

이산화염소의 활성산소 유발에 따른 곤충 세포의 아폽토시스

김민현 · 수닐 쿠마르 · 권혁¹ · 김욱^{1**} · 김용균*

안동대학교 식물의학과, ¹고려대학교 바이오시스템공학과

Influence of Reactive Oxygen Species Produced by Chlorine Dioxide on Induction of Insect Cell Apoptosis

Minhyun Kim, Sunil Kumar, Hyeok Kwon¹, Wook Kim^{1**} and Yonggyun Kim*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

¹Department of Biosystems and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea

ABSTRACT: Chlorine dioxide has an insecticidal activity via its production of reactive oxygen species (ROS). Its cytotoxic activity has been regarded as a main cause of the insecticidal activity. This study tested a hypothesis that cytotoxicity of chlorine dioxide is resulted from its induction of apoptosis against target cells using ROS. Injection of chlorine dioxide significantly reduced total hemocyte counts of *Plodia interpunctella* larvae and subsequently killed the larvae. To analyze the cytotoxicity with respect to apoptosis, terminal deoxynucleotidyl transferase nick end translation (TUNEL) assay was performed. An insect cell line (Sf9) cells were exposed to different concentrations of chlorine dioxide. TUNEL assay showed that chlorine dioxide induced significant apoptosis of Sf9 cells in a dose-dependent manner. When different concentrations of chlorine dioxide were injected to larvae of *P. interpunctella*, it showed a dose-dependent induction of apoptosis against hemocytes. However, addition of vitamin E significantly suppressed the apoptosis induction and insecticidal activity of chlorine dioxide in a dose-dependent manner. These results suggest that cytotoxicity of chlorine dioxide is resulted from its induction of apoptosis against insect cells using ROS.

Key words: Chlorine dioxide, Apoptosis, Reactive oxygen species, Insecticidal activity, *Plodia interpunctella*

조 록: 이산화염소는 살충효과를 지니며, 이는 이 물질이 발생시키는 활성산소에 기인된다. 살충효과를 주는 주요 원인으로 이산화염소의 세포독성에 주목하고 있다. 본 연구는 이산화염소가 유발하는 세포독성이 활성산소에 기인한 아폽토시스 유발로 가설을 세우고 이를 검증하였다. 화랑곡나방(*Plodia interpunctella*) 유충에 이산화염소를 주입한 결과 전체혈구수의 뚜렷한 감소를 보였고, 이후 처리 유충은 사망하였다. 아폽토시스 세포치사과정을 규명하기 위해 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end translation) 분석법을 적용하였다. 곤충 세포주의 하나인 Sf9 세포에 서로 다른 이산화염소를 처리하고 TUNEL 분석법으로 관찰한 결과 처리 농도에 비례하여 아폽토시스 비율이 증가하였다. 다음으로 서로 다른 농도의 이산화염소를 화랑곡나방 유충에 주입하고 혈구 세포를 TUNEL 분석법으로 관찰한 결과 이산화염소는 처리 농도에 비례하여 아폽토시스 유발을 나타냈다. 그러나 항산화제인 비타민 E를 이산화염소와 함께 처리하면 비타민 E의 농도에 비례하여 이산화염소의 아폽토시스 유발을 억제하고 이에 따라 살충률도 감소하였다. 이러한 결과는 이산화염소에 기인한 세포독성은 활성산소에 기인한 아폽토시스 유발로 이뤄졌다는 것을 제시하고 있다.

검색어: 이산화염소, 아폽토시스, 활성산소, 살충활성, 화랑곡나방

이산화염소(ClO₂)는 염소 산화물의 일종으로 높은 산화력을 지니며, 낮은 온도의 물에서도 높은 용해도를 나타내 음용수

소독 및 표백제로 사용되고 있다(Volk et al., 2002). 더욱이 이산화염소는 액상 및 기체 상태의 제제화가 가능하여 여러 용도의 환경처리제로 사용 가능성을 넓히고 있다. 이산화염소의 살균 및 표백 효과는 이 물질이 갖는 화학적 산화력에 기인된다(Don, 1998). 즉, 이산화염소가 물속에서 용해된 경우 더 이상 분해되지 않는 분자 모습을 지니게 된다. 그러나 이 분자의 최

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

**Co-corresponding author: kwook@korea.ac.kr

Received June 27 2016; Revised July 15 2016

Accepted July 19 2016

외각 전자수가 홀수로 존재하여, 특이적 단일 전자 교환기작의 산화력을 발휘하게 된다. 따라서 이산화염소는 유기물질의 전자밀집센터를 공격하여 자신은 하나의 전자를 받아들인 chlorite (ClO_2) 형태로 환원되고 해당 유기물은 산화되게 된다. 이러한 이산화염소의 산화력은 살균 및 살충 작용에 응용되었다 (Hinenoya et al., 2015).

훈증제로서 제형화된 이산화염소는 해충의 방제에 유효한 것으로 알려지고 있다. 의학해충인 빈대류(*Cimex lectularius*, *Cimex hemipterus*)에 대해서 비교적 높은 농도(약 1,000 ppm)의 이산화염소 훈증 처리는 속효성의 방제 효과를 나타냈다 (Gibbs et al., 2012). 이를 거짓쌀도둑거저리와 화랑곡나방의 저곡해충 방제에 비교적 낮은 농도(200 ppm)를 적용하여 완전 방제 효과를 나타냈다(Kim et al., 2015; Kumar et al., 2015). 이러한 이산화염소의 살충력은 이 물질이 생체 내에서 생성하는 활성산소(reactive oxygen species)에 기인된다. 활성산소는 체 내에서 환원력을 발휘하는 효소들에 의해 제거될 수 있지만, 한계 이상의 농도에 노출되면 생체 내 다양한 부위에서 생리교란을 유발하게 된다. 이산화염소 처리 농도에 따라 곤충의 세포내에서는 높은 농도의 활성산소가 형성되고 이에 따라 살충력이 증가하였다. 반면에 항산화제를 첨가할 경우에는 이산화염소의 살충력이 낮아졌다. 이산화염소의 활성산소 발생 기능은 항바이러스 및 세포독성으로도 나타났다(Kim et al., 2016). 두 종류의 바이러스에 대해 이산화염소는 활성산소에 기인된 항바이러스 기작을 나타냈으며, 유사하게 인체 암세포에 대한 세포독성을 나타냈다.

