

## FTY720에 의한 LLC-PK<sub>1</sub> 세포내 sphingoid bases의 축적

이우진 · 이용문\*

충북대학교 약학대학

(Received December 5, 1998)

### Endogenous Sphingoid Bases Accumulation by FTY720 in LLC-PK<sub>1</sub> Cells

Woo-Jin Lee and Yong-Moon Lee\*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract**—FTY720, a novel immunosuppressant, elevated the level of endogenous sphingoid bases in a dose-dependent manner within 3 hr in LLC-PK<sub>1</sub> cells. The relative molar ratio of sphingoid bases expressed as sphingosine/sphinganine (SPN/SPA), a biomarker of altered sphingolipid biosynthesis, in 10  $\mu$ M of FTY720 showed tow-fold increase as compared with the one in control culture. FTY720 under the serum-free medium condition increased only cytosolic free sphingosine concentration, not sphinganine concentration in a time-dependent manner over the 8 hr incubation under the same condition as in serum free cultures, the SPN/SPA ratio began to fluctuate and the number of floating cells as an indicator of cytotoxicity was increased 8 hr after the addition of FTY720 to cultured cells. These results suggest that the process of FTY720-induced cell death in LLC-PK<sub>1</sub> cells.

**Keywords** □ Sphingosine, sphinganine, FTY720, LLC-PK<sub>1</sub> cells, sphingoid bases ratio.

FTY720은 동충하초로부터 분리, 정제된 ISP-1을 모핵골격으로 하여, 최근, 새로이 합성한 면역억제제로, 기존의 cyclosporin A가 lymphocytes의 활성화를 억제하여 면역억제기능을 나타내는 반면, FTY720은 lymphocytes가 병변조직이나 이식부위로 이동하는 것을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 최근에는 FTY720이 apoptosis를 유발하여 세포의 사멸을 유도하며, 그 작용부위가 스핑고지질 대사경로에서 ceramide의 축적을 유발함에 의한 것이 아닌가 추정하고 있다.<sup>3)</sup>

스핑고지질은 세포의 생명을 유지하는데 없어서는 안 될 중요한 구성성분으로, 최근 일련의 연구결과는 스핑고지질의 세포내 대사물질, 즉 ceramides, sphingosine, sphinganine(dihydrosphingosine), sphingosine-1-phosphate 및 sphingosine-1-phosphocholi-

ne(SPC)등이 세포의 종류, 배양환경의 차이에 따라 약간씩 다르나, 모두 세포내 정보전달의 second messenger로서 역할을 수행함이 밝혀졌다.<sup>4,5)</sup> 세포내 스핑고지질 class는 일정한 대사경로의 고리 내에서 상호 연결되어 있으며, 세포의 생명현상을 유지하기 위하여 끊임없이 세포내에서 농도의 균형을 유지하려고 하고 있다. 그러므로, 만일 세포내의 스핑고지질의 균형이 깨어지면 esophageal cancer<sup>6)</sup>, chronic liver toxicity<sup>7)</sup> 및 Faber's disease<sup>8)</sup> 등과 같은 여러 가지 질병을 유발됨이 알려져 왔다. 전형적인 예로 *Fusarium moniliforme*로부터 추출된 fumonisin B<sub>1</sub> 및 *Alteraria alternata* f. sp. *lycopersici* (AAL)로부터 추출된 AAL-toxins 등은 sphinganine-N-acyltransferase의 활성을 억제하여 세포내의 sphinganine의 농도를 급격히 상승시키며, 그 결과 세포내의 sphingosine/sphinganine의 균형이 깨어지게 된다.<sup>9)</sup> 또한 *Aspergillus fumigatus*로부터 정제된 sphingofusins B 및 C는 스핑고지질의 생합성과정의 첫

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0431-261-2825 (팩스) 0431-268-2732

