

넓치 배아세포에서 tacrolimus에 의한 DNA 손상, 세포사멸 및 염증성 반응에 대한 luthione의 억제 효과

Inhibitory effect of luthione on tacrolimus-induced DNA damage, apoptosis and inflammatory response in olive flounder natural embryo cells

박상은¹, 최영현^{2*}

Sang Eun Park¹, Yung Hyun Choi^{2,3*}

¹교수, 동의대학교 한의과대학 간계내과학교실, 부산광역시 부산진구 양정로 52-57, 47227, 대한민국

²교수, 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 부산광역시 부산진구 양정로 52-57, 47227, 대한민국

¹Department of Korean internal medicine, College of Korean Medicine, Dong-eui University, Busan 47227, Korea

²Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University, Busan 47227, Korea

(Received 30 March 2022, Revised 21 April 2022, Accepted 6 May 2022)

Abstract Tacrolimus, a type of macrolide produced by *Streptomyces tsukubaensis*, is widely used as an immunosuppressant. However, continuous exposure to tacrolimus causes oxidative stress in normal cells, ultimately inducing cell injury. Therefore, this study investigated whether luthione, a reduced glutathione, could inhibit tacrolimus-induced cytotoxicity in olive flounder (*hirame*) natural embryo (HINAE) cells. According to the results, luthione significantly inhibited tacrolimus-induced reduction in cell viability in a concentration-dependent manner. Additionally, although luthione unaffected autophagy by tacrolimus, tacrolimus-induced apoptosis was significantly suppressed in the presence of luthione. Luthione also markedly blocked DNA damage in tacrolimus-treated HINAE cells, associated with the inhibition of reactive oxygen species (ROS) generation. Additionally, tacrolimus cytotoxicity in HINAE cells was correlated with increased inflammatory response, also attenuated by luthione. Collectively, these results show that at least luthione protects HINAE cells against tacrolimus-induced DNA damage, apoptosis, and inflammation, but not autophagy, by scavenging ROS. Although additional in-vivo studies are required, this study's results can be used as a basis for utilizing luthione to reduce the toxicity of fish cells caused by excessive immune responses.

Keywords : *Hirame* natural embryo cells, tacrolimus, luthione, ROS, apoptosis, inflammation

서론

글루타티온(glutathione)은 ubiquitous thiol-containing tripeptide (L-cysteine, l-glutamic acid 및 glycine)로서 세포 내 대표적인 항산화제이다[1,2]. 글루타티온

의 항산화 효과는 세포의 주요 산화 환원 조절 신호 전달 경로의 매개를 통해 세포 증식과 세포사멸(apoptosis)을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다[3,4]. 많은 선행 연구에서 글루타티온은 산화적 및 염증성 스트레스로 인한 세포 손상을 예방

* Corresponding author

Phone: +82-51-890-3319 Fax: +82-51-890-3333

E-mail: choiyh@deu.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

하는 반면, 글루타티온 의존성 효소 경로의 손실은 많은 질병의 발병 및 진행에 기여한다는 것을 보여주었다[2,5]. 특히, 세포 내 환원형 글루타티온 (reduced glutathione)과 산화형 글루타티온(oxidized glutathione)의 균형은 세포 면역 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 한다[4,6]. 최근 글루타티온의 유익한 효과는 다양한 종류의 어류에서도 보고되고 있는데, 예를 들어 잉어과 어류인 *Ctenopharyngodon idella*에서 글루타티온은 reactive oxygen species (ROS)의 생성과 lipopolysaccharide에 의한 염증성 반응이 감소시켰다[7]. 그리고 zebrafish 모델에서 식품과 오염된 환경에 주로 존재하는 유해 물질인 2-amino-3-methylimidazole[4,5-f]quinoline에 의한 간 독성은 항산화 활성에 기여하는 다양한 효소들과 염증 인자들의 발현 저하와 연관이 있었으며, 글루타티온 수준의 감소가 동반되었다[8]. 이러한 글루타티온의 활성 저하는 고콜레스테롤 식이에 노출된 zebrafish에서와 arsenic에 장기간 노출된 잉어 신장에서도 유사하였음이 보고된 바 있다[9,10]. 특히 Liu et al. [11]는 최근 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*) 근육세포에서 타우린(taurine)은 high glucose에 의한 superoxide dismutase 활성의 감소 및 산화형 글루타티온의 양을 유의적으로 개선시켰음을 보고한 바 있다. 이러한 결과들은 포유동물에서 뿐만 아니라 어류에서도 글루타티온은 산화적 및 염증성 스트레스 제어에 핵심 인자로 작용할 수 있음을 의미한다.

대표적인 calcineurin 억제제인 tacrolimus (FK506)는 *Streptomyces tsukubaensis* 균의 발효액에서 유래한 면역 억제제로 장기이식 후 이식된 장기의 거부 반응을 억제하는 데 널리 사용된다[12,13]. 이 억제제는 T 세포 수용체 유도 림프구 활성화의 주요 조절 인자인 calcineurin 또는 calcineurin에 의해 조절되는 전사 인자의 활성을 억제하여 nuclear factor of activated T cells (NFAT)의 탈인산화 및 핵으로 전위를 방지한다[14-16]. NFAT는 림프구에서 T 세포 수용체 매개 신호에 대한 반응으로 초기 유전자 전사를 조절하는 데 중요한 전사 인자 계열이며[14,17], 이 기전을 통해 tacrolimus은 T 림프구의 과도한 활성화를 억제한다. 그러나 tacrolimus은 신독성, 고혈압, 이식 후 당뇨병 발병, 이상지질혈증 및 심혈관 위험 등을 포함한 광범위한 부작용을 나타낼 수 있다

