

## 진균독소 Gliotoxin-유도성 산화적 손상에 의한 Apoptosis

장해란<sup>1</sup> · 김영희<sup>1</sup> · 김남송<sup>2</sup> · 원진숙<sup>3</sup> · 조정환<sup>1</sup> · 윤재도<sup>1</sup> · 임창인<sup>1</sup> · 김호찬<sup>1</sup> · 최익준<sup>1</sup> · 신재훈<sup>1</sup> · 박래길<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>원광대학교 의과대학 미생물학교실 및 <sup>2</sup>예방의학교실,  
<sup>3</sup>전북대학교 의과대학 생화학교실

### Gliotoxin-Induced Oxidative Stress Mediates the Apoptotic Death in Human Leukemic HL-60 cells

Hay-Ran Jang<sup>1</sup>, Young-Hee Kim<sup>1</sup>, Nam-Song Kim<sup>2</sup>, Jean-Sook Won<sup>3</sup>, Jeong-Hwan Cho<sup>1</sup>, Jae-Do Yun<sup>1</sup>,  
Chang-In Lim<sup>1</sup>, Ho-Chan Kim<sup>1</sup>, Ik-Jun Choi<sup>1</sup>, Jae-Hoon Shin<sup>1</sup> and Raekil Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Wonkwang University School of medicine &

<sup>2</sup>Preventive Medicine, Wonkwang University School of Medicine Iksan, Chonbuk 570-749, Korea

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Chonbuk University School of Medicine Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea  
(Received May 4, 2002)

(Accepted August 12, 2002)

**ABSTRACT :** Fungal metabolite, gliotoxin is an epipolythiodioxopiperazin (ETP) class and has various roles including immunomodulatory and apoptotic effects. This study was designed to evaluate the mechanism by which gliotoxin exerts the apoptosis on human promyelocytic leukemic HL-60 cells. Herein, we demonstrated that the gliotoxin decreased the cell viability in a time-dependent manner. Gliotoxin-induced cell death was confirmed as apoptosis characterized by chromatin condensation and ladder-pattern fragmentation of genomic DNA. Gliotoxin increased the catalytic activities of caspase-3 and caspase-9. Activation of caspase-3 was further confirmed by degradation of procaspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) by gliotoxin in HL-60 cells. Furthermore, gliotoxin induced the changes of mitochondrial transmembrane potential (MTP). Antioxidants, including GSH and NAC, markedly inhibited apoptosis with consistent suppression of enzymatic activity of caspase-3, caspase-9, and MTP loss in gliotoxin-treated cells. Taken together, we suggest that gliotoxin functions as an oxidant and plays proapoptotic roles in HL-60 cells via activation of intrinsic caspase cascades as well as mitochondrial dysfunction.

**Key Words :** Gliotoxin, Apoptosis, Antioxidants, HL-60

## I. 서 론

진균의 대사산물인 gliotoxin은 epipolythiodioxopiperazine (ETP) ring을 가지는 화합물의 하나로 잘 알려져 있다 (Taylor, 1971). ETP class는 공통적으로 bridged disulfide piperazinedione six-membered ring의 구조를 가지는데, 이러한 구조적 특성 때문에 gliotoxin은 강력한 항미생물 기능, 면역 조절 기능, 그리고 세포독성 같은 다양한 생리적 효과를 나타낸다 (Trown 등, 1972). 진균 중에서 *Penicillium*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, 및 *Thermoascus* 등이 gliotoxin을 생성한다고 알려져 있다 (Johnson 등, 1943; Richard 등, 1994; Waring 등, 1987). ETP class 화합물은

직접 또는 간접적으로 진균 감염에 의한 질병과 관계가 있으며 *Aspergillus fumigatus*에 의해서 생성되는 gliotoxin은 aspergillosis를 유발시키는 것으로 보고되어 있다 (Bodley 등, 1992).

Gliotoxin의 생체내 독성작용에 대한 정확한 기전은 분명하지 않으나 활성산소의 생성 그리고 이 gliotoxin의 dithiol 구조가 세포내의 free thiol group과 반응하여 disulfide를 형성하여 다른 단백질의 기능을 변화시킬 가능성이 제시되고 있다 (Eichner 등, 1988; Suen 등, 2001; Zhou 등, 2000). 최근의 연구는 gliotoxin에 의한 세포독성이 세포고사(apoptosis) 기전에 의한다는 실험적 근거가 탐식세포, T 세포, B 세포, 및 흉선세포에서 보고되어 있다 (Beaver 등, 1994; Park 등, 1998, 1999; Waring 등, 1988, 1990a, b).

\*To whom correspondence should be addressed

본 연구실에서는 gliotoxin은 사람 백혈병 세포주 HL-60의 세포고사를 초래하였으며 전형적인 caspase의 활성화와 형태학적 변화를 매개함을 보고한 바 있다(Park 등, 1998, 1999). 세포고사 현상은 빠른 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상(blebbing), 세포질내의 칼슘 농도의 증가, 염색체(chromatin)의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성을 동반한다(Choi, 1998). 최근의 보고에 의하면 미토콘드리아는 세포고사의 초기반응인 미토콘드리아의 막전위차의 변화를 초래함으로써 세포고사를 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다. 또한 미토콘드리아는 cytochrome c의 방출에 의해서 caspase의 활성화를 조절한다고 알려져 있다. 미토콘드리아에서 세포질로 방출되어지는 cytochrome c는 apoptotic protease activating factor-1(Apaf-1), deoxyadenosine triphosphate(dATP)와 결합하며, 이 복합체는 다시 procaspase-9와 결합하여 이 효소를 활성화 시킨 후 하부의 caspase-3를 활성화시켜 세포고사 현상을 유도한다(Budihardjo 등, 1999; Desagher 등, 2000; Green 등, 1998; Susin 등, 1999).

