약학회지 제41권 제6호 789~796(1997)
Yakhak Hoeji Vol. 41, No. 6

LLC-PK$_1$ 세포에서의 퓨모너신 B$_1$에 의해 유도된 스핑고리피드 대사

유환수# · 윤여표
충북대학교 약학대학 약학과
(Received November 11, 1997)

Fumonisin B$_1$-induced Alteration of Sphingolipid Metabolism in LLC-PK$_1$ Cells

Hwan-Soo Yoo# and Yeo-Pyo Yun
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract—The purpose of this study was to determine the effect of sulfinpyrazone on fumonisin B$_1$-induced elevation of free sphingoid bases in LLC-PK$_1$ cells. Fumonisins are a family of mycotoxins produced by the fungi *Fusarium moniliforme* which is common contaminant in corn. Fumonisins are also potent inhibitors of sphingosine and sphinganine *N*-acyltransferases (ceramide synthases), key enzymes in sphingolipid metabolism resulting in the elevation of free sphinganine. The cytosolic concentration of fumonisin B$_1$ was known to be closely proportional to the elevation of free sphinganine in LLC-PK$_1$ cells [Yoo, H.-S., Norred, W.P., Wang, E., Merrill, A.H., Jr., and Riley, R.T. (1992) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114**, 9-15]. Sulfinpyrazone, an anion transport inhibitor, reduced the elevated level of free sphinganine resulting from fumonisin B$_1$ inhibition of *de novo* sphingolipid biosynthesis. Fumonisin B$_1$ at a concentration of 20 μM showed approximately 120 pmol/10^6 cells relative to 3~10 pmol/10^6 cells in control cultures, and sulfinpyrazone at a concentration of 200 μM partially reversed the increased level of free sphinganine induced by fumonisin B$_1$ down to normal level after exposure to fumonisin B$_1$ for 8 to 24 hr. However, the reduced effect of sulfinpyrazone on the fumonisin B$_1$-induced elevation of intracellular sphinganine was not shown after 24 hr. Fumonisin B$_1$ exposure to LLC-PK$_1$ cells for 36 and 48 hr showed approximately 74 and 80 pmol per 10^6 cells relative to 82 and 76 pmol, respectively, in fumonisin B$_1$ plus sulfinpyrazone-treated cultures. Sulfinpyrazone-induced less elevation of free sphinganine in confluent cells after exposure to fumonisin B$_1$ suggested that either sulfinpyrazone may block the availability of fumonisin B$_1$ to cells or act on the fumonisin B$_1$ interaction with ceramide synthase.

Keywords ☐ Fumonisin B$_1$, sphingoid bases, sphingosine, sphinganine, LLC-PK$_1$ cells, sulfinpyrazone.

Fumonisins은 주로 옥수수에 오염되는 곰팡이인 *Fusarium moniliforme*에 의하여 생성되는 일군의 진균독소이다.[2] Fumonisin B$_1$은 1988년에 남아프리카 과학자들에 의해서 처음으로 *F. moniliforme* 배양액에서 분리되어, 그 구조가 규명되었다.[3] Fumonisins은 열에 매우 안정하며,[4] 생체내에서 거의 대사가 일어나지 않는 것으로 알려져 있다.[5] Fumonisins는 여러 포유동물 세포주에서 세포독성을 나타내며,[6] LLC-PK$_1$세포에서 세포증식을 억제하는 것으로 밝혀졌다.[1,7] Fumonisins와 관련있는 동물질병으로서는 말이나 당나귀에서 발생하는 Equine Leukoencephalomalacia(ELEM),[8] 돼지에서 나타나는 Porcine Pulmonary Edema(PPE) Syndrome,[9-10] 흰쥐에서 간 및 신장 독성,[11] 그 이외에도 가금류,[12] 어류,[13] 및 영장류[14] 등에서 각기 다른 독성이 보고되고 있다. 또한 역학조사 결과 사람의 식도암 유발과

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0431-61-3215 (팩스) 0431-68-2732

밀접한 관련성이 있는 것으로 추정되고 있다.[15]

Sphingolipids는 동물세포에서 생합성되며, 유리 sphingoid bases를 골격구조로 하는 300종류 이상의 sphingolipids가 알려져 있다. Sphingolipids는 생체내에서 세포 구성성분을 이루며, 세포내의 생리활성에도 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.[16] Sphingosine은 강력한 protein kinase C의 억제제로서 보고되었으며,[17] 흰쥐의 뇌 시냅토솜에서 정제된 Na^+-K^+ ATPase 활성을 억제하는 것으로 밝혀졌다.[18] 또한 sphingosine은 효소작용에 의하여 sphingosine-1-phosphate로 전환되어, 세포내 칼슘저장고인 소포체에서의 칼슘분비 작용과 관련이 있는 것으로 보고되었다.[19] Complex sphingolipids의 한 종류인 ceramide는 세포내 신호전달물질로 알려져 있으며, 세포분화 및 증식,[20] 세포변이,[21] apoptosis[22] 등을 일으키는데 관련되는 것으로 알려져 있다.

