

## HepG2 세포의 포스포리파제 D 활성과 자유 지방산 방출에 대한 디프테리아 독소의 영향

고은희

덕성여자대학교 화학과  
(접수 2014. 12. 3; 게재확정 2014. 12. 24)

### Effect of Diphtheria Toxin on the Phospholipase D activity and Free Fatty Acid Release in HepG2 Cells

Eun-Hie Koh

Department of Chemistry, Duksung Woman's University, Seoul 132-714, Korea. E-mail: ehkoh@duksung.ac.kr  
(Received December 3, 2014; Accepted December 24, 2014)

**요 약.** 본 연구에서는 디프테리아 독소가 세포막의 지질에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 세포에서 포스포리파제 D와 유리된 지방산(Free fatty acid)의 변화를 살펴보았다. 지질변화는 pH 5.1에서 최고 값을 나타냈으며, 이 pH에서 포스포리파제 D의 활성을 3.5배 가량, 유리된 지방산의 방출은 5배 정도 증가되었다. 이는 디프테리아 독소가 세포 안으로 들어가는 과정에서 세포막이 교란되어 재배열되었음을 시사한다. 한편 세포막을 무작위로 교란시키는 디지토닌의 영향이 디프테리아 독소의 그것보다 중성 pH에서 4배 이상 상당히 높게 나타난 것으로 미루어 보아 디프테리아 독소의 영향이 상대적으로 선택적인 교란 현상인 것으로 보여진다. 이런 세포막 교란의 연유를 밝히고자 세포막 구멍 형성 저해제인 cibacron blue와 세포막 융합 펩티드를 갖고 있는 hemagglutinin의 영향을 검토하였다. Cibacron blue는 디프테리아 독소에 의한 지질 변화를 50% 정도 저해시켰으며, hemagglutinin에 의한 지질변화는 디프테리아 독소의 그것과 유사함을 관찰 할 수 있었다. 이들 결과들은 디프테리아 독소에 의한 세포막 교란이 구멍형성과 독소의 소수성 펩티드가 세포막에 삽입되는 과정이 서로 연계되어 있음을 암시한다. 그 외 일련의 실험으로 디프테리아 독소가 세포막을 통과하는 과정에서 HepG2 세포의 투과성은 상승시켰으나, 세포의 생존능력은 상당히 높게 유지되었고 DNA 토막내기 같은 세포의 괴사는 일어나지 않았다. 이런 조건하에서 디프테리아 독소는 산성 pH에서 HepG2 세포의 지질의 변화를 가져 온다는 것을 밝힐 수 있었다.

**주제어:** 디프테리아 독신, HepG2 세포, 포스포리파아제 D, 자유 지방산, 세포막 교란

**ABSTRACT.** The effect of diphtheria toxin on cell membrane lipids was studied by examining the phospholipase D (PLD) activity and free fatty acids (FFA) release in HepG2 cells. The diphtheria toxin effects on lipid alteration show apparently maximal at pH 5.1, stimulating PLD activity nearly 3.5 fold and enhancing FFA release approximately 5 fold over the control. These results indicate that the membrane is perturbed and its lipid component is rearranged during the diphtheria toxin translocation. Digitonin, a random membrane perturbing detergent, exhibit about four-fold higher perturbation effect over the diphtheria toxin at neutral pH. This observation suggests that the membrane perturbation induced by diphtheria toxin appears to be rather selective. To investigate the cause of the membrane perturbation, Cibacron blue, an inhibitor of membrane pore formation, and hemagglutinin, an influenza virus with fusion peptide, were tested for their effects on diphtheria toxin action. Cibacron blue decreased the diphtheria toxin effect by almost 50%, but the lipid alteration induced by hemagglutinin was similar to the diphtheria toxin effect. These observations imply that the membrane perturbation induced by diphtheria toxin may be caused by a combination of pore formation and insertion of hydrophobic peptide of toxin to the membrane as well. Additionally, we found that the diphtheria toxin increased the HepG2 cells permeability but the cells viability was maintained at high level at the same time. DNA fragmentation which is related to apoptosis was not induced by the toxin. Under these conditions, we could demonstrate that the lipid alteration of HepG2 cells was brought about by diphtheria toxin at acidic pH.

**Key words:** Diphtheria toxin, HepG2 cells, Phospholipase D, Free fatty acid, Membrane perturbation

## 서 론

진핵 세포에서 세포 내로 외부 물체를 운반하는 주요 수단은 막 함입(endocytosis)에 의하여 이루어진다. 세포막을 통과하여야 하는 이런 운송에는 세포막 융합에 관여하는 세포막 단백질이나 수용체의 역할이 중요하다. 이와 함께 세포막 지질이 공간과 시간에 따라 동적으로 변형되어 구멍이 형성되어야 막 함입에 의한 운송(membrane trafficking)이 가능하다. 이런 세포막 현상과 관련된 단백질 연구는 활발한 연구의 대상이 되고 있는데 반하여 세포막 지질 측면의 연구는 큰 진전을 보이지 못하고 있다.<sup>1,2</sup> 본 연구에서는 막 함입에 의한 세포막의 물리적 변화가 비교적 잘 알려진 디프테리아 독소(diphtheria toxin)을 이용하여, HepG2 세포에서 이 독소에 의한 세포막 교란이 어떻게 포스포리파제 D(PLD)의 활성화와 자유 지방산(FFA) 방출 등에 영향을 미치는지 살펴보고자 한다.

디프테리아 독소는 *Corynebacterium diphtheria*에서 얻어지며, 분자량이 58 kDa의 폴리펩티드로 그 결정구조가 밝혀져 있고,<sup>3</sup> 전위(translocation) 과정도 비교적 잘 알려져 있다.<sup>4,5</sup> 이 독소 단백질은 가수분해로 두 개의 상이한 조각 A와 B로 나뉘어진다. 조각 A(21 kDa)는 감염된 세포의 단백질 합성을 저해시키는 촉매 구역을 가지고 있으며, 조각 B(37 kDa)는 세포막에 작용하여 조각 A를 세포 내로 이동시키는 역할을 한다. 결정 구조에서 조각 B는 구조와 기능면에서 두 개의 구역, 즉 수용체 결합 R 구역(R domain)과 세포막 관통 T 구역(T domain)으로 구분할 수 있다.<sup>3</sup> 디프테리아 독소는 수용체를 중개로 하여 막 함입에 의해 엔도솜(endosome)을 형성한다. 엔도솜의 산성 pH 환경에서 조각 B의 소수성 구역이 노출되면서 엔도솜 세포막에 삽입되고, 그에 따라 세포막이 변형되어 조각 A가 세포 안으로 전위되어 그 독성을 나타내게 된다고 알려져 있다.