최근 gliotoxin에 의한 세포고사 기전에 관한 다양한 보고가 있으나 미토콘드리아를 경유하는 세포고사 기전에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 또한 gliotoxin에 의한 세포고사가 생체 또는 세포내로 유입된 gliotoxin이 생성하는 활성산소물질이 세포내에서 DNA 손상이나 비정상적인 신호전달을 유발시키는 것은 잘 알려져 있지만(Braithwaite 등, 1987; Shah 등, 1995; Suen 등, 2001; Zhou 등, 2000) 이에 관한 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. 따라서 이 연구에서는 gliotoxin에 의한 HL-60 백혈구 암세포의 죽음에서 caspase family 단백질 및 미토콘드리아의 막전위차 등을 조사하여 gliotoxin에 의한 세포고사 기전과 gliotoxin에 의해서 생성된 활성산소의 역할을 규명하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 세포주

HL-60 세포는 사람 백혈구 세포주로서 한국 세포주은행(KNCC, 서울대학교)에서 분양받아 계대배양하면서 실험을 실시하였다.

#### 2) 시약 및 기기

RPMI 1640, 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), 항

생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, U.S.A.)로부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. Gliotoxin, methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT), Hoechst 33342, propidium iodide(PI), biconchonic acid(BCA), reduced glutathione(GSH), N-acetyl-L-cysteine(NAC), sodium dodesyl sulfate(SDS), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, U.S.A.)로부터 구입하였고, JC-1은 Molecular probes사(Eugene, OR, U.S.A.)로부터 구입하였다. Genomic DNA isolation kit는 Promega사(Madison, WI, U.S.A.)로부터 구입하였다. Caspase-3의 기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin(AMC)와 caspase-9의 기질인 Ac-LEHD-7-amino-4-trifluorometer(AFC)는 Calbiochem사(San Diego, CA, U.S.A.)로부터 구입하였으며, caspase-3, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)에 대한 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, U.S.A.)로부터 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) HL-60 세포주 배양 및 시약처리

HL-60는 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지로 배양하였다. 24시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하며, mid-log phase에 있는 세포에 gliotoxin을 처리한 뒤 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다. Gliotoxin은 1 mg/ml씩 에탄올에 녹여 -70°C에 보관하였고, 사용시 RPMI 1640 배지에 희석해서 사용하였다.

#### 2) 세포 활성도 측정

세포 활성도는 MTT assay를 이용하였다. 세포 배양판(96-well plate)에 세포( $1 \times 10^5$  세포수/ml)를 100  $\mu$ l/well씩 분주하여 3시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포 배양기안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음, MTT 용액(5 mg/ml, PBS)을 배양액 부피의 1/10되게 첨가하였다. 4시간 후 10% SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액을 100  $\mu$ l/well 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 96 well용 분광광도계(THERMO max, U.S.A.)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 활성도는 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

#### 3) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 조사하기 위해 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA kit을 이용하였다. DNA 5 g을

1.5% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등으로 DNA 분절을 관찰하였다.

#### 4) Hoechst 염색

Gliotoxin으로 처리된 세포를 포집하여 냉 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)로 세척하고 cytospin(Shandon Southern Products Ltd., England)으로 600 rpm, 3분 회전 분사하여 slide glass에 부착시켰다. Slide glass에 부착된 세포는 4% formaldehyde 용액에서 고정시키고 PBS로 세척하여 10  $\mu$ M Hoechst 33342로 10분 염색한 후 다시 PBS에서 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

#### 5) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

HL-60 세포( $1 \times 10^6$ )는 냉 파쇄완충용액(1% Triton X-100, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.32 M sucrose, 5 mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 2 mM dithiothreitol(DTT), 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin)으로 15분 파쇄하고 13,000 rpm으로 15분 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액은 BCA kit를 이용하여 단백질을 정량한 후 동량(100  $\mu$ g)의 세포 파쇄액을 분석 완충용액(100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 2 mM DTT, 0.1% Chaps, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin)으로 희석한 형광기질과 37°C에서 30분 반응시켰다. Caspase-3의 활성측정은 fluorogenic substrate인 50  $\mu$ M Ac-DEVD-AMC를 사용하였으며, 이 기질의 proteolytic cleavage에 의하여 생성된 형광값의 차이를 형광분광 광도계(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 380/460 nm(excitation/emission)를 사용하였다. Caspase-9 효소적 활성은 기질로 50  $\mu$ M Ac-LEHD-AFC를 사용하였으며 이때의 파장은 400/505 nm를 사용하였다.

#### 6) Western blotting

배양된 HL-60 세포는 gliotoxin을 일정 시간 처리한 후 세포를 포집하여, 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin)으로 얼음 속에서 30분 반응시켰다. 세포 파쇄액(200  $\mu$ g)은 2 $\times$  sample buffer와 혼합하여 100°C에서 3분 가열하여 단백질의 변성을 유도하였으며 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane으로 이동시키고(0.8 mA/cm<sup>2</sup>), blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응시켰다. Caspase-3 및

PARP에 대한 항체는 0.05%(v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered saline(TBS-T)에 1 : 1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰으며, PARP는 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase(HRP)를 상온에서 1시간 반응시키고, caspase-3에 대한 이차항체는 TBS-T로 1 : 3,000으로 희석된 anti-mouse IgG conjugated HRP 항체를 상온에서 1시간 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence(ECL) kit(Amersham, England)를 이용하여 필름에 노출시켜 현상하였다.