[18,19]. 이러한 tacrolimus의 부작용은 산화적 스트레스 증가에 따른 DNA 손상 및 세포사멸과 세포자식(autophagy) 유도와 연관성이 매우 높다[20-22]. 비록 tacrolimus가 적절한 항염증 효능이 있음에도 불구하고[23,24], cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 transforming growth factor- α 와 같은 염증 유도 인자의 과도한 생성은 사구체 및 세뇨관 세포의 손상을 촉진하는 요인으로 보고되고 있다[25,26]. 특히, ROS의 과잉 생산과 연관된 미토콘드리아의 기능 손상은 tacrolimus에 의한 세포독성의 주요 원인으로 제안되었다[22,27]. 최근 본 연구실에서는 항산화 및 항염증 물질의 도출을 위한 어류 세포 검출 시스템을 정립하기 위하여 넙치 배아(flounder embryo)에서 유래된 HINAE 세포(hirame natural embryonic cells)에서 tacrolimus가 미치는 영향을 조사한 바 있다[22]. 우리의 결과에 의하면 tacrolimus는 HINAE 세포에서 ROS의 생성을 증가시키면서 DNA 손상과 미토콘드리아 기능 부전에 연계된 세포사멸을 유도하였다. 또한, 항산화 및 항염증 효능이 입증된 *Nocardia* sp.에서 분리된 항균성 macrolide 계열 물질인 nargenicin A1은 tacrolimus에 의해 유도된 HINAE 세포의 세포사멸을 유의적으로 억제하였다[22]. 따라서 본 연구에서는 어류 *in vitro* 검출 시스템으로서 HINAE 세포의 확장성을 추가로 확보하기 위하여 tacrolimus에 의한 세포독성에 미치는 환원형 글루타티온인 luthione의 영향을 조사하였으며, 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다

재료 및 방법

세포 배양 및 약물 처리

HINAE 세포는 부산대학교 정재훈 교수에게서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum (WelGENE Inc., Gyeongsan, Republic of Korea), 100 U/mL penicillin 및 100 U/mL streptomycin (WelGENE Inc.)를 포함하는 Leibovitz's L-15 배지(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 20°C 조건에서 배양하였다. Luthione[®] (DaehanNewPharm. Co., Ltd., Seoul, Republic of Korea)과 tacrolimus (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)은 dimethyl sulfide (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)에 녹여 stock solution을 만든 후, 세포 배양 배지에 적절한

농도로 희석하여 처리하였다. DMSO의 최종 농도는 세포독성이 없는 0.5%를 넘지 않게 사용하였다.

세포 생존율 분석

Tacrolimus과 luthione이 HINAE 세포의 생존에 미치는 영향은 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay로 조사하였다. 이를 위하여 HINAE 세포에 적정 농도별로 두 약물을 처리하여 24시간 동안 배양하거나, tacrolimus에 의한 HINAE 세포의 생존율 억제에 미치는 luthione의 영향을 평가하기 위해서는 luthione을 1시간 전처리한 후, 적정 농도의 tacrolimus을 첨가하여 24시간 추가 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 well에 MTT 용액(0.5 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 넣은 후 2시간 동안 반응시키고 DMSO를 첨가하여 well에 생성된 formazan을 녹였다. 그 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 각 약물 처리에 따른 세포 생존율은 대조군과 비교하여 백분율로 환산하여 제시하였다. 아울러 동일 조건에서 배양된 세포의 형태는 위상차 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 하에서 관찰하였다.

세포자식 유도의 평가

다양한 조건에서 배양된 세포에서의 세포자식 유발 여부를 평가하기 위해 Cyto-ID[®] autophagy detection kit (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY, USA)를 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. 이를 위하여 luthione을 1시간 전처리한 후, tacrolimus을 첨가하여 24시간 추가 배양한 세포를 수집하여 현탁하고, kit에 제공된 Cyto-ID 염색 용액으로 염색한 다음, 유세포 분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 세포자식이 유도를 정량적으로 분석하였다. 이와 함께, Cyto-ID 염색 후, 핵의 염색을 위하여 1.0 mg/mL의 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 10분 동안 염색하고 다시 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하였다. 각 세포의 녹색 Cyto-ID 형광 강도는 형광현미경(Carl Zeiss) 하에서 관찰하였다.

유세포 분석기를 이용한 세포사멸의 평가

상기와 동일한 조건에서 배양된 HINAE 세포의 세포사멸 유발 정도의 정량적 분석하기 위하여 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin V and propidium iodide (PI) double staining kit (Becton Dickinson)를 이용하였다. 이를 위하여 처리가 끝난 세포들을 모아서 kit에 제공된 binding buffer를 넣고 혼합한 후, annexin V/PI 용액을 첨가하여 암실에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, binding buffer를 첨가하고 유세포 분석기를 이용하여 세포사멸 유도의 빈도를 비교하였다.

핵의 형태 변화에 따른 세포사멸의 평가

추가적인 세포사멸 유도의 평가를 위하여 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. 다양한 조건에서 배양된 HINAE 세포를 모아서 PBS로 세척한 후, 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 30분 동안 실온에서 고정하였다. 고정된 세포를 5분 동안 0.1% Triton X-100 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)에 노출시킨 후, 1.0 mg/mL의 DAPI 용액으로 염색하고 PBS로 세척하고, 핵 형태 변화는 형광현미경 하에서 관찰하였다.

ROS 생성의 측정

Tacrolimus에 의한 HINAE 세포에서의 ROS의 생성에 미치는 luthione의 영향을 조사하기 위하여 tacrolimus과 luthione을 1시간 동안 단독 처리하거나, luthione을 1시간 처리한 후, tacrolimus을 처리하여 1시간 추가 배양하였다. 처리가 끝난 세포들을 PBS로 수세하고 10 μ M의 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA, Invitrogen) 용액을 첨가하여 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 유세포 분석기를 이용하여 ROS 생성 변화를 정량적으로 평가하였다.