이산화염소의 활성산소에 기인된 세포독성은 대상 세포의 아포토시스(apoptosis) 유발에 의해 기인될 수 있다. 이는 여러 시스템에서 활성산소는 세포의 아포토시스를 유발하기 때문으로 증명되었기 때문이다. 아포토시스는 다세포 생명체에서 발육과정 중에 일어나는 프로그램된 세포자연치사 과정을 일컫는다(Elmore, 2007). 이러한 아포토시스는 개체의 방어기작으로서 외부 병원체 침입에 대한 면역반응 또는 위험한 물질의 노출에 대해서 세포가 피해를 받게 될 때에도 일어난다(Norbury and Hickson, 2001). 본 연구는 이러한 기반 위에 이산화염소가 활성산소에 기인하여 곤충세포주의 아포토시스를 유발하는 지 그리고 이러한 아포토시스가 곤충의 혈구세포에서 일어나는지, 그리고 이러한 아포토시스 유발이 살충력에 영향을 주었는지 증명하는 데 목표를 두었다.

재료 및 방법

화랑곡나방 사육

본 연구에 사용된 화랑곡나방은 실내 누대 사육층으로 1994년 대구의 건조 채소류 저장창고에서 유래되었다. 유충은 인공 사료(800 g rice bran, 200 g 이스트 추출물, 500 mL 글리세롤, 2 g sorbic acid, 2 g methyl *p*-hydroxybenzoate)를 이용하여 온도 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 65-75%, 일장 16:8 (L:D) h 조건의 배양기에서 사육되었다. 소집단이 겪는 임의유전적부동을 줄이기 위해 매 세대 100 마리 이상의 암수를 교미시켜 차세대를 형성하였다. 성충은 10% 설탕물을 제공하였다.

이산화염소 합성

본 연구에 이용된 이산화염소는 800 ppm의 저장 용액이었다. 이 시약은 프루고팜(Suwon, Korea)에서 제공되었다. 이산화염소 저장 용액의 희석은 멸균된 100 mM 인산완충용액(pH 7.4)을 이용하였다.

이산화염소 처리에 따른 생물검정

이산화염소 액상 주입 처리는 0, 50, 100, 200, 400 및 800 ppm을 이용하였다. 혈강 주입(1 μL)은 유리 모세관을 이용하여 초미량펌프가 장착된 미세조정장치(SYS-microcontroller, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 주입하였다. 유리 모세관은 micropipette puller (PN-30, Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 제조하였다. 각 농도 처리는 3 반복으로 실시하였으며, 각 반복은 10 마리의 5령충을 대상으로 실시하였다. 처리 후 25°C 실내 조건에서 24 시간 방치 후 사망률을 조사하였다. 사망 판정은 핀셋으로 복부를 가볍게 눌렀을 때 자의적 행동이 없는 상태로 규정하였다.

아포토시스 분석법 - Sf9 세포에 대한 이산화염소 처리 효과

TUNEL 분석법을 이용한 아포토시스 정량화는 Abcam (Cambridge, UK)의 ab66110 제품인 In situ BrdU-Red DNA Fragmentation Assay Kit을 이용하였다. 간략하게 서로 다른 이산화염소 농도(0-50 ppm)를 Sf9 세포 배양액에 24 시간 처리하였다. 아포토시스를 확인하기 위한 대조구 세포(Abcam, Cambridge, UK)는 이산화염소의 추가 처리를 진행하지 않았

다. 처리된 세포(1×10^5)를 0.5 mL의 인산완충용액(100 mM phosphate buffered saline: PBS, pH 7.4)에 현탁시키고 4% (w/v) formaldehyde 용액 5 mL을 첨가하여 얼음 위에서 15 분간 고정시켰다. 고정액을 제거하기 위해 3 분간 원심분리($300 \times g$) 후 1×10^6 개 세포를 1차 세척완충용액(Abcam)으로 2 회 세척한 후 50 μ L의 DNA 표지용액(10 μ L terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT) 반응완충용액, 0.75 μ L TdT 효소, 8 μ L BrdUTP, 32.25 μ L 탈이온증류수)에 현탁시키고 37°C에서 60 분간 반응시켰다. 이후 2차 세척완충용액(Abcam)으로 2 회 세척한 후 0.1 mL의 항체반응용액(Anti-BrdU-Red Antibody 5 μ L Rinse Buffer 95 μ L)을 첨가한 후 실내 암 조건에서 30 분간 반응시켰다. 이후 PBS로 2 회 세척 후 슬라이드 옮겨 형광현미경 (DM 2500, Leica, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다. 세포 전체 관찰은 Bright field (BF) 모드를 이용하였고, DNA 절편을 관찰하기 위해 rhodamine 필터를 이용하였다. 모든 현미경 자료는 400 배의 배율에서 확인하였다.

