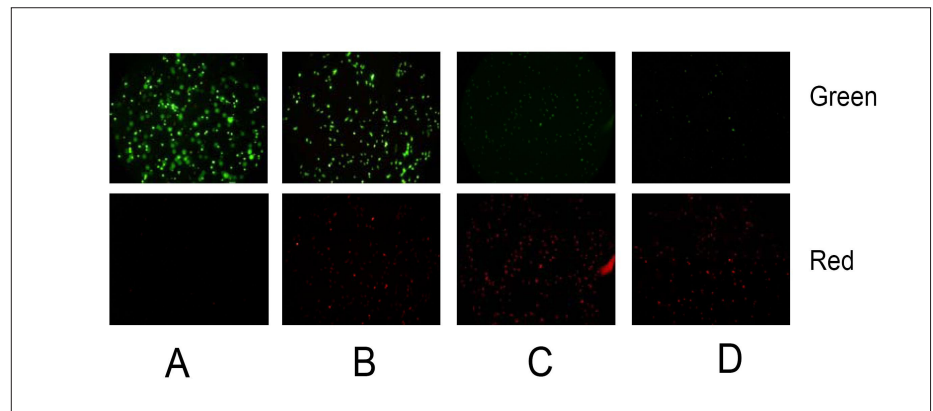


그림 4. Live dead staining of HUVEC cells dosed with Camptothecin. A, 0 nM camptothecin; B, 500 nM camptothecin; C, 1000 nM camptothecin; D, 5000 nM camptothecin. The top level of photographs shows the calcein staining. The number of cells fluorescing green decreases as the level of drug increases. Conversely in the lower photographs the red stain of cells with compromised membranes increases with increasing drug.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
ViaLigh Plus Assay Kit	500 회	LT07-221
	1,000 회	LT07-121
	10,000 회	LT07-321
	500 회 (TC plate 5개 포함)	LT17-221
ToxiLight Non-Destructive Cytotoxicity BioAssay Kit	1,000 회	LT07-117
	500 회	LT07-217
	500 회 (TC plate 5개 포함)	LT17-217
ToxiLight 100% Lysis Control Set	100 ml (200 tests)	LT07-517