Comet assay

Tacrolimus에 의한 HINAE 세포의 DNA 손상에 미치는 luthione의 영향을 조사하기 위하여 tacrolimus과 luthione을 24시간 동안 단독 처리하거나, luthione을 1시간 전에 처리한 후, tacrolimus을 처리하여 24시간 추가 배양하였다. 처리가 끝난 세포를 comet assay kit (Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD, USA)의 지침에 따라 0.5% low-melting agarose에 혼합하여 1.0% normal-melting agarose가 미리 코팅된 슬라이

드 위로 펼쳤다. Agarose를 응고시킨 후, 슬라이드를 덮고 lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na-ethylenediaminetetraacetic acid, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 및 10% DMSO, pH 10)에 4°C에 1시간 동안 방치하였다. 그 후, 슬라이드를 electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na-EDTA, pH 10)를 이용하여 전기영동을 실시하고, 40 g/m의 ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 염색 후, 형광현미경 하에서 관찰하였다.

Nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성에 미치는 영향 평가

Tacrolimus에 의한 염증 반응에 미치는 luthione의 영향을 평가하기 위하여 tacrolimus과 luthione을 24 시간 동안 처리하거나, luthione을 1시간 동안 전처리 한 다음 tacrolimus을 24시간 동안 처리하였다. NO의 생성은 Griess 시약(Sigma-Aldrich Chemical Co.)을 이용하여 생성된 아질산염(NaNO₂)의 양으로 측정하였으며, 이를 위하여 100 µL의 세포 배양 상층액과 동량의 Griess 시약과 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도 비교하였다. PGE₂의 생성 수준은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 세포 배양 상층액을 반응시킨 후 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

통계 처리

실험 결과의 유의성 분석을 위한 통계 처리를 위해 GraphPad Prism® version 5.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)의 one-way ANOVA를 사용하였으며, Tukey's test로 사후 검정하여 p<0.05의 값을 유의한 값으로 처리하였다.

결과 및 고찰

HINAE 세포의 생존에 미치는 tacrolimus과 luthione의 영향

Luthione이 tacrolimus 유도 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험 조건의 설정을 위하여 HINAE 세포의 생존에 미치는 tacrolimus과 luthione의 영향을 먼저 조사하였다. 이를 위하여 다양한 농

도의 tacrolimus과 luthione이 존재하는 배지에서 24 시간 동안 배양된 HINAE 세포를 대상으로 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 tacrolimus은 처리 농도 의존적으로 HINAE 세포의 생존율을 유의적으로 억제하였다. 그러나 luthione의 경우, 최고 처리 농도인 200 µg/mL 처리군에서도 세포 독성 효과는 관찰되지 않았으며, 오히려 처리 농도의 증가에 따라 유의적이지는 않았지만, 약간의 세포 생존율의 향상 효과를 보였다(Fig. 1B). 비록 본 연구에서는 luthione의 최고 처리 농도를 200 µg/mL로 제한하였으나, 대식세포를 이용한 선행 연구의 결과와 비교해 볼 때[29], 이 보다 더 높은 농도에서는 아마도 세포독성이 유발될 수 있을 것으로 추측된다. 따라서 본 연구에서 tacrolimus에 의한 세포독성 유발 농도는 60% 정도의 세포 생존율을 보인 50 nM을 최고 농도로 설정하였으며, 이에 대한 보호 효과 조사를 위한 luthione의 최고 농도는 100 µg/mL로 설정하였다.

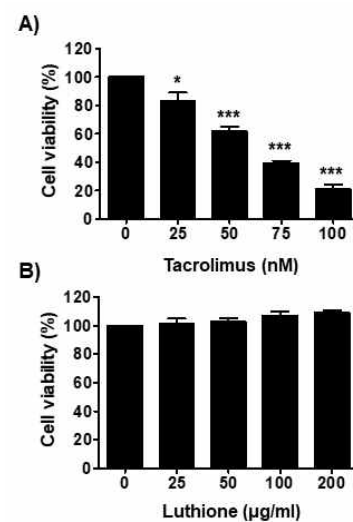


Figure 1. Effect of tacrolimus and luthione on the cell viability in HINAE cells. HINAE cells were treated with the indicated concentration of tacrolimus (0~100 nM) and luthione (0~200 µg/ml) for 24 h. And then cell viability was measured by the MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD. The statistical analyses were conducted using analysis of variance (ANOVA-Tukey's post-hoc test) between groups (*p<0.05 and ***p<0.001 when compared to control).

HINAE 세포에서 tacrolimus에 의한 세포독성 및 세포자식에 미치는 luthione의 영향

HINAE 세포에서 luthione이 tacrolimus에 의한 세

포독성을 억제할 수 있는지를 조사하기 위하여 100 µg/mL의 luthione을 1시간 동안 전처리한 후, 25 및 50 nM의 tacrolimus를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Fig. 2A에 나타난 MTT assay의 결과에 의하면, 25 nM의 tacrolimus을 처리한 세포에서는 유의적인 차이점이 없었으나, 50 nM의 tacrolimus이 처리된 세포에의 생존을 저하는 100 µg/mL의 luthione의 전처리에 의하여 유의적으로 억제되었다. Tacrolimus에 의한 세포의 손상은 세포사멸뿐만 아니라 세포자식의 유도에도 연관성이 있기 때문에[30-32] HINAE 세포에서도 tacrolimus가 세포자식을 유발하는지 관찰하였으며, 이에 미치는 luthione의 영향을 조사하였다. Fig. 2B의 결과에서 알 수 있듯이, tacrolimus이 처리된 세포에서는 세포의 밀도 감소와 함께 부유된 세포의 수가 증가하였으며, 전형적인 세포자식이 유도된 세포에서 관찰되는 공포(cytoplasm vacuolization)의 형성 빈도가 매우 증가되었다. 비록 luthione이 전처리된 조건에서 tacrolimus이 처리된 경우, tacrolimus 단독 처리군에 비하여 세포의 밀도가 높게 유지되었으나, 공포의 형성을 여전히 유지되었다 (Fig. 2B).