아폽토시스 분석 - 총체내 혈구세포에 대한 이산화염소 처리 효과

화랑곡나방 5령충을 대상으로 서로 다른 농도(0-800 ppm)의 이산화염소 1 μ L를 혈강 주입하였다. 처리 1 일 경과 후 복부 다리를 절단하고 나오는 혈림프를 수거하였다. 수거된 혈림프 (약 100 μ L)는 900 μ L의 항응고용액(1.32% sodium citrate, 0.48% citric acid, 1.47% dextrose, pH 4.5)과 혼합하고 얼음 위에서 20 분간 반응 후 다시 곤충세포배양용액(TC-100 insect cell culture medium, Hyclone, Daegu, Korea)에 현탁시켰다. 이후 혈구세포의 DNA 절편을 관찰하기 위한 방법은 앞에서 기술한 방법과 동일하게 적용하였다. 혈구세포의 경우 핵을 형광 현미경으로 관찰하기 위해 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Scientific, Meridian, Rockford, USA)을 1:1,000의 희석 비율로 하여 상온에서 2 분간 염색시켰다. 형광현미경 관찰은 BF, rhodamine 및 DAPI 필터를 이용하여 세포, DNA 절편 및 핵을 각각 관찰하였다. 아폽토시스의 나타내는 세포 비율 결정은 임의로 100 개의 세포를 선택하고 여기에서 적색의 형광을 보이는 세포를 계수하여 백분율로 환산하여 산출하였다. 이러한 계수는 3 회 반복하였다.

비타민 E 처리

본 연구에 이용된 비타민 E는 Sigma-Aldrich Korea (Seoul, Korea)에서 제공된 α -tocopherol을 사용하였으며 dimethyl

sulfoxide (Amresco)를 이용하여 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mM로 희석하였다. 화랑곡나방 5령충에 대한 비타민 E 처리는 1 μ L 부피로 이산화염소 처리와 함께 혈강 주입되었다. 각 처리 농도는 3 회 반복 처리되었다. 살충율 검정에는 반복 당 10 마리를 처리하였다.

통계분석

모든 살충효과 및 아폽토시스 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균 간 비교를 실시하였다. 평균간비교는 SAS의 ANOVA 분석에서 제공되는 DUNCAN의 다중평균 간비교법을 이용하였다. 이때 제1형 오류의 확률(α)은 0.05이었다.

결과

Sf9 세포주에 대한 이산화염소의 아폽토시스 유발 효과

화랑곡나방의 혈구세포에 대한 세포치사효과를 분석하기 위해 우선 이산화염소의 농도별 살충효과를 분석하였다(Fig. 1A). 이산화염소의 살충효과는 처리된 가장 낮은 농도인 50 ppm 수준에서 나타났으며 주입 농도가 증가함에 따라 살충효과는 증가하였다. 이러한 양독 반응을 기준으로 뚜렷한 살충효과를 보이는 100 ppm의 이산화염소를 화랑곡나방의 혈강에 주입하고 시기별로 진행되는 전체혈구수의 변화를 추적하였다 (Fig. 1B). 전체 혈구수는 처리 1 일 후에 본래의 약 60% 수준으로 감소하였다. 이러한 낮은 상태의 혈구수는 살충효과가 나타나는 4 일 까지 지속하였다. 본 결과는 이산화염소가 화랑곡나방의 혈구세포에 대한 세포독성을 지닌다는 기존 결과를 뒷받침하였다. 이러한 이산화염소의 세포치사효과가 아폽토시스에 의해 이뤄지는지를 이후 연구에서는 TUNEL 분석 방법으로 진행하였다.

이산화염소의 아폽토시스 유발효과는 Sf9 세포주를 이용하여 관찰하였다(Fig. 2). 본 연구에 이용된 TUNEL 분석의 아폽토시스의 판별력을 판정하기 위해 두 가지 양성 및 음성 대조구에 대해서 분석을 실시하였다. 양성 대조구세포는 본 연구에 이용된 TUNEL 분석 키트로 처리한 결과 형광현미경의 rhodamine 모드에서 붉은 양성 반응을 보였다. 반면에 동일 조건으로 처리되고 관찰된 음성 대조구 세포는 이러한 형광 반응이 전혀 나타나지 않았다. 이러한 판별력 위에 서로 다른 이산화염소 농도를 Sf9 세포에 처리하고, 24 시간 경과 후에 TUNEL 분석을 실시

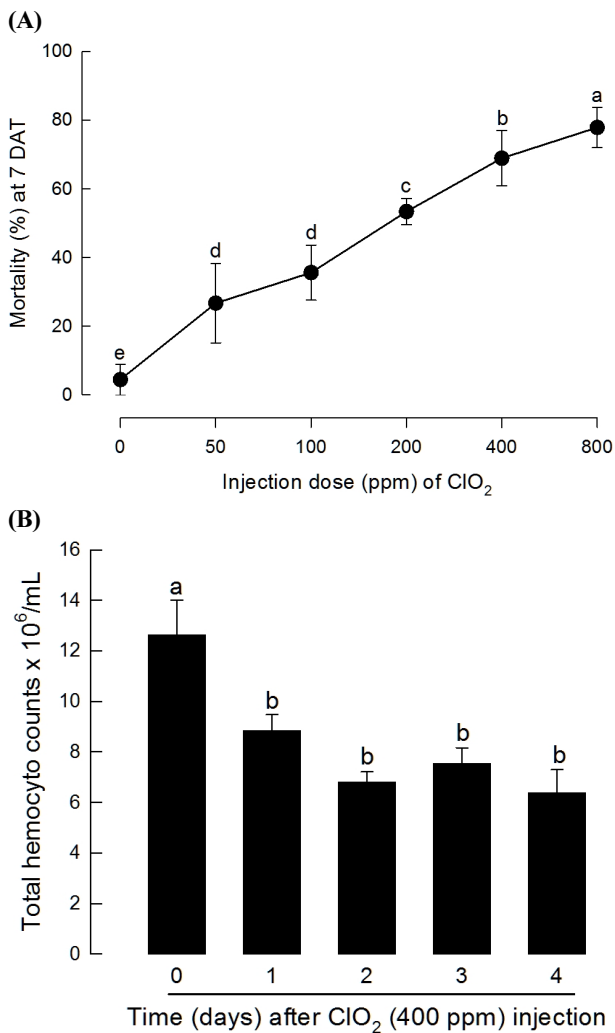


Fig. 1. Cytotoxicity of chlorine dioxide against *P. interpunctella* larvae by hemocoelic injection. (A) Toxicity of chlorine dioxide, in which different concentrations of chlorine dioxide were injected in 1 μ L volume. Mortality was measured at 7 days after treatment (DAT). Each dose was treated to 10 fifth instar larvae. Each dose treatment was replicated three times. (B) Influence of chlorine dioxide (400 ppm) on total hemocyte counts of the fifth instar larvae. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I = 0.05 (Duncan multiple range test).