#### 7) 미토콘드리아 막전위 측정

세포내 소기관의 하나인 미토콘드리아의 막전위(transmembrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 JC-1 염색을 시행하였다. 세포는 PBS로 2회 세척하여 10  $\mu$ g/ml JC-1을 각각 RPMI 배지에 희석하여 20분, CO<sub>2</sub> 배양기에 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하고 cytospin으로 600 rpm, 3분 회전 분사하여 slide glass에 부착시켰다. Slide glass에 부착된 세포는 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다(Bradbury 등, 2000; Facompre 등, 2000; Salvioli 등, 2000).

#### 8) Flow cytometry 분석

세포고사 현상을 조사하기 위해서 propidium iodide(PI)로 세포를 반응시켜 염색한 후 FACS Vantage flow cytometry로 형광의 세기를 측정하였다. Gliotoxin을 처리한 세포는 70% ethanol로 4°C에서 4시간 동안 고정시킨 후 phosphate-citrate buffer(0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M citrate)와 실온에서 30분 반응시켰다. 그리고 RNase A(0.1 mg/ml)와 37°C에서 30분 반응시킨 후 세포는 propidium iodide(PI, 50  $\mu$ g/ml)와 37°C 암실에서 반응시켰다. FACS Vantage flow cytometry를 이용하여 형광의 세기를 측정하였으며 그 정보의 분석은 Cell Quest software(Becton Dickinson)를 이용하였다.

#### 9) 결과 산출 방법

표시된 결과는 4번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균과 표준편차를 산출하여 통계적 유의성을 검증하였다.

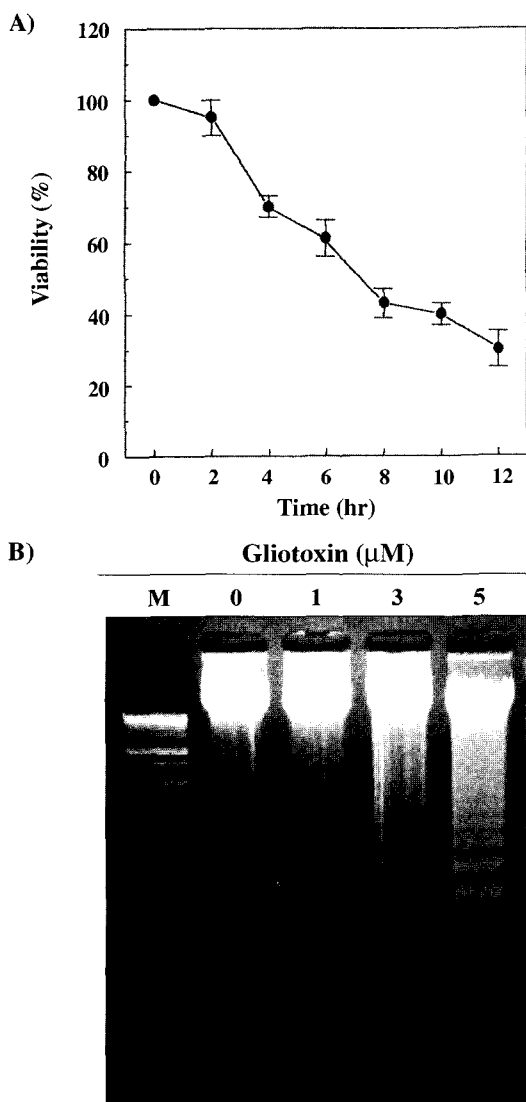
### III. 결 과

#### 1. Gliotoxin이 HL-60 세포의 생존율에 미치는 영향

Gliotoxin의 HL-60 세포 생존율에 대한 영향을 조사하기 위하여 gliotoxin 처리 후 세포 활성도를 MTT 방법으로 측정하였다. Gliotoxin(5  $\mu$ M) 처리 후 HL-60 세포의 생존율을 시간별로 조사한 결과 gliotoxin 처리 3시간 이

후에 현저한 감소(30%)가 시작되어 6시간 경과 후 40%의 생존율을 나타냈으며, 점차 시간 의존적인 생존율 감소가 관찰되었다(Fig. 1A).

Gliotoxin에 의한 세포죽음이 세포고사 이전에 의하여 매개될 가능성이 제시되었기에(Gong 등, 1994; Park 등, 1998, 1999; Waring, 1990a), 세포고사 현상의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 HL-60 세포의 DNA 분절을 핵산의 agarose gel electrophoresis 방법으로 확인하였다. Gliotoxin으로 처리한 HL-60 세포에서 분리한 genomic

