

## 호중구의 자연 세포사멸 및 세포사멸 지연에 대한 Brefeldin A의 영향

김재석<sup>1</sup> · 이민정 · 이창민<sup>2</sup> · 이상화<sup>2</sup> · 배외식 · 곽종영\*

동아대학교 의과대학 생화학교실  
<sup>1</sup>내과학교실, <sup>2</sup>미생물학교실

### Effects of brefeldin A on spontaneous and delayed apoptosis of human neutrophils

Jae-Suk Kim<sup>1</sup>, Min-Jung Lee, Chang-Min Lee<sup>2</sup>, Sang-Hwa Lee<sup>2</sup>, Yoe-Sik Bae and Jong-Young Kwak\*

Department of Biochemistry, Internal Medicine<sup>1</sup>, and Microbiology<sup>2</sup>,  
Dong-A University College of Medicine, Busan 602-103, Korea

#### Abstract

Neutrophil apoptosis is a constitutive process that can be enhanced or delayed by various stimuli. In this study, effect of brefeldin A (BFA), which affects biological process of secretion, on constitutive and delayed apoptosis of neutrophils was investigated. Neutrophil apoptosis was determined after culturing for 20 hr *in vitro* by morphological changes, annexin V staining and DNA electrophoresis. BFA increased the constitutive apoptotic rate of neutrophils in dose-dependent manner. The delay of apoptosis induced by granulocyte macrophage-colony stimulating factor and lipopolysaccharide was also blocked by 10  $\mu$ M of BFA. However, this effect of BFA was less marked when neutrophils were treated with dexamethasone, interleukin-8, or dibutyryl-cAMP. Moreover, the delay of neutrophil apoptosis induced by rottlerin, a specific inhibitor of protein kinase C- $\delta$  was significantly abrogated by BFA. Although BFA-induced apoptosis was not blocked by the caspase-3 inhibitor, zDEVD-fmk, expression levels of myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) were down-regulated by BFA. These results suggest that derangement of vesicular protein transport may be involved in the apoptosis of neutrophils, and that the action of BFA on apoptosis is dependent on changes in the expression of Mcl-1.

**Key words** – Neutrophils, apoptosis, brefeldin A, Mcl-1, protein kinase C- $\delta$ , caspase.

#### 서 론

호중구는 생체 내 염증이 일어나는 경우 가장 먼저 동원되는 탐식세포로서 다량의 활성 산소종을 생성하여 세

균 등을 사멸시키지만 이러한 생성물에 의하여 조직의 손상을 동반하기도 한다. 따라서, 활성화된 기능을 억제하는 것과 함께 호중구의 세포사멸의 조절은 염증의 종결을 위하여 필수적이며 더욱 중요하다고 알려져 있다[7,28]. 사멸된 호중구는 세포 내 독작용을 나타내는 물질의 분비가 없이 대식세포에 의하여 탐식되어 소멸된다[23]. 사멸된 호중구가 제거됨으로써 염증 반응이 종결되어야 하나 세

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 051-240-2928, Fax : 051-241-6940  
E-mail : jkwak@mail.donga.ac.kr

포사멸에 들어가지 않은 노화된 세포들은 일부분의 기능이 유지되므로 노화된 호중구의 제거가 일어나지 않으면 염증 매개 활성물질에 의한 조직 손상은 더욱 증가된다[24].

호중구는 생체 내에서 6-10시간, 배양 상태에서 24시간에 50%가 자연 세포사멸이 된다. 그러나 세균의 감염으로 인한 lipopolysaccharide (LPS)의 증가, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)와 같은 성장 인자들 및 만성 염증성 질환에서 분비되는 여러 사이토카인들에 의하여 생존기간이 증가한다[1,17,26]. 현재까지 호중구의 세포사멸이 일어나는 현상의 연구에 비하여 세포사멸의 기작에 관한 연구는 부족하다. 세포사멸은 모든 세포에서 일어나는 일반적인 현상이지만 세포의 종류나 자극제에 따라서 각각 다른 생화학적, 기능적인 차이를 보이기 때문에 생각할 수 있다[1].

Brefeldin A (BFA)는 *Penicillium brefeldianum*으로 부터 분리한 macrocyclic lactone으로서 ADP-ribosylation factor (ARF)의 GDP-GTP교환을 억제하여 골지체로의 막 이동이나 소포의 이동을 억제하는 물질이다[4,8,11]. BFA는 HL-60 세포에서 세포사멸을 증가시킨다고 알려져 있으며 여러 암세포에서 세포사멸을 증가시키는 것은 p53과는 관계가 없는 것으로 밝혀졌다[25,27]. 최근의 연구에서 Jurkat T-세포를 BFA로 처리하였을 때 caspase-3의 활성 증가가 세포사멸을 유도한다고 하였으며 세포사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2의 발현의 증가가 있으면 BFA에 의한 세포사멸은 방지된다고 하였다[6]. 그러나 호중구에서는 Bcl-2의 발현은 측정되지 않고 그와 같은 종류에 속하는 myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1)은 발현되어 있다는 것이 밝혀짐으로써 호중구의 세포사멸 조절은 암세포주들과는 다르다는 것을 제시하고 있다[9,19].