하였다. 눈에 띄는 형광신호는 20 ppm의 농도 이상에서 나타났으며, 40 ppm 이상에서는 거의 모든 세포에서 형광을 나타냈다. 일부 세포에서는 아포토시스의 특징적인 모양 변화인 세포 부풀음(blebbing)의 모습이 관찰되었다.

화랑곡나방 혈구세포에 대한 이산화염소의 아포토시스 유발 효과

Sf9 세포주에서 일어난 아포토시스가 화랑곡나방의 총체 내에

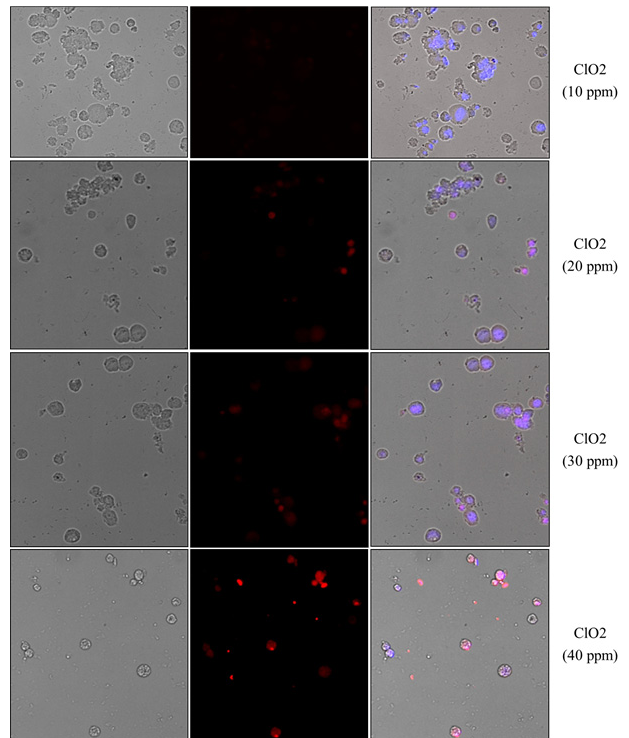


Fig. 2. Influence of chlorine dioxide on induction of apoptosis in Sf9 cells. DNA damage was assessed by TUNEL method. (A) Control test of TUNEL assay. Both positive and negative control cells provided from Abcam (Cambridge, UK) were analyzed. (B) Effect of different concentrations of chlorine dioxide on Sf9 cells by incubation for 24 h. Immunofluorescence assay of bromo deoxyuridine ('BrdU') was detected by its monoclonal antibody in a rhodamine mode of a fluorescence microscope (DM 2500, Leica, Wetzlar, Germany) at 400 x magnification. Nuclei were stained with DAPI (data not shown). Total cells were observed by bright field ('BF') mode. All these pictures were combined in a merged mode ('Merge').

있는 혈구세포에서도 관찰되는 지를 분석하기 위해 서로 다른 농도의 이산화염소를 주입하고 24 시간 후에 분석하였다(Fig. 3). 주입된 이산화염소의 농도가 증가할수록 TUNEL 양성 반응 신호는 증가하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3A). 이를 정량화하면, 뚜렷한 아포토시스 양성 반응이 100 ppm 이상의 이산화염소 농도에서 나타났다(Fig. 3B). 400 ppm 이상의 이산화염소 농도 처리에서는 큰 차이 없이 75-80% 혈구세포가 아포토시스 반응을 보이는 것으로 나타났다.

비타민 E의 아포토시스 억제 효과

이산화염소에 의해 나타나는 아포토시스가 이 물질이 생성시키는 활성산소에 의해 이뤄지는 지를 분석하기 위해 항산화제인 비타민 E를 처리하여 아포토시스 억제 효과를 분석하였다(Fig. 4). 앞에서 보듯 400 ppm 농도의 이산화염소 처리는 약