포스포리파제 D(phospholipase D, PLD)는 생물계에 광범위하게 분포되어 있으며, 그 역할은 다양하여 성장 제어(growth control), 유사분열(mitosis), 분화(differentiation), 세포골격 개조(cytoskeletal reorganization), 세포막 운송(membrane trafficking), 세포괴사(apoptosis) 등의 현상과 연계되어 있다.<sup>6</sup> 이들 현상들은 모두 그 과정에서 세포막의 융합이나 교란 같은 변화를 수반하고 있다. PLD의 이런 역할들은 반응생성물인 phosphatidic acid(PA) 자체가 신호 분자 역할을 함은 물론, 그 구조가 세포막의 물리적 성질을 변화시켜 세포막의 모양을 바꿀 수 있다는 데에서 기인한다고 할 수 있다.<sup>7,8</sup> 세포막은 세포의 여러 생리현상에 따라 여러 가지 형태로 그 모양이 바뀌어야 한다. 즉 세포막의 곡선이 변해야 하며, 이에 따라 여러 형태의 지질이 요구된다. PLD의

기질인 phosphatidylcholine(PC)은 원통 모양이나, 그 생성물인 PA는 썩기 모양으로 PC가 PA로 변환되면, 세포막의 곡선 모양이 볼록(convex)한 상태에서 오목(concave)한 모양으로 바뀌게 된다. 유리된 지방산(free fatty acids, FFA)은 활성화된 phospholipase A<sub>2</sub>에 의해 생성되며, 그 때 얻어진 lysophosphatidylcholine은 역세기 모양으로 세포막의 곡선에 큰 변화를 가져올 것이다. 이런 배경에서 본 실험에서는 PLD의 활성을 측정하였고, FFA의 방출도 함께 검토하였다.

세포막 지질의 변화를 관찰할 수 있는 방법으로는 양쪽성 폴리펩티드(amphiphilic polypeptide)나 디지털린 같은 계면활성제를 이용하여 세포막의 이중층막을 교란시켜 그 영향을 검토할 수 있다. 세포막 교란으로 세포막 지질의 조성을 제어하는 포스포리파제들의 활성이 변화를 가져오고, 결과적으로 세포막 지질의 조성이 바뀌고 있음이 널리 보고되고 있다.<sup>8</sup> 꿀벌 독액에서 추출한 melittin 같은 양쪽성 폴리펩티드는 세포막과 상호작용하여 여러 종류의 포스포리파제들을 복합적으로 증가시키고 있다고 알려져 있다.<sup>9</sup> 말벌 독액에서 얻은 mastoparan-7도 지질 조성을 폭넓게 변화시키는 것으로 보고되었으며, 이 독소는 불포화나 포화된 각종 유리된 지방산의 방출도 유도하였다.<sup>10</sup> 디지털린으로 투과성이 높아진 Vero 76 세포는 그 PLD가 상당히 활성화 됨이 알려져 있다.<sup>11</sup>

본 실험에서는 세포막 운송 연구에 적합한 모델로 알려져 있는 인체 간암 세포인 HepG2 세포를 활용하였다. 디프테리아 독소의 HepG2 세포 내로의 전위와 연계된 지질 변화에 대하여 pH 영향을 조사하였으며, 그 결과 엔도솜의 산성 pH와 유사한 조건에서 PLD의 변화가 최대임을 관찰할 수 있었다. 이 산성 조건하에서는 디프테리아 독소의 세포막 관통 T 구역이 노출되어 원형질막과 직접 접촉하는 것으로 알려져 있다.<sup>12</sup> 디프테리아 독소에 의한 세포막 교란이 무작위적이 아니라는 것을 보여주기 위해 계면활성제로 알려진 디지털린의 영향도 함께 수행하였다. 또한 전위 과정에서 세포막 구멍의 형성을 규명하기 위해 세포막 구멍 저해제인 cibacron blue을 검토하였다. 그리고 융합 펩티드(fusion peptide)를 갖고 있는 것으로 알려진 인플루엔자 바이러스Hemagglutinin의 영향을 디프테리아 독소와 비교하였다. 그 외 HepG2 세포의 투과성과 생존능력 등도 함께 검토하였다.

이들 일련의 실험으로 디프테리아 독소는 산성 pH에서 HepG2 세포의 세포막 지질에 변화를 가져 온다는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 이 독소가 세포막을 통과하는 과정에서 HepG2 세포의 투과성은 상승시켰으나 DNA 토막내기 같은 세포의 괴사는 일어나지 않았다.

## 재료 및 방법

### 재료

[9,10-<sup>3</sup>H]Palmitic acid(5 mCi/mL)(PAL)는 Dupont NEN (Wilmington, DEL)에서 구입하였다. Phosphatidylbutanol(PBt)는 이미 보고된 실험과정에 따라 양배추 PLD를 이용하여 phosphatidylcholine으로부터 만들었다.<sup>13</sup> *Corynebacterium diphtheriae*로부터 얻은 diphtheria toxin, cibacron blue와 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma(St. Louis, MO)로 부터, 그리고 digitonin은 Calbiochem (San Diego, CA)으로 부터 각각 구입하였다. 세포배양 시약들, Dulbecco's modified Eagles's medium(DMEM), minimum essential medium(MEM), fetal bovine serum(FBS)과 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)들은 BRL(Gaithersburg, MD)에서 구입하였다. 미리 코팅된 silica gel TLC 판(Kieselgel 60 F254)은 Merck(Damstadt, Germany) 제품을 사용하였고, 그 외 유기 용매 같은 시약들은 시약 등급을 사용하였다.

### 세포배양

HepG2(인체 간암 세포)는 배양매체 MEM에서 길렀다. 열로 처리한 10%의 FBS가 포함된 배양액에는 0.12 mg/mL penicillin G, 0.2 mg/mL streptomycin, 그리고 20 mM sodium carbonate를 추가로 넣어 주었다. 세포는 37 °C에서 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기로 구성된 습기 있는 배양기에서 길렀다.

### 동위원소 표지

방사성 동위원소 표지는 Lee 등이 기술한 방법을 따랐다.<sup>9</sup> HepG2세포의 세포밀도가  $6 \times 10^5$ /well이 되면 여섯 개의 웰(well)이 있는 배양 판에 옮기고, 하루가 지난 후 [<sup>3</sup>H]palmitic acid(2  $\mu$ Ci/well)와 0.3%(w/v) FBS가 포함된 매체를 넣고 37 °C에서 3시간 동안 배양하여 [<sup>3</sup>H]palmitic acid가 들어간 표지된 phosphatidylcholine(PC)을 얻었다.