호중구는 Mcl-1이나 caspase-3와 같은 세포사멸 조절 단백질들을 발현하고 이들 단백질 합성 정도에 따라 세포사멸이 증가되거나 억제된다[1]. 단백질이나 mRNA 합성을 억제하는 약물들에 의한 호중구의 세포사멸 변화는 많은 연구가 되어 있으나 단백질 분비에 관여하는 약물들의 세포사멸에 대한 영향은 조사된 것이 거의 없다. 따라서, 본 연구에서는 단백질의 분비를 억제하는 BFA가 호중구의 자연 세포사멸과 여러 약물에 의한 세포사멸의 지연에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하고 세포사멸에서 BFA의 작용기작을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사람 호중구의 분리 및 배양

호중구의 분리는 dextran 침전과 ficoll-hypaque 법으로 분리하고 RPMI 배지에서 5% 소 혈청을 첨가하여 20시간 동안 배양하여 호중구의 세포사멸을 유도하였다[20]. 혈액 (100 ml)은 0.1 M EDTA, pH 7.4 /0.9% NaCl이 들어 있는 수혈용 팩에 채혈하였다. 30 ml의 Hespán을 넣고 1시간 동안 실온 상태에서 방치하여 적혈구를 제거하였다. 호중구를 포함하는 혈장 성분층을 분리하여 4°C 상태에서 850×g로 15분 동안 원심분리하였다. 침전된 세포를 20 ml의 인산염 완충액(8.0 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4)에 부유시킨 다음 60 ml의 증류수를 넣고 잘 섞은 뒤 50초간 방치한 후 20 ml의 4%(w/v) NaCl을 넣었다. 세포는 850×g에서 10분간 원심 분리하고 인산염 완충액에 다시 부유시켰다. 임파구 분리용액인 ficoll-hypaque 용액을 세포층 밑에 넣고 850×g 에서 30분간 원심분리하여 분리된 과립구층은 다시 RPMI 배양액에 부유하여 사용하였다.

### 호중구 세포사멸의 형태 관찰

2×10<sup>5</sup>세포를 약물을 처리하고 20시간 37°C에서 CO<sub>2</sub> 배양기에 두었다. Cytospin에서 500rpm으로 1분간 원심 분리한 다음 메탄올으로 고정시키고 May-Grünwald Giemsa 염색액으로 염색하였다. 호중구의 세포사멸은 400×10 배현미경 시야에서 최소한 300개의 세포 중에서 특이적인 변화가 나타난 세포를 확인하여 %로 표시하였다[14].

### DNA 전기영동

사멸된 세포에서 특징적으로 나타나는 조각의 DNA를 전기영동으로 확인하였다[14]. 5×10<sup>5</sup>의 호중구를 약물 처리한 다음 13,000×g에서 2분간 원심하여 분리한다. 인산염 완충액으로 세척하고 세포용해 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100)에 proteinase K (500 μg/ml)를 첨가하여 55°C에서 12시간 처리하였다. 28,000rpm에서 2시간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 DNA를 phenol/chloroform으로 추출하고 isopropanol로 침전시켰다. RNase A (20 μg/ml)를 첨가하여

37°C에서 1시간 반응시킨 다음 1% 아가로스 겔에서 전기영동(50V)을 3시간 시행하였다.

#### Flow-cytometry 측정

$5 \times 10^5$ 의 호중구를 인산염 완충액으로 세척하고 70% 에탄올에 부유하였다. -20°C에서 하룻밤을 방치하고 다시 인산염 완충액으로 1회 세척한 다음 0.5 mM EDTA가 들어있는 인산염 완충액에 시료를 부유하였다. RNase(20  $\mu$ g/ml)와 propidium iodide (PI)(50  $\mu$ g/ml)를 첨가하여 실온에서 15분간 배양하였다. 측정할 때까지 4°C에 보관한 다음  $10^4$ 개의 세포를 이용하였다. Phosphatidylserine (PS)의 세포 외막으로의 노출되는 정도는 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)의 결합을 이용하였다(TACS apoptosis detection kit, Trevigen, Netherland)[20]. 세포를  $1 \times 10^6$ 으로 분리하여 인산염 완충액으로 2회 세척한 다음 annexin V-FITC와 PI를 첨가하고 15분 동안 반응시켰다.  $1 \times 10^4$ 의 세포를 flow-cytometry (Beckton Dickinson, USA)으로 측정하였다. Annexin V-FITC와 PI의 결합 차이로써 다음과 같은 세포들을 구분하였다; 세포사멸된 세포: annexin V-FITC 양성, 세포사멸 말기 세포나 괴사된 세포: annexin V-FITC 와 PI 양성, 생존하는 세포: 모두 음성 염색.

