

Regulation of ER Stress Response on 1,2,3-Trichloropropane-Induced Hepatotoxicity of Sprague Dawley Rats

Tae Ryeol Kim^{1†}, You Jeong Jin^{1†}, Ji Eun Kim¹, Hee Jin Song¹, Yu Jeong Roh¹, Ayun Seol¹, Eun Seo Park¹, Ki Ho Park¹, Su Jeong Lim¹, Su Ha Wang¹, Yong Lim² and Dae Youn Hwang^{1*}

¹Department of Biomaterials Science (BK21 FOUR Program)/Life and Industry Convergence Research Institute/Laboratory Animal Resources Center, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, College of Nursing and Healthcare Science, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received November 22, 2023 /Revised January 25, 2024 /Accepted February 8, 2024

Endoplasmic reticulum (ER) stress responses are markedly induced during toxic responses caused by various chemical substances, including difenoconazole, but no research has been conducted on 1,2,3-trichloropropane (TCP), a chemical that is generally used in agriculture and industry, which induces hepatotoxicity. Therefore, in this study, the changes in indicators for hepatotoxicity, apoptosis, and ER stress were analyzed in TCP-treated Sprague Dawley (SD) rats to study the regulatory mechanism of ER stress during the hepatotoxicity. The TCP-treated group decreased in body weight and dietary intake compared to the vehicle-treated group, and necrosis and vacuolation increased significantly in liver histology. In addition, the expression of apoptosis-related factors, including Bax/Bcl-2 and cleaved caspase (Cas)-3/Cas-3 increased significantly in the TCP-treated group compared to the vehicle-treated group. In the analysis of ER stress response indicators, the expression of C/EBP homologous protein (CHOP), phospho-eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit (eIF2 α), and phospho-inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) increased only in the TCP100-treated group and decreased in the TCP200-treated group. However, the transcriptions of growth arrest and DNA damage-34 (GADD34) increased in the TCP200-treated group, while Spliced X-box binding protein-1 (XBP1s) and unspliced XBP1(XBP1u) decreased in the same group. These results suggest that the ER stress response is successfully triggered during the hepatotoxicity induced by TCP treatment through the alternative regulation of the unfolded-protein response (UPR) pathway.

Key words : Apoptosis, CHOP, ER stress, Liver injury, 1,2,3-trichloropropane

서 론

Endoplasmic reticulum (ER) 스트레스(stress)는 ER에 산화적 환경, 칼슘 항상성 변화 등 단백질 folding에 대한 요구가 증가되거나 folding을 방해하는 자극에 의해 ER에 unfolding 혹은 misfolding 단백질의 과도한 축적 또는 소포체 칼슘이 고갈될 때 발생하는 기능장애이다[34, 36]. 이러한 반응은 영양결핍(nutritional deficiency), 번역 후 변형(post-translational modification)의 결함, Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ERAD) 및 autophagy

와 같은 분해 경로의 비효율성, 저산소증을 유발하는 낮은 산소 수치 등에 의해 유발된다[1]. 세포는 ER스트레스를 통한 misfolding 단백질의 축적을 방지하고, 단백질의 folding ability를 복원하기 위해 unfolded-protein response (UPR)경로를 활성화시킨다. 이러한 경로는 double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase (PERK), inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), activating transcription factor (ATF) 6에 의해 매개되어 ER의 기능을 회복시킨다 [28]. 한편, ER 내에서 unfolding 단백질의 축적은 Type 1 막관통 단백질(Transmembrane proteins)인 PERK에 의해 감지된다. 이 과정에서 PERK로부터 binding immunoglobulin protein (Bip)가 방출되어 활성화되며, 활성화된 PERK는 eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α)를 인산화시키고, 단백질 번역과정을 저해하여 ER스트레스를 완화한다[34]. 또한, 인산화된 eIF2 α 는 C/EBP homologous protein (CHOP) 및 growth arrest and DNA damage-34 (GADD34)의 전사를 활성화시키는 ATF4의 번역(translation)을 촉진시키며, ER스트레스가 완화되지 않으면, CHOP는 apoptosis

[†]Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5388, Fax : +82-55-350-5389

E-mail : dyhwang@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

를 유도하게 된다. 더불어, unfolding 단백질은 Type 2 막관통 단백질인 ATF6에 의해서도 감지된다. 이러한 단백질은 unfolding 단백질이 축적됨에 따라 반응하여 BiP가 ATF6에서 떨어져 나가 ER수송에 의해 골지체(Golgi apparatus)로 이동한다. 골지체에서 ATF6는 site 1 protease (S1P)와 site 2 protease (S2P)에 의해 순차적으로 절단되어 pATF6(N)으로 변환되어 핵(Nucleus)으로 이동한다. 핵으로 이동한 pATF6(N)는 ER chaperone 유전자의 전사를 활성화한다[34]. IRE1 α 는 unfolding 단백질을 감지하는 도메인과 RNA를 분해하는 RNase 도메인으로 구성되어 있다[26]. BiP가 분리되어 활성화된 IRE1 α 는 X-box binding protein 1 (XBP1) splicing을 통해 전사인자로서 기능을 가지는 XBP1s를 생성한다. 이는 핵으로 들어가 ER chaperone, 지질 생합성 효소(Fatty acid synthesis enzyme) 등과 같은 UPR 표적 유전자의 발현을 증가시킨다. 또한, 활성화된 IRE1 α 는 ER스트레스 하에서 XBP1이외의 mRNA를 인식하여 분해를 유도한다[21]. 그러나 ER스트레스에 대해 단백질의 응집이 지속되고 스트레스가 해결되지 않으면 신호가 pro-survive에서 pro-apoptotic으로 전환되며, 결과적으로 apoptosis를 유발한다[8]. 이러한 apoptosis는 세포 수축, 미토콘드리아 막 전위(MMP)의 감소, 염색질 응축, 핵 DNA 단편화, apoptotic factor의 방출 및 caspase (Cas), Bax/Bcl-2의 활성화와 같은 특징을 나타낸다[5].