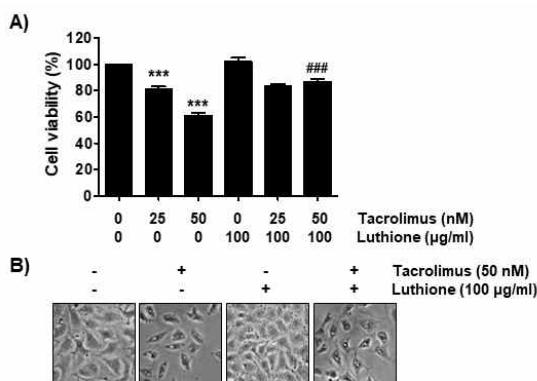


Figure 2. Luthione inhibited the decrease in cell viability in tacrolimus-treated HINAE cells. Cells were pretreated with or without 100 µg/ml luthione for 1 h and then treated with 25 or 50 nM tacrolimus for another 24 h. (A) After the MTT assay was performed and data are graphically presented as mean ± SD (**p<0.001, compared with the control group; ###p<0.01 compared with tacrolimus treatment group). (B) Morphologic changes were photographed under an inverted-microscope (x200).

이상에서 관찰된 세포의 형태학적 변화가 세포자

식에 의한 것임을 정량적으로 평가하기 위하여 동일 조건에서 배양된 세포를 Cyto ID로 염색한 후, 유세포 분석을 수행하였으나, tacrolimus에 의한 세포자식은 luthione에 의하여 유의적으로 차단되지 못하였다(Fig. 3A). 아울러 Cyto ID의 형광 강도를 형광현미경 하에서 관찰하였을 경우에도 유사한 결과로 나타났다(Fig. 3B). 이는 luthione이 tacrolimus에 의한 세포독성을 유의적으로 차단하였음에도 불구하고 세포자식 현상의 억제와는 무관함을 보여주는 것이다.

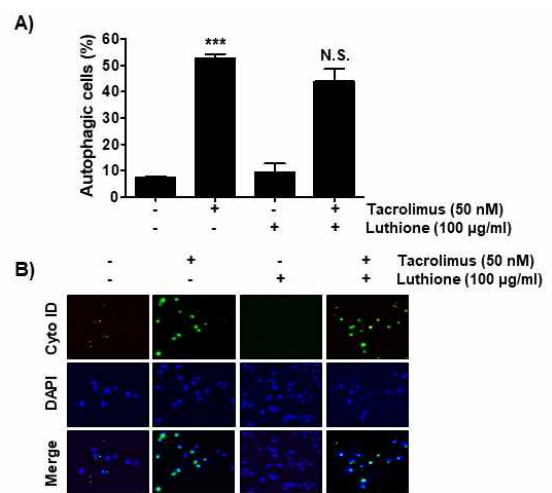


Figure 3. Luthione had no protective effect against tacrolimus-induced autophagy in HINAE cells. Cells were incubated with 100 µg/ml luthione for 1 h, and then incubated with 50 nM tacrolimus for additional 24 h. (A) Cells were stained with Cyto-ID and then analyzed using flow cytometry. The averages of the frequencies of autophagic cells were presented. Significant differences compared to the control cells (**p < 0.001, compared with the control group; N.S., not significant). (B) Cells were labeled for Cyto-ID (green) and DAPI (blue), and representative immunofluorescence images are presented.

HINAE 세포에서 tacrolimus에 의한 세포사멸에 미치는 luthione의 영향

다음은 tacrolimus에 의한 HINAE 세포에서의 세포독성 유발과 세포사멸 유도와의 연관성 및 그에 미치는 luthione의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 tacrolimus과 luthione을 각각 24시간 처리하거나, luthione을 1시간 동안 전처리한 후, tacrolimus를 추가로 처리하여 24시간 동안 배양시킨 세포를 대상으로 유세포 분석에 의한 세포사멸 유도 빈도를 정량적으

로 평가하였다. Fig. 4A에 제시한 결과에 의하면, 대조군 및 luthione의 단독 처리군에 비하여 tacrolimus이 단독 처리된 세포에서는 세포사멸 유도가 매우 증가하였음을 알 수 있다. 그러나 luthione이 존재하는 조건에서 tacrolimus을 처리하였을 경우, luthione 전처리 농도 의존적으로 세포사멸 유도 빈도가 유의적으로 감소되었다. 아울러 핵의 형태학적 변화 관찰에서도 tacrolimus은 전형적인 세포사멸이 유도된 세포에서 관찰되는 염색질의 응축과 세포 사멸체 형성을 증가시켰지만, luthione은 이를 억제시켰다(Fig. 4B). 이러한 결과는 다양한 자극에 의하여 유도된 세포사멸을 luthione이 유의적으로 차단하였다는 선행 연구 결과들과 잘 일치된다[33,34].

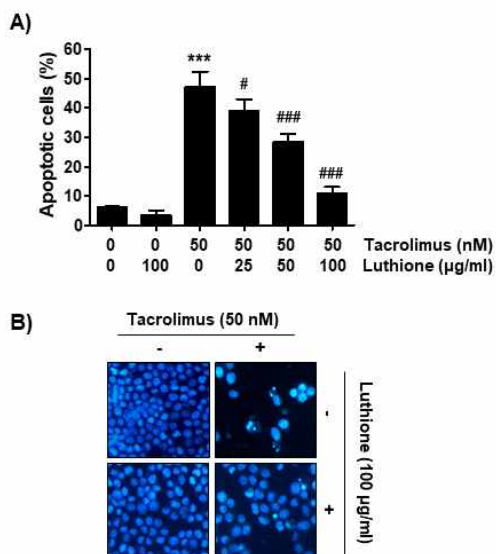


Figure 4. Luthione attenuated apoptosis in tacrolimus-treated HINAE cells. Cells were stimulated with or without 25, 50 or 100 µg/ml luthione for 1 h and then treated with 50 nM tacrolimus for another 24 h. (A) After treatment, flow cytometry with annexin V/PI dual staining was performed. All bar graphs represent mean ± SD (**p<0.001 compared with control group; #p<0.01 and ###p<0.01 compared with tacrolimus treatment group). (B) Cells were stained with DAPI for nuclear morphological observation. Representative images of DAPI-stained nuclei are shown.