#### Western blot

배양한 세포( $2 \times 10^7$ )를 인산염 완충액으로 세척한 다음 단백질 분해효소 억제제(0.5  $\mu$ M leupeptin, 1  $\mu$ M aprotinin 및 10 mM phenylmethylsulfonylfluoride)와 50 mM NaF 및 2.5 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 가 첨가된 세포용해 완충액(1% Triton X-100, 50 mM NaCl 및 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)을 이용하여 4°C 하에서 1시간 동안 방치하였다. 파괴된 세포를 함유하는 용액을 Eppendorf microcentrifuge를 이용하여  $16,000 \times g$ 로 10분간 원심 분리하여 핵 분획 및 파괴되지 않은 세포 등을 침전시키고 상층액을 얻어서 단백질을 측정하는 다음 전기영동에 이용하였다.

SDS-PAGE 후 western blot법을 사용하여 Mcl-1에 대한 항체(Santa Cruz, USA)를 이용하여 Mcl-1의 발현 정도를 측정하였다. 약물을 처리한 호중구는 2.5% mercapto-ethanol과 1.2% sodium dodecyl sulfate를 넣고 100°C에서 5분간 가열하여 처리한 다음 15% polyacrylamide 겔에 loading하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 겔의

단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% sodium azide로 구성된 완충액에 5% skim milk을 포함하는 용액으로 2시간 처리하며 1차 항체는 1:1000으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 2차 항체를 실온에서 1시간 반응시키고 nitrocellulose membrane을 세척하였다. 다시 Triton X-100이 들어있지 않는 Tris 용액으로 세척하고 ECL chemiluminescence (Amersham)나 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 발색 방법으로 전개시켰다.

#### 통계 처리

세포사멸의 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 통계학적 유의성은 자료들의 분포를 확인하고 Student's t-test를 이용하여 검정하였고 p값이 0.05이하이면 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

#### BFA에 의한 호중구 세포사멸의 유도

호중구는 배양 상태에서 자연 세포사멸이 빠르게 일어난다. 세포사멸의 특징인 핵의 농축이나 세포질 내 낭포가 쉽게 관찰되었다(Fig. 1A). 이들 변화는 DNA조각의 증가와 일치하여 증가하였으며 PS의 세포 외막으로의 노출 정도와도 일치하였다(Figs. 1B와 1C). 20 시간 배양 후 약 50%가 세포사멸이 유도되었다. 1  $\mu$ M의 BFA를 첨가하였을 때 호중구의 세포사멸은  $75 \pm 8\%$ 로 증가하였다. BFA를 처리하지 않은 세포들에서는 DNA의 조각이나 PS의 측정이 약하게 나왔으나 BFA를 처리한 호중구들은 DNA 조각이나 annexin-V염색이 강하게 나타남으로써 BFA에 의하여 세포사멸이 증가함을 보였다. BFA에 의한 세포사멸을 0.01  $\mu$ M로부터 10  $\mu$ M까지 농도별로 측정하였을 때 0.5  $\mu$ M의 낮은 농도에서부터 세포사멸이 일어났으며 10  $\mu$ M에서 최대의 반응을 보였다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서는 10  $\mu$ M 농도의 BFA를 실험에 사용하였다.

#### 호중구의 세포사멸 지연에 대한 BFA의 영향

호중구의 세포사멸을 지연시킨다고 알려진 LPS나 GM-CSF로 호중구를 20시간 처리하였을 때 세포사멸되는

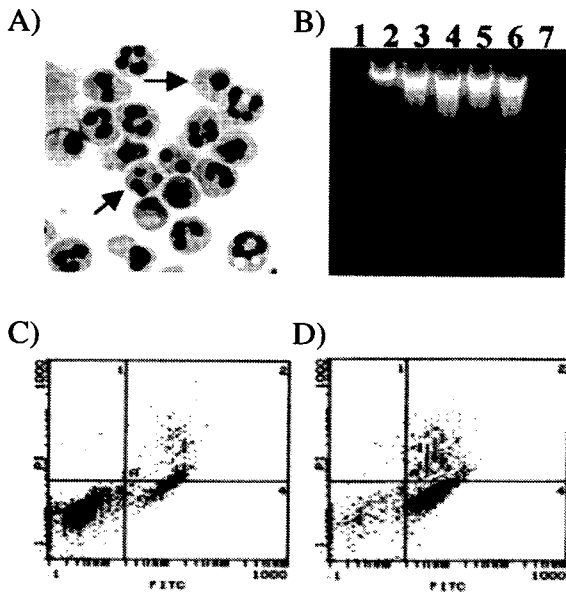


Fig. 1. Induction of neutrophil apoptosis by BFA. (A) Cytospin preparations of neutrophils after incubation *in vitro* for 20 hr were stained with Giemsa solution. Solid arrows indicate apoptotic cells. (B) Nucleosomal DNA fragmentations in neutrophils were analyzed by agarose gel electrophoresis (lane 1, 1 kb DNA ladder marker; lane 2, fresh neutrophils; lane 3, 20 hr cultured control cells; lane 4, 20 hr cultured cells with 1  $\mu$  M BFA; lane 5, 20 hr cultured cells with 1  $\mu$  g/ml LPS; lane 6, 20 hr cultured cells with BFA and LPS; lane 7, positive DNA fragment). (C) Neutrophils were cultured for 20 hr and cell death was assessed by annexin V staining. (D) Neutrophils were cultured for 20 hr in the presence of 10  $\mu$  M of BFA and cell death was assessed by annexin V staining.