번째 단계인 serine palmitoyltransferase의 활성을 억제하여, 세포증식에 필요한 스핑고지질의 공급을 차단함으로써 세포내 전체 스핑고지질의 함량을 낮추게 된다.<sup>10)</sup> 따라서 외부에서 가하는 물질에 의하여 스핑고지질의 대사경로중의 일부가 차단되면 스핑고지질의 대사변화에 의하여 세포내 sphingosine/sphinganine의 농도조성 비율이 변하게 된다. 따라서 이러한 변화를 이전부터 biomarker로서 앞서 언급한 toxins의 감염 등의 지표로서 활용하여 왔다.<sup>11)</sup>

따라서 본 연구는 FTY720이 구조적으로 스핑고지질과 유사한 점으로부터, 스핑고지질의 대사과정중 어느 단계를 제어할 수 있는가를 구체적으로 알고자 하였다. 세포내의 sphingosine 및 sphinganine의 농도변화는 orthophthaldehyde(OPA)와 2-mercaptoethanol의 형광단 도입반응에 의하여 sphingosine 및 sphinganine의 절대량을 측정할 수 있다.<sup>12)</sup>

그 결과, FTY720은 기존의 toxins과 다른 양상으로 sphingoid bases의 세포내 축적을 유발하였으며, 이때 나타나는 sphingosine/sphinganine의 구성비의 급격한 변화는 LLC-PK<sub>1</sub> 세포의 사멸을 유도하는 시점과 상관성을 나타내었다.

### 실험방법

**실험재료 및 기기** - DMEM/F12와 heat-inactivated FBS는 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)에서 구입하였고, LLC-PK<sub>1</sub> 세포는 ATCC (No. CL-101)(Rockville, MD, U.S.A.)에서 구입하였다.

실험에 사용한 sphingosine, sphinganine, l-cycloserine 및 2-mercaptoethanol은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, OPA시약은 Nakalai Tesque(Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

기타 실험에 사용한 유기용매들은 모두 특급을 사용하였다.

**HPLC 장치 및 분리조작** - 측정에 사용한 HPLC system(Cosmosil ODS C18(4.6 mm i.d.×150 mm L: Nakalai Tesque))은 low pressure pump (L-6200 Series, Hitachi, Japan), Rheodyne 7125 injector 및 형광검출기(FP-920, Jasco)로 구성하였다. 유속은 항상 1.0 ml/min으로 고정하였으며, 역상칼럼의 온도는 40°C를 유지하였다. OPA유도체화된 sphingoid ba-

ses는 용리액 87% CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O를 사용하여 isocratic 용리조건에서 용출하였으며, 분리된 sphingoid bases (sphingosine, sphinganine) 및 내부표준물질 C<sub>20</sub>-sphinganine의 OPA유도체를 여기파장 340 nm, 형광파장 455 nm에서 검출하였다.

**LLC-PK<sub>1</sub> 세포의 배양 및 FTY720 처리** - LLC-PK<sub>1</sub>세포는 DMEM/F12배지에 sodium bicarbonate를 가하여 pH를 7.4로 조절한 후, 5% heat-inactivated FBS의 농도가 되도록 하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 함유한 조건에서 배양하였다. 세포내 스핑고지질의 변화를 관찰하기 위하여 Nunc 6 well-plate에 LLC-PK<sub>1</sub> 세포를 5×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 세포의 suspension을 가하였다. 12시간의 pre-incubation 후, 10~100 μM 범위의 FTY720의 ethanol용액을 가하여 3시간동안 배양 후 각각의 sphingoid bases 함량을 측정하였다. 시간경과에 따른 FTY720에 의한 sphingoid bases 축적 활성의 관찰은 12시간의 pre-incubation 후, 10 μM FTY720을 가하고 2시간 간격으로 cell을 harvest하여 각각의 sphingoid bases의 량을 측정하였다.