### PLD활성 측정

방사성 동위원소로 표지된 HepG2세포는 매체에 남아 있는 [<sup>3</sup>H]palmitic acid를 제거하기 위해 FBS가 없는 배양 매체로 두 번 씻어 주었다. PLD 활성측정은 Lee 등이 기술한 방법에 따라 수행하였다.<sup>14</sup> PLD 활성은 butanol 존재 하에서 PLD의 transphosphatidylation 생성물인 phosphatidylbutanol(PBt)을 측정하여 결정하였다. [<sup>3</sup>H]Palmitic acid로 표지된 세포들은 0.3%(w/v) 1-butanol이 포함된 DMEM에 diphtheria toxin을 넣어 실험하였다. 표준 PLD 반응조건은 37 °C에서 20분간이었으며, 반응 종결은 찬 methanol 1 mL를 넣어서 종결시켰다. 생성된 지질은 2 mL chloroform과 0.8 mL 0.1 M KCl을 넣고 격렬히 섞어서 추출하였다. 지질을 포함한 아래쪽의

chloroform 상은 조심스럽게 새 마이크로 바이알에 모아서 진공원심분리기(speed vac)로 증발시켜 말렸다. 방사성 [<sup>3</sup>H] PBt의 검색을 돕기 위해 별도로 합성된 확실한 PBt를 말린 반응생성물에 추가로 넣고 chloroform으로 녹여냈다. 이들 지질들은 TLC 판에서 ethylacetate/iso-octane/acetic acid/water(13:2:3:10, v/v)의 전개용매를 이용하여 분리하였다. 전개된 TLC 판은 요오드 증기에 노출시키고, [<sup>3</sup>H] PBt 띠(Rf값 ~0.47)는 판에서 긁어냈다. 분리된 PBt는 200  $\mu$ L ethanol/1 N HCl(100:1, v/v)로 용출시키고, 그 방사성은 액체 섬광계측기(scintillation counter, Wallac 1409)로 측정하였다. PLD 활성 측정은 한번에 3중으로 행했으며, 오차 범위가 10%가 넘는 경우에는 반복 실험을 수행하였다.

### FFA 방출측정

HepG2세포의 FFA 방출은 알려진 과정에 따라 수행하였다.<sup>9</sup> PLD 활성측정과 동일한 반응조건으로 diphtheria toxin을 넣고 배양한 후, 찬 메탄올 1 mL를 넣어 반응을 종결시켰다. 방출된 [<sup>3</sup>H] palmitic acid(PAL)를 측정하기 위해 방사성 없는 palmitic acid를 추가로 넣고 heptane/diethylether/acetic acid(60:40:2, v/v) 전개용매를 사용하여 TLC 판에서 FFA를 분리하였다. 방사성 측정은 위의 PLD 측정 방법과 동일하게 수행하였다.

### 세포막 투과성 측정

세포막 교란 정도는 세포막 투과성(permeability)의 변화를 측정하여 확인할 수 있다. 세포막 투과성은 형광염료 ethidium bromide(EtBr)의 투과성을 이용해 측정 하였다. 실험 하루 전에 웰 여섯 개의 배양판에 준비한 HepG2세포에  $10^{-8}$ M diphtheria toxin을 넣고 37 °C에서 20분간 배양하였다. 독소로 교란된 세포들은 DPBS로 씻어준 후, 10  $\mu$ g EtBr를 넣고 37 °C에서 5분간 염색한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

### 세포 viability 검토(MTT 측정)

HepG2세포의 diphtheria toxin에 대한 생존능력을 검토하기 위해 세포를 하루 전에 96 웰 배양판에 10% FBS를 포함한 200  $\mu$ L 배양매체에서 배양하였다. 여기에 일정량의 diphtheria toxin을 넣고 37 °C에서 일정 시간 동안 배양하였다. 정해진 배양 시간이 끝나면 2 mg/mL 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 50  $\mu$ L를 각 웰에 넣고 37 °C에서 4시간 더 배양하였다. 배양 후 2,000 rpm으로 10분간 원심분리 하고, 그 상등 액은 주사기로 제거하였다. 양금은 150  $\mu$ L DMSO로 녹여내고, 이 용액의 광학밀도를 분광학기기로 570 nm에서 읽었다.

**DNA fragmentation 검토**

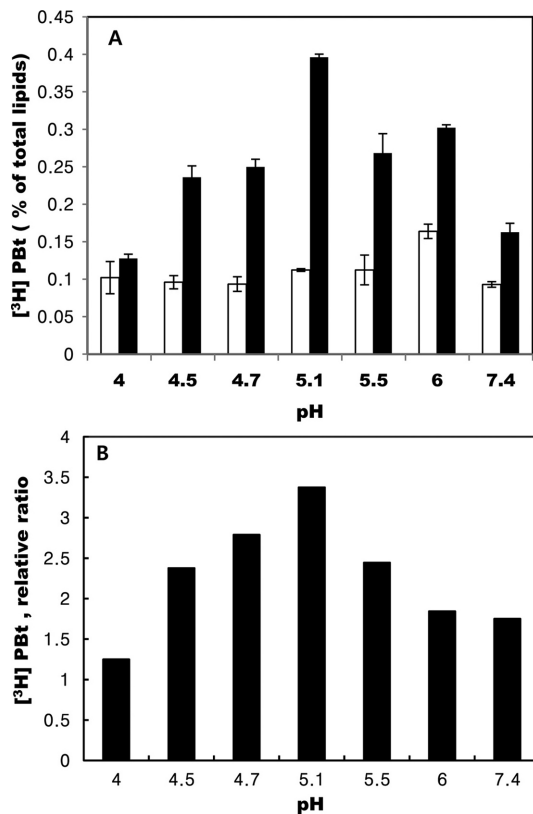
HepG2세포( $5 \times 10^6$  cells/dish)를 일정 시간 동안  $10^{-8}$  M diphtheria toxin으로 처리한 후 이들 세포를 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 100 g/mL proteinase K, 그리고 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)이 들어 있는 용해 용액에서 용해시켰다. 얼음 bath에서 20분간 흔들어 준 후, 이들 세포를 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 토막 DNA(상등 액)를 온전한 DNA(양금)로부터 분리하였다. 상등 액의 토막 DNA는 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1, v/v) 용액으로 추출하고, 이 용출 액의 토막 DNA는 ethanol과 3 M sodium acetate (20:1, v/v) 용액으로 양금으로 가라 앉혔다. 동일한 양의 이들 DNA를 EtBr을 포함하는 1.5% agarose 겔에서 전기영동하여 UV로 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