Fumonisins은 아미노기를 포함한 20개의 탄소로 이루어진 직쇄탄화수소를 근간으로 하고 있으며 sphingolipids의 sphingoid backbone과 상당히 유사한 분자구조를 이루고 있다(Fig. 1). 또한 Fumonisins은 2개의 tricarballylic acid를 가지고 있으므로 sphingolipids와는 달리 수용성이 높은 화합물이다. Fumonisins의 독성작용에 대한 분자단위에서의 작용기전 연구가 sphingolipids대사와 관련되어 시작되었다. Fumonisins은 동물세포에서 sphingolipids 대사에 관여하는 ceramide synthase를 억제하여 유리 sphinganine의 증가와 complex sphingolipids의 고갈을 일으키고, 그 결과로서 세포독성은 물론 세포증식을 억제하는 것이 밝혀졌다.[7]

본 연구에서는 돼지신장의 근위세뇨관에서 유래한 상피세포인 LLC-PK_1 세포주를 사용한 유기음이온물질 수송 차단제인 sulfinpyrazone이 fumonisin B_1에 의해 유발된 세포내 유리 sphinganine의 증가에 미치는 영향을 검토하였다.

실험방법

시약 및 재료 – LLC-PK_1 세포(CRL 1392, passage 196)는 American Type Culture Collection에서 구입하였으며, fumonisin B_1, C_{20}-sphinganine 및 sulfinpyrazone은 미국 농무성연구소에서 공급받아 사용하였다. 세포배양을 위하여 fetal bovine serum (FBS), DMEM, Ham's F-12 배지 및 trypsin-EDTA(Gibco BRL Life Technology, Inc.)를 사용하였고, sphingoid bases 정량, 세포수 산정 및 배양세포의 단백질함량 측정을 위해서 sphinganine, sphingosine, trypan-blue(Sigma Chemical Co.) 및 단백질정량 kit(Bio-Rad, Inc.) 등을 사용하였다.

세포배양 – LLC-PK_1 세포는 돼지신장의 근위세뇨관에서 유래된 세포주이며, 세포배양은 Riley 등에 의해서 기술된 방법[23]을 따랐다. 배양방법을 간단히 기술하면, LLC-PK_1 세포는 5% CO_2, 37°C에서 CO_2배양기를 사용하여, 5% FBS가 포함되어있는 DMEM/F-12(1:1) 액상배지상에서 배양하였다. 세포는 본 실험 최소 24시간 전에 6-well plate(10 cm^2)상에서 배양하고, 배양용기의 바닥에 고착되어 자랐다. LLC-PK_1 세포는 전형적인 상피세포 형태를 나타내고, 매 20~24시간마다 세포분열을 일으켜서 세포수가 2배로 증가하였다. LLC-PK_1 세포는 완전히 confluency를 이루면 특징적인 cobble stone의 형태를 보였으며, 이는 Na^+-K^+ ATPase의 활성이 활발함을 시사하는 것으로 알려져 왔다.

단백질 함량측정 및 세포수 산정 – 생성된 유리 sphinganine의 함량을 단위 세포수 및 단백질함량으로 표시하기 위하여 각 well에 자라고 있는 LLC-PK_1 세포의 단백질 함량과 생세포 수를 산정하였다. 그 방법을 간단히 기술하면, 세포가 자라고있는 well plate의 액상배지를 aspiration에 의해서 제거하고 배양용기중의 세포는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(PBS)으로 3회 세척하였다. 각 well에 있는 세포는 0.2 N NaOH로 용해시켜서 단백질의 함량을 측정하였다. 이때 측정된 단백질 함량은 생세포 수와 linear하게 상관관계를 갖는 범위에서 이루어졌다. 또한 생세포가 trypan-blue를 배제하는 원리를 이용하여 배양용기내 생세포 수를 산정하였다. 우선 배양세포의 배양액을 제거한 후 칼슘을 함유하지 않은 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척하고, 500 μl의 0.5% trypsin-EDTA를 첨가하여 세포가 각각의 단일세포로 plate의 바닥으로부터 분리되도록 CO_2 배양기에서 약 30~40분 방치하였다. 분리된 세포를 1 ml의 배양액으로 현탁하고, 100 μl의 세포현탁액을 1.5 ml의 polypropylene tube로 옮겨서 10 μl의 0.4% trypan-blue를 첨가하였다. 세포 수는 현미경하에서 hemocytometer를 사용하여 trypan-blue를 배제하는 생세포 수를 산정 함으로서 결정하였다.