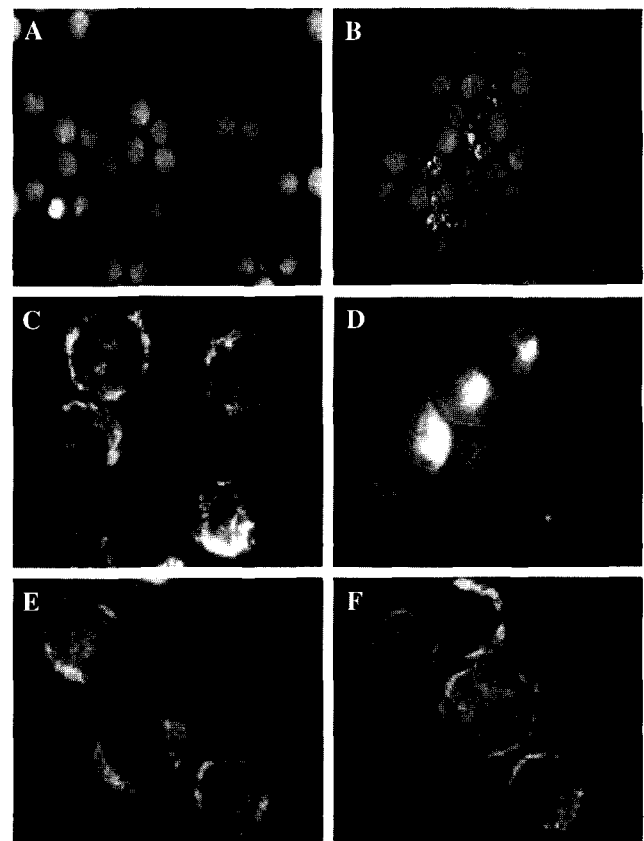


**Fig. 1.** Time-dependent cytotoxic effect of gliotoxin and gliotoxin-induced DNA fragmentation in HL-60 cells. A, Cells were treated with 5  $\mu\text{M}$  gliotoxin for various times and then, cells viability was measured by MTT assay. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation (S.D.) of quadruplicates. B, Cells were treated with various concentrations of gliotoxin (1, 3, and 5  $\mu\text{M}$ ) for 6 hr and DNA fragmentation was determined by 1.5% agarose-gel electrophoresis. Extracted DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

DNA는 1.5% agarose gel에 전기영동한 결과 gliotoxin (3  $\mu\text{M}$ )을 6시간 처리하였을 때 세포고사의 전형적인 특징인 사다리 모양의 DNA 분절(ladder-pattern fragmentation)이 관찰되었고 5  $\mu\text{M}$  gliotoxin 처리군에서는 더욱 현저한 사다리 모양의 분절이 형성되었다(Fig. 1B). 이상의 결과는 gliotoxin이 암세포주 HL-60의 생존율을 저하시키며, 이러한 gliotoxin에 의한 HL-60 세포 독성은 세포고사 이전에 의하여 매개됨을 관찰할 수 있었다.

## 2. Gliotoxin이 세포의 형태학적 변화와 미토콘드리아의 막전위차 변화에 미치는 영향

Gliotoxin에 의한 세포고사 현상의 형태학적 특징을 확



**Fig. 2.** Chromatin fragmentation and mitochondrial membrane potential transition (MPT) of gliotoxin treated HL-60 cells. Cells were treated with 5  $\mu\text{M}$  gliotoxin for 6 hr, stained with Hoechst dye 33342 and observed by fluorescence microscope. (A) control cells, (B) HL-60 cells treated with 5  $\mu\text{M}$  gliotoxin. Antioxidants, including 5 mM GSH and 5 mM NAC, were preincubated for 1 hr and followed by the addition of 5  $\mu\text{M}$  gliotoxin for 5 hr in HL-60 cells. Gliotoxin-treated cells were stained with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of JC-1 (10  $\times$  40) and visualized under a fluorescent microscope. The data were one of three independent experiments. (C) control cells, (D) gliotoxin-treated HL-60 cells, (E) pretreatment of GSH with gliotoxin, (F) pretreatment of NAC with gliotoxin.

인하기 위하여 HL-60 세포의 DNA 분절을 Hoechst 염색으로 확인하였다. 5  $\mu$ M gliotoxin을 6시간 처리 후 HL-60 세포를 Hoechst 염색 후 형광 현미경을 이용한 검사에서 대조군 HL-60 세포핵은 타원형의 온전한 형태의 균질한 형광 염색을 나타냈다. 그러나 gliotoxin 처리군은 핵이 여러 조각으로 분절된 형광 절편을 나타냈다(Fig. 2A, B).

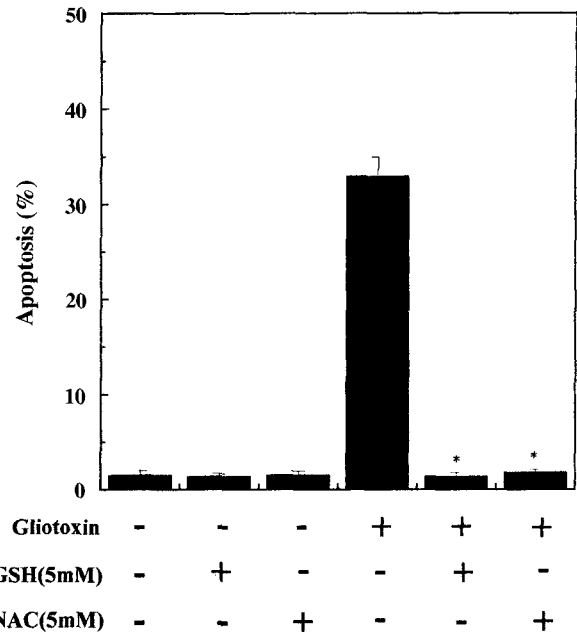
Gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사에서 미토콘드리아의 막전위차 변화를 확인하기 위하여 JC-1 형광염색을 시행하였다. HL-60 세포는 gliotoxin(5  $\mu$ M)으로 3시간 처리후 JC-1으로 염색하여 형광현미경하에서 관찰하였다. 그 결과 HL-60 세포의 형태학적인 변화와 함께 정상 대조군의 오렌지 형광이 세포질에서 점상(punctate) 형태로 분포하다가 gliotoxin 처리에 의하여 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미만성(diffuse)으로 산재하는 녹색 형광을 나타냈다(Fig. 2C, D).

최근, gliotoxin에 의한 세포고사가 활성산소에 의해서 매개된다는 많은 연구결과가 제시되고 있다(Braithwaite 등, 1987; Suen 등, 2001; Shah 등, 1995; Zhou 등, 2000). 항산화제의 처리가 미토콘드리아의 막 전위차 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 gliotoxin과 함께 항산화제인 GSH 및 NAC로 처리하여 위와 같은 방법으로 조사하였다. 항산화제와 gliotoxin과의 병용처리는 대조군과 유사한 오렌지 형광으로 회복되었으며 미토콘드리아의 염색도 점상 형태로 관찰되었다(Fig. 2E, F)

이상의 결과에서 gliotoxin은 HL-60 세포에서 세포고사의 중요한 특징 중 하나인 형태학적인 변화와 함께 미토콘드리아의 막전위 변화를 포함한 미토콘드리아 기능 이상이 관찰되었다. 또한 항산화제는 이러한 미토콘드리아의 막전위차 변화를 예방하였다.