세포의 수가 현저히 감소하였다. 이들 약물을 처리하기 1 시간 전에 BFA를 투여하고 20시간 배양 후 세포사멸을 측정하였다. BFA를 처리한 세포에서는 LPS나 GM-CSF가 들어 있더라도 세포사멸되는 정도가 증가함으로써 BFA는 세포사멸의 지연을 억제한다는 것을 알 수 있다(Figs. 2와 3). LPS를 처리한 세포에서 DNA 조각이 감소하는 현상도 BFA의 전처리 시에는 억제되었다. 한편, dibutyryl-cyclic AMP (db-cAMP), dexamethasone 및 interleukine-8 (IL-8) 으로 처리하여 세포사멸이 지연된 경우, BFA의 효과는 부분적으로 나타났다. 이들 결과들은 BFA가 세포사멸을

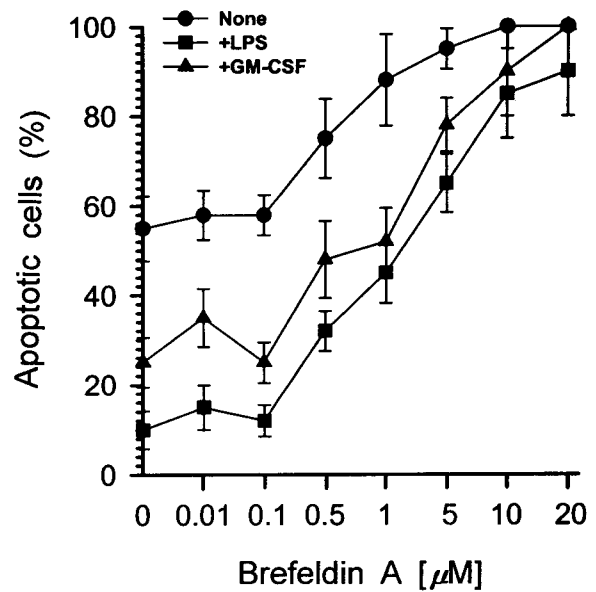


Fig. 2. Dose-dependent effect of BFA on the spontaneous and the delayed apoptosis of neutrophils. Neutrophils were incubated with various concentrations of BFA for 1 hr at 37°C prior to the addition of media alone (None), or media containing 1  $\mu$  g/ml of LPS (+LPS), or 1  $\mu$  g/ml of GM-CSF (+GM-CSF). The cells were cultured for 20 hr, and apoptotic cells were identified by their morphologies under light microscopy and counted. Data are reported as the percentage of cells showing the morphologic features of apoptosis. Results represent means  $\pm$  SD.

억제하는 서로 다른 약물들에 대하여 각각 다른 작용을 가진다는 것을 보여주고 있으며 그들에 의한 호중구의 세포사멸 억제작용이 다를 것이라는 것을 암시하고 있다.

#### BFA에 의한 세포사멸 유도에서 caspase-3 억제제와 protein kinase C- $\delta$ (PKC- $\delta$ ) 억제제의 영향

최근 다른 연구자들의 보고에 의하면, 세포사멸이 일어나는 동안 PKC- $\delta$ 는 caspase-3에 의하여 분해되면서 활성형으로 전환된다고 하였다[10,21]. 따라서, 본 연구에서는 PKC- $\delta$ 에 대한 특이적인 억제제인 rottlerin과 caspase-3의 억제제인 zDEVD-fmk가 BFA에 의한 세포사멸에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. Rottlerin을 단독으로 첨가했을 때 호중구의 세포사멸은 현저히 감소하였다(Fig. 4).