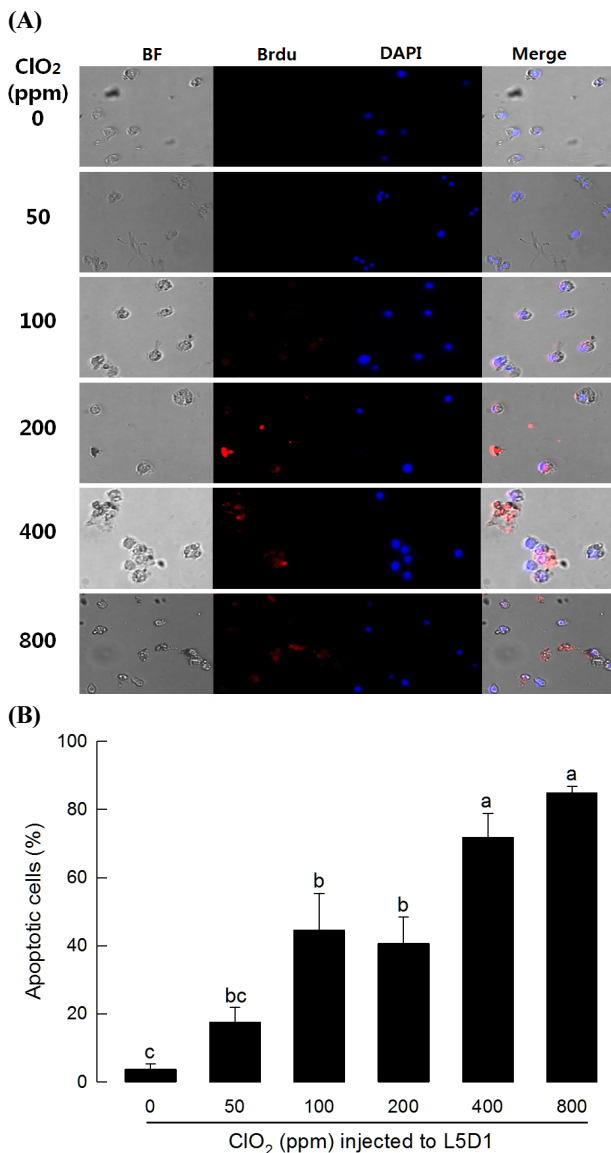


Fig. 3. Influence of chlorine dioxide on induction of hemocytes of one day old fifth instar (L5D1) larvae of *P. interpunctella*. (A) TUNEL assay of hemocytes of the treated larvae for 24 h with different concentrations of chlorine dioxide. (B) Quantification of apoptotic cells emitting rhodamine fluorescence with respect to treated doses of chlorine dioxide. Immunofluorescence assay of bromo deoxyuridine ('BrdU') was detected by its monoclonal antibody in a rhodamine mode of a fluorescence microscope (DM 2500, Leica, Wetzlar, Germany) at 400 x magnification. Nuclei were stained with DAPI (data not shown). Total cells were observed by bright field ('BF') mode. All these pictures were combined in a merged mode ('Merge'). Each treatment dose was replicated three times. In each measurement, 100 cells were randomly chosen and counted in number of fluorescent cells. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I = 0.05 (Duncan multiple range test).

75% 이상의 아포토시스를 유발하였다(Fig. 4A). 특별히 핵의 위치를 알려주는 DAPI 염색은 TUNEL 분석 신호가 핵을 중심

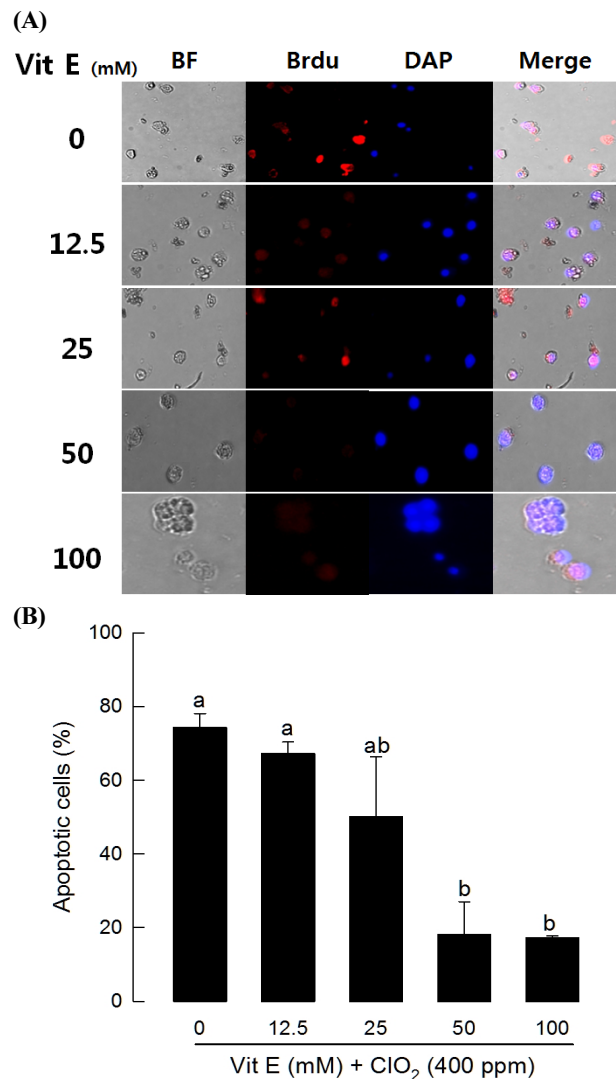


Fig. 4. Inhibitory effect of vitamin E (Vit E) on apoptosis induced by chlorine dioxide in hemocytes of *P. interpunctella*. Chlorine dioxide and Vit E were co-injected to hemocoel of one day old fifth instar larvae with each 1 μ L volume. (A) TUNEL assay of hemocytes of the treated larvae for 24 h with different concentrations of Vit E plus 400 ppm of chlorine dioxide. (B) Quantification of apoptotic cells emitting rhodamine fluorescence. Immunofluorescence assay of bromo deoxyuridine ('BrdU') was detected by its monoclonal antibody in a rhodamine mode of a fluorescence microscope (DM 2500, Leica, Wetzlar, Germany) at 400 x magnification. Nuclei were stained with DAPI (data not shown). Total cells were observed by bright field ('BF') mode. All these pictures were combined in a merged mode ('Merge'). Each treatment dose was replicated three times. In each measurement, 100 cells were randomly chosen and counted in number of fluorescent cells. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I = 0.05 (Duncan multiple range test).

으로 일어나는 것을 보여 주었다. 이러한 아포토시스 유발 효과는 비타민 E의 처리 농도가 높아짐에 따라 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 4B). 통계적으로 뚜렷한 감소는 비타민 E의 농

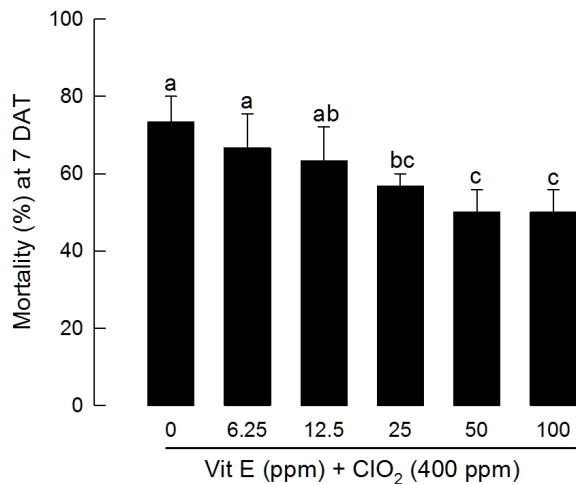


Fig. 5. Rescue effect of vitamin E (Vit E) on insecticidal activity of chlorine dioxide against *P. interpunctella*. Different concentrations of Vit E were co-injected with 400 ppm of chlorine dioxide to one day old fifth instar larvae. Both chemicals were injected with each 1 μ L volume per larva. Mortality was measured at 7 days after treatment (DAT). Each dose was treated to 10 larvae. Each dose treatment was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I = 0.05 (Duncan multiple range test).