한편, 간 독성과 ER스트레스의 연관성은 이전의 일부 연구들에서만 보고되어 있다. 복합 항레트로 바이러스 치료제(Combination antiretroviral therapy, cART)에서 가장 널리 사용되는 non-nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)인 efavirenz는 apoptosis를 포함하여 간 독성을 유발하며, 이러한 과정 동안에 ER스트레스의 중요 인자인 PERK, ATF6, IRE1 α 들의 증가를 유도하였다[3]. 또한, 환경 살균제로 널리 사용되는 트리아졸(Triazole) 화합물 중의 하나인 difenoconazole은 식수 및 식품을 통해 장기간 노출되면, 간독성을 유발하며, difenoconazole을 간 세포인 HepG2에 처리하였을 때 ER스트레스가 유발되었다[37]. 한편, 1,2,3-Trichloropropane (TCP)는 산업 및 농업 생산에 주로 사용되는 화합물로 경구, 경피, 복강, 피부, 흡입 등 다양한 경로를 통해 동물에서 광범위한 급성독성(Acute toxicity)이 나타나며, 유전독성, 생식독성 및 면역독성을 유발한다[27]. 낮은 용량의 TCP는 흡입 또는 경구 투여된 마우스와 랫드에서 간 중량의 증가, 혈청효소의 증가, 간세포의 핵포화, 간세포 괴사 및 담관 증식 등 간 손상을 유도하며, 간세포선종(Hepatocellular adenoma), 간세포암(Hepatocellular carcinoma) 등을 유발하였다[11, 23]. 이러한 간 손상과정은 주요 apoptosis 과정 및 신호전달 경로에 의해 전달되었다[7, 14]. 하지만, TCP의 독성에 대한 많은 연구 결과에도 불구하고, TCP-유도 간독성과정 동안에 ER스트레스반응에 대한 연구는 현재까지 진행된 바

없다.

따라서 본 연구에서는 TCP로 유도된 급성 간독성 유발 동안에 ER스트레스반응의 조절기전에 대해 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

동물실험의 설계

본 연구에 수행된 동물실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACAU)로부터 동물실험의 윤리성과 과학성에 대한 승인(승인 번호: PNU-2021-0097)을 받아 수행하였다. 수컷 SD랫드(7주령, 250-300 g)는 Samtako Bio Korea Co. (Osan, Korea)에서 구입하여, 일주일 순화시킨 후 사용하였다. 사료와 물은 자유급식 하였으며, 실험동물은 AAALAC International (승인번호: 001525)의 인증과 식품의약품안전처에 등록된(등록 번호: 000231) 부산대학교 청정실험동물센터(온도 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 \pm 10%)에서 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 Specific pathogen free (SPF)상태에서 사육하였다.

먼저, 수컷 SD랫드(n=15)는 Vehicle 처리그룹(n=5), TCP 100 mg/kg 처리그룹(TCP100 처리그룹, n=5), TCP 200 mg/kg 처리그룹(TCP200 처리그룹, n=5)으로 분류하여 무작위로 배정하였다. Vehicle 처리그룹은 Corn Oil (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)을 48시간 내에 2회 경구 투여 하였다. TCP 처리그룹은 랫드의 체중에 따라서 100 mg/kg 혹은 200 mg/kg의 TCP (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 Corn Oil에 용해시켜서 48시간 내에 2회 경구투여 하였다. 랫드는 부검 전 12시간 동안 절식하고, CO₂를 사용하여 안락사 시킨 후 혈액을 채취하고, 간을 적출하여 분석에 사용하였다.

체중, 식이량, 음수량 변화 분석 및 장기 무게 측정

실험동물의 체중, 사료량, 음수량은 TCP를 투여하기 전에 측정하고, 48시간 내 2회 시험물질을 투여한 뒤에 측정하여 변화량을 계산하였다. 실험동물의 체중과 간 무게는 화학저울(OHAUS Corporation, NJ, USA)을 이용하여 반복 측정하였다.

조직병리학적 분석

실험동물로부터 적출한 간 조직은 10% 포르말린용액에 72시간 고정된 후, 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣은 후 조직처리기(Shandon CitaDLEI 1000, Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK)를 이용하여 고정시켰다. 고정된 조직은 paraffin embedding station (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 embedding한 후, rotary microtome (Leica Microsystems)을 사용하여 블록(Block)을 4 μ m 두께로 박절하였다. 박절한 간 조직은 H&E (Hema-

toxyling and Eosin) 용액(Sigma-Aldrich Co.)으로 염색한 후 광학현미경(Optical microscope, Leica Microsystem)을 사용하여 100, 200배율에서 관찰하였으며, Necrosis area는 Image J 소프트웨어(National Institutes of Health, Maryland, USA)를 사용하여 분석하였다.

혈청생화학적 분석(Serum Biochemical analysis)

전체 혈액(Whole blood)은 복강 정맥에서 채혈하여서 혈청분리튜브(BD Containers, Franklin Lakes, NJ, USA)로 실온에서 30분간 방치하였다. 이후 15분 동안 4,000 rpm에서 원심분리기(Labogene 1730R, GYROZEN inc., Korea)를 통해 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 혈청 내 alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) 및 alkaline phosphatase (ALP)의 농도는 BS-120 자동화학분석기(Mindray, Shenzhen, China)를 사용하여 분석하였다.

Western blot 분석

Apoptosis와 ER스트레스 관련 단백질의 발현은 Western blot을 이용하여 분석하였다. 먼저, Vehicle 처리그룹과 TCP 처리그룹의 간 조직(30 mg)은 PRO-PREP protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Sunnam, Korea)에 첨가하여 분쇄한 후, 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMART™ BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)를 이용하여 정량하였으며, 30 µg의 단백질을 전기영동에 사용하였다. SDS-PAGE gel (10-12%)에 전기영동된 단백질은 Enhanced Chemiluminescence (ECL)막(Amersham Life Science, Piscataway, NJ, USA)에 전이하고, 3-5% skim milk로 1시간 동안 블로킹하였다. 단백질이 전이된 막은 anti-β-actin (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), anti-caspase3 (Cell Signaling Technology Inc.), anti-Bax (Abcam, Cambridge, UK), anti-Bcl-2 (Invitrogen, Waltham, MA, USA), anti-CHOP (Cell Signaling Technology Inc.), eIF2α (Cell Signaling Technology Inc.), p-eIF2α (Cell Signaling Technology Inc.), CHOP (Cell Signaling Technology Inc.), p-IRE1α (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)의 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후, HRP-conjugated된 secondary anti-rabbit antibody를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science)를 사용하여 각 단백질의 발광 정도를 검출하였다.