**Sphingoid bases의 측정** - 세포내의 sphingoid bases의 변화는 다음과 같이 측정하였다. FTY720을 처리하고 일정 시간 경과 후, 2% trypsin-EDTA로 처리하여 모든 세포를 얻었다. 모든 세포는 1 ml의 PBS 완충 용액으로 2회 세척한 후, 여기에 chloroform-methanol혼액(1:2,v/v) 1.5 ml와 내부표준물질인 C<sub>20</sub>-sphinganine stock solution(40 pmol/40 μl) 에탄올 용액 40 μl를 넣어 충분히 혼화하여 세포내의 총 지질을 추출하였다. 지질이 이행된 유기 층을 따로 모아 1 ml의 알칼리 용액(증류수 250 ml에 1.0N-KOH 500 μl를 가하여 용시 조제, pH 9.5)으로 2회 세척한 후, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 통과시켜 수분을 완전히 제거하였다. 상기의 추출조작을 다시 1회 반복하여 얻은 유기용매층을 speed vacuum concentrator에서 완전히 건조하였다.

Sphingoid bases의 변화를 측정하기 위하여 사용한 OPA에 의한 형광표식은 Merrill 등에 의하여 보고된 방법을 사용하였다.<sup>12)</sup> 즉, 3% boric acid buffer(KOH를 사용하여 pH 11.0으로 조정함) 99 ml에 0.4 M OPA의 에탄올용액 1.0 ml를 가하여 잘 섞은 용액을 OPA 시액으로 하였다. 유도체 화는 배양세포로부터 추출, 건조된 pellets을 에탄올 40 μl에 다시 녹인 후, OPA시액 100 μl와 2-mercaptoethanol 20 μl를 순차적으로 가하고 상온에서 20분간 방치하여 유도체화 반응을 시

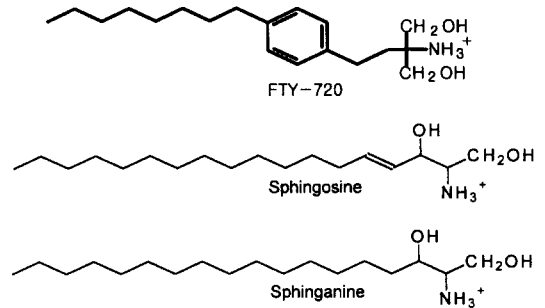
켰다. 반응액중 10  $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 용출되는 형광피이크의 면적을 측정하여 내부표준물질로 사용한 C<sub>20</sub>-sphinganine과의 형광 세기 비로 작성한 각각의 calibration 직선식( $y=0.063x+0.437$  for sphingosine;  $y=0.082x+0.562$  for sphinganine)으로부터 sphingoid bases의 량을 산출하였다.

**단백질 함량 측정 및 통계처리** - 단백질함량의 측정은 Bradford법을 이용하여 bovine serum albumin 표준액으로부터 계산된 표준검량곡선( $y=0.078x+0.038$ ; cell number =  $x \times 10^3$ )에서 그 함량을 산출하였다.<sup>13)</sup> 결과에 대한 통계학적 계산은 Student's *t*-test를 통하여 그 유의성을 판정하였다.

### 결과 및 고찰

LLC-PK<sub>1</sub> 세포는 pig kidney로부터 유래된 정상조직의 epithelial cells로 스펅고지질 대사가 활발하여, 스펅고지질 대사의 연구에 많이 사용되고 있다.<sup>14)</sup> 따라서 본 연구에서는 FTY720이 스펅고지질의 대사에 미치는 영향을 연구하고자 이 cell line을 사용하였다. 스펅고지질의 대사이상을 판정하는 데는 세포내의 sphingoid bases 함량간의 상호비율의 변화가 세포독성의 발현과 깊이 관련되어 있다.<sup>15)</sup> Sphingoid bases란 탄소수 18개의 linear chain의 1번 탄소 및 3번 탄소에 OH 기가 있으며, 2번 탄소에 NH<sub>2</sub>기가 붙어있는 그룹의 화합물을 총칭하며, 세포내에는 주로 sphingosine과 sphingosine에서 4,5번 탄소에 걸쳐있는 이중결합이 없는 sphinganine이 주로 주 대사물로 존재한다. 이들의 세포내 함량은 정상상태의 세포의 종류에 따라 다르나, 일반적으로 10 pmol/10<sup>6</sup> cells 정도의 농도를 유지하고 있다.<sup>15)</sup> 따라서 이들을 총지질 추출물로부터 측정하기 위하여는 선택성이 좋은 측정법이 요구되고 있다.