도가 50 mM 이상을 처리하였을 때 나타났다.

이산화염소의 아포토시스 유발효과와 살충효과를 기능적으로 연결시키기 위해 서로 다른 농도를 처리하고 사망률 감소 효과를 분석하였다(Fig. 5). 400 ppm의 이산화염소를 처리한 결과 앞에서 보듯 높은 살충효과를 보였다. 그러나 비타민 E를 함께 처리한 결과 비타민 E의 농도가 높아짐에 따라 살충력의 감소를 나타냈다. 통계적으로 뚜렷한 살충력 감소 효과는 25 mM 이상에서 나타났다.

고찰

본 연구는 이산화염소의 살충 기작을 탐구하는 일련의 연구 과정의 일환으로 수행되었다. 기존의 연구는 이산화염소가 발생시키는 활성산소가 살충 효과를 주는 주요 치사 인자로 추정하였다(Kumar et al., 2015). 본 연구는 이산화염소의 살충기작 물질인 활성산소가 세포독성을 보이며, 이러한 세포독성은 대상 곤충 세포의 아포토시스를 유발함으로 초래된다는 것을 보여준다.

기존의 연구와 같이 본 연구에서도 이산화염소는 총체로 주입할 경우 뚜렷한 살충효과를 재확인하여 주었다. 비록 50 ppm의 낮은 농도로 주입하여도 살충효과가 나타나지만, 이후 혈구 세포독성 연구에서는 400 ppm의 이산화염소 농도를 기반으로 실시하였다. 이 농도를 처리하고 전체혈구수를 분석한 결과 처

리 후 1 일 이후부터 뚜렷한 혈구수 감소를 나타냈는데 이는 이산화염소의 살충작용이 일어나는 4 일 이후 보다 빠른 시기에 총체 내에서는 세포치사를 유발시키고 있다는 사실을 내재하고 있다. 본 연구에서는 혈구세포를 대상으로 세포독성을 분석하였지만, 체내 여러 세포에서 이러한 세포독성 작용이 가능하였을 것이고 이에 따라 이산화염소는 살충효과를 나타냈을 것으로 추정된다.

Sf9 세포주를 이용한 기내시험과 화랑곡나방 혈구세포를 대상으로 한 총체 시험 모두에서 이산화염소의 세포치사효과는 아포토시스 유발에 기인된 것으로 TUNEL 분석 결과는 제시하고 있다. TUNEL 분석 기술은 DNA 절편화를 관찰하기 위한 것으로 조각으로 주로 아포토시스 후반기에 일어나는 절단된 DNA 말단에 terminal deoxynucleotidyl transferase에 의해 형광으로 표지된 dUTP를 연결하면서 dUTP에 특이적 단일항체로 관찰하게 하였다(Gavrieli et al., 1992). 이러한 DNA 절편화는 다른 세포 치사와 구분되는 아포토시스의 특징적 세포 변화의 일종이다. 아포토시스는 외상적 피해에 따라 나타나는 세포괴사(necrosis)와는 구분지어 아포토시스는 특징적 세포 모양 변화를 수반하게 된다. 즉, 아포토시스를 겪는 세포는 DNA 절편화, 염색사 응축, 핵 조각화 및 세포막에 부풀음(blebbing)의 특징적 모습을 보이게 된다. 근본적으로 세포괴사는 에너지 합성 억제 또는 세포막 손상으로 통해 세포조절에 필요한 에너지 부족에 따른 절제 능력이 상실된 상태에서 비롯된 과정이라면 아포토시스는 절제되고 에너지 의존적 과정으로 대별될 수 있다(Zeiss, 2003). 이러한 아포토시스 과정 중에는 다양한 생화학적 변화가 일어난다. 아포토시스를 진행하는 세포에서는 광범위한 단백질 상호 연결이 일어나는데 이는 transglutamase의 활성화에 기인된다(Nemes et al., 1996). 또한 칼슘과 마그네슘의 도움에 따라 활성화된 핵산분해효소는 DNA를 180-200 bp 길이로 조각화한다(Bortner et al., 1995). 또 다른 생화학적 특징으로 아포토시스 세포가 세포 표면에 다른 세포에 의해 포식되는 신호를 발현시키는 과정이다. 이러한 신호에 인지질인 phosphatidylserine이 세포막의 이중층 가운데 외막으로 돌출되어 생성하는 것으로 포함한다(Bratton et al., 1997). 또 다른 표지로서 Annexin I과 calreticulin을 포함한다. Annexin V는 phosphatidylserine을 인식하여 결합하는 단백질로서 아포토시스 세포를 찾아내는 데 역할을 담당하게 된다(Arur et al., 2003). Calreticulin은 곤충의 지질운송단백질인 저밀도 리포포린의 수용체 연계 단백질로서 phosphatidylserine과 동력 작용을 발휘하여 아포토시스 과정을 돕게 된다(Gardai et al., 2005). 이러한 두 가지 중요한 세포 변화가 본 연구에서 유발되었다. 즉, 세포 부풀음이 관찰되었고, DNA 절편화가 TUNEL 분석법으로

나타났다. 따라서 이산화염소는 곤충 세포 치사를 유발하는 데 아폽토시스 과정을 야기하는 것으로 판단된다.