지질추출 – 추출방법을 간단히 기술하면, 우선 배양액을 제거하고 세포를 HBSS로 세척하여 trypsinization으로 각각의 세포를 배양용기 바닥으로부터 분리시켰다. 1.5 m*l*의 PBS로 현탁된 세포를 polypropylene tube로 옮기고 4,000×g로 10분간 원심분리하여 cell pellets만을 얻었다. Cell pellets에 20 pmol의 C_{20}-sphinganine을 내부표준물질로 첨가하고, 0.6 m*l*의 0.15 M methanolic KOH : $CHCl_3$(4:1)용액으로 1시간 동안 37°C의 진탕기에서 가수분해하였다. 이때 가수분해의 목적은 acylglycerolipids 및 lysosphingolipids로부터 유리 sphingosine을 방출하는 것이었다. 가수분해 후 0.4 m*l* $CHCl_3$, 0.5 m*l* 알칼리수와 100 μ*l*의 2N NH_4OH용액을 가하고 섞은 후에 원심분리하여 수층을 제거하였다. 유기용매층은 1 m*l*의 알칼리수로 3회 세척하고, 실리콘 처리된 polypropylene tube로 옮겨서 증발 건조시켰다.

Sphinganine 및 sphingosine함량측정 – Sphingolipid 함량측정은 Merrill 방법[24]을 변형시켜 사용하였다. 간단히 기술하면, sphinganine 및 sphingosine의 함량을 측정하기 위해서 시료건조잔사에 40 μ*l* 에탄올을 넣어 65~70°C에서 약 20분간 방치시켰다. 5 μ*l* O-phthaldehyde(OPA) 시약을 넣어 실온에서 약 30분간 반응시키고, 형광검출기가 부착된 HPLC를 사용하여 유리 sphingoid bases의 함량을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

유리 sphingoid bases 정량 – LLC-PK_1 세포는 배양용기 바닥에 강하게 고착되어 증식하므로 trypsin-EDTA를 처리후 30분 동안 CO_2배양기에서 trypsinization시킴으로서 세포를 수확하였다. 따라서 기존의 rubber policeman을 사용한 scrapping 방법에 비하여 트립신 처리후 원심분리에 의한 방법이 세포수확에 용이하였으며, 특히 배양용기의 바닥면적이 적은 경우(2 또는 10 cm^2)에 이용될 수 있는 유용한 방법이었다. 유리 sphingosine은 4번 탄소에 이중결합이 있는 것을 제외하고는 유리 sphinganine과 동일한 분자구조를 이루고 있으며(Fig. 1), 정상세포내 유리 sphingosine과 유리 sphinganine은 함량비가 약 3:1을 나타내고 있다(Fig. 3). 추출 및 정량방법의 효율성에 있어서 세포내 함유지질 추출율은 기존의 방법과 비교시 지질 추출율이 약 20% 높았다. 기지농도의 내부표준물질인 C_2O-sphinganine과 유리 sphingosine 및 유리 sphinganine을 사용하여 추출율을 산정한 경우에 세 가지 물질은 모두 86±17%의 추출회수율을 보였고, 기존의 추출방법[22]을 이용시 65±23% 회수율을 나타냈다.

본 연구에서는 HPLC를 사용하여 정량시 sphingoid bases를 형광물질인 OPA시약으로 유도체화하였는데 형광반응은 반응성에 있어서 유리 sphingosine〉유리 sphinganine〉C_{20}-sphinganine의 순서로 나타났으며, 반응성의 비율은 C_{20}-sphinganine : 유리 sphinganine : 유리 sphingosine에서 1:2:3을 보여주었다. 각 물질의 형광유도체 반응의 경우 실온에서 1시간 후에 최대 형광을 나타내었고, 24시간까지 동일한 형광강도

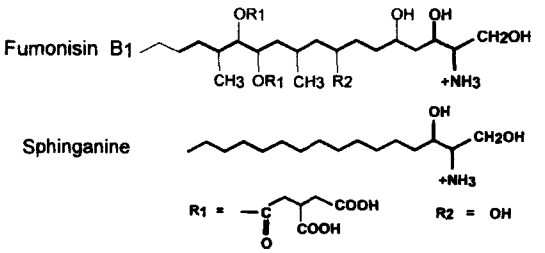

Fig. 1 — Structures of fumonisin B_1 and sphinganine. Sphingosine is the same as sphinganine for a single double bond between the C4 and C5.