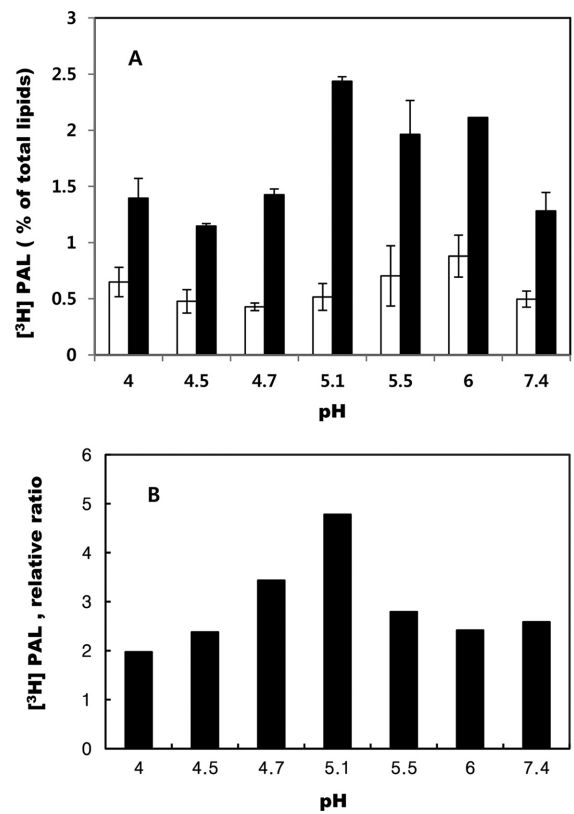
**PLD 활성화와 FFA 방출에 미치는 pH 영향**

세포막 지질의 변화는 막 함입(endocytosis)이나 분화

(differentiation) 같이 세포막이 합치거나 나뉠 때 일어나는 것으로 믿어지고 있다. 본 실험에서는 세포막 통과 과정이 비교적 상세하게 알려진 diphtheria toxin을 가지고, 이 독소가 HepG2 세포와 상호작용할 때 어떻게 세포막 지질이 변화하는 지를 관찰하였다. Diphtheria toxin이 세포 내로 유입되는 과정에서 막 함입에 의해 생긴 endosome의 pH가 산성인 것을 감안하여 pH에 따른 지질의 변화를 살펴보았다.<sup>12</sup> PLD 활성화의 pH 영향은 Fig. 1에 FFA 방출의 pH 영향은 Fig. 2에 각각 도시하였다. Diphtheria toxin에 의한 PLD의 활성화는 pH에 민감하게 좌우되었다. 즉 pH가 5.1 일 때 가장 높은 값을 보여주었으며, 그 값은 대조표준 값보다 약 3.5배 더 활성화 되었다(Fig. 1). FFA 방출에 대한 pH 영향도 pH 5.1일 때 최고 값을 나타냈고, 그 값은 대조표준 값보다 거의 5배 가까이 되었다(Fig. 2). 이 pH 결과에 따라 모든 diphtheria toxin 실험은 pH 5.1에서 수행하였다. 지질 변화에서 최대치를 보여주는 pH 5.1은 endosome 내부의 pH와 유사한 것으로, 이 조건하에서는 원형질막과 endosome 막을 구분할 필요가 없을 것으로 보여진다. 이 산성



**Figure 1.** Effect of pH on diphtheria toxin induced PLD activity in HepG2 cells. (A) HepG2 cells treated with  $10^{-8}$  M/mL diphtheria toxin were exposed to medium with different pH and incubated for 20 min at 37 °C. Control (□), DT (■). (B) The pH effect on PLD activity was expressed as the relative ratio over the control activity.



**Figure 2.** Effect of pH on diphtheria toxin induced FFA release (PAL) in HepG2 cells. (A) HepG2 cells treated with  $10^{-8}$  M/mL diphtheria toxin were exposed to medium with different pH and incubated for 20 min at 37 °C. Control (□), DT (■). (B) The pH effect on FFA release was expressed as the relative ratio over the control activity.

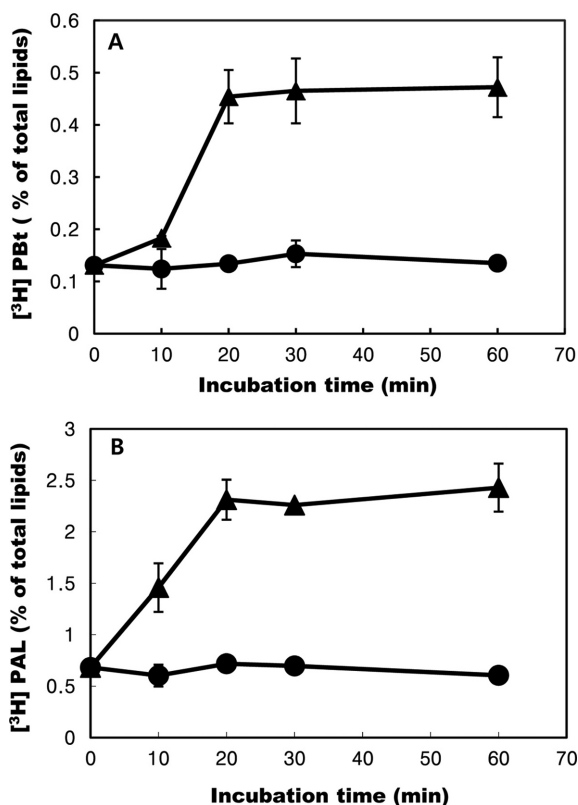
조건에서는 diphtheria toxin의 B-fragment는 노출되어 세포막 관통 T 구역의 소수성 펩티드가 세포막 이중층의 내부 아실 체인(acyl chain)과 접촉할 것이라는 보고는 여기서 관찰한 지질변화가 같은 현상에서 기인할 수 있는 것임을 암시하고 있다.<sup>15</sup>