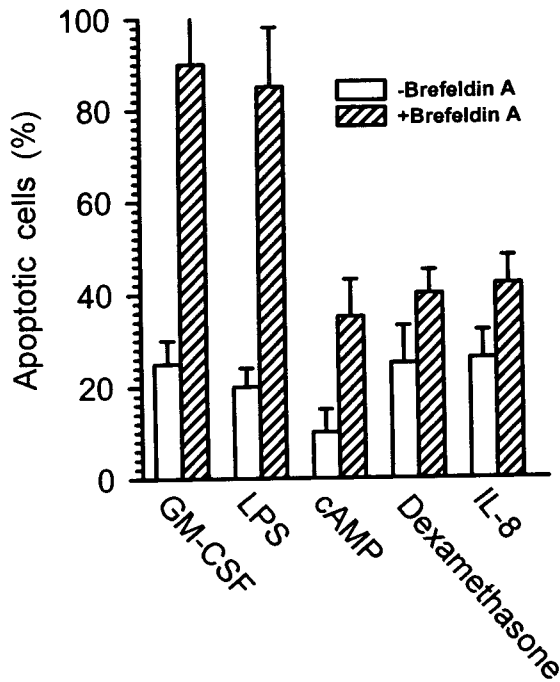


Fig. 3. Effect of BFA on the delay of neutrophil apoptosis. Neutrophils were pretreated with or without 10  $\mu$  M of BFA for 1 hr and further incubated for 20 hr in the presence of 1  $\mu$ g/ml GM-CSF, 1  $\mu$ g/ml LPS, 300  $\mu$ M db-cAMP, 5  $\mu$ M dexamethasone, or 100 ng/ml IL-8. Data are reported as the percentage of cells showing morphologic features of apoptosis. Results represent means  $\pm$ SD.

그러나 BFA를 농도별로 증가시켜 유도된 세포사멸은 10  $\mu$ M의 rottlerin에 의하여 영향을 받지 않았다. 또한, zDEVD-fmk를 200  $\mu$ M의 농도로 BFA와 처리하여 PI 염색으로 세포사멸 정도를 관찰하였을 때도 BFA에 의한 세포사멸은 억제되지 않았다(Fig. 5). 이들 두 결과는 BFA에 의한 세포사멸은 caspase-3를 통한 PKC- $\delta$ 의 활성화에 의한 세포사멸과는 관계가 없다는 것을 제시하고 있다.

#### Mcl-1의 발현에 대한 BFA의 영향

호중구에서 발현되는 세포사멸 억제단백질인 Mcl-1의 발현이 BFA에 의하여 영향을 받는가를 보기 위하여 10  $\mu$ M의 BFA가 들어 있는 배양액에서 세포를 20시간 처리한 다음 Mcl-1에 대한 항체를 이용하여 western blot을 시행하였다(Fig. 6). Mcl-1의 단백질 양은 배양 20시간에서

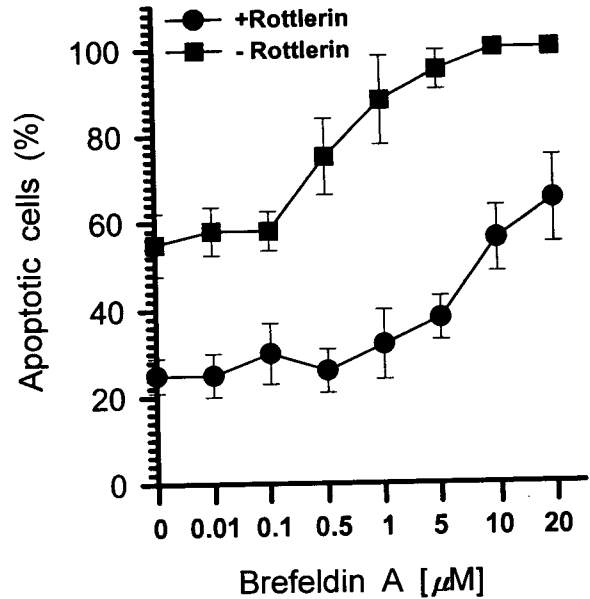


Fig. 4. Effect of BFA on the delay of apoptosis by rottlerin. Neutrophils were preincubated with 10  $\mu$ M of BFA for 1 hr and further incubated for 20 hr in the presence or in the absence of 1  $\mu$ M of rottlerin. Results represent means  $\pm$ SD.

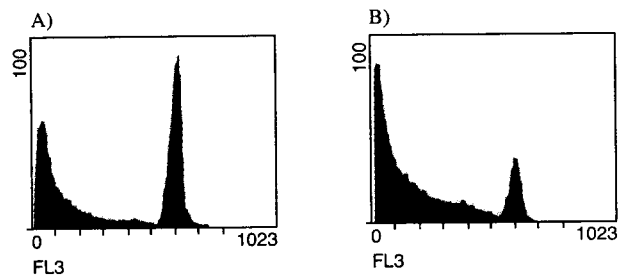


Fig. 5. Effect of caspase-3 inhibitor on the BFA-induced apoptosis of neutrophils. Neutrophils were preincubated with 200  $\mu$ M zDEVD-fmk for 1 hr and further incubated with (B) or without (A) BFA. Cell death was assessed by PI dye staining.

현저히 감소하였으나 LPS나 db-cAMP를 처리하였을 때 감소되는 양이 줄었다. Mcl-1의 단백질 양은 BFA의 단독 처리에 의하여 감소되었을 뿐만 아니라 LPS나 db-cAMP에 의하여 증가되는 것도 억제되었다. 이들 결과는 세포사멸을 억제시키는 Mcl-1의 발현되는 단백질 양의 변화에 의하여 BFA의 효과가 나타난다는 것을 제시하고 있다.