### 3. 항산화제 GSH와 NAC가 gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사에 미치는 영향

Gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사에서 미토콘드리아의 막전위차 변화가 항산화제에 의해서 억제되었기에 이러한 항산화제가 세포 생존율에도 영향을 미치는지를 조사하였다. 즉, gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사 현상이 활성산소에 의해서 매개되어질 가능성을 조사하기 위하여 gliotoxin과 함께 항산화제인 GSH 및 NAC로 처리하여 PI 염색 후 flow cytometry를 이용하여 세포고사 정도를 조사하였다(Fig. 3). GSH 및 NAC의 단독 처리는 HL-60 세포의 고사율에 유의한 변화를 초래하지 않았다. Gliotoxin(5  $\mu$ M)으로 5시간 처리한 HL-60 세포의 고사율은 34% 정도 증가하였으나 항산화제인 GSH와 NAC 처리가 gliotoxin에 의한 세포고사를 억제하여 HL-60의 생존율을 대조군과 유사한 수준을 나타냈다.



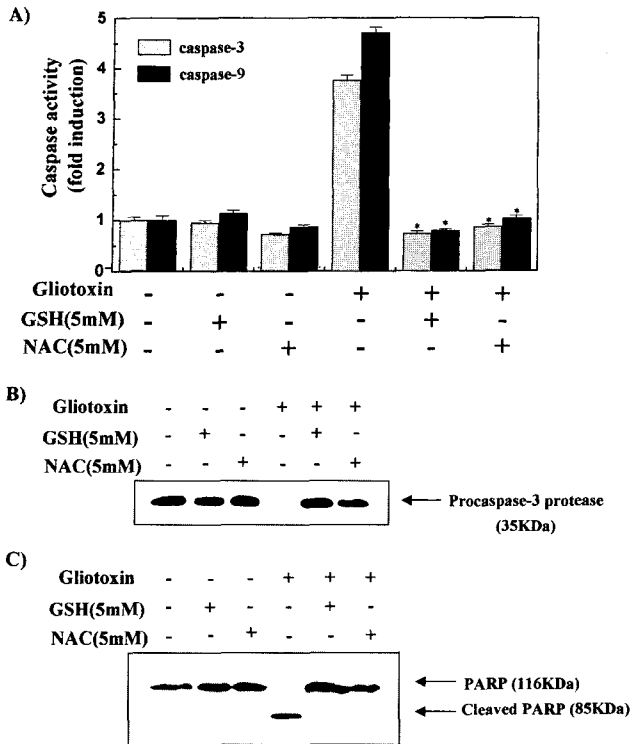
**Fig. 3.** Effect of antioxidants, GSH and NAC, on the gliotoxin-induced HL-60 cell death. Antioxidants, including 5 mM GSH and 5 mM NAC, were preincubated for 1 hr in HL-60 cells and followed by the addition of 5  $\mu$ M gliotoxin for 5 hr. After PI staining, apoptosis (%) was measured by flow cytometry. The data represent mean $\pm$ S.D. of quadruplicates. \* indicate significant difference at  $p < 0.001$  levels when compared with the control group.

이상의 결과에서 gliotoxin에 의한 HL-60 세포의 세포고사가 항산화제에 의하여 억제되었으며, 항산화제가 미토콘드리아의 막전위차 변화를 예방하여 gliotoxin에 의한 세포고사에 대한 방어효과를 나타냄을 의미하였다.

### 4. 항산화제가 gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사의 caspase 활성에 미치는 영향

세포고사의 특징적인 현상을 초래하는 세포내 신호전달 기전에서 caspase의 중요성은 이미 잘 알려져 있다(Klaus 등, 1998). 또한 gliotoxin에 의한 HL-60 세포의 고사 현상이 caspase의 활성화에 의한 것이라고 이미 보고된 바 있다(Park 등, 1998; Park 등, 1999). 항산화제에 의한 gliotoxin 유도성 HL-60 세포고사 현상의 억제 기전이 caspase protease 활성 조절을 통한 결과인지를 확인하기 위하여 caspase의 활성에서 항산화제에 의한 영향을 조사하였다. Gliotoxin(5  $\mu$ M)으로 5시간 처리한 HL-60 세포질에서 caspase-3 및 caspase-9의 효소적 활성을 이들 caspase의 substrate를 이용하여 조사하였다(Fig. 4A). HL-60 세포에서 gliotoxin에 의하여 증가된 caspase-3 및 caspase-9의 효소적 활성은 두 항산화제에 의하여 거의 대조군과 유사할 정도로 저하되어 나타났다. 항산화제의 caspase-3 활

IV. 고 찰



**Fig. 4.** Effect of antioxidants, GSH and NAC, on the activation of caspase-3 and -9 in glutoxin treated HL-60 cells. A, Antioxidants, including 5 mM GSH and 5 mM NAC, were preincubated for 1 hr and followed by the addition of 5 μM glutoxin for 4 hr in HL-60 cells. Cell lysate was used to measure the activity of caspase-3 and caspase-9 by using fluorogenic biosubstrates. The data represent mean±S.D. of quadruplicates. B, C, Antioxidants, including 5 mM GSH and 5 mM NAC, were preincubated for 1 hr and followed by the addition of 5 μM glutoxin for 5 hr in HL-60 cells. After cell lysis, the equal amount of protein was subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and immunoblotted with anti-caspase-3 (B) and anti-PARP antibodies (C). The immunoreactive signals were visualized by ECL. \* indicate significant difference at p<0.001 levels when compared with the control group.