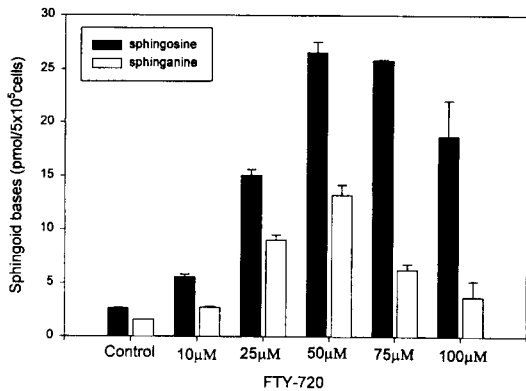
지금까지 개발된 sphingoid bases의 측정방법은 OPA/2-mercaptoethanol을 이용하여 화학적 반응을 통하여 2번 탄소에 NH<sub>2</sub>기에 형광단 도입하여 HPLC로 측정하는 방법,<sup>12)</sup> sphingosine kinase의 활성을 이용하여 sphingoid bases를 인산화시키고, 그 인산화된 정도를 TLC 전개후, spot에서 나오는 방사선의 세기로 측정하는 방법<sup>16)</sup> 그리고 방사표식된 acetic anhydride로 sphingoid bases와 반응시켜 나오는 C<sub>2</sub>-ceramide의 량을 TLC spot에서 나오는 방사선의 량으로 측정하



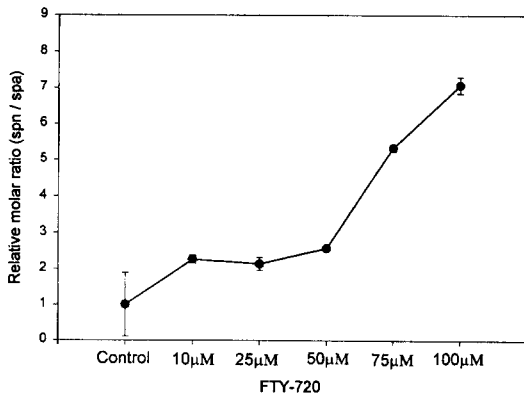
**Fig. 1** — Structural similarity between FTY720 and sphingoid bases.

는 방법<sup>17)</sup> 등이 있다. 모든 방법이 서로 보완적인 장단점을 갖고 있으나, 본 실험에서는 형광표식에 의한 HPLC측정법은 측정에 시간이 걸리는 단점은 있으나, 비방사선 표식 법으로 세포내 sphingoid bases의 절대량을 측정할 수 있다는 점과 재현성이 높은 점으로부터 이 방법으로 sphingoid bases를 측정하였다.