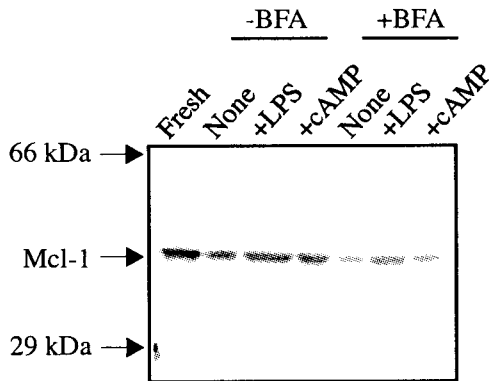


Fig. 6. Effect of BFA on Mcl-1 expression. Neutrophils were incubated with media alone (none), or media containing 1  $\mu$ g/ml LPS(+LPS) or 300  $\mu$ M db-cAMP (+cAMP) in the presence (+BFA) or in the absence (-BFA) of 10  $\mu$ M of BFA for 20 hr. Freshly isolated neutrophils (Fresh) were used as a control.

### 고 찰

본 연구는 단백질 분비의 억제제인 BFA가 자극을 받지 않은 상태에서나 세포사멸을 억제시키는 상태에서 호중구의 세포사멸을 유도한다는 것을 보였다. BFA는 골지체에서 저분자 GTP결합 단백질인 ARF-1의 guanine핵산의 치환능을 억제하는 물질인데 호중구에서 ARF-1은 세포질 분획에 존재하는 것이 증명되었다[15]. 본 연구의 결과는 낭포의 이동이 BFA에 의하여 억제되는 경우와 단백질의 분비 과정이 손상을 받는 경우, 이들에 의하여 호중구의 세포사멸이 영향을 받을 수 있을 가능성을 제시하였다.

호중구의 세포사멸은 염증성 매개물질을 포함한 여러 인자들에 의하여 조절 받는다[1,28]. 그러나 아직 어떠한 기작에 의하여 이들 물질이 호중구의 생존 기간에 영향을 주는가는 밝혀져 있지 않다. LPS, GM-CSF, IL-8, dexamethasone 및 db-cAMP 등은 호중구의 세포사멸을 지연시켰다(Fig. 3). BFA는 LPS나 GM-CSF에 의한 호중구 세포사멸의 지연을 억제하였으나 이들 물질들 중에서 db-cAMP에 의한 세포사멸은 BFA에 영향을 적게 받았다. 이들 결과는 단백질 이동을 억제함으로써 세포사멸이 증가한다는 것을 보여주고 있으며 다른 자극제에 의한 세포사멸은 다른 경로에 의하여 조절을 받고 있다는 것을 암시하고 있다. 어떤 일정한 조건에서 호중구는 세포사멸을 억제한다

고 알려진 GM-CSF나 IL-8 등을 생성하고 분비한다[18]. 따라서, BFA가 이들 사이토카인의 분비를 억제하여 세포사멸에 영향을 줄 가능성이 있다고 추측할 수 있다. 그러나 본 연구에서 이들 사이토카인들을 첨가하였을 때 BFA에 의한 세포사멸 유도는 억제되지 못하였다.

BFA에 의한 세포사멸의 기작에 대한 연구에서 Jurkat T-세포를 BFA로 처리하였을 때 caspase-3의 활성증가가 관련이 있을 것이라고 제안되었다[6]. 본 연구에서도 BFA를 처리한 호중구는 세포사멸의 증가과정에서 PI 염색이나 DNA 전기영동에서 DNA 조각이 증가함을 보임으로써 BFA에 의하여 endonuclease가 활성화된다는 것을 알 수 있다. 그러나, caspase-3의 억제제는 BFA에 의한 호중구의 형태 변화, annexin V의 결합양상, DNA 조각의 증가 등에 대하여 영향을 미치지 못하였다. 활성화된 호중구에서는 caspase와는 다른 endonuclease 활성이 있음이 보고된 것과 위의 결과는 비교될 수 있다[5]. 또한, 단백질 분해효소의 억제제인 3,4-dichloroisocoumarin이나 N-1-tosylamide-demethyl-chloromethyl ketone이 HL-60 세포에서 BFA에 의한 DNA의 절단을 억제한다고 하였는데 이는 BFA에 의한 DNA의 절단은 단백질 분해 효소에 의하여도 영향을 받을 수 있음을 보여주고 있다[25]. Pongracs 등은 caspase-3에 의한 PKC- $\delta$ 의 활성화가 호중구의 세포사멸에 중요하다고 하였다[21]. 그러나 본 연구에서는 BFA에 의한 세포사멸은 PKC- $\delta$ 에 대한 특이적인 억제제인 rottlerin에 의하여 영향을 받지 않았다. 이러한 결과로써 우리는 BFA에 의한 세포사멸은 caspase-3를 통하지 않는 단백질 분해효소에 의하여 일어난다는 것을 추측할 수 있으나 아직 어떠한 인자에 의한 것인지는 밝히지 못하였다. 최근, 소포체에 대한 BFA의 장기간 처리에 의하여 세포사멸이 일어난다는 것은 caspase-7을 통한 caspase-12의 활성 때문이라고 보고된 바 있다[22]. 세포사멸 동안 일어나는 미토콘드리아의 transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ ), 세포질에서 미토콘드리아로의 Bax의 전이, cytochrome c의 분비 및 미토콘드리아에서 apoptosis inducing factor (AIF)의 분비와 같은 미토콘드리아에서의 변화는 caspase의 억제제에 의하여 영향을 받지 않기 때문에 미토콘드리아가 caspase-의존형과 caspase-비의존형의 세포사멸의 교차물질로서 역할을 할 것이라고 가정할 수 있다[2]. BFA가 미토콘드리아에 직접적으로 변화를 일으켜서 세포사멸을 유도하는