HINAE 세포에서 tacrolimus에 의한 ROS 생성 및 DNA 손상에 미치는 luthione의 영향

Tacrolimus에 의한 세포 손상은 산화적 스트레스 유도와 직접 연관성이 있음은 이미 몇몇 선행연구에

서 제시된 바 있다[22,32,35]. 따라서 이상에서 관찰된 luthione의 세포독성 차단력이 산화적 스트레스 차단과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 ROS 생성의 정도를 분석하였다. 이를 위하여 DCF-DA 염색에 따른 유세포 분석을 하였으며, tacrolimus가 단독 처리된 HINAE 세포에서는 ROS의 생성이 매우 높게 증가하였지만, luthione은 이를 효과적으로 차단시켰다(Fig. 5A). 과도한 ROS의 생성에 따른 산화적 스트레스는 미토콘드리아 및 DNA 손상과 직접적인 연관성을 지닌다[36,37]. 비록 본 연구에서 tacrolimus에 의한 ROS의 생성이 미토콘드리아 손상과 직접 연관성이 있는지는 조사하지 못하였으나, tacrolimus에 의한 세포사멸은 DNA 손상과도 연계되었기에 [38,39], 이를 확인하기 위하여 개별 세포에서 DNA 가닥 파손을 측정하기 위하여 가장 널리 사용되는 방법인 comet assay를 실시하였다[40]. Fig. 5B에 제시한 바와 같이, 대조군 및 luthione 단독 처리군에 비하여 tacrolimus가 단독 처리된 세포에서는 DNA 손상의 지표인 comet tail의 형성이 뚜렷하게 관찰되어 DNA 손상이 유발되었음을 알 수 있었다. 그러나 luthione의 존재하에서는 comet tail의 길이가 매우 감소되어 DNA 손상이 차단되었음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과는 tacrolimus에 의한 HINAE 세포의 세포사멸은 ROS 생성 증가에 따른 DNA 손상과 밀접한 연관성이 있음을 의미한다.

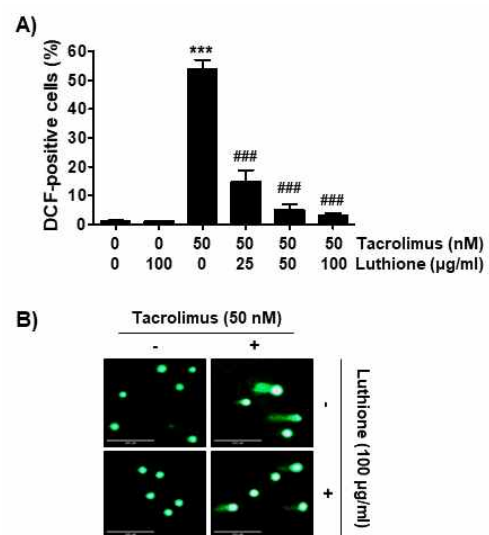


Figure 5. Luthione protected HINAE cells against tacrolimus-induced ROS generation and DNA damage. Cells were pretreated with or without 25, 50 or 100 µg/ml luthi

one for 1 h and then treated with 50 nM tacrolimus for another 1 h (A) or 24 h (B). (A) The intracellular ROS production levels were determined using flow cytometry after DCF-DA staining. Values are presented as mean \pm SD (** p <0.001 compared with the control group; #### p <0.001 compared with tacrolimus treatment group). (B) After treatment, comet assay was performed to analyze DNA damage. Representative immunofluorescence microscopic images are shown.

HINAE 세포에서 tacrolimus에 의한 염증성 반응에 미치는 luthione의 영향

염증은 일반적으로 박테리아 또는 바이러스 감염, 유해 자극 및 세포 손상과 같은 다양한 독성 또는 자극적 조건에 대한 보호 면역 반응으로 인식되지만 [41,42], 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상 및 세포 사멸과도 밀접한 연관성이 가진다[28,43]. 비록 tacrolimus은 면역 억제제로서 항염증 효능도 가지지만[44], 최근 Meyer et al. [45]은 tacrolimus에 의한 내피 전구 세포의 기능 장애 유발에 염증 반응이 동반됨을 보고한 바 있다. 이러한 과도한 염증 반응은 *in vitro* 실험계에서는 처리 조건에 따라 상이한 결과가 도출될 수 있겠지만, tacrolimus의 부작용으로 고려해야 할 주요한 사항임이 동물실험 및 간 이식 환

자에게서도 제기된 바 있다[46,47]. 따라서 본 연구에서는 HINAE 세포에서 tacrolimus에 의한 세포독성이 염증성 반응을 동반하는지와 여기에 미치는 luthione의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 대표적인 전염증 매개 인자(pro-inflammatory mediator)로 분류되는 NO와 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 두 염증성 매개 인자의 생성이 tacrolimus 처리에 의하여 유의적으로 증가된 반면, luthione은 이들의 생성을 전처리 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 6A 및 B). 이러한 tacrolimus에 대한 luthione의 항염증 효과가 luthione의 항산화 활성과 직접적인 연관성이 있는지를 추가로 확인하기 위하여 대표적인 ROS scavenger로 알려진 N-acetyl cysteine (NAC)을 전처리하였다. Fig. 6C 및 D에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, NAC의 전처리 또한 tacrolimus에 의한 NO와 PGE₂의 생성을 유의적으로 억제하였으며, NAC과 luthione을 동시에 전처리하였을 경우, 각각의 단독 전처리에 비하여 염증성 반응 억제 효과가 더욱 증가하였다. 이는 luthione의 tacrolimus에 대한 염증성 반응 억제 효과가 항산화 활성에 의한 것임을 간접적으로 시사하는 결과이다. 잘 알려진 바와 같이, NO와 PGE₂는 각각 inducible NO synthase 와