#### 시간에 따른 PLD 활성화와 FFA 방출

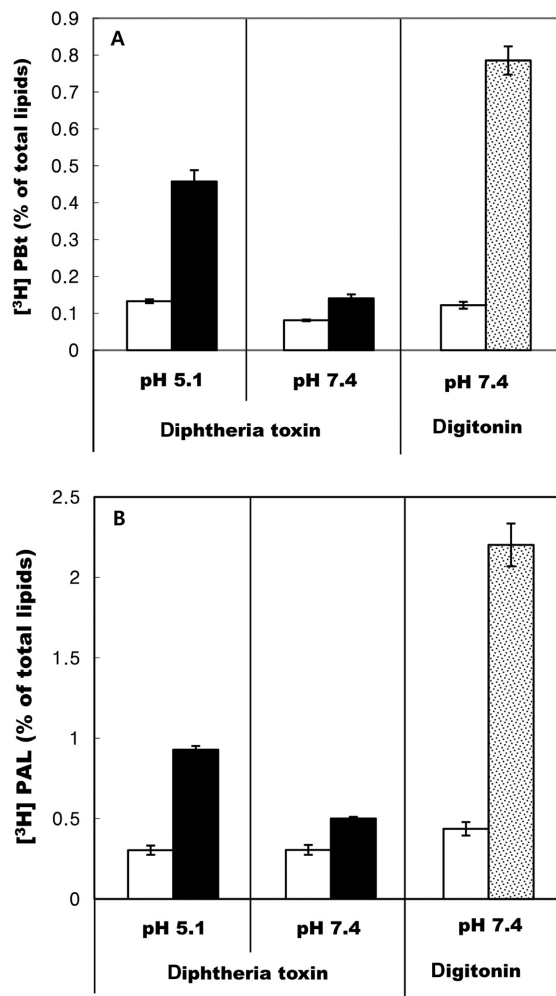
Diphtheria toxin에 의한 PLD 활성화와 FFA 방출의 최적 조건을 찾기 위해 반응시간에 대한 영향을 살펴 보았다 (Fig. 3). HepG2 세포를 pH 5.1에서 diphtheria toxin  $10^{-8}$  M/mL 존재 하에서 시간에 따라 37°C에서 반응시켰다. PLD 활성 (Fig. 3A)과 FFA 방출 (Fig. 3B)은 20분까지는 급격히 상승하였으나 그 후는 시간에 따라 별 변화가 없었다. 따라서 특별한 경우가 아니면 diphtheria toxin 영향은 20분 동안만 관찰하였다.

#### 세포막 교란에 대한 diphtheria toxin과 digitonin의 비교

Diphtheria toxin에 의한 세포막의 교란과 계면활성제로 알려진 digitonin에 의한 무차별적 교란을 비교하였다. 세



**Figure 3.** Time dependence of diphtheria toxin induced PLD activity (A) and FFA release (B) in HepG2 cells. HepG2 cells treated with  $10^{-8}$  M/mL diphtheria toxin were exposed to medium with pH 5.1 and incubated for different time intervals at 37°C. Control (●), DT (▲).



**Figure 4.** Effect of digitonin in comparison with the effect of diphtheria toxin on PLD activity (A) and FFA release (B) in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with  $10^{-8}$  M/mL diphtheria toxin and 30  $\mu$ g/mL digitonin at specified pH and incubated for 20 min at 37°C. Control (□), DT (■), digitonin (▨).

포막의 지질 이중층막이 digitonin에 의해 광범위하게 교란됨은 이미 알려져 있다.<sup>11</sup> HepG2 세포막 지질에 대한 diphtheria toxin과 digitonin의 영향을 정확히 비교하기 위해 두 교란을 동시에 수행하였으며, PLD 결과는 Fig. 4A에 FFA의 방출은 Fig. 4B에 각각 도시하였다. Diphtheria toxin에 의한 영향은 위의 PLD 결과 (Fig. 1)와 같이 pH 5.1에서 PLD의 활성을 약 3.5배 가까이 증가되었으며, FFA 결과도 Fig. 2와 유사한 값의 방출을 보여주었다. 그러나 pH 7.4에서는 PLD의 활성과 FFA 방출은 모두 미미하여 2배를 넘지 못하는 것을 확인하였다. 이와 대조적으로 계면활성제인 digitonin의 경우는 중성 pH(pH 7.4)에서 PLD의 활성과 FFA의 방출이 대조표준 값보다 6배 이상으로 나타났다. 즉 중성에서 digitonin에 의한 지질 변화는 diphtheria toxin의 그것 보다 약 4배나 더

큰 것으로 드러났다. 이 결과는 digitonin의 세포막 교란은 무차별적으로 광범위하게 일어나고 있음을 시사한다. 반면 diphtheria toxin은 산성 조건에서 주로 HepG2 세포막을 교란시키고 있다는 측면에서 더 선택적으로 작용하고 있음을 알 수 있다.

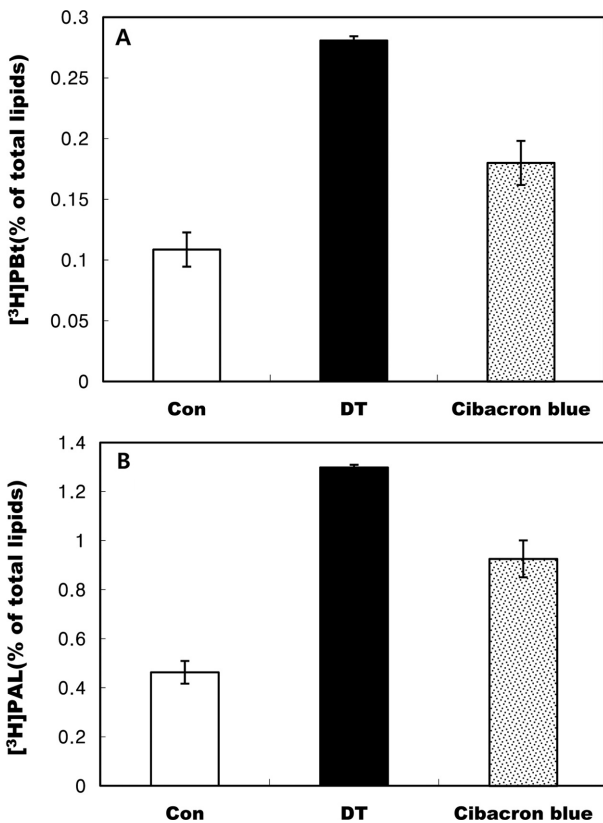
**세포막 구멍 형성 저해제의 영향**

Diphtheria 독소에 의한 HepG2 세포막 교란으로 PLD가 활성화 되고 FFA 방출이 증가되고 있다. 그러나 이 지질 변화가 어떤 과정과 연계되어 일어나는 지는 확실하지가 않다. 즉 diphtheria 독소의 세포막 관통 T 구역의 소수성 펩티드가 세포막에 삽입되어 일어나는 현상이거나, 또는 diphtheria 독소에 의해 세포막에 구멍이 형성되는 과정에서 일어나는 것인지 분명하지가 않다. 이를 밝히려는 목적으로 구멍형성 저해제인 cibacron blue 존재 하에서 HepG2 세포막의 지질변화를 관찰하였다. Cibacron blue는 세포막 구멍형성을 막아주는 것으로 보고되어 있다.<sup>16</sup> HepG2 세포를 우선 10 μM cibacron blue로 처리한 후 diphtheria 독소를 넣고 표준조건으로 실험하였다. Fig. 5에서 보여주듯이, cibacron