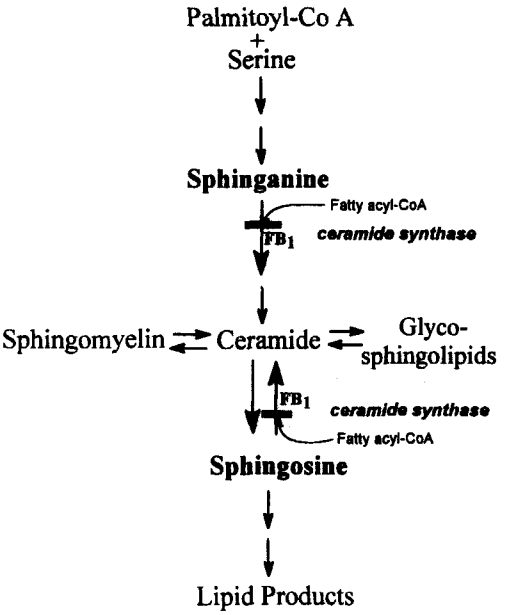

Fig. 2 — The pathways of *de novo* sphingolipid biosynthesis, sphingolipid turnover and catabolism in a mammarian cell.

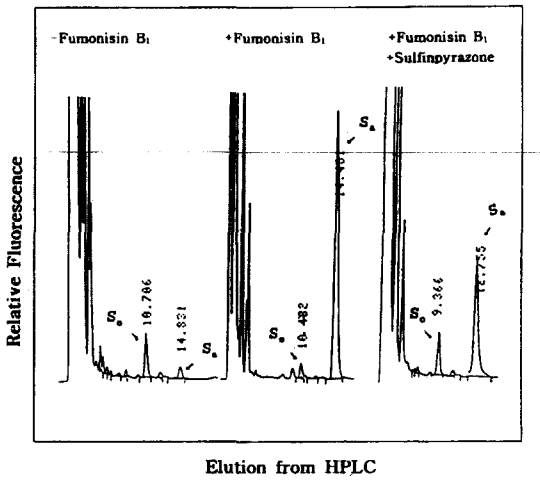

Fig. 3 — Comparison of HPLC chromatograms showing the free sphinganine (Sa), and free sphingosine (So) from a control, 20 μM fumonisin B_1- and fumonisin B_1 plus 200 μM sulfinpyrazone-treated LLC-PK_1 cell cultures. Cells were seeded in 6 well plates (10 cm^2/well), allowed to grow until full confluency, old medium was changed with fresh one, and fumonisin B_1 and sulfinpyrazone were added. Cells were harvested after 24 hr, free sphingoid bases extracted and analyzed using HPLC.

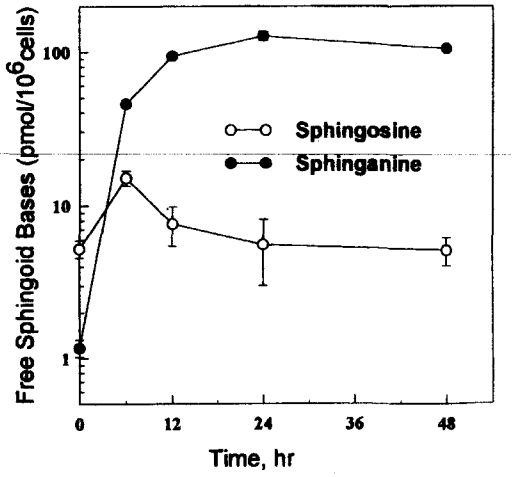

Fig. 4 — Time course for the elevation of free sphingoid bases. LLC-PK_1 cells in cultures were grown until full confluency and incubated with 20 μM fumonisin B_1. The cells were analyzed as described in the text for the amounts of sphinganine (closed circles) and sphingosine (open circles). Data are given as means±SD (n=5).

를 유지하였다. 크로마토그램상에서 보면 sphingoid bases의 최소 감지농도는 0.5 pmol(S/N=3)로서 이 실험에서 사용된 조건 및 방법이 매우 예민한 정량방법임을 알 수 있었다.