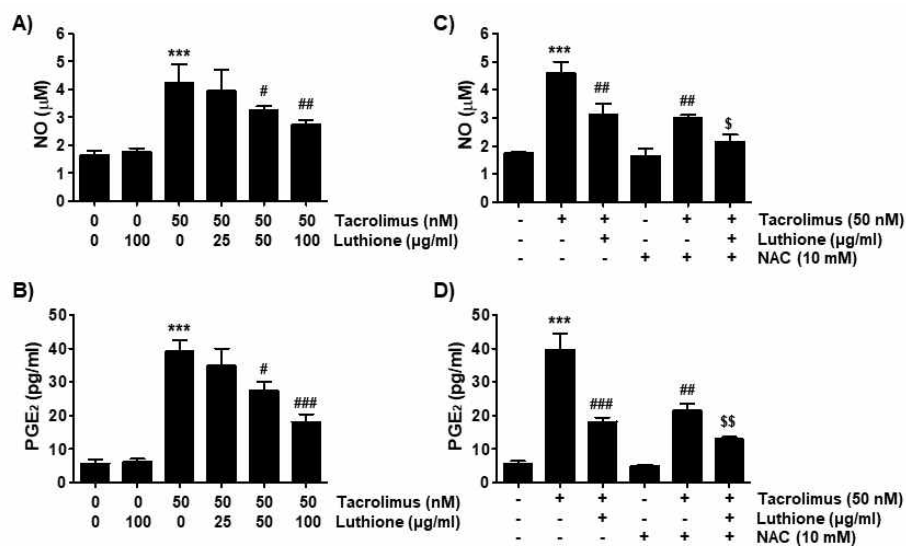


Figure 6. Luthione neutralized tacrolimus-induced inflammatory response in HINAE cells. Cells were pretreated with or without 25, 50 or 100 µg/ml luthione and/or 10 mM NAC for 1 h prior to incubation with 50 nM tacrolimus for 24 h. The levels of NO (A and C) and PGE₂ (B and D) in the culture media were measured by Griess assay and an ELISA kit, respectively. Data are expressed as the mean \pm SD obtained from three independent experiments. *** p <0.001 compared with the control group; # p <0.05, ## p <0.01 and ### p <0.001 compared with tacrolimus treatment group; \$ p <0.05 and \$\$ p <0.01 compared with tacrolimus and NAC co-treatment group.

COX-2에 의하여 생성되며, 이는 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 신호계 의존적이다[48,49]. 따라서 tacrolimus에 의한 염증성 반응 경로의 활성화에 관한 NF- κ B를 포함한 세포 내 신호계의 역할과 염증성 cytokin을 포함한 다양한 염증 유발 인자들의 연관성과 이에 미치는 luthione의 역할 재정립에 관한 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서는 HINAE 세포에서 tacrolimus에 의해 매개되는 세포독성이 DNA 손상, 세포사멸 및 염증성 반응과 직접적인 연관성이 있으며, luthione이 이를 차단한 것은 아마도 luthione의 항산화 활성화에 의한 것임을 제시하였다. 그러나 현재까지 HINAE 세포에서 다양한 세포 내 신호계의 역할을 조사할 수 있는 항체를 포함한 연구 재료의 한계로 인하여 연구의 범위가 제한적이었으며, 이는 향후 극복해야 할 과제이다. 아울러 세포자식 억제제를 이용한 추가 연구가 요구되지만, 본 연구의 결과 luthione이 세포자식 비의존적으로 세포독성을 억제하였으며, 세포자식의 유지는 아마도 세포 생존을 위한 기전으로 작용할 가능성이 높음을 시사한다. 아울러 본 연구 결과는 HINAE 세포가 산화적 및 염증성 스트레스 관련 연구를 위한 *in vitro* 시스템으로서 활용성의 가치가 매우 높을 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서 우리는 넙치 배아세포인 HINAE 세포에서 tacrolimus의 세포독성에 미치는 luthione의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, luthione은 tacrolimus에 의한 세포 생존율을 전처리 농도의존적으로 억제하였다. 비록 luthione은 tacrolimus에 의해 유도된 세포자식에는 유의적인 억제 형상을 보이지 않았지만, 세포사멸은 유의적으로 억제되었다. Luthione은 또한 tacrolimus이 처리된 세포에서 나타나는 DNA 손상을 차단하였으며, 이는 ROS 생성의 억제와 연관성이 있었다. 아울러 HINAE 세포에서 tacrolimus의 세포독성은 염증성 반응의 증가와 상관성이 있었으며, 이 또한 luthione에 의하여 감소되었다. 비록 추가적인 *in vivo* 연구가 수행되어야겠지만, 본 연구의 결과는 과도한 면역 반응에 의한 어류 세포의 독성 경감에 luthione의 적용이 가능하다는 근거로서 활용될 수 있을 것이다.