Quantitative reverse transcription-PCR

GADD43와 XBP1s의 mRNA 수준은 Quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR)을 이용하여 분석하였다. 먼저, total RNA는 간 조직로부터 RNAzol (Tel-Test Inc., Friendswood, TX, USA)을 이용하여 추출하였고, RNA의 농도는 nanodrop 시스템(Biospecnano, Shimadzu Biotech,

Kyoto, Japan)을 사용하여 정량하였다. Complement DNA (cDNA)는 total RNA (5 µg), oligo-dT primer (Invitrogen), dNTP 및 역전사효소(Superscript II, Invitrogen)를 혼합하여 합성하였다. qPCR은 cDNA 템플릿 및 2× power SYBR Green (Toyobo Co., Osaka, Japan)을 이용하여 95°C에서 15초, 55°C에서 30초, 70°C에서 60초의 주기(Cycle)로 수행하였으며, 표적 유전자의 발현 확인을 위한 프라이머 서열은 다음과 같다: GADD34, sense primer: 5'-TAGAGAGCAA GAAGT GGAGC ACACA GC -3', anti-sense primer: 5'-CGTCA TCTTC TTCTT CTGTG TCCTC-3'; β-actin, sense primer: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3', anti-sense primer: 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'. PCR 증폭 단계 동안에 PCR 산물이 형광강도 임계값(Threshold)을 초과하는 반응주기를 임계값 주기(Ct)로 간주하였다. Livak과 Schmittgen의 방법에 따라 일정한 형광 강도에서 Ct 값의 비교를 기반으로 β-actin의 발현에 대한 표적 유전자의 발현을 정량화하였다 [17].

Semi quantitative reverse transcription-PCR

XBP1s와 XBP1u mRNA의 Splicing 수준은 Semi quantitative reverse transcription (Semi-qPCR)을 이용하여 분석하였다. Total RNA는 간 조직로부터 RNAzol (Tel-Test Inc.)을 이용하여 추출하였고, RNA의 농도는 nanodrop 시스템(Biospecnano, Shimadzu Biotech)을 사용하여 정량하였다. Complement DNA (cDNA)는 total RNA (5 µg), oligo-dT primer (Invitrogen), dNTP 및 역전사효소(Superscript II, Invitrogen)를 혼합하여 합성하였다. RT-PCR은 cDNA 템플릿, primer, 10× buffer (Roche, Basel, Switzerland), dNTP (Invitrogen), Taq polymerase (Roche)를 이용하여 95°C에서 5분간 변성 후 95°C에서 20초, 52°C에서 20초, 72°C에서 30초 주기(Cycle)로 36회 증폭을 수행하였다. 사용한 primer는 다음과 같다[16]. Spliced XBP1 (XBP1s), sense primer: 5'-TGGGCATCTCAAACCTGCTT-3', anti-sense primer: 5'-GGAGTGGTCTGTACCAAGTGGGA-3'; Unspliced XBP1 (XBP1u), sense primer: 5'-CATGGGCTTGATTGAGAA-3', anti-sense primer: 5'-TGCAGAGGCGCACGTAGT-3'. 그 후, 25°C에서 5분간 반응을 중단시켰다. 만들어진 PCR 산물은 agarose gel (2%)에 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 GelDoc (AE-9000 E-graph, ATTO, Amherst, NY, USA)을 이용하여 관찰하였다.

통계분석

Vehicle 처리그룹과 TCP 처리그룹 간의 실험결과에 대한 유의성은 One way ANOVA와 함께 사후분석으로 Tukey방법(SPSS for windows, Release 10.10, Standard Version, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다. 분석

된 결과는 모든 값을 평균± SD (Standard deviation) 로 표기하였고, *p*-value를 유의성 있는 값으로 제시하였다.

결 과

TCP에 의한 간 독성 유발

먼저, TCP가 성공적으로 SD랫드의 간독성을 유발하는지 확인하기 위하여, 주요 간독성지표인 체중, 사료 섭취량, 음수 섭취량, 간의 무게, 간의 형태, 혈청단백질 등의 변화를 측정하였다. 체중과 사료 섭취량은 Vehicle 처리그룹과 비교하여 TCP 처리그룹에서 유의적으로 감소하였으며, 음수 섭취량은 TCP 처리그룹에서 유의적으로 증가하였다(Fig. 1). 하지만, 간의 무게는 TCP 처리그룹과 Vehicle 처리그룹에서 일정하게 유지되었으며, 외형적으로 TCP 처리그룹의 간은 색상이 검붉고 어두운 색상으로 변화하였다(Fig. 1). 또한, 간독성 혈청지표인, ALT, AST의 농도는 Vehicle 처리그룹과 비교하여 TCP 처리그룹에서 유의적으로 증가하였다(Fig 1). 또한, TCP를 처리한 그룹의 H&E로 염색된 간 조직에서도 유사한 독성지표의 변화가 관찰되었다. TCP 처리그룹의 간조직에서 울혈

Categories	Vehicle	TCP100	TCP200	
Body weight (g)	331±13.41	279.86±13.60*	270.62±12.56*	
	14.55±1.36	14.65±1.40	13.84±1.31	
Liver weight (g)				
Food intake (g)	37.7±5.54	11.38±5.94*	10.63±3.24*	
Water consumption (mL)	67±9.13	280±12.16*	270±11.23*	
Liver enzymes	ALT (U/L)	60.7±8.36	120.3±23.28*	176.75±71.30*
	AST (U/L)	78.1±8.50	150.4±58.05*	411±90.80*
	ALP (g/mL)	511.9±82.03	647±110.20	623±143

Fig. 1. Level of body weight, food intake, water consumption and serum hepatotoxicity factor in TCP-treated SD rat. The body weight was measured at 48 hr after the final oral administration of TCP. Livers were collected from each rat per group and weighed as described in Materials and Methods. Food intake and water consumption were calculated by measuring the amount of feed (water) supplied and the amount of feed (water) remaining. Concentration of three liver enzymes including ALT, AST and ALP were analyzed in serum using a serum biochemical analyzer. The body weight, food intake, water consumption and liver weight were measured twice in five rats. The whole serum samples were collected from five rats, and serum biochemical analyses were assayed twice for each serum. The data are reported as the mean ± SD. *, *p*<0.05 compared to the Vehicle-treated group.