세포내 함유된 유리 sphingoid bases의 정량에서 지질 추출율에 영향을 미치는 요인은 유기용매로 추출한 지질을 건조잔사로 만든 후 다시 용출시킬때의 용매조건과 건조잔사를 포함하고 있는 시료용기의 종류에 따라 추출율이 크게 차이가 있었다. 지질 추출의 효율성을 증대시키기 위하여 에탄올을 사용하여 sphingoid bases를 용출시켰고, 시료용기는 내부가 silane으로 도포된 eppendorf tube를 사용함으로써 용기벽면에 지질이 부착하여 지질의 용출이 저하될 가능성을 배제하였다. 세포내 sphingoid bases의 HPLC를 사용한 정량원리는 아미노산 정량에 이용하는 OPA 방법을 응용하였으며, $-NH_2$ 기를 포함하고 있는 지질은 모두 검출이 가능하였다. 그러나 구조상에 $-NH_2$ 기를 가지고 있는 지질은 sphingolipid이외에는 알려져 있는 경우가 없었으므로, OPA 형광유도체반응은 sphingoid bases를 포함하고 있는 지질에 대한 특이반응이었다.

Sphingolipid 대사 억제 – Sphingolipids 신생합성(Fig. 2)은 serine과 palmitoyl Co-A의 축합반응에 의해 3-ketosphinganine이 형성되고, 중간체로서 sphinganine, dihydroceramide를 거쳐서 ceramide를 생성한다. 이때 형성된 ceramide는 다른 complex sphingolipids를 생성하는데 이용되거나 sphingosine을 거쳐서 분해경로를 밟는다. 유리 sphingoid bases와 유사한 분자구조를 가지고 있는 진균독소인 fumonisins(Fig. 1)은 선택적으로 sphingolipids의 신생합성과 분해에 관련되는 효소인 ceramide synthase (sphinganine 또는 sphingosine *N*-acyltransferases)를 억제함으로써 세포내 유리 sphinganine이 축적되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 유리 sphingosine과 유리 sphinganine은 세포 내에 극소량 존재하며, 이들 화합물은 그 자체로서 세포독성을 일으키는 것으로 보고되었다.[25,26] 정상 LLC-PK_1 세포에서 sphingosine의 함량은 10^6세포수당 3~10 pmol이고, sphinganine은 1~2 pmol을 나타냈다(Fig. 4). 또한 이들 유리 sphingoid bases는 세포의 여러 생리현상에 직접 관련되는 필수적인 활성물질로서 알려져왔다. 세포내 소포체에서 이루어지는 sphingolipids의 신생합성은 세포증식과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다.[26]

Fig. 3의 chromatogram에서 보면 20 μM fumon-

isin B_1을 투여한 배양세포와 투여하지 않은 세포를 비교시 신생합성 과정의 중간체인 유리 sphinganine의 peak가 현저히 커진 것을 보여주었다. 유리 sphingosine의 세포내 함량은 fumonisin B_1 처리후 6시간대에 10^6 세포수당 15±3 pmol으로서 fumonisins을 처리하지 않은 세포(4±1 pmol/10^6 cells)와 비교시 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 4). 그러나 20 μM fumonisin B_1 처리 12시간 후부터 48시간까지 유리 sphingosine의 함량증가는 진균독소에 노출되지 않은 세포와 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. Sphingolipid 신생합성 과정의 중간체인 유리 sphinganine은 fumonisin B_1을 처리한 세포배양에서 대조군과 비교시 50~100배의 증가를 보였다(Fig. 4). LLC-PK_1 세포에서 fumonisins에 의한 세포증식 억제와 세포독성이 농도 의존적으로 나타나고 있음이 보고되었다.[7] LLC-PK_1 세포의 증식이 매우 활발한 세포배양에서 10~35 μM fumonisin B_1을 처리후 세포증식억제를 보였으며, 35 μM fumonisin B_1에서 세포독성 및 세포증식억제가 보고되었다.[1]

본 연구에서 사용된 fumonisin B_1의 농도에서 처음 24시간까지 유리 sphinganine의 함량증가를 보였고, 48시간대에는 10^6 세포수당 104±4 pmol로서 24시간대의 106±3 pmol과 유사한 세포내 유리 sphinganine을 포함하고 있었다. Fumonisin B_1 처리후 6시간후에 대조 배양세포(1~2 pmol/10^6 cells)에 비하여 유리 sphinganine 함량(45±2 pmol/10^6 cells)은 현저히 증가하였다. 따라서 sphingoid bases의 중요한 생리활성에 비추어서 세포내 유리 sphinganine의 증가가 분자단위에서의 fumonisins 작용기전이라고 시사된다. Sphingosine이 sphingosine kinase에 의해서 sphingosine-1-phosphate로 전환되어 세포내 칼슘저장고인 소포체에서 세포질로의 칼슘유리에 sphingosine-1-phosphate가 직접 작용한다고 보고되었다.[27] 배양세포에 20 μM fumonisin B_1을 처리한 후 48시간까지는 세포내 sphinganine의 농도가 10^6세포수당 100±4 pmol이었으나, 72시간대에는 75±5 pmol로 감소되었다. 아마도 유리 sphingosine에서와 마찬가지로 유리 sphinganine의 경우도 유리 sphinganine의 축적에 따른 sphinganine kinase의 활성 증가에 의하여 sphinganine-1-phosphate가 생성되어 세포내 유리 sphinganine이 감소되었다고 생각된다. Fumonisins에 의한 sphingolipids 신생합성 과정의 억제결과 발생하는 유리 sphinganine의 함량증가와 진균독소인 fumonisins에 의해 유발되는 여러 동물질병과의 상호 관련성을 분자단위에서 밝힐 수 있는 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