FTY720은 그 화학적 구조가 sphingoid bases와 유사하며 따라서 세포내의 스펅고지질의 대사를 제어할 가능성이 있다(Fig. 1). 세포내의 sphingoid bases의 함량은 매우 적으므로, 배양액의 교환 등과 같은 외부충격에 의하여 그 함량의 변화가 일어날 수 있음이 보고되어 있다.<sup>17)</sup> 따라서 배양액 교환후, 나타나는 sphingoid bases의 변화를 관찰 한 결과, 약 12시간 이후에는 정상상태로 안정화됨을 알았다(data not shown). 따라서 이하의 모든 실험과정에 12시간 이상의 pre-incubation 과정을 삽입하여 수행하였다. FTY720은 10~100  $\mu$ M의 농도범위에서 5% FBS 존재 하에서 3시간동안 배양한 결과, 세포내의 sphingoid bases 농도를 급격히 증가시켰다. FTY720투여 농도에 비례하여 sphingoid bases 함량도 함께 증가하며 50  $\mu$ M농도에서 basal level의 10배까지 증가하였다. 그 이상의 농도에서는 세포의 급격한 사멸에 의한 세포수의 저하, cell lysis등의 원인에 의하여 편차가 발생하였다(Fig. 2). 이 결과를 sphingosine/sphinganine의 상대적 비로 나타내면 10  $\mu$ M FTY720의 투여에서 sphingoid bases의 상대적 비가 약 2배 증가하였으며, 50  $\mu$ M을 초과하면 급격히 상대적 비가 증가하고 있다(Fig. 3). 일반적으로 sphingoid bases의 상대적 비가 control의 약 2배 이상이 되면 스펅고지질 대사에 상당한 이상이 있음을 나타내고 있다. 따라서 FTY720은 약 10  $\mu$ M의 투여로 세포내의 sphingoid bases의 상승을 유발하였으



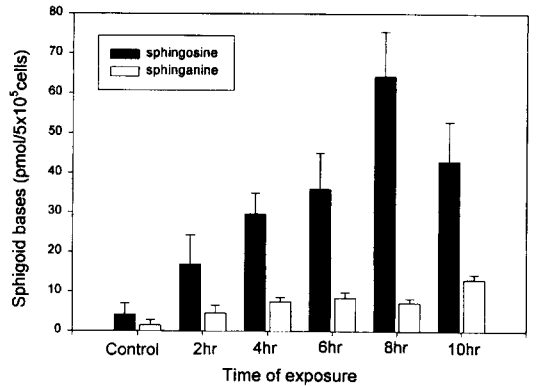
**Fig. 2**—Endogenous sphingoid bases accumulation increased by FTY720 for 3 hr in LLC-PK<sub>1</sub> cells. The cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) after 12 hr pre-incubation were treated with FTY720 and then the cellular lipid extract was derivatized by OPA. The determination of sphingoid bases was calculated by fluorescent peak intensity using in HPLC system. Control means the sphingoid bases level treated with ethanol vehicle. The data represent the means  $\pm$  S.E. of triplicated experimental.



**Fig. 3**—Changes of sphingosine/sphinganine ratio by FTY720 for 3 hr. Experimental procedure is the same as Fig. 2.

며, 스핑고지질의 대사를 제어함을 알 수 있었다.

한편, 세포배양액의 FBS는 강한 mitogen으로 세포 증식에 필수적인 인자로 인식되고 있다. FBS의 투여는 세포증식에 필요한 스핑고지질의 생합성 경로를 활성화하므로, sphingoid bases의 합성도 증가한다. 따라서, FBS에 의한 sphingoid bases의 함량변화에 미치는 영향을 배제하기 위하여, FBS를 첨가하지 않은 배지에서 자란 LLC-PK<sub>1</sub> cells에 10 μM FTY720을 가하고, 시간경과에 따른 sphingoid bases를 관찰하였



**Fig. 4**—Endogenous sphingoid bases accumulation increased by 10 μM FTY720 in LLC-PK<sub>1</sub> cells with serum-free media. The cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) after 12 hr pre-incubation were treated with 10 μM FTY720 and the determination of sphingoid bases was performed with the same as described in Fig. 2. Control means the sphingoid bases level treated with ethanol vehicle for 8 hr. The sphingoid bases level in cultured cells treated with ethanol vehicle for various time interval is almost the same as those of the untreated cells. The data represent the means  $\pm$  S.E. of triplicated experimental.