(Hemorrhage), 괴사(Necrosis), 공포화(Vacuolation) 등이 관찰되었으며, 조직괴사 부위의 증가도 확인되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 TCP는 SD랫드에서 성공적으로 간독성을 유발함을 제시하고 있으며, TCP유도 간독성을 나타내는 간 조직이 ER스트레스의 분석에 적합한 시료임을 제시하고 있다.

TCP 유발 간독성 과정동안 apoptosis의 동반

TCP에 의해 유발된 간독성 과정동안에 apoptosis가 동반되는지 확인하기 위하여, TCP 처리그룹의 간 조직에서 apoptosis관련 단백질(Bax, Bcl-2, Cas-3, Cleaved Cas-3)의 발현을 western blot을 이용하여 분석하였다. 그 결과,

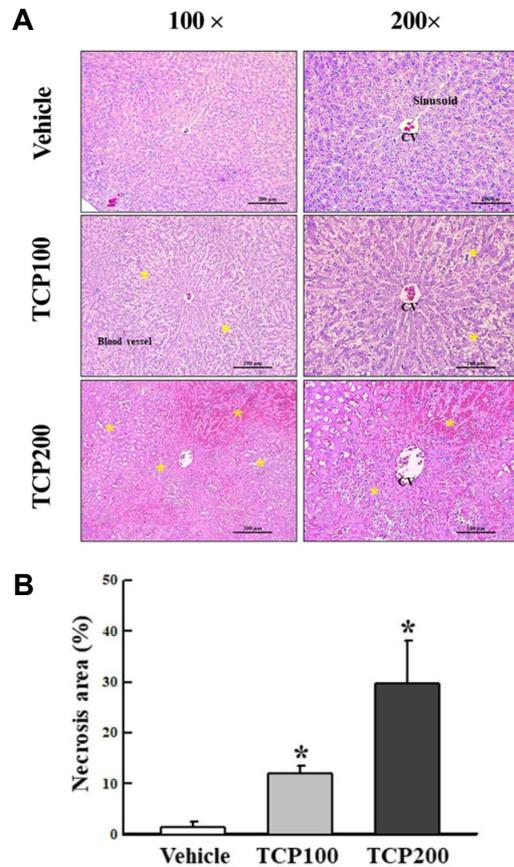


Fig. 2. Histological structure of liver in TCP-treated SD rats. (A) Histological structure. Each liver in Vehicle and TCP-treated group were stained with H&E solution, and histological structure was observed at 100× and 200× magnification. (B) Necrosis area of liver. The necrosis area indicates yellow asterisk. The necrosis area were measured as described in Materials and Methods. The H&E stained tissue sections were prepared from tissue samples from five mice per group, and the pathological factors were analyzed twice for each stained tissue. The data are reported as the mean ± SD. *, *p*<0.05 compared to the Vehicle-treated group.

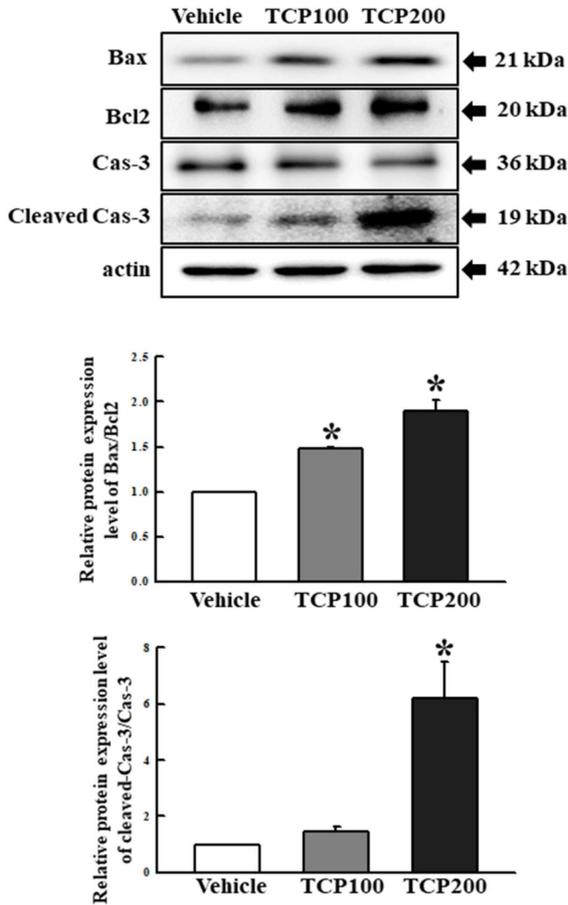


Fig. 3. Expression levels of key proteins in apoptosis signaling pathway. The expression levels of four proteins including Bax, Bcl-2, Cas-3, Cleaved Cas-3 were detected in the liver of TCP-treated SD rats. Value was defined as 1 (Vehicle-treated group) for the acquisition of other relative values. Total proteins homogenate of liver tissue were prepared from three to five rats per group and western blot analyses were assayed twice for each homogenate. Data represent the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ relative to the Vehicle-treated group.

Bax/Bcl-2 단백질의 상대적 발현은 Vehicle 처리그룹에 비해서 TCP 처리그룹에서 농도 의존적으로 증가하였고, Cleaved Cas-3/Cas-3 단백질의 상대적 발현은 Vehicle 처리그룹에 비해서 TCP 처리그룹에서 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 TCP를 처리한 SD랫드의 간 조직에서 간 독성이 증가하는 동안 apoptosis가 활성화됨을 제시하고 있다.