Sulfinpyrazone의 sphingolipid 대사에 대한 영향 – Fumonisins의 세포내 농도 및 sphingolipid 생합성억제는 fumonisin B_1의 세포내 유입기전에 의해서 영향을 받을 수 있다. Fumonisins의 세포내 유입기전에 대한 연구는 아직 보고된 적이 없다. Fumonisins의 분자구조는 12번과 13번 탄소에 2개의 카복실산으로 이루어져있는 tricarballylic acid를 포함하고 있다(Fig. 1). 따라서 fumonisins에 있는 이들 4개의 카복실산은 음이온을 가지고 있으므로 fumonisins의 세포내 전달과정에서 유기음이온물질 전달체의 매개에 의하여 세포내로 유입될 가능성이 높다고 추정된다. 유기음이온전달물질 억제제인 sulfinpyrazone이 fumonisin B_1에 의한 유리 sphinganine의 세포내 증가에 미치는 영향을 살펴봄으로써 간접적이나마 fumonisin B_1의 세포내 전달기전에 유기음이온물질 전달체의 관련여부를 살펴보았다. Fig. 3은 20 μM fumonisin B_1에 12시간 노출된 세포와 fumonisin B_1이외에도 200 μM sulfinpyrazone을 동시에 처리한 배양세포의 지질추출물에서 얻은 유리 sphingosine과 유리 sphinganine을 나타내는 두 peak의 상대적인 크기를 보여주고 있다. Fumonisin B_1을 처리한 경우는 예상대로 유리 sphinganine이 유리 sphingosine의 경우에 비하여 peak가 현저히 커졌지만, sulfinpyrazone에 의해서 sphinganine의 peak가 뚜렷이 작아졌다. 따라서 유기음이온전달물질 억제제인 sulfinpyrazone이 fumonisin B_1에 의해서 유발되는 유리 sphinganine의 축적을 부분적으로 줄이는 것으로 밝혀졌다.

Fumonisin B_1에 의한 유리 sphinganine의 세포내 증가는 sulfinpyrazone에 의해 시간 의존적으로 줄어들었다. Fumonisin B_1 및 sulfinpyrazone 투여 후 24시간을 기준으로 살펴볼 때 fumonisin B_1에 의한 유리 sphinganine의 증가는 10^6 세포수당 70±6 pmol이고, fumonisin B_1과 sulfinpyrazone을 동시에 투여한 경우는 10^6 세포수당 21±3 pmol을 나타내었다(Fig. 5). Sulfinpyrazone의 영향이 fumonisin B_1을 처리한 배양세포와 현저한 차이를 보이면서 24시간까지 부분적으로 나타났으며, 24시간 이후에는 sulfinpyrazone의 영향이 소실되었음을 보여주었다(Fig. 5). 배

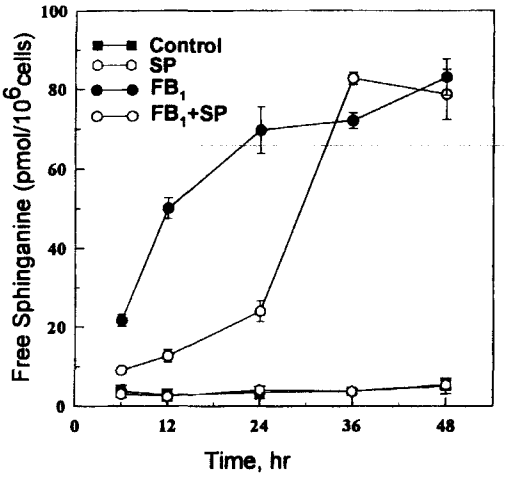

Fig. 5 — Effects of sulfinpyrazone on fumonisin B_1-induced elevation of free sphinganine. The cells were grown until full confluency, exposed to 20 μM fumonisin B_1±200 μM sulfinpyrazone and analyzed as described in the text for the amounts of sphinganine. Data are given as means±SD (n=5).