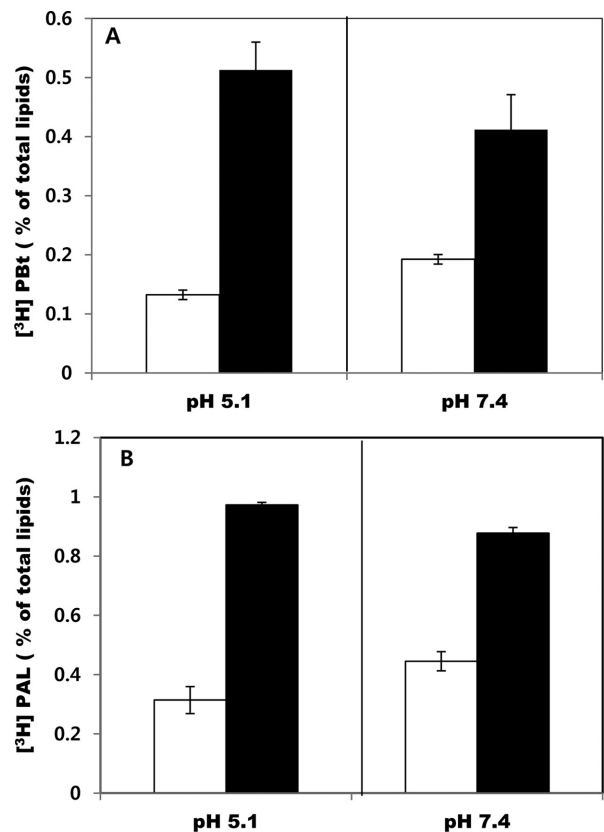
blue는 PLD의 활성(Fig. 5A)과 FFA의 방출(Fig. 5B)을 모두 저해하는 것으로 나타났다. 전체 지질변화에 대략 50%정도 저해시키는 것으로 보여져, 세포막의 구멍 형성과 지질변화의 연계성을 시사해 주고 있다.

**Hemagglutinin에 의한 세포막 교란과의 비교**

Diphtheria 독소의 소수성 펩티드에 의한 세포막 교란과 융합 펩티드(fusion peptide)를 갖고 있는 것으로 알려진 인플루엔자 바이러스 hemagglutinin(HA) 영향을 비교하였다. HA는 2개의 다이설파이드로 연결된 HA1과 HA2로 이루어져 있으며, HA 바이러스-리포솜 융합연구에서 융합 펩티드가 지질 이중층막의 소수성 내부까지 침투함이 알려져 있다.<sup>17</sup> 이는 소수성 펩티드가 세포막에 삽입되어 세포막을 교란시킬 수 있음을 보여주는 또 다른 사례라고 할 수 있다. 이런 측면에서 HA의 영향을 HepG2에서 검토하였다. 실험 조건은 HepG2 세포에 5 μg/mL 인플루엔자 바이러스 HA를 처리하고 37°C에서 30분간 배양하였다(Fig. 6). 검토한 두 개의 pH에서 PLD가 다 활성화 되었고(Fig. 6A), FFA의 방출도 증가하였다(Fig. 6B). 특히 pH 5.1에서 더



**Figure 5.** Effect of cibacron blue, a pore formation inhibitor, on the PLD activity (A) and FFA release (B) in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 10 μM cibacron blue and then diphtheria toxin (10<sup>-8</sup> M/mL) was added at pH 5.1 and incubated for 20 min at 37 °C. Control (□), DT (■), cibacron blue (▨).

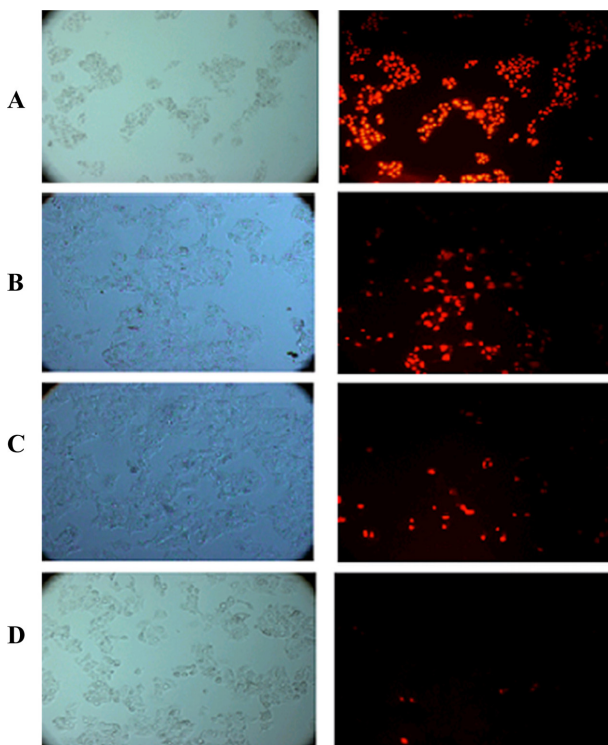


**Figure 6.** Effect of hemagglutinin, an influenza virus, on PLD activity (A) and FFA release (B) in HepG2 cells. Cells were treated with 5 μg/mL hemagglutinin at different pH and incubated for 30 min at 37 °C. Control (□), HA (■).

큰 영향을 보여주어 약 3배의 활성화를 나타내 diphtheria toxin 영향과 유사하였다. 이 결과는 hemagglutinin에 의한 세포막 교란 즉 융합 펩티드가 지질 이중층막의 내부까지 침투하는 현상이 diphtheria 독소에서 일어나고 있을 가능성을 보여주고 있다.