성에 대한 세포내 전구체 및 기질에 대한 직접적인 영향을 procaspase-3와 PARP의 Western blot 방법을 통하여 조사하였다(Fig. 4B, C). HL-60 세포는 glutoxin(5 μM)으로 5시간 처리한 후, 파쇄하여 세포질내의 procaspase-3의 양적 변화를 측정하였다. 항산화제인 GSH와 NAC 등의 단독처리는 procaspase-3 단백질에 아무런 영향이 없었다. 그러나 glutoxin에 의하여 완전히 분해된 35 kDa의 procaspase-3가 항산화제 처리에 의하여 일부분 보호되었다. 또한, PARP 역시 항산화제가 glutoxin에 의한 116 kDa 분자량 단백질의 분해현상을 완전히 억제하는 것을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과는 항산화제의 glutoxin에 의한 세포고사에 대한 방어효과는 glutoxin에 의한 caspase-3 및 caspase-9의 효소적 활성화에 활성산소가 관여하고 있음을 시사하였다.

Glutoxin은 홍선세포, T 아세포, 탐식세포나 P815, WEHI 7과 같은 세포주에서 세포고사를 일으킨다고 보고된 바 있다(Waring 등, 1988, 1990a, b). 또한 glutoxin에 의한 인간 백혈병 세포주 HL-60 세포에서 세포고사 기전에 관한 연구가 보고된 바 있는데, 이러한 세포고사는 염증반응이나 포유동물의 세포고사 기전에 핵심적인 역할을 수행하는 효소인 caspase의 활성화, MAP kinase 중에서 세포고사의 신호전달을 담당하는 c-Jun N-terminal kinase(JNK1)의 활성화 그리고 염증반응에 관련된 유전자의 전사적 활성을 조절 하는 전사활성인자인 activating protein-1(AP-1) 및 nuclear factor-kB(NF-kB)의 불활성을 통해서 세포고사가 유도됨이 보고된 바 있다(Beg 등, 1996; Park 등, 1998; Reap 등, 1997; Van Antwerp 등, 1996; Wang 등, 1996).

위와 같이 glutoxin에 의한 세포고사 기전의 다양한 보고에도 불구하고 최근 세포고사 기전에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 미토콘드리아의 기능 변화에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없다. 또한 glutoxin에 의한 세포고사가 세포내에서 glutoxin이 생성하는 활성산소에 의한 산화적 손상에 의한 것이라는 보고는 많이 되어 있으나 그에 관한 구체적인 세포고사 기전은 밝혀진 바 없다.

이 연구 결과에서 glutoxin에 의한 인간 백혈병 세포주 HL-60의 세포고사 효과는 앞선 보고들의 결과와 일치하였다. 먼저 glutoxin을 세포에 처리했을 때 세포고사의 특징 중의 하나인 DNA ladder을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). Glutoxin의 농도가 높을수록 DNA ladder가 더 많이 관찰되었다(Fig. 1B). Hoechst staining을 이용하여 glutoxin이 세포고사의 형태학적 특징인 염색사의 응축과 핵 분절을 유도한다는 사실을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 또한, glutoxin에 의한 미토콘드리아의 막전위 변화를 관찰하기 위해서 glutoxin를 처리한 HL-60 세포에 JC-1을 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 정상 세포의 경우 미토콘드리아는 핵 주위로 분포되어 있으며, JC-1의 정상적인 색깔인 오렌지색을 띄고 있었으나 glutoxin를 처리한 세포군에서는 미토콘드리아가 핵 방향으로 많이 이동하여 존재하며 녹색으로 색깔이 전환되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2D). 즉 glutoxin에 의해서 미토콘드리아 막전위가 상실되었음을 알 수 있었다. Caspase 활성화도 앞선 보고들의 결과와 유사하게 glutoxin에 의해서 caspase 활성이 증가함을 관찰할 수 있었다. 특히 caspase-3, 및 caspase-9의 효소적 활성이 glutoxin에 의하여 증가하고 caspase-3의 세포내 기질의 하나인 PARP의 절단을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

또한, glutoxin에 의한 세포고사에 관한 많은 연구결과

에서 보고한 바처럼 본 연구 결과에서도 gliotoxin이 세포 내에서 생성하는 활성산소에 의한 세포고사 현상임을 확인할 수 있었다.

항산화제인 GSH와 NAC는 gliotoxin에 의해 감소된 HL-60세포의 생존율을 대조군 수준까지 회복시켰다(Fig. 3). 그리고 항산화제는 caspase-3 및 caspase-9의 효소적 활성과 caspase-3 활성에 의한 PARP 절단을 억제하였다(Fig. 4C). 또한 gliotoxin에 미토콘드리아 막전위의 상실도 항산화제에 의하여 억제되었다(Fig. 2E, F). 이상의 결과는 gliotoxin은 산화제로서 caspase protease의 활성화뿐만 아니라 미토콘드리아 기능변화를 통하여 HL-60 세포에서 세포고사를 유도했음을 알 수 있었다.

따라서 gliotoxin은 산화제로서 HL-60 세포에서 세포고사를 유도하였으며, gliotoxin에 의한 HL-60 세포의 세포고사는 caspase 활성화 및 미토콘드리아를 경유하는 신호 전달기전이 매개되었음을 알 수 있었다.