TCP 유발 간독성 조직에서 ER스트레스의 유도

TCP에 의해 유발된 간독성 동안 ER스트레스가 유발되는지 확인하기 위하여, ER스트레스관련 단백질(CHOP, eIF2 α , P-eIF2 α , P-IRE1 α)의 발현 및 이들의 전사조절 인자(GADD34, XBP1s, XBP1u)의 발현을 TCP로 처리된 SD랫

드의 간에서 분석하였다. 그 결과, CHOP 단백질의 발현은 TCP100 처리그룹에서 3-4배 이상 증가하였지만 TCP200 처리그룹에서는 유의적으로 감소하였다. 유사한 발현변화는 eIF2 α 의 인산화와 p-IRE1 α 의 단백질 발현에서 관찰되었다. eIF2 α 의 인산화수준과 p-IRE1 α 의 단백질수준은 Vehicle 처리그룹에 비해서 TCP100 처리그룹에서 급격히 증가하였으며, TCP200 처리그룹에서 감소하였다(Fig. 4). 또한, GADD34와 XBP1s의 mRNA 수준도 TCP처리에 의해서 유의적으로 변화되었다. TCP200 처리그룹에서 GADD34 mRNA는 Vehicle 처리그룹에 비하여 유의적으로 증가하였다. XBP1s와 XBP1u mRNA는 Vehicle 처리그룹에 비하여 TCP100과 TCP200 처리그룹에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 비록 ER스트레스를 유발하는 TCP의 농도에는 차이가 있지만, ER스트레스는 TCP유도 간 독성 동안에 유도됨을 제시하고 있다.

고 찰

산업(Industry) 및 농업(Agriculture)에서 주로 사용되는 화학물질인 TCP가 간독성을 유발하는 기전은 다양하게 연구되었다. 대부분의 이전 연구는 TCP가 랫드의 간에서 DNA 손상(DNA damage), 간세포 괴사와 같은 독성학적 특성을 나타냄을 보고하였다[11, 15]. 또한, 다양한 유형의 간 손상은 사멸반응이 관여하는 것으로 확인되었으며, 특히 apoptosis가 우세한 특징으로 나타난다고 알려져 있다[12]. 하지만 TCP가 apoptosis와 연계된 ER스트레스를 유도하는 기전에 대한 연구는 보고된 적이 없다. 따라서, 본 연구는 TCP로 유도한 간독성과정 동안에 apoptosis와 연계된 ER스트레스에 대한 작용기전을 분석하고자 하였다. 이러한 결과는 TCP로 유도된 간 독성은 apoptosis와 연계된 ER스트레스 유발과 밀접한 관계가 있음을 제시하고 있다.

Apoptosis는 프로그램된 세포 사멸의 한 형태로, 면역반응(Immune response) 또는 유해인자(Risk factors)에 의한 손상이 발생하였을 때, 방어메커니즘(Defense mechanism)으로 발생한다[5]. 이러한 메커니즘은 DNA 손상, 과도한 ROS, ER 스트레스, 여러 질병 등과 같은 수많은 조건들에 의해 유도된다[7, 31, 35]. 이러한 과정동안, pro-apoptotic 작용을 하는 Bax 단백질은 apoptosis를 증가시키는 한편, anti-apoptotic 작용을 하는 Bcl-2 단백질은 apoptosis를 감소시키게 되며, 이 두 단백질의 발현 비율이 apoptosis를 조절하는 역할을 하게 된다[19]. 또한 Bax/Bcl-2의 비율이 증가에 따라 Cas-3, 6, 7, 9의 활성화되고, apoptosis가 발생하게 된다. 더불어, apoptosis는 간 독성 및 여러 간질환에서도 특징적으로 나타났다[10]. 식량에서 자주 발견되는 오염 물질 중 하나인 deoxynivalenol (DON)은 간에서 apoptosis 관련 인자인 Cas-3, Cox-2의 발현을 증가시키고

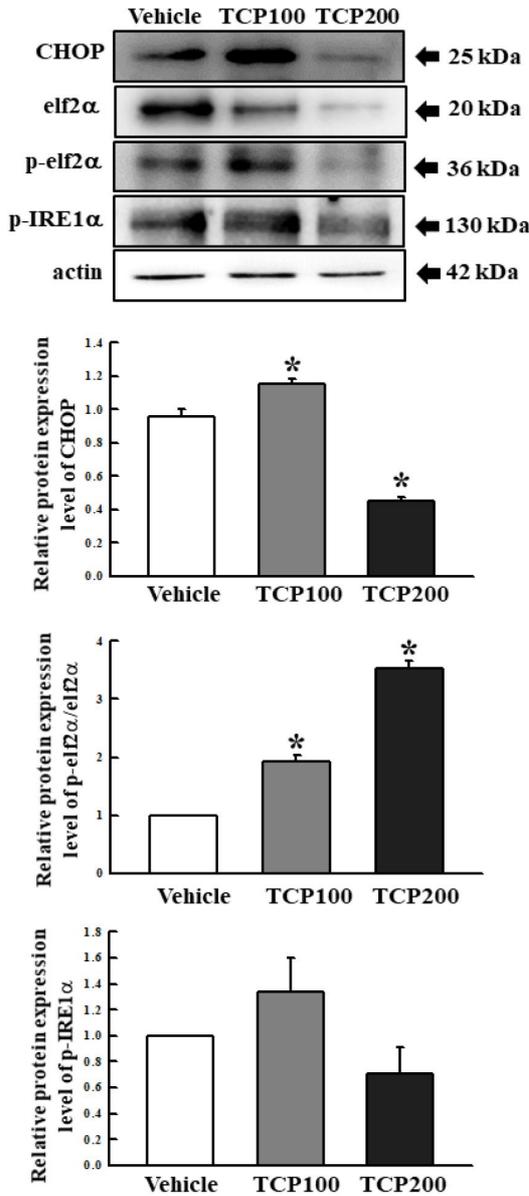


Fig. 4. Expression levels of key proteins in ER stress signaling pathway. The expression levels of four proteins including CHOP, eIF2 α , P-eIF2 α , P-IRE1 α were detected in the liver tissue of TCP-treated SD rat. Value was defined as 1 (Vehicle-treated group) for the acquisition of other relative values. Total proteins homogenate of liver tissue were prepared from three to five rats per group and western blot analyses were assayed twice for each homogenate. Data represent the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ relative to the Vehicle-treated group.