References

1. Diaz Vivancos, P., Wolff, T., Markovic, J., Pallardó, F. V. and Foyer, C. H. 2010. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem. J.* **431**, 169-178.
2. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. and Piemonte, F. 2003. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* **333**, 19-39.
3. Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E. and Tri, S. 2009. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *J. Chromatogr. B* **877**, 3331-3346.
4. Perricone, C., De Carolis, C. and Perricone, R. 2009. Glutathione: A key player in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **8**, 697-701.
5. Kerksick, C. and Willoughby, D. 2005. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2**, 38-44.
6. Filomeni, G., Rotilio, G. and Ciriolo, M. R. 2005. Disulfide relays and phosphorylative cascades: Partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ.* **12**, 1555-1563.
7. Lei, C. X., Xie, Y. J., Li, S. J., Jiang, P., Du, J. X. and Tian, J. J. 2002. Fabp4 contributes toward regulating inflammatory gene expression and oxidative stress in *Ctenopharyngodon idella*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **259**, 110715.
8. Li, D., Li, Z., Zhang, T., Peng, B., Zhang, Y., Sun, H. and Wang, S. 2021. 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline triggering liver damage by inhibiting autophagy and inducing endoplasmic reticulum stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxins (Basel)* **13**, 826.
9. Han, J., Dong, J., Zhang, R., Zhang, X., Chen, M., Fan, X., Li, M., Li, J., Zhu, J., Shang, J. and Yue, Y. 2021. *Dendrobium catenatum* Lindl. water extracts attenuate atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* **2021**, 9951946.
10. Wang, Y., Zhao, H., Liu, Y., Nie, X. and Xing, M. 2020. Zinc exerts its renal protection effect on arsenic-exposed common carp: A signaling network comprising Nrf2, NF- κ B and MAPK pathways. *Fish Shellfish Immunol.* **104**, 383-390.
11. Liu, J., Pan, M., Liu, Y., Huang, D., Luo, K., Wu, Z.,

- Zhang, W. and Mai, K. 2022. Taurine alleviates endoplasmic reticulum stress, inflammatory cytokine expression and mitochondrial oxidative stress induced by high glucose in the muscle cells of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* **123**, 358-368.
12. Klintmalm, G. B. 1994. FK 506: An update. *Clin. Transplant.* **8**, 207-210.
 13. Wallemacq, P. E. and Reding, R. 1993. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: Clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clin. Chem.* **39**, 2219-2228.
 14. Kitamura, N. and Kaminuma, O. 2021. Isoform-selective NFAT inhibitor: Potential usefulness and development. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2725.
 15. Bonner, J. M. and Boulianne, G. L. 2017. Diverse structures, functions and uses of FK506 binding proteins. *Cell. Signal.* **38**, 97-105.
 16. Wimmer, C. D., Angele, M. K., Schwarz, B., Pratschke, S., Rentsch, A. M., Khandoga, Guba, M., Jauch, K. W., Bruns, C. and Graeb, C. 2013. Impact of cyclosporine versus tacrolimus on the incidence of *de novo* malignancy following liver transplantation: A single center experience with 609 patients. *Transpl. Int.* **26**, 999-1006.
 17. Sommerer, C. and Giese, T. 2016. Nuclear factor of activated T cells-regulated gene expression as predictive biomarker of personal response to calcineurin inhibitors. *Ther. Drug Monit.* **38**, S50-56.
 18. Noble, J., Terrec, F., Malvezzi, P. and Rostaing, L. 2021. Adverse effects of immunosuppression after liver transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **54-55**, 101762.
 19. Amorese, G., Lombardo, C., Tudisco, A., Iacopi, S., Menonna, F., Marchetti, P., Vistoli, F. and Boggi, U. 2020. Induction and immunosuppressive management of pancreas transplant recipients. *Curr. Pharm. Des.* **26**, 3425-3439.
 20. Hissong, E., Mostyka, M. and Yantiss, R. K. 2022. Histologic features of tacrolimus-induced colonic injury. *Am. J. Surg. Pathol.* **46**, 118-123.
 21. Kim, H. S., Lim, S. W., Jin, L., Jin, J., Chung, B. H. and Yang, C. W. 2017. The protective effect of febuxostat on chronic tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron* **135**, 61-71.
 22. Park, C., Kwon, D. H., Hwang, S. J., Han, M. H., Jeong, J. W., Hong, S. H., Cha, H. J., Hong, S. H., Kim, G. Y., Lee, H. J., Kim, S., Kim, H. S. and Choi, Y. H. 2019. Protective effects of nargenicin A1 against tacrolimus-induced oxidative stress in hirame natural embryo cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**, 1044.
 23. Liu, G., Fan, G., Guo, G., Kang, W., Wang, D., Xu, B. and Zhao, J. 2017. FK506 attenuates the inflammation in rat spinal cord injury by inhibiting the activation of NF- κ B in microglia cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **37**, 843-855.
 24. Yu, Y., Zhong, J., Peng, L., Wang, B., Li, S., Huang, H., Deng, Y., Zhang, H., Yang, R., Wang, C. and Yuan, J. 2017. Tacrolimus downregulates inflammation by regulating pro-/anti-inflammatory responses in LPS-induced keratitis. *Mol. Med. Rep.* **16**, 5855-5862.
 25. Wang, L., Chang, J. H., Paik, S. Y., Tang, Y., Eisner, W. and Spurney, R. F. 2011. Calcineurin (CN) activation promotes apoptosis of glomerular podocytes both *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Endocrinol.* **25**, 1376-1386.
 26. Gürkan, A., Afacan, B., Emingil, G., Töz, H., Başkesen, A. and Atilla, G. 2008. Gingival crevicular fluid transforming growth factor- β 1 in cyclosporine and tacrolimus treated renal transplant patients without gingival overgrowth. *Arch. Oral Biol.* **53**, 723-728.
 27. Lim, S. W., Jin, L., Luo, K., Jin, J. and Yang, C. W. 2017. Ginseng extract reduces tacrolimus-induced oxidative stress by modulating autophagy in pancreatic β cells. *Lab. Investig.* **97**, 1271-1281.
 28. Jeon, S. H., Park, H. M., Kim, S. J., Lee, M. Y., Kim, G. B., Rahman, M. M., Woo, J. N., Kim, I. S., Kim, J. S. and Kang, H. S. 2010. Taurine reduces FK506-induced generation of ROS and activation of JNK and Bax in Madin Darby canine kidney cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **29**, 627-633.
 29. Kwon, D. H., Cha, H. J., Lee, H., Hong, S. H., Park, C., Park, S. H., Kim, G. Y., Kim, S., Kim, H. S., Hwang, H. J. and Choi, Y. H. 2019. Protective effect of glutathione against oxidative stress-induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-2/heme oxygenase-1 pathway. *Antioxidants (Basel)* **8**, 82.
 30. Ding, J., Jin, J., Lei, Y.N., Cui, S., Li, H. Y., Zheng,