가를 알기 위하여 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

단백질들을 새로이 합성하는 것은 세포사멸을 억제하거나 유도하는데 중요하다. 세포사멸 억제 단백질의 발현을 조절함으로써 세포사멸은 조절을 받게 되는데 Bcl-2의 과발현이 있으면 BFA에 의한 세포사멸은 방지된다고 하였다[6]. 그러나 호중구에서는 Bcl-2의 발현은 측정되지 않고 그와 같은 종류에 속하는 Mcl-1은 발현되어 있다. Mcl-1은 반감기가 3시간 정도로 매우 짧는데 이는 이 단백질에 PEST 서열이 있기 때문이다[12]. 따라서, Mcl-1은 완전히 분화된 세포에서 짧은 생존기간의 연장에 관여하며 Bcl-2는 미성숙 세포 단계에서 주로 발현됨을 알 수 있다[13]. 호중구에서 Mcl-1은 세포 핵분획에 주로 존재하며 세포사멸이 일어나는 경우 단백질의 양이 감소하나 GM-CSF나 LPS의 처리에 의하여 증가한다[3,16]. 따라서, Mcl-1은 호중구에서 주요 세포사멸 억제단백질로서 작용하며 그 발현의 증가에 의하여 세포사멸이 지연될 것으로 추측된다. 본 연구에서는 단백질 이동을 억제하는 약물인 BFA가 Mcl-1의 세포 내 양을 감소시킨다는 것을 밝혔다. 이러한 결과는 BFA에 의한 작용은 Mcl-1의 생성이나 분해에 영향을 미쳐서 세포사멸을 유도할 것이라고 추측된다. 한편, 또 다른 세포사멸 억제단백질인 A1의 mRNA가 호중구에서 발현되고 LPS나 GM-CSF에 의하여 그 발현이 증가된다고 알려져 있으나[3], 현재까지 시판되고 있는 A1에 대한 항체를 이용하여 실험하였을 때 이들 세포에서 A1의 단백질 발현을 western blot으로 측정하지는 못하였다. BFA는 sphingomyelin을 가수분해하여 ceramide를 생성하는데 이 물질에 의하여 세포사멸이 증가되므로 BFA에 의한 세포사멸에 이 기작이 관여할 가능성도 있다[17]. ARF-1은 호중구의 PLD활성을 증가시킨다고 알려져 있는데 PLD활성을 억제하는 n-butanol을 처리하였을 때 호중구의 세포사멸은 증가하였다[15,20]. BFA가 ARF의 활성을 억제하므로 ARF에 의한 PLD 활성이 억제되어 세포사멸이 촉진될 가능성이 있는데 이를 규명하기 위한 실험이 앞으로 필요할 것이다.

## 요 약

호중구의 세포사멸은 자연적으로 일어나지만 여러 자극에 의한 신호에 의하여 증가하거나 지연된다. 본 연구

에서는 세포 내 단백질 분비과정을 억제한다고 알려진 BFA가 호중구의 자연 세포사멸 및 세포사멸 지연에 어떠한 기작으로 작용하는가를 연구하였다. 호중구의 세포사멸은 사람 말초 혈액으로부터 분리하여 세포 배양 20시간 후 형태 변화, annexin V and propidium iodide의 염색, 및 DNA 전기영동 등으로 조사하였다. BFA는 농도 의존적으로 호중구의 세포사멸을 증가시켰다. GM-CSF나 LPS에 의한 세포사멸의 지연도 BFA에 의하여 억제되었다. 그러나 BFA의 영향은 db-cAMP, dexamethasone, 및 IL-8을 처리한 세포에서는 큰 영향을 받지 않았다. PKC- $\delta$ 의 억제제인 rottlerin에 의한 세포사멸의 지연은 BFA에 의하여 감소하였다. 그러나 BFA에 의한 세포사멸의 유도는 caspase-3 억제제인 zDEVD-fmk에 의하여는 영향을 받지 않았다. 한편, 세포사멸 억제에 관여하는 Mcl-1 단백질의 발현은 BFA의 처리에 의하여 감소하였다. 이들 결과들은 세포 내 단백질 분비 과정의 억제가 호중구의 세포사멸에 관여하며 이들의 작용은 Mcl-1 발현의 조절에 의한다는 것을 제시하고 있다.