#### Diphtheria toxin에 의한 세포막 투과성 변화

Diphtheria toxin은 산성 pH에서 모델 세포막 리포솜에 구멍을 만들 수 있고, 경우에 따라선 큰 분자량(>5,000)의 물질도 투과된다는 보고가 있다.<sup>18</sup> 근자에는 diphtheria 독소의 농도에 따라 크기가 다른 구멍이 형성된다는 연구가 있다.<sup>19</sup> Diphtheria 독소에 의한 구멍형성을 살피기 위해 HepG2세포막의 투과성을 EtBr의 유입 정도로 측정하였다(Fig. 7). EtBr은 스스로 투과성이 없는 형광 염료로 세포막을 통과하면 DNA에 층간삽입(intercalation) 되어 침투된 것을 확인 할 수 있다. Diphtheria 독소에 의한 투과성과 비교하기 위해 세포막을 광범위 하게 교란시키는 계면활성제인 digitonin의 투과성도 함께 수행하였다. Fig. 7A에는 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  digitonin, Fig. 7B에는 pH 5.1에서  $10^{-8}$  M/mL diphtheria toxin, Fig. 7C에는 pH 5.1에서 10  $\mu\text{M}$  cibacron blue

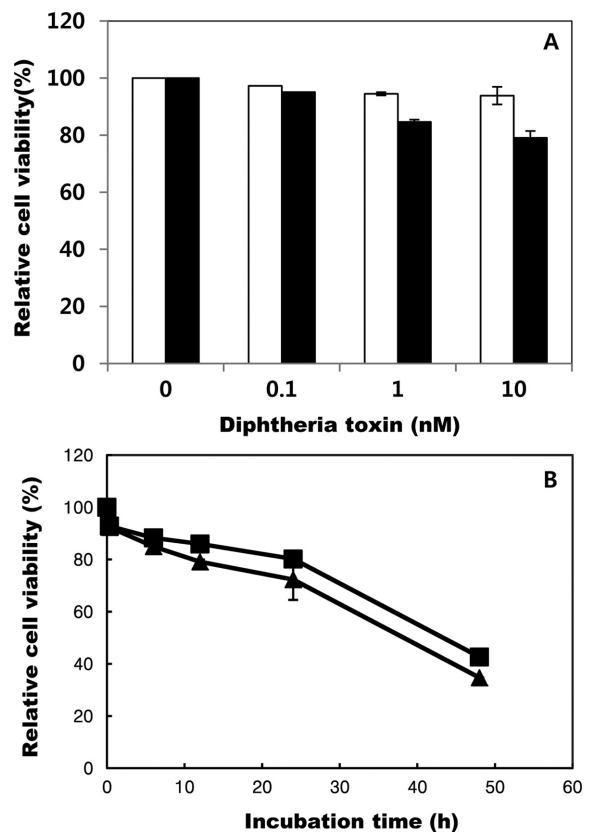


**Figure 7.** Effect of diphtheria toxin on membrane permeability in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were stimulated by 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  digitonin, (B)  $10^{-8}$  M/mL DT at pH 5.1, (C) 10  $\mu\text{M}$  cibacron blue with DT at pH 5.1, and (D) DT at pH 7.4 for 20 min at 37 °C. Then cells were stained with 10  $\mu\text{g}$  EtBr and observed by a fluorescence microscope.

를 넣은 후  $10^{-8}$  M/mL diphtheria toxin, 그리고 Fig. 7D에서는 pH 7.4에서  $10^{-8}$  M/mL diphtheria toxin을 각각 처리하고, 10  $\mu\text{g}$  EtBr로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. Digitonin의 경우 기대한 대로 커다란 투과성의 변화와 형태의 변화를 보여주었다(Fig. 7A). 이는 L1210 세포에서 보고된 digitonin의 세포막 교란과 매우 유사하다.<sup>11</sup> 산성 pH (5.1)에서 diphtheria toxin에 의한 HepG2 세포막의 투과성이 관찰되었으나 digitonin의 그것 보다는 제한 적이었다(Fig. 7B). 이 diphtheria toxin의 투과성은 cibacron blue 존재 하에서 더 줄어들었다(Fig. 7C). 이 결과는 cibacron blue 존재 하에서 지질 변화가 축소되었던 것(Fig. 5)과 일치한다. 중성 pH 7.4에서는 EtBr의 투과성은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 7D), 이는 중성 pH에서는 세포막 교란이 상대적으로 적게 일어나지 있음을 반영한다고 볼 수 있다.

#### 세포 viability와 DNA fragmentation에 미치는 diphtheria toxin의 영향

HepG2 세포의 생존능력(viability)에 대한 diphtheria 독



**Figure 8.** Effect of diphtheria toxin on cell viability at different pH. (A) Cells were treated with different amount of diphtheria toxin at pH 5.1 and incubated for 20 min at 37 °C. Control (□), DT (■); (B) Cells were treated with 10 nM DT and incubated for different time intervals at pH 7.4 (■) and at pH 5.1 (▲).

소의 영향을 보기 위해 세포에 대한 독성여부와 DNA 토막내기 효과를 조사하였다. Diphtheria 독소의 독성 검사는 MTT 에세이로 검토하였다(Fig. 8). MTT 에세이는 diphtheria 독소의 농도에 따라(Fig. 8A), 그리고 시간에 따라(Fig. 8B) 수행하였다. 표준 실험 조건, 즉 산성 pH, 10 nM diphtheria toxin 농도에서 20분간 반응시켰을 때 HepG2 세포의 생존능력은 대조표준 값의 80% 정도로 나타났다. 시간에 따른 세포의 생존능력은 20분 이후부터는 비교적 급격히 줄어들어 50분에서 산성 pH의 경우 세포가 50%이상 파괴됨이 관찰되었다(Fig. 8B). 산성 pH에서 상대적으로 세포의 생존능력이 더 낮은 이유는 세포막에 형성된 구멍이 중성 pH보다 더 많이 형성되었기(Fig. 7) 때문일 것이다. 현재의 실험조건(10nM diphtheria toxin과 함께 37 °C에서 20분간 배양)에서는 세포의 생존능력이 지질 실험결과에 지대한 영향을 미치지 못할 것으로 판단된다. 한걸음 더 나아가 diphtheria 독소가 세포괴사(apoptosis)에 관여하는지를 알기 위해 DNA 토막내기가 발생하는지를 검토하였다(Fig. 9). 실험결과 37 °C에서 48 h 배양에서도 DNA 토막은 관찰되지 않았다. 이는 diphtheria 독소가 단백질 합성을 저해시킬 지라도 세포괴사는 유발하지 않음을 보여주고 있다. 즉 본 실험에서 관찰한 diphtheria 독소에 의한 지질의 변화는 세포막의 용해(lysis)나 DNA 토막내기와는 직접적인 상관이 없음을 보여주고 있다.