apoptosis를 유도하였다. 건선 및 난치성 아토피 피부염과 같은 자가면역 질환에 일반적으로 사용되는 의약품인 methotrexate를 처리하였을 경우에도 간 손상과 함께 apoptosis가 유도되며, Cas-3의 증가와 더불어 Bax의 증가 및 Bcl-2의 감소를 유도하였다[2, 6]. 본 연구에서는 간독

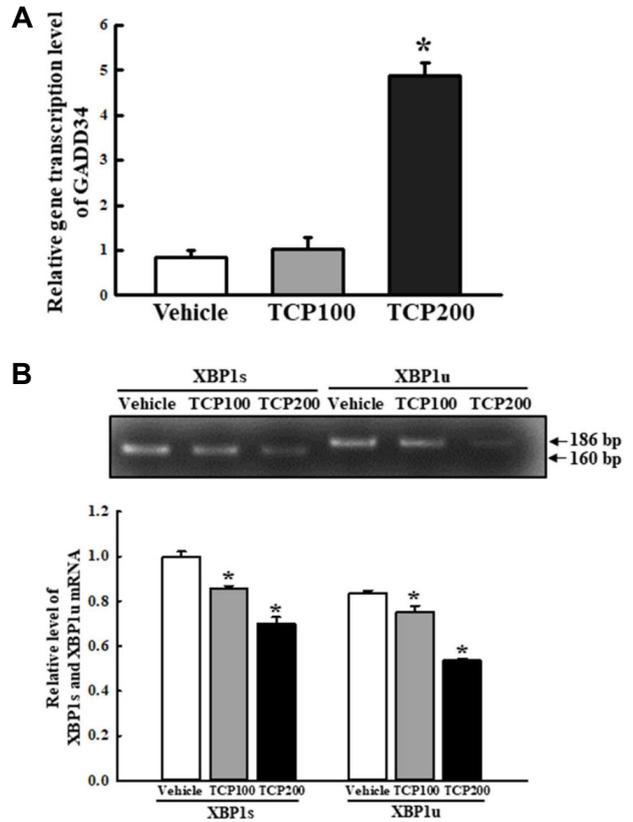


Fig. 5. mRNA levels of three ER stress factors including GADD34 (A), XBP1s and XBP1u (B). The transcription levels of three factors were quantified by RT-qPCR and Semi-qPCR as described in materials and methods. Total RNAs were prepared from three to five mice per group and RT-qPCR and Semi-qPCR analyses were assayed twice for each total RNA. The data represent the means \pm SD. *, $p < 0.05$ relative to the Vehicle-treated group.

성을 유발하는 TCP를 처리하는 동안, apoptosis의 작용기전을 분석하였다. 그 결과 Bax/Bcl-2 단백질의 발현이 TCP를 처리한 그룹에서 농도의존적으로 증가하였으며, Cleaved Cas-3/ Cas-3 단백질의 발현이 증가되었다. 이러한 연구 결과는 간독성을 유발하는 DON, methotrexate 등을 처리하여 유도된 간독성 유발과정에서 apoptosis를 분석한 이전의 연구 결과들과 일치함을 제시하고 있다. 따라서, TCP처리는 다른 간독성 유발물질과 유사하게 apoptosis를 유도함을 제시하고 있다. 한편, ER스트레스 반응은 다양한 세포 내·외의 요인에 의하여 세포내에 misfolded 단백질의 소포 내 축적과 칼슘의 조절장애로 발생하며, CHOP, eIF2, IRE1 α 등의 조절 단백질에 의해 매개된다[30]. 이러한 과학적 근거에 기반하여, ER스트레스 반응의 연구에서 이들 단백질은 중요한 평가지표로 활용되고 있다[25]. 이들 조절단백질은 일부 독성물질을 처리하여 유도된 독성과정 동안에 유의적인 변화를 나타내고 있다.