다. 그 결과, 약 8시간 배양에서 sphingosine이 최대 축적되었으며, 그 이후부터는 세포수의 감소를 나타내었다(Fig. 4). 한편 FBS에 의한 영향을 배제하면, sphinganine의 축적은 일어나지 않고, sphingosine의 축적만이 나타났다. 이는 FBS가 제거됨으로써 스핑고지질의 생합성의 활성도가 저하되고, 따라서 스핑고지질 생합성 단계에 위치한 sphinganine의 존재량이 상대적으로 줄어들게 되어, FTY720의 처리에서도 영향을 받지 않게 되는 것이 아닌가 추정하고 있다. 또한, 5%FBS의 존재 하에 10 μM FTY720를 투여하면, 시간의 경과에 따라 sphinganine도 함께 축적됨을 관찰할 수 있었다(data not shown). 이 결과를 sphingosine/sphinganine의 상대적 비로 나타내면 Fig. 5에서 보는 바와 같이 10 μM FTY720의 투여에 의하여 약 8시간 정도에서 상대적 비의 변화가 나타나기 시작하였다. 이와 동시에 FTY720의 처리는 0.4% trypan blue하에서 관찰한 결과, 살아있는 세포중 부착하여 자라는 LLC-PK<sub>1</sub> cells은 시간경과에 따라 약 6~8시간 이후부터 배양액 표면으로 부상하는 것을 관찰되었다. 이는 아직 세포가 살아있다는 점에서 cytotoxicity와는 구별되며, FTY720처리로 볼 수 있는 특징적인 현상이다(Fig. 6).

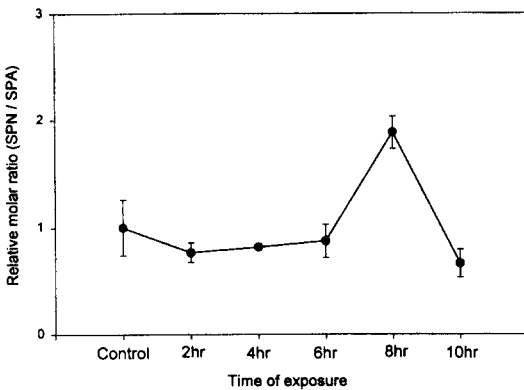


Fig. 5—Changes of sphingosine (SPN)/sphinganine (SPA) ratio by 10  $\mu$ M FTY720 in serum-free media. Experimental procedure is the same in Fig. 4.

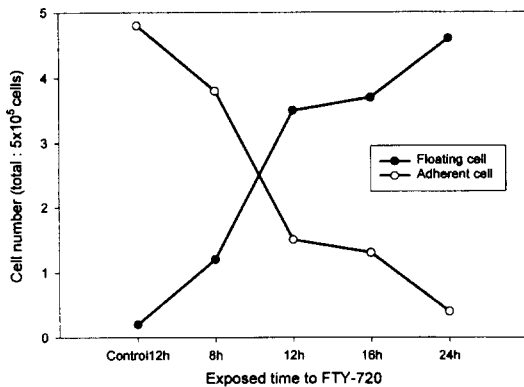


Fig. 6—FTY720 begin to increase the population of floating cells after 8 hr. The cell number was counted by the number of exclusion body of 4% trypan blue staining. Control means the cell number calculated at 12 hr in serum-free media. The results are represented as means of duplicated independent experimental.

따라서 FTY720은 그 구조적 유사성에 의하여 스펅고지질의 대사물의 제어에 관여하며, 특히 sphingosine 및 sphinganine의 급격한 세포내의 축적을 나타내었으며, sphingosine/sphinganine의 상대적 비를 변화를 지표로 하여 그 세포독성의 발현을 알 수 있었다. FTY720의 면역억제 활성 및 apoptosis 유발효과가 sphingosine 및 sphinganine의 축적유발과 같은 스펅고지질의 대사제어에 의한 것인지 현재 검토중이나, FTY720의 세포독성 유발과 상관성이 있음을 알 수 있었다.