세포고사를 조절하는 중요한 역할을 담당하고 있는 미토콘드리아에 대한 최근의 보고에 의하면 미토콘드리아에서 세포질로 방출되어지는 cytochrome c와 같은 caspase activators, 미토콘드리아 막전위차의 손실 그리고 Bcl2 family 단백질 등에 의해 조절 되어진다(Budihardjo 등, 1999; Desagher 등, 2000; Green 등, 1998; Susin 등, 1999). 특히 미토콘드리아에서 세포질로 방출되어지는 cytochrome c는 Bcl2 family 단백질에 의해 조절 되어지는데, 이렇게 세포질로 방출된 cytochrome c는 apoptotic protease activating factor 1(Apaf-1), deoxyadenosine triphosphate(dATP)와 결합하며, caspase-1, caspase-2, caspase-9 그리고 caspase-8의 caspase recruitment domain(CARD)과의 결합을 통해 그 활성이 조절되어 하부의 caspase-3를 활성화시켜 세포고사 현상을 유도한다. 미토콘드리아에서의 cytochrome c의 방출을 조절하는 Bcl2 family 단백질은 크게 두 가지로 구분할 수 있는데, 세포고사를 억제하는 Bcl2나 Bcl-XL 단백질 등은 세포고사 촉진 단백질인 Bax와 heterodimer를 형성하거나 암세포에서 항암제 처리 시 인산화되어 그 기능을 상실하게 된다. 그러나 Bax, Bak, Bad 그리고 Bcl-Xs 같은 세포고사 촉진 단백질은 미토콘드리아로 이동되어 cytochrome c를 방출할 수 있는 pore를 형성하기도 한다. 특히 Bid 단백질은 활성화된 caspase-8에 의해 절단되어 미토콘드리아로 이동, 세포고사를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

Gliotoxin에 의해 유도되는 HL-60 세포의 세포고사 현상에서도 앞선 연구 결과와 유사하게 미토콘드리아 변화를 관찰할 수 있었다. 이는 gliotoxin이 미토콘드리아를 경유한 세포고사 신호를 caspase-9에 전달한 결과로 판단된다. 결국 caspase-9의 효소적 활성화에 의하여 caspase-3 활성화에 기여하여 PARP절단을 유도하였다고 추정되었다.

그러나 gliotoxin에 의한 세포고사가 미토콘드리아를 경유하는 기전임을 더욱 명확히 하기 위해서는 미토콘드리아에서의 cytochrome c의 방출과 실질적으로 cytochrome c의 방출을 조절하는 Bcl2 family 단백질 발현 변화도 확인되어야 할 것이다.

진균 대사산물의 ETP class에 속하는 gliotoxin은 항미생물 및 항진균 효능을 가지고 있으나 전신성 독성효과 때문에 임상적 사용에는 아직까지는 문제가 있다(Eichner 등, 1988; Mullbacher 등, 1986; Taylor, 1971; Trown 등, 1972). Gliotoxin의 세포독성은 혈액세포 특히 면역세포에서 심하며 그 기전은 아직까지 많이 밝혀져 있지는 않다(Mullbacher 등, 1987; Waring 등, 1988g, 1990a). *In vitro* 및 *in vivo*의 면역억제 효과는 설치류의 골수이식 거부반응을 효과적으로 예방하였다고 보고 된 바 있으며 이는 장기이식에 의하여 활성화된 림프구만을 선별적으로 제거한 결과라고 알려져 있다(Mullbacher 등, 1987). 또한 이러한 면역억제 기전은 침윤성 aspergillosis 같은 감염시 치료하기 어려운 이유가 될 수 있다. 실제로 amphotericin B 같은 진균감염 치료제가 있음에도 불구하고 침윤성 aspergillosis에 의한 치사율은 75% 이상이나 된다(Burch 등, 1987). 따라서 gliotoxin에 의해서 유도되는 면역세포들에 대한 기능 억제나 세포고사의 작용 기전을 밝히는 것은 gliotoxin의 임상적 응용을 모색하거나 aspergillosis와 같은 진균의 병리학적인 기초 기전을 이해하는 기초 자료가 될 수 있다(Eichner 등, 1984, 1986a, b; Mullbacher 등, 1985, 1987).

## 참고문헌

- Beaver, J. and Waring, P. (1994): Lack of correlation between early intracellular calcium ion rises and the onset of apoptosis in thymocytes, *Immunol. Cell Biol.*, **72**, 489-499.
- Beg, A.A. and Baltimore, D. (1996): An essential role for NF- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -induced cell death, *Science*, **274**, 782-784.
- Bodley, G., Bueltmann, B., Duguid, W., Gibbs, D., Hanak, H. and Hotchi, M. (1992): Fungal infections in cancer patients: an international autopsy study, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **11**, 99-109.
- Bradbury, D.A., Simmons, T.D., Slater, K.J. and Crouch, S.P. (2000): Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis, *J. Immunol. Methods*, **240**, 79-92.
- Braithwaite, A.W., Eichner, R.D., Waring, P. and Mullbacher, A. (1987): The immunomodulating agent gliotoxin causes genomic DNA fragmentation, *Mol. Immunol.*, **24**, 47-55.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X.