## 참 고 문 헌

1. Akgul, C., D. A. Moulding and S. W. Edwards. 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* **487**, 318-322.
2. Bidere, N. and A. Senik. 2001. Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes. *Apoptosis* **6**, 371-375.
3. Chuang, P. I., E. Yee, A. Karsan, R. K. Winn and J. M. Harlan. 1998. A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 361-365.
4. Donaldson, J. G., D. Finazzi and R. D. Klausner. 1992. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**, 350-352.
5. Fadeel, B., A. Ahlin, J. I. Henter, S. Orrenius and M. B. Hampton. 1998. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood* **92**, 4808-4818.
6. Guo, H., T. V. Tittle, H. Allen and R. T. Maziarz. 1998. Brefeldin A-mediated apoptosis requires the activation of caspases and is inhibited by Bcl-2. *Exp.*

- Cell Res.* **245**, 57-68.
7. Haslett, C. 1992. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin. Sci. (Colch)* **83**, 639-648.
  8. Helms, J. B. and J. E. Rothman. 1992. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 352-354.
  9. Iwai, K., T. Miyawaki, T. Takizawa, A. Konno, K. Ohta, A. Yachie, H. Seki and N. Taniguchi. 1994. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* **84**, 1201-1208.
  10. Khwaja, A. and L. Tatton. 1999. Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase C  $\delta$  plays a central role in neutrophil apoptosis. *Blood* **94**, 291-301.
  11. Klausner, R. D., J. G. Donaldson and J. Lippincott-Schwartz. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* **116**, 1071-1080.
  12. Kozopas, K. M., T. Yang, H. L. Buchan, P. Zhou and R. W. Craig. 1993. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3516-3520.
  13. Krajewski, S., S. Bodrug, M. Krajewska, A. Shabaik, R. Gascoyne, K. Berean and J. C. Reed. 1995. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am. J. Pathol.* **146**, 1309-1319.
  14. Kwak, J. Y., S. W. Park, K. H. Kim, Y. J. Na and K. S. Lee. 2002. Modulation of neutrophil apoptosis by plasma and peritoneal fluid from patients with advanced endometriosis. *Hum. Reprod.* **17**, 595-600.
  15. Lambeth, J. D., J. Y. Kwak, E. Bowman, D. Perry, D. Uhlinger and I. Lopez. 1995. ADP-ribosylation factor functions synergistically with a 50-kDa cytosolic factor in cell-free activation of human neutrophil phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **270**, 2431-2434.
  16. Leuenroth, S. J., P. S. Grutkoski, A. Ayala and H. H. Simms. 2000. The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 158-166.
  17. Linardic, C. M., S. Jayadev and Y. A. Hannun. 1996. Activation of the sphingomyelin cycle by brefeldin A: effects of brefeldin A on differentiation and implications for a role for ceramide in regulation of protein trafficking. *Cell Growth Differ.* **7**, 765-774.
  18. Lloyd, A. R. and J. J. Oppenheim. 1992. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol. Today* **13**, 169-172.
  19. Moulding, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart and S. W. Edwards. 1998. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* **92**, 2495-2502.
  20. Park, M. A., M. J. Lee, S. H. Lee, D. K. Jung and J. Y. Kwak. 2002. Anti-apoptotic role of phospholipase D in spontaneous and delayed apoptosis of human neutrophils. *FEBS Lett.* **519**, 45-49.
  21. Pongracs, J., P. Webb, K. Wang, E. Deacon, O. J. Lunn and J. M. Lord. 1999. Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C- $\delta$ . *J. Biol. Chem.* **274**, 37329-37334.
  22. Rao, R. V., E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L. M. Ellerby, H. M. Ellerby and D. E. Bredesen. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 33869-33874.
  23. Savill, J. 1992. Macrophage recognition of senescent neutrophils. *Clin. Sci. (Colch)* **83**, 649-655.
  24. Savill, J. and C. Haslett. 1995. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin. Cell Biol.* **6**, 385-393.
  25. Shao, R. G., T. Shimizu and Y. Pommier. 1996. Brefeldin A is a potent inducer of apoptosis in human cancer cells independently of p53. *Exp. Cell Res.* **227**, 190-196.
  26. Squier, M. K., A. J. Sehnert and J. J. Cohen. 1995. Apoptosis in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **57**, 2-10.
  27. Wallen, E., R. G. Sellers and D. M. Peehl. 2000. Brefeldin A induces p53-independent apoptosis in primary cultures of human prostatic cancer cells. *J. Urol.* **164**, 836-841.
  28. Ward, C., I. Dransfield, E. R. Chilvers, I. Haslett and A. G. Rossi. 1999. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 503-509.

(Received June 7, 2002; Accepted July 16, 2002)