본 연구결과, FTY720은 용량 및 배양시간에 의존적

으로 sphingosine 및 sphinganine의 세포내 축적을 유발하였다. 따라서 FTY720은 스펅고지질의 대사과정에서 sphingosine 및 sphinganine의 대사에 관여하고 있는 sphingosine kinase 및 sphinganine-N-acyltransferase의 활성을 억제하는 것으로 추정할 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 96년도 교육부 학술조성연구비(GE96-101)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문헌

- 1) Shimizu, C., Li, X., Kimura, M., Hashimoto, K., Sugaya, K., Kubo, M., Suzuki, S. and Nakayama, T.: A novel immunosuppressant, FTY720, increases the efficiency of a superantigen-induced peripheral T-cell deletion whilst inhibiting negative selection in the thymus *Immunology*, **94**(4), 503 (1998).
- 2) Matsuda, T., Nakajima, H., Fujiwara, I., Mizuta, N. and Oka, T.: Caspase requirement for the apoptotic death of WR19L-induced by FTY 720 *Transplant Proc.*, **30**(5), 2355 (1998).
- 3) Kahan, B. D.: FTY720: a new immunosuppressive agent with novel mechanism of action *Transplant Proc.*, **30**(5), 2210 (1998).
- 4) Spiegel, S. and Merrill, A.H., Jr.: Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.* **10**, 1388 (1996).
- 5) Hannun, Y. A.: The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* **269**, 3125 (1994).
- 6) Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Shephard, G. S., van Schalkwyk, D. J. and Koch, K. R.: Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J. Agric. Fd. Chem.*, **38**, 1900 (1990).
- 7) Norred, W. P., Plattner, R. D., Vesonder, R. F., Bacon, C. W. and Voss, K. A.: Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat

- primary hepatocytes. *Fd. hem. Toxicol.*, **30**, 233 (1992).
- 8) Koga, M.: Faber disease, acid ceramidase deficiency, *Ryokibetsu Shokogun Shirizu*, **19**(2), 389 (1998).
- 9) Wu, W. I., McDonough, V. M., Nickels, J. T., Ko, J., Fischl, A. S., Vales, T. R., Merrill, A. H., Jr and Carman, G. M.: Regulation of lipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by fumonisin B<sub>1</sub>, *J. Biol. Chem.*, **270**(22), 13171 (1995).
- 10) Merrill, A. H., Jr., Schmelz, E. M., Dillehay, D. L., Spiegel, S., Shayman, J. A., Schroeder, J. J., Riley, R. T., Voss, K. A. and Wang, E.: Sphingolipids-The enigmatic lipid class: biochemistry, physiology and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 208 (1997).
- 11) Riley, R. T., Wang, E. and A. H. Merrill, Jr., Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine to sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *J. A. O. A. C.*, **77**(2), 533 (1994).
- 12) Merrill, A. H., Jr, Wang, E., Mullins, R. E., Jamison, W. C. L., Nimkar, S. and Liotta, D. C.: Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **171**, 373 (1988).
- 13) Weiner, G.J. and Kaminski, M. S.: Anti-idiotypic antibodies recognizing stable epitopes limit the emergence of idiotype variants in a murine B cell lymphoma. *J. Immunol.* **144**(6), 2436 (1990).
- 14) Yoo, H., Norred, w. p., Showker, J. and Riley, R. T.: Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **138**, 211 (1996).
- 15) Liscovichi, M. and Lavie, Y.: Sphingoid bases as endogenous cationic amphiphilic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 2071 (1991).
- 16) Olivera, A., Rosenthal, J. and Spiegel, S.: Sphingosine kinase from Swiss 3T3 fibroblasts: a convenient assay for the measurement of intracellular levels of free sphingoid bases *Anal. Biochem.*, **223**, 306 (1994).
- 17) Igarashi, Y.: Functional roles of sphingosine, sphingosine-1-phosphate and methylsphingosine: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways. *J. Biochem.*, **122**, 1080 (1997).