- (1999): Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 269-290.
- Burch, P.A., Karp, J.E., Merz, W.G., Kuhlman, J.E. and Fishman, E.K. (1987): Favorable outcome of invasive aspergillosis in patients with acute leukemia, *J. Clin. Oncol.*, **5**, 1985-1993.
- Choi, E.J. (1998): SAPK pathway and apoptosis of Genetics Review 2 (The Genetics Society of Korea). World Science, Seoul, 79-91.
- Desagher, S. and Martinou, J.C. (2000): Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol.*, **10**, 369-377.
- Eichner, R.D., Al Salami, M., Wood, P.R. and Mullbacher, A. (1986a): The effect of gliotoxin upon macrophage function, *Int. J. Immunopharmacol.*, **8**, 789-797.
- Eichner, R.D., Waring, P., Geue, A., Braithwaite, A. W. and Mullbacher, A. (1988): Gliotoxin causes oxidative damage to plasmid and cellular DNA, *J. Biol. Chem.*, **263**, 3772-3777.
- Eichner, R.D., Waring, P., Tiwari-Palni, U. and Mullbacher, A. (1986b): LAV/HTLV-III plays a dominant role in the etiology of AIDS, *AIDS Res.*, **2**, 157-159.
- Eichner, R.D. and Mullbacher, A. (1984): Hypothesis: Fungal toxins are involved in aspergillosis and AIDS, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **62**, 479-484.
- Facompre, M., Watez, N., Kluza, J., Lansiaux, A. and Bailly, C. (2000): Relationship between cell cycle changes and variations of the mitochondrial membrane potential induced by etoposide, *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.*, **4**, 37-42.
- Gong, J. and Traganos, F. (1994): A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry, *Analytical. Biochem.*, **218**, 314-319.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998): Mitochondria and apoptosis, *Science*, **281**, 1309-1312.
- Johnson, J.R., Bruce, W.F. and Dutcher, J.D. (1943): Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. Production, physical and biological properties, *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**, 2005-2009.
- Klaus, S.O. and Davide, F. (1998): Apoptosis signal by death receptors, *Eur. J. Biochem.*, **254**, 439-459.
- Mullbacher, A., Hume, D., Braitwaite, A.W., Waring, P. and Eichner, R.D. (1987): Selective resistance of bone marrow derived hemopoietic progenitor cells to gliotoxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3822-3825.
- Mullbacher, A., Waring, P., Tiwari-Palni, U. and Eichner, R.D. (1986): Structural relationship of epipolythiodioxopiperazines and their immunomodulating activity, *Mol. Immunol.*, **23**, 231-235.
- Mullbacher, A., Waring, P. and Eichner, R.D. (1985): Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity *in vitro*, *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1251-1258.
- Mullbacher, A. and Eichner, R.D. (1984): Immunosuppression *in vitro* by a metabolite of a human pathogenic fungus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3835-3837.
- Park, J.S., So, H.S., Kim, M.S., Jung, B.H., Choi, I.J., Jin, G.H., Jin, S.H., Kim, N.S., Cho, K.H. and Park, R.K. (1999): 진균독소 Gliotoxin에 의한 세포고사에서 Zinc의 예방적 역할, *대한미생물학회지*, **34**, 501-512.
- Park, R.K., Lee, S.R., Kim, Y.H., Cho, K.H., Jang, Y.W. and Chung, H.T. (1998): Gliotoxin Induces the Apoptosis in HL-60 Cells, *대한면역학회지*, **20**, 397-403.
- Reap, E.A., Roof, K., Maynor, K., Borrero, M., Booker, J. and Cohen, P. (1997): Radiation and stress-induced apoptosis : a role for Fas/FasL ligand interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5750-5755.
- Richard, J.L., Debey, M.C., Chermette, R. and Pier, A.C. (1994): Advances in veterinary mycology, *J. Med. Vet. Mycol.*, **32**, 169-187.
- Salvioli, S., Dobrucki, J., Moretti, L., Troiano, L., Fernandez, M.G., Pinti, M., Pedrazzi, J., Franceschi, C. and Cossarizza, A. (2000): Mitochondrial heterogeneity during staurosporine-induced apoptosis in HL60 cells: analysis at the single cell and single organelle level, *Cytometry*, **40**, 189-197.
- Shah, D.T., Glover, D.D. and Larsen, B. (1995): In situ mycotoxin production by candida albicans in women with vaginitis, *Gynecol. Obstet. Invest.*, **39**, 67-69.
- Suen, Y.K., Fung, K.P., Lee, C.Y. and Kong, S.K. (2001): Gliotoxin induces apoptosis in cultured macrophages via production of reactive oxygen species and cytochrome c release without mitochondrial depolarization, *Free Radic. Res.*, **35**, 1-10.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebbersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, **397**, 387-389.
- Taylor, A. (1971): The toxicology of sporidesmins and other epipolythiodioxopiperazines, *Microb. Toxins.*, **7**, 337-376.
- Trown, P.W. and Bilello, J.A. (1972): Mechanism of action of gliotoxin: elimination of activity by sulfhydryl compounds, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 261-266.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green D.R. and Verma, I.M. (1996): Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B, *Science*, **274**, 787-789.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S. Jr. (1996): TNF-



- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science*, **274**, 784-787.
- Waring, P. (1990a): DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin dose not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J. Biol. Chem.*, **265**, 14476-14480.
- Waring, P., Egan, M., Braithwaite, A.W., Mullbacher, A. and Sjaarda A. (1990b): Apoptosis induced in macrophages and T blasts by the mycotoxin sporidesmin and protection by zinc salts, *Int. J. Immunopharmac.*, **12**, 445-457.
- Waring, P., Eichner, R.D., Mullbacher, A. and Sjaarda, A. (1988): Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties, *J. Biol. Chem.*, **263**, 18493-18499.
- Waring, P., Eichner, R.D., Tiwari-Palni, U. and Mullbacher, A. (1987): Gliotoxin E: a new biologically active epipolythiodioxipiperazine from *Penicillium terlikowskii*, *Aust. J. Chem.*, **40**, 991-997.
- Zhou, X., Zhao, A., Goping, G. and Hirszel, P. (2000): Gliotoxin-induced cytotoxicity proceeds via apoptosis and is mediated by caspases and reactive oxygen species in LLC-PK1 cells, *Toxicol. Sci. Mar.*, **54**, 194-202.