- H. L., Piao, S. G., Jiang, Y. J., Xuan, M. Y., Jin, J. Z., Jin, Y. S., Lee, J. P., Chung B. H., Choi, B. S., Yang, C. W. and Li, C. 2022. Exogenous pancreatic kininogenase protects against tacrolimus-induced renal injury by inhibiting PI3K/AKT signaling: The role of bradykinin receptors. *Int. Immunopharmacol.* **105**, 108547.
31. Jiang, Y. J., Cui, S., Luo, K., Ding, J., Nan, Q. Y., Piao, S. G., Xuan, M. Y., Zheng, H. L., Jin, Y. J., Jin, J. Z., Lee, J. P., Chung, B. H., Choi, B. S., Yang, C. W. and Li, C. 2021. Nicotine exacerbates tacrolimus-induced renal injury by programmed cell death. *Korean J. Intern. Med.* **36**, 1437-1449.
32. Xu, X. S., Shao, N., Duan, X. T., Zhang, X. and Zhang, Y. F. 2018. Tacrolimus alleviates Ox-LDL damage through inducing vascular endothelial autophagy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**, 3199-3206.
33. Babaeenezhad, E., Hadipour Moradi, F., Rahimi Monfared, S., Fattahi, M. D., Nasri, M., Amini, A., Dezfoulian, O. and Ahmadvand, H. 2021. D-limonene alleviates acute kidney injury following gentamicin administration in rats: Role of NF- κ B pathway, mitochondrial apoptosis, oxidative stress, and PCNA. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 6670007.
34. Ren, J., Li, S., Wang, C., Hao, Y., Liu, Z., Ma, Y., Liu, G. and Dai, Y. 2021. Glutathione protects against the meiotic defects of ovine oocytes induced by arsenic exposure via the inhibition of mitochondrial dysfunction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **230**, 113135.
35. Jie, J., Li, W., Wang, G. and Xu, X. 2021. FK506 ameliorates osteoporosis caused by osteoblast apoptosis via suppressing the activated CaN/NFAT pathway during oxidative stress. *Inflamm. Res.* **70**, 789-797.
36. Kowalczyk, P., Sulejczak, D., Kleczkowska, P., Bukowska-Oško, I., Kucia, M., Popiel, M., Wietrak, E., Kramkowski, K., Wrzosek, K. and Kaczyńska, K. 2021. Mitochondrial oxidative stress-A causative factor and therapeutic target in many diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 13384.
37. Shi, T. and Dansen, T. B. 2020. Reactive oxygen species induced p53 activation: DNA damage, redox signaling, or both? *Antioxid. Redox Signal.* **33**, 839-859.
39. Ferjani, H., Timoumi, R., Amara, I., Abid, S., Achour, A., Bacha, H. and Boussema-Ayed, I. 2017. Beneficial effects of mycophenolate mofetil on cardiotoxicity induced by tacrolimus in wistar rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **242**, 448-455.
40. Cordelli, E., Bignami, M. and Pacchierotti, F. 2021. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicol. Res. (Camb)* **10**, 68-78.
41. Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C. C., Kandaswamy, E., Zhou, T. and Zuo, L. 2018. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Front. Physiol.* **9**, 477.
42. Aksentijevich, M., Lateef, S. S., Anzenberg, P., Dey, A. K. and Mehta, N. N. 2020. Chronic inflammation, cardiometabolic diseases and effects of treatment: psoriasis as a human model. *Trends Cardiovasc. Med.* **30**, 472-478.
43. Picca, A., Calvani, R., Coelho-Junior, H. J. and Marzetti, E. 2021. Cell death and inflammation: The role of mitochondria in health and disease. *Cells* **10**, 537.
44. Mailey, B., O'Shea, G., Romanelli, M. and West, B. 2021. Systemic immunosuppression for prevention of recurrent tendon adhesions. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open* **9**, e3834.
45. Meyer, N., Brodowski, L., von Kaisenberg, C., Schröder-Heurich, B. and von Versen-Höyneck, F. 2021. Cyclosporine A and tacrolimus induce functional impairment and inflammatory reactions in endothelial progenitor cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9696.
46. Wang, F., Wei, F., Liu, H., Wang, X., Wang, W., Ouyang, Y., Liu, J., Chen, D. and Zang, Y. 2021. Association of the IL-6 Rs1800796 SNP with concentration/dose ratios of tacrolimus and donor liver function after transplantation. *Immunol. Invest.* **50**, 939-948.
47. Ibrahim, S. A., Eltahawy, N. F., Abdalla, A. M. and Khalaf, H. M. 2021. Protective effects of selenium in tacrolimus-induced lung toxicity: potential role of heme oxygenase 1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **99**, 1069-1078.
48. Soufli, I., Toumi, R., Rafa, H. and Touil-Boukoffa, C. 2016. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **7**, 353-360.
49. Aleem, D. and Tohid, H. 2018. Pro-inflammatory cytokines, biomarkers, genetics and the immune system: a mechanistic approach of depression and psoriasis. *Rev. Colomb. Psiquiatr.* **47**, 177-186.