폴리케타이드(Polyketide) 유래 진균 독소인 시트리닌(Citrinin)은 강한 간독성으로 인해 간세포 손상을 일으킨다. 이러한 독성유발 동안에 ER스트레스 매개 인자인 CHOP, PERK가 증가되었다[32]. 또한, 결핵 치료를 위해 1차적으로 사용되는 약물로 간독성을 유발하는 피라진아미드(Pyrazinamide)은 IRE1 α , XBP1s, CHOP의 mRNA 수준을 증가시켰으며, p-PERK, p-eIF2 α /eIF2 α , CHOP의 발현도 증가시켰다[9]. 본 연구에서는 TCP로 유도된 간독성유발 동안에 CHOP, p-eIF2 α /eIF2 α , p-IRE1 α 의 발현과 GADD34, XBP1s의 mRNA 수준을 분석하였다. TCP처리는 CHOP, p-eIF2 α /eIF2 α , p-IRE1 α 의 발현을 증가시켰으며, GADD34 mRNA를 증가시켰다. IRE1 α 의 작용기전 연구에서, IRE1 α 는 ER스트레스 반응 동안에 p-IRE1 α 로 전환되어 XBP1 mRNA의 alternative splicing을 조절하여 XBP1s로 전환시키기 때문에 이전의 다른 연구에서 분석된 방법을 기반으로 spliced form의 XBP1 mRNA와 p-IRE1 α 단백질의 발현만을 결과로 제시하였다[29, 33]. 또한, 본 연구에서 CHOP, eIF2 α , p-eIF2 α , p-IRE1 α 의 발현은 TCP100 처리그룹에서는 증가하여 ER스트레스의 증가를 나타내고 있지만 TCP200 처리그룹에서는 감소하였다. 이러한 결과는 Fig. 3에서 제시한 TCP200 처리그룹에서 Cleaved Cas-3가 6배 이상 급격히 증가하는 결과와 연관하여 해석하면, 이들 그룹의 세포들은 세포사가 발생하여 이들 단백질의 발현이 감소하는 경향으로 관찰된 것으로 사료된다. 더불어, 본 연구의 Fig. 3에서 관찰된 TCP의 농도에 따른 Bcl-2 단백질의 발현의 증가는 Bcl-2 단백질의 anti-apoptotic 기능으로 설명하기는 어렵다. TCP는 자유라디칼(Free radicals)과 같은 독성화학물질의 반응중간체(Reactive intermediates)를 생성하여 자동산화(Autoxidation)을 시작하고, 산화적 세포손상(Autoxidative cellular injury)을 유도하여 세포막의 파괴를 통한 자가포식작용(Autophagocytosis), 세포사(Cell death), 돌연변이(Mutations)를 유도한다[4, 22]. 이러한 결과는 Bcl-2 단백질의 과발현이 자유산소라디칼(Oxygen free radicals)의 생산과 지질과산화물(Lipid peroxides)의 형성을 감소시키는 기능과 연관될 것으로 사료된다[13, 24]. 다만, XBP1s의 감소는 이전의 ER스트레스 반응에 대해 스트레스를 완화하고 세포 생존을 촉진하는 기능을 한다고 알려져 있지만, XBP1s의 손실은 간에서 pro-apoptotic 신호를 우선적으로 활성화하여 ER스트레스로 인한 apoptosis에 민감하게 반응한다고 알려져 있어 apoptosis의 결과와 일치하는 경향을 나타낼 수 있다[20]. 이러한 결과는 이전에 간 독성물질에 의한 ER스트레스 분석과 연구결과와 매우 유사하다.

이러한 결과를 종합하면, 본 연구에서는 TCP로 유도된 간독성유발 동안에 ER스트레스의 작용기전을 분석하였으며, 이러한 결과는 TCP가 apoptosis를 통한 간 독성을 유발하며, 이러한 간독성은 ER스트레스의 증가와 밀접하

게 연관됨을 제시하고 있다. 한편, TCP를 고농도로 처리한 그룹에서는 CHOP, XBP1s 등 ER스트레스관련 인자들의 감소가 관찰되었으며, 이는 일반적인 연구결과와 차이가 있다. 이러한 결과는 과다한 세포사멸로 인해 ER스트레스 관련 인자가 감소한 것으로 사료되며 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다[18].

감사의 글

저자들은 실험동물의 사용과 관리를 지원해준 부산대학교 청정실험동물센터(Laboratory Animal Resources center)의 황진향 선생님께 감사드리며, 이 연구는 식품의약품안전처의 지원(20183MFDS410)을 받아 수행되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Adams, C. J., Kopp M. C., Larburu, N., Nowak, P. R. and Ali, M. M. 2019. Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 11.
- Al-khawalde, A. A. A., Abukhalil, M. H., M. Jghef, M. M., Alfwuaires, A., Alaryani, F. S., Aladaileh, S. H., Algefare, A. I., Karimulla, S., Alasmari, F. and Aldal'in, H. K. 2022. Punicalagin protects against the development of methotrexate-Induced hepatotoxicity in mice via activating Nrf2 signaling and decreasing oxidative stress, inflammation, and cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 12334.
- Apostolova, N., Gomez-Sucerquia, L. J., Alegre, F., Funes, H. A., Victor, V. M., Barrachina, M. D., Blas-Garcia, A. and Esplugues, J. V. 2013. ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: mitochondria again. *J. Hepatol.* **59**, 780-789.
- Comporti, M. 1989. Three models of free radical-induced cell injury. *Chem. Biol. Interact.* **72**, 1-56.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495-516.
- Ezhilarasan, D. 2021. Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. *Toxicology* **458**, 152840.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I. and Andrews, D. W. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486-541.
- Gorman, A. M., Healy, S. J., Jäger, R. and Samali, A. 2012. Stress management at the ER: regulators of ER