본 연구는 비타민 E 처리는 곤충 세포의 아폽토시스 유발을 억제하였다. 비타민 E는 높은 항산화제로서 활성산소의 작용을 길항적으로 억제하는 것으로 알려지고 있다(Herrera and Barbas, 2001). 아폽토시스는 여러 조절자에 의해 통제받게 되고 또 야기된다. 아폽토시스를 유발하는 데에는 크게 외부신호 과정과 내부신호과정의 두 가지 경로로 이뤄진다. 내부 유기회로는 세포자체에서 스트레스를 감지하고 세포 자신을 치사시키는 경우이고, 외부 유기회로는 주변 세포에서 기인된 신호에 의해 세포치사를 유발하는 경우이다. 두 경우 모두는 아폽토시스와 연계된 캐스페이즈(caspase) 단백질 분해효소를 활성화할 동반하게 된다. 캐스페이즈는 아스팔릭산(aspartic acid) 위치에서 단백질의 펩타이드 결합을 분해하는 효소로서 아폽토시스 연계 캐스페이즈가 활성화되면 비가역적으로 세포치사가 야기된다. 현재까지 10 개의 주요 캐스페이즈가 알려지고 이를 크게 시작 캐스페이즈(caspase-2,-8,-9,-10), 실행 캐스페이즈(caspase-3,-6,-7) 그리고 염증 캐스페이즈(caspase-1,-4,-5)로 분류한다(Cohen, 1997; Rai et al., 2005). 외부신호과정은 외부의 아폽토시스 유기 인자와 대상 세포막에 존재하는 tumor necrosis factor (TNF) 수용체 유전자군에 속하는 치사수용체(death receptor)와의 결합을 통해 치사 신호를 세포내부로 전달하게 된다(Locksley et al., 2001). TNF 수용체 유전자군은 cysteine 아미노산이 많은 세포밖영역을 지니고 세포안영역에는 약 80 개 아미노산으로 이뤄진 “치사영역”을 띠게 된다(Ashkenazi and Dixit, 1998). 현재까지 밝혀진 치사수용체와 이에 특이적 리간드는 FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 그리고 Apo2L/DR5를 포함한다(Chicheportiche et al., 1997; Peter and Kramer, 1998; Suliman et al., 2001; Rubio-Moscardo et al., 2005). 일단 수용체와 리간드 사이에 결합이 일어나면 세포내 연결단백질(adapter protein)인 FADD (FasL/FasR 경우) 또는 TRADD (TNF- α /TNFR1 경우)를 활성화하게 된다(Hsu et al., 1995; Wajant, 2002). FADD는 수용체 이량화(dimerization)를 통해 procaspase-8와 연결되고 치사유기신호복합체(death-inducing signaling complex)를 이뤄 procaspase-8이 활성화를 유도하게 한다(Kischkel et al., 1995). 활성화된 caspase-8는 아폽토시스의 실행 캐스페이즈를 활성화하게 된다. 반면에 치사 수용체는 더 이상의 아폽토시스 신호 유발을 억제하기 위해 c-FLIP 이 FADD와 caspase-8과 결합하여 불활성화시킨다(Kataoka et al., 1998; Scaffidi, 1999). 내부신호과정은 세포막 수용체의 작용 없이 세포내부에서 일어나는 신호과정으로 미토콘드리아 내막의 변화를 유발하는 과정이다. 음성적 조절과정은 세포내

아폽토시스를 억제하는 인자를 낮추어 세포치사를 유발하는 과정을 일컫는다. 반면에 양성적 조절과정은 방사선, 독소, 무산소, 고열, 바이러스 침입 및 활성산소 등의 유기인자를 포함하게 된다. 두 과정은 모두 미토콘드리아 흡수 통로(mitochondrial permeability transition)를 열어, 미토콘드리아 막전위를 상실하게 하고 이를 통해 두 종류의 아폽토시스 유발 인자를 세포질로 방출하게 된다(Saelens et al., 2004). 이 가운데 첫 번째 종류는 cytochrome c, Smac/DIABLO 그리고 세번째 단백질 분해효소인 HtrA2/Omi를 포함한다(Du et al., 2000; Garrido et al., 2006). 이들은 캐스페이즈 의존적 미토콘드리아 아폽토시스 유발 과정을 활성화한다. Cytochrome c는 procaspase-9 뿐만 아니라 Apaf-1과 결합하여 이들을 활성화한 후 아폽토시스결합체(apoptosome)를 이룬다(Chinnaiyan, 1999; Hill et al., 2004). Smac/DIABLO와 HtrA2/Omi는 IAP (inhibitors of apoptosis proteins) 활성을 억제하여 아폽토시스를 유발하게 된다(van Loo et al., 2002; Schimmer, 2004). 두 번째 종류의 미토콘드리아 방출인자는 아폽토시스 후기에 일어나며 AIF, endonuclease G 그리고 CAD를 포함한다. AIF는 핵으로 들어가 DNA 절편을 유도하고 염색사 응축을 유발시킨다(Joza et al., 2001). Endonuclease G도 핵으로 이행하여 염색사를 절단하여 DNA 절편화를 유도한다(Li et al., 2001). CAD는 염색사 응축에 관여한다(Enari et al., 1998). 한편 Bcl-2 유전자군은 아폽토시스 과정에 관여하여 일부는 미토콘드리아 막 흡수도를 유지시켜 cytochrome c의 방출을 억제하는 anti-apoptosis 인자로 작용한다(Cory and Adams, 2002). 외부 및 내부신호과정을 통해 실행 캐스페이즈를 활성화하게 되면 비로서 아폽토시스가 일어나게 된다. 실행 캐스페이즈는 세포질에 존재하는 핵산분해효소를 활성화하여 핵 물질을 분해하고 단백질 분해효소를 활성화하여 핵과 세포 골격을 분해한다(Slee et al., 2001). Caspase-3는 가장 중요한 실행 캐스페이즈로서 어떠한 시작 캐스페이즈에 의해서도 활성화가 이뤄진다. Caspase-3는 특히 핵산분해효소인 CAD의 억제자인 ICAD를 분해시켜 CAD를 활성화하게 된다(Sakahira et al., 1998). CAD는 이때 핵내 염색체 DNA를 분해시키고 염색사응축을 유발시킨다. Caspase-3는 세포골격을 이루는데 중심적 역할을 담당하는 gelsolin을 분해하여 세포골격의 와해를 통해 아폽토시스 몸체(apoptotic bodies)를 세포로부터 분리시킨다(Kothakota et al., 1997). Caspase-3는 caspase-8과 더불어 아폽토시스 몸체의 세포막에 phosphatidylserine의 돌출화를 유도하여 주변 포식세포에 의한 포식작용을 도와주게 된다(Bratton et al., 1997). 따라서 본 연구에서 처리된 이산화염소는 세포내 활성산소의 함량의 증가를 유도하고(Kumar et al., 2015), 증가된 활성산소는 화랑곡나방 혈구세포내에서