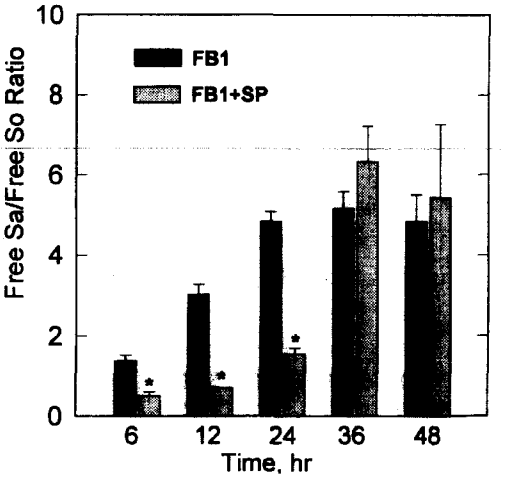

Fig. 6 — Comparison of free sphinganine (Sa) to free sphingosine (So) ratio between fumonisin B_1 (FB_1)- and FB_1 plus sulfinpyrazone (SP)-exposed cells. Cells were incubated with 20 μM FB_1±200 μM SP and free sphingoid bases measured with HPLC. Significantly different from the no SP control. *$p<0.05$. Data are given as means±SD (n=5).

양세포에서 유리 sphinganine의 증가가 sulfinpyrazone에 의해 부분적으로 감소된 점으로 보아서 fumonisin B_1의 세포내 전달기전은 유기음이온물질 전달체 이외에도 fumonisins의 세포내 유입에 다른 기전이 존재하고 있음을 시사한다. 24시간 이후의 유리 sphinganine의 증가는 fumonisins만을 처리한 배양세포와 같은 수준으로 증가된 점에 있어서 유기음이온물질 전달체에 의한 fumonisin B_1의 세포내 유입이 억제됨으로써 약하게 존재하였던 또 다른 전달기전이 활성화되어 나타난 결과가 아닌가 추정된다.

대사변화의 indicator로서의 sphinganine 및 sphingosine의 생성비 – Fumonisin B_1과 sulfinpyrazone에 대한 세포내 유리 sphingoid bases의 생성량을 sphinanine/sphingosine의 비율로 표현하였을때, 배양세포에 24시간 20 μM fumonisin B_1과 200 μM sulfinpyrazone을 투여한 경우 그 비율이 1.8±0.2인 반면, 20 μM fumonisin B_1을 단독으로 투여한 세포에 있어서는 4.7±0.4을 나타냈다(Fig. 6). 또한 24시간까지 sulfinpyrazone의 영향이 통계학적으로 유의성이 있음을 보여주었으며, fumonisin B_1에 의한 유리 sphinganine의 증가도 시간 의존적임을 나타냈다(Fig. 6). 세포내 유리 sphinganine 함량을 측정하는 것도 fumonisins에 노출된 정도를 측정하는 indicator이지만 절대량 측정이 불가능한 경우에 유리 sphinganine 대 유리 sphingosine의 상대적인 비율도 매우 유용하게 활용될 수 있는 biomarker이다. Sphinganine 대 sphingosine의 비율을 fumonisin B_1 및 sufinpyrazone에 노출된 경우에 적용하였을 때 sphingolipid 신생합성의 저해결과로 생기는 유리 sphingoid bases의 균형이 파괴되는 것을 쉽게 표현할 수 있었다.

결 론

돼지신장의 근위세뇨관에서 유래한 상피세포인 LLC-PK_1 세포주에서 fumonisin B_1과 유기음이온물질 전달 차단제인 sulfinpyrazone이 세포내 sphingolipids 신생합성 과정에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. HPLC를 사용한 sphingoid bases의 분리 및 정량에 있어서 최소검출농도가 0.5 pmol(S/N=3)까지 가능하고, sphingolipids 추출시 추출율이 유리 sphinganine 및 유리 sphingosine의 경우 86±17%로서 2 및 10 cm^2의 바닥면적이 적은 배양용기에서 자라는 세포내 지질정량이 가능하였다.

2. 세포증식 속도가 느린 confluent 세포에서 20

μM fumonisin B_1을 처리하였을 때 유리 sphinganine의 증가는 시간 의존적으로 나타났으며, fumonisin B_1 처리후 24 및 48시간에 최대 증가를 보였다. 정상세포에서 10^6세포수당 1~2 pmol이었고, fumonisin B_1을 처리한 경우에 최대 106±3 pmol을 나타냈다.