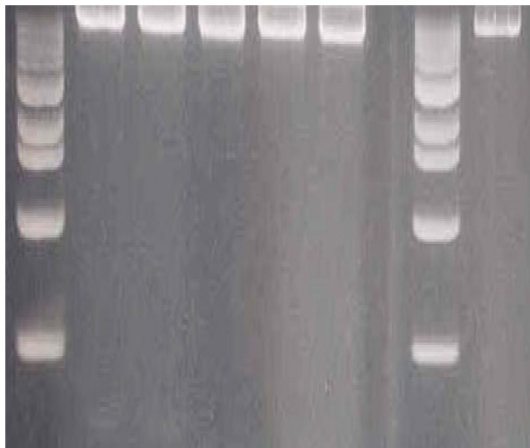
본 실험에서는 diphtheria 독소가 HepG2 세포 내로 전위하는 과정에서 유발된 세포막 교란이 HepG2 세포막 지질의 변화를 유도한다는 것을 PLD의 활성화와 FFA의 방출로 보여 주었다. 이 지질변화는 pH 5.1에서 최고 값을 보여주

었으며, PLD의 경우 대조표준 값보다 약 3.5배 더 활성화되었다. 지질변화의 연유를 밝히고자 세포막 구멍형성 저해제인 cibacron blue의 영향을 검토하여 50% 정도의 지질변화 저해 효과를 관찰할 수 있었다. 그리고 세포막을 관통하는 바이러스 hemagglutinin의 영향과 diphtheria 독소의 그것과 비교하여 그 지질 변화의 유사점을 살펴보았다. 이와 함께 일련의 실험으로 diphtheria 독소는 세포막을 통과하는 과정에서 HepG2 세포의 투과성은 상승시켰으나, 세포의 생존능력은 상당히 높게 유지되었고, DNA 토막내기 같은 세포의 괴사는 일어나지 않았음을 보여주었다. 결과들은 제한적이기는 하나 이런 조건하에서 HepG2 세포막의 지질 변화는 diphtheria 독소에 의한 구멍형성과 세포막 관통 T 구역의 소수성 펩티드가 지질 이중층막의 내부까지 침투하는 현상이 복합적으로 작용하여 얻어진 결과라고 추정할 수 있다. 즉 여기서 관찰한 지질의 변화는 알려진 diphtheria 독소의 세포 내로의 전위 과정과 그 맥락을 같이 한다고 볼 수 있다.<sup>15,20</sup> 구체적으로 중성자 반사 측정법(neutron reflectometry)이나 고체 NMR 같은 물리적 방법을 동원하여 산성 조건에서 얻어진 diphtheria 독소의 T 구역(T domain)이 세포막 인지질 이중층막을 교란하여 투과성을 유도한다는 물리적 결과와<sup>15,20</sup> 여기서 얻어진 효소의 활성 변화에 의한 지질의 변화, 즉 생화학적 관찰이 서로 일맥상통하는 것으로 여겨진다. 결론적으로 산성 조건에서 diphtheria 독소가 HepG2 세포막을 통과하는 과정에서 세포막의 지질 변화가 수반되고 있음을 관찰할 수 있었다.

**Acknowledgments.** 본 연구의 방사성 동위원소를 이용한 실험은 서울대학교 대학원 생화학 실험실에서 이루어졌다. 실험을 도와준 김영주에게 감사한다.

## REFERENCES

1. Echert, D. M.; Kim, P. S. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 777.
2. Jia, X.; Chen, F.; Pan, W.; Yu, R.; Tian, S.; Han, G.; Fang, H.; Wang, S.; Xhao, J.; Li, X.; Zheng, D.; Tao, S.; Liao, W.; Han, X.; Han, L. *Micro. Infect.* **2014**, *16*, 491.
3. Choe, S.; Bennette, M.J.; Fujii, G.; Curmi, P. M. G.; Kandardijieff, K. A.; Collier, R. J.; Eisenberg, D. *Nature* **1992**, *357*, 216.
4. Umata, T.; Mekada, E. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8351.
5. Rodnin, M. V.; Kyrychenko, A.; Kienker, P.; Sharma, O.; Posokhov, Y. O.; Collier, R. J.; Finkelstein, A.; Ladokhin, A. S. *J. Mol. Biol.* **2010**, *402*, 1.
6. Exton, J. H. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 303.
7. Pleskot, R.; Li, J.; Zarsky, V.; Potocky, M.; Staiger, C. J. *Trend. Plant Science* **2013**, *18*, 496.



**Figure 9.** Examination of DNA fragmentation in HepG2 cells after treatment of diphtheria toxin. HepG2 cells were treated with  $10^{-8}$  M/mL diphtheria toxin at pH 5.1 and at 37 °C for different duration of times. M, 1 kb ladder; lane 1, control; lane 2, 20 min; lane 3, 6 h; lane 4, 12 h; lane 5, 24 h; lane 6, 48 h.



8. Marguerite, V.; Gkikopoulou, E.; Alberto, J.-M.; Gueant, J.-L.; Merten, M. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 213.
  9. Lee, S. Y.; Park, H. S.; Lee, S. J.; Choi, M. U. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *389*, 57.
  10. Park, H. S.; Lee, S. Y.; Kim, Y. H.; Kim, J. Y.; Lee, S. J.; Choi, M.-U. *Biochem. Biophys. Acta.* **2000**, *1484*, 121.
  11. Koh, E.-H. *J. Korean Chem. Soc.* **2005**, *49*, 473.
  12. Moskang, J. Q.; Stenmark, H.; Siur, O. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2652.
  13. Jung, K.; Koh, E.-H.; Choi, M. U. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1989**, *10*, 585.
  14. Lee, S. Y.; Park, N. G.; Choi, M. U. *FEBS letters* **1998**, *432*, 50.
  15. Chenal, A.; Prongidi-Fix, L.; Perier, A.; Aisenbrey, C.; Ver-  
nier, G.; Lambotte, S.; Fragneto, G.; Bechinger, B.; Gillet, D.; Forge, V.; Ferrand, M. *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 872.
  16. Sharpe, J. C.; Kachel, K.; London, E. *J. Membrane Biol.* **1999**, *171*, 223.
  17. Ramalho-Santos, J.; Maria, C.; De Lima, P. *Biochem. Biophys. Acta.* **1998**, *1376*, 147.
  18. Sharpe, J. C.; London, E. *J. Membrane Biol.* **1999**, *171*, 209.
  19. Khrantsov, Y. V.; Rokitskaya, T. I.; Rosenkranz, A. A.; Trusov, G. A.; Gnuchev, N. V.; Antonenko, Y. N.; Sobolev, A. S. *J. Control. Release* **2008**, *128*, 241.
  20. Man, P.; Montagner, C.; Vitrac, H.; Kavan, D.; Pichard, S.; Gillet, D.; Forest, E.; Forge, V. *J. Mol. Biol.* **2011**, *414*, 123.
-