산화적 스트레스로 작용하여 아폽토시스 억제인자인 Bcl-2 또는 glutathione의 한계를 초과하여 아폽토시스를 유발한 것으로 해석된다(Cai and Jones, 1998). 아폽토시스 억제인자들의 처리 한계 이상의 활성산소는 미토콘드리아 내막의 물질 통과도를 변경시켜 cytochrome c가 세포질로 방출하게 하고 궁극적으로 실행 캐스페이즈를 활성화하여 비가역적 아폽토시스 과정을 진행하게 한 것으로 해석된다. 즉, 활성산소에 기인한 아폽토시스는 생명체의 방어기작으로서 세포자연치사과정(Matés and Sánchez-Jiménez, 2000)을 오히려 절제 한계 이상의 자가치사과정으로 전락시킨 것으로 추정된다.

이상의 결과를 통해 이산화염소의 살충효과는 이 물질이 충체 내에서 활성산소를 생성시키고 이 활성산소는 다시 곤충의 여러 세포에 아폽토시스를 유발하여 세포독성을 일으켜 궁극적으로 치사에 이르게 한 것으로 설명된다.

사 사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술 평가원의 농생명산업기술개발사업(114063-03)으로부터 지원을 받아 연구되었다.

Literature Cited

Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., Han, D.K., 2003. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev. Cell.* 4, 587-598.

Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidowski, J.A., 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 5, 21-26.

Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., Henson, P.M., 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.* 272, 26159-26165.

Cai, J., Jones, D.P., 1998. Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J. Biol. Chem.* 273, 11401-11404.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L., 1997. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 32401-32410.

Chinnaiyan, A.M., 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1, 5-15.

Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.

Cory, S., Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647-656.

Don, G., 1998. The chlorine dioxide handbook. *Am. Water Works Assoc.* 3-4.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501.

Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenburg, P.A., Michalak, M., Henson, P.M., 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-334.

Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G., 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13, 1423-1433.

Gibbs, S.G., Lowe, J.J., Smith, P.W., Hewlett, A.L., 2012. Gaseous chlorine dioxide as an alternative for bedbug control. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 33, 495-499.

Herrera, E., Barbas, C., 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.* 57, 43-56.

Hill, M.M., Adrain, C., Duriez, P.J., Creagh, E.M., Martin, S.J., 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J.* 23, 2134-2145.

Hinenoya, A., Awasthi, S.P., Yasuda, N., Shima, A., Morino, H., Koizumi, T., Fukuda, T., Miura, T., Shibata, T., Yamasaki, S., 2015. Chlorine dioxide is a better disinfectant than sodium hypochlorite against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68, 276-279.

Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V., 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G., Penninger, J.M., 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.

Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M.,

- Thome, M., Froelich, C.J. Tschopp, J., 1998. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.* 161, 3936-3942.
- Kim, Y., Kumar, S., Cheon, W., Eo, H., Kwon, H., Jeon, Y., Jung, J., Kim, W., 2016. Anticancer and antiviral activity of chlorine dioxide by its induction of the reactive oxygen species. *J. Appl. Biol. Chem.* 59, 31-36.
- Kim, Y., Park, J., Kumar, S., Kwon, H., Na, J., Chun, Y., Kim, W., 2015. Insecticidal activity of chlorine dioxide gas by inducing an oxidative stress to the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* 64, 88-96.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 14, 5579-5588.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- Kumar, S., Park, J., Kim, E., Na, J., Chun, Y.S., Kwon, H., Kim, W., Kim, Y., 2015. Oxidative stress induced by chlorine dioxide as an insecticidal factor to the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 124, 48-59.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X., 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Matés, J.M., Sánchez-Jiménez, F.M., 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 157-170.
- Nemes, Z., Jr., Friis, R.R., Aeschlimann, D., Saurer, S., Paulsson, M., Fesus, L., 1996. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur. J. Cell Biol.* 70, 125-133.
- Norbury, C.J., Hickson, I.D., 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 367-401.
- Peter, M.E., Krammer, P.H., 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 545-551.
- Rai, N.K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V.K., 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int. J. Low Extrem. Wounds* 4, 138-144.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J.I., Schilhabel, M., Karran, E.L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L.M., Fernandez-Luna, J.L., Pinkel, D., Dyer, M.J., Martinez-Climent, J.A., 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106, 3214-3222.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S., 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- SAS Institute, Inc., 1989. SAS/STAT user's guide. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 1541-1548.
- Schimmer, A.D., 2004. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 64, 7183-7190.
- Slee, E.A., Adrain, C., Martin, S.J., 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320-7326.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R., Srivastava, R.K., 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20, 2122-2133.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Vandenabeele, P., 2002. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ.* 9, 20-26.
- Volk, C.J., Hofmann, R., Chauret, C., Gagnon, G.A., Ranger, G., Andrews, R.C., 2002. Implementation of chlorine dioxide disinfection: effects of the treatment change on drinking water quality in a full-scale distribution system. *J. Environ. Eng. Sci.* 1, 323-330.
- Wajant, H., 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.
- Zeiss, C.J., 2003. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet. Pathol.* 40, 481-495.