3. 유기음이온물질 전달 차단제인 sulfinpyrazone을 사용하여 fumonisin B_1에 의해 유도된 유리 sphinganine의 증가를 감소시켰다. LLC-PK_1 세포에서 24시간 동안 fumonisin B_1을 단독으로 처리한 세포의 경우에 유리 sphinganine은 10^6세포수당 70±6 pmol이고, fumonisin B_1과 sulfinpyrazone을 동시에 처리한 세포에서는 10^6세포수당 21±3 pmol을 나타냈다. 따라서 fumonisins의 세포내 유입에 있어서 유기음이온 물질전달체가 부분적으로 역할을 하고 있다고 추정된다.

4. 유리 sphinganine/유리 sphingosine의 비율을 세포내 sphingolipids의 신생합성 과정의 변화에 대한 biomarker로서 유용하게 활용할 수 있었다. 배양세포에 24시간 동안 20 μM fumonisin B_1과 200 μM sulfinpyrazone을 동시에 투여한 경우 sphinanine/sphingosine의 비율이 1.8±0.2인 반면, 20 μM fumonisin B_1을 단독으로 투여한 세포에 있어서 그 비율은 4.7±0.4를 나타냈다.

이상의 결과에서 세포내 활성물질인 유리 sphinganine과 유리 sphingosine의 변화를 측정함으로서 진균독소인 fumonisins의 세포 및 동물에 미치는 영향에 대한 분자단위의 작용기전 연구에 활용할 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도 학술진흥재단의 학술연구조성비 지원으로 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Yoo, H.-S., Norred, W. P., Wang, E., Merrill, A. H., Jr., and Riley, R. T. : Fumonisin inhibition of *de novo* sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK_1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **114**, 9 (1992).

2) Nelson, P. E., Desjardins, A. E., and Plattner, R. D. : Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 233 (1993).

3) Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G. and Vleggaar, R. : Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 743 (1988).

4) Dupuy, J., Le Bars, P., Boudra, H., and Le Bars, J. : Thermostability of fumonisin B_1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2864 (1993).

5) Shephard, G. S., Thiel, P. G., and Sydenham, E. W. : Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B_1 in rats. *Fd. Chem. Toxic.* **20**, 277 (1992).

6) Shier, W. T., Abbas, H. K., and Mirocha, C. J. : Toxicity of mycotoxins fumonisin B_1 and B_2 and *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin (AAL) in cultured mammarian cells. *Mycopathologia* **116**, 97 (1991).

7) Yoo, H. -S., Norred, W. P., Showker, J. L., and Riley, R. T. : Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **138**, 211 (1996).

8) Kellerman, T. S., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Gelderblom, W. C. A., Cawood, M., and Coetzer, J. A. W. : Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B_1. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **57**, 269 (1990).

9) Haschek, W. M., Motelin, G. K., Ness, D. K., Harlin, K. S., Hall, W. F., Vesonder, R. F., Peterson, R. E., and Beasley, V. R. : Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia* **117**, 83 (1992).

10) Motelin, G. K., Haschek, W. M., Ness, D. K., Hall, W. F., Harlin, K. S., Schaeffer, D. J., and Beasley, V. R. : Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. *Mycopathologia* **126**, 27 (1994).

11) Voss, K. A., Chamberlain, W. J., Bacon, C. W.,

and Norred, W. P. : A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B_1. *Natural Toxins* **1**, 222 (1993).

12) Espada, Y., Ruiz de Gopegui, Cuadradas, and Cabanes, F. J. : Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. *Avian Dis.* **38**, 454 (1994).

13) Brown, D. W., McCoy, C. P., and Rottinghaus G. E. : Experimental feeding of *Fusarium moniliforme* culture material containing fumonisin B_1 to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**(1), 123 (1994).

14) Fincham, J. E., Marasas, W. F. O., Taljaard, J. J. F., Kriek, N. P. J., Badenhorst, C. J., Gelderblom, W. C. A., Seier, J. V., Smuts, C. M., Faber, M., Weight, M. J., Slazus, W., Woodrof, C. W., van Wyk, M. J., Kruger, M., and Thiel, P.G. : Atherogenic effects in non-human primate of *Fusarium moniliforme* cultures added to a carbohydrate diet. *Atherosclerosis* **94**, 13 (1992).

15) Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., and Gelderblom, W. C. A. : The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* **117**, 3 (1992).

16) Hannun, Y. A., and Bell, R. M. : Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* **243**, 500 (1989).

17) Merrill, A. H., Jr., Sereni, A. M., Stevens, V. L., Hannun, Y. A., Bell, R. M., and Kinkade, J. M., Jr. : Inhibition of phorbol ester-dependent differentiation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cell by sphinganine and other long-chain bases. *J. Biol. Chem.* **261**, 12610 (1986).

18) Oishi, K., Zheng, B., and Kuo, J. F. : Inhibition of Na^+, K^+-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J. Biol. Chem.* **265**, 70 (1990).