- stress-induced apoptosis. *Pharmacol. Ther.* **134**, 306-316.
9. Guo, H. L., Hassan, H. M., Ding, P. P., Wang, S.J., Chen, X., Wang, T., Sun, L.X., Zhang, L.Y. and Jiang, Z.Z. 2017. Pyrazinamide-induced hepatotoxicity is alleviated by 4-PBA via inhibition of the PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway. *Toxicology* **378**, 65-75.
 10. Iorga, A., Dara, L. and Kaplowitz, N. 2017. Drug-induced liver injury: cascade of events leading to cell death, apoptosis or necrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1018.
 11. Irwin, R. D., Haseman, J. K. and Eustis, S. L. 1995. 1, 2, 3-Trichloropropane: a multisite carcinogen in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **25**, 241-252.
 12. Jaeschke, H., Duan, L., Akakpo, J. Y., Farhood, A. and Ramachandran, A. 2018. The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **118**, 709-718.
 13. Kerr, J. F., Winterford, C. M. and Harmon, B. V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013-2026.
 14. Kondylis, V. and Pasparakis, M. 2019. RIP kinases in liver cell death, inflammation and cancer. *Trends Mol. Med.* **25**, 47-63.
 15. La, D. K., Lilly, P. D., Anderegg, R. J. and Swenberg, J. A. 1995. DNA adduct formation in B6C3F1 mice and Fischer-344 rats exposed to 1, 2, 3-trichloropropane. *Carcinogenesis* **16**, 1419-1424.
 16. Liu, L., Xu, L., Zhang, S., Wang, D., Dong, G., Chen, H., Li, X., Shu, C. and Wang, R. 2018. STF-083010, an inhibitor of XBP1 splicing, attenuates acute renal failure in rats by suppressing endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and inflammation. *Exp. Anim.* **67**, 373-382.
 17. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402-408.
 18. Malhi, H. and Kaufman, R. J. 2011. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J. Hepatol.* **54**, 795-809.
 19. Obeng, E. 2020. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Braz. J. Biol.* **81**, 1133-1143.
 20. Olivares, S. and Henkel, A. S. 2015. Hepatic Xbp1 gene deletion promotes endoplasmic reticulum stress-induced liver injury and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **290**, 30142-30151.
 21. Park, S.M., Kang, T. I. and So, J. S. 2021. Roles of XBPs in transcriptional regulation of target genes. *Biomedicines* **9**, 791.
 22. Parke, D. V. 1982. Mechanisms of chemical toxicity – a unifying hypothesis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2**, 267-286.
 23. Program, N. T. 1993. NTP toxicology and carcinogenesis of 1, 2, 3-Trichloropropane (CAS no. 96-18-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* **384**, 1-348.
 24. Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y. and Wang, J. 2022. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front. Oncol.* **12**, 985363.
 25. Sano, R. and Reed, J. C. 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **1833**, 3460-3470.
 26. Siwecka, N., Rozpędek-Kamińska, W., Wawrzynkiewicz, A., Pytel, D., Diehl, J. A. and Majsterek, I. 2021. The structure, activation and signaling of IRE1 and its role in determining cell fate. *Biomedicines* **9**, 156.
 27. Sun, D. and Zhang, X. 2008. Clinical analysis on 10 cases of subacute 1, 2, 3-trichloropropane poisoning. *Chin. J. Ind. Med.* **21**, 154-156.
 28. Szegezdi, E., Duffy, A., O'Mahoney, M. E., Logue, S. E., Mylotte, L. A., O'Brien, T. and Samali, A. 2006. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **349**, 1406-1411.
 29. Tan, Z., Zhang, W., Sun, J., Fu, Z., Ke, X., Zheng, C., Zhang, Y., Li, P., Liu, Y. and Hu, Q. 2018. ZIKV infection activates the IRE1-XBP1 and ATF6 pathways of unfolded protein response in neural cells. *J. Neuroinflammation* **15**, 1-16.
 30. Vivas, W. and Weis, S. 2022. Tidy up -The unfolded protein response in sepsis. *Front. Immunol.* **13**, 980680.
 31. Wan, Y., Yang, L., Jiang, S., Qian, D. and Duan, J. 2022. Excessive apoptosis in ulcerative colitis: crosstalk between apoptosis, ROS, ER stress, and intestinal homeostasis. *Inflamm. Bowel Dis.* **28**, 639-648.
 32. Wu, J., Yang, C., Yang, M., Liang, Z., Wu, Y., Kong, X., Fan, H., Wang, S., Ning, C. and Xiao, W. 2022. The role of ER stress and ATP/AMPK in oxidative stress mediated hepatotoxicity induced by citrinin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **237**, 113531.
 33. Yang, J., Zhou, S., Gu, J., Wang, Y., Guo, M. and Liu, Y. 2015. Differences in unfolded protein response pathway activation in the lenses of three types of cataracts. *PLoS one* **10**, e0130705.
 34. Yoshida, H. 2007. ER stress and diseases. *FEBS J.* **274**, 630-658.
 35. Yousefzadeh, M., Henpita, C., Vyas, R., Soto-Palma, C., Robbins, P. and Niedernhofer, L. 2021. DNA damage – how and why we age? *Life* **10**, e62852.
 36. Zhang, K. and Kaufman, R. J. 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454**, 455-462.
 37. Zhuang, S. L., Bao, L. L., Wang, H. F., Zhang, M., Yang, C., Zhou, X. Y., Wu, Y., Rehman, K. and Naranmandura, H. 2015. The involvement of ER-stress and ROS generation in difenoconazole-induced hepatocellular toxicity. *Toxicol. Res.* **4**, 1195-1203.

초록 : 1,2,3-Trichloropropane으로 유도된 SD랫드의 간독성에서 ER 스트레스 반응의 조절

김태렬^{1†} · 진유정^{1†} · 김지은¹ · 노유정¹ · 송희진¹ · 설아윤¹ · 박은서¹ · 박기호¹ · 임수정¹ · 왕수하¹ ·
임 용² · 황대연^{1*}

(¹부산대학교 생명자원과학대학 바이오소재과학과(BK21사업단), ²동의대학교 의료·보건·생활대학 임상병리학과)

ER (Endoplasmic reticulum) 스트레스반응은 difenoconazole 등과 같은 다양한 독성물질에 의한 독성반응 동안에 유도되지만, 농업 및 산업에서 전반적으로 사용되는 화학물질로 간독성(Hepatotoxicity)을 유도하는 1,2,3-Trichloropropane (TCP)와의 연관성은 연구된 바 없다. 따라서, 본 연구에서는 TCP처리로 유발된 간독성(Hepatotoxicity) 유발과정 동안에 ER스트레스의 유발기전에 대해 연구하기 위하여, TCP로 처리된 SD (Sprague Dawley)랫드에서 간독성, apoptosis 그리고 ER스트레스에 대한 지표들의 변화를 분석하였다. 그 결과, TCP 처리그룹은 Vehicle 처리그룹에 비하여 체중과 식이 섭취량이 감소하였고, 간 조직에서 괴사(Necrosis)와 공포화(Vaculation) 등이 유의적으로 증가하였다. 또한, apoptosis 관련 인자인 Bax/Bcl-2와 Cleaved Caspase-3(Cas-3)/Cas-3의 발현은 Vehicle 처리그룹보다 TCP 처리그룹에서 유의적으로 증가하였다. ER스트레스 반응지표 분석에서, C/EBP homologous protein (CHOP), p-eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit (eIF2 α), p-inositor-requiring enzyme 1 α (IRE1 α)의 발현은 TCP100 처리그룹에서만 증가하였다. 하지만 Growth arrest and DNA damage-34 (GADD34)와 X-box binding protein-1 (XBP1)의 전사는 TCP200 처리그룹에서 유의적으로 변화되었다. 따라서, 이러한 결과는 ER스트레스반응은 TCP 처리에 의해 유도된 간독성과정 동안에 unfolded protein response (UPR) pathway의 조절을 통해 성공적으로 유도됨을 제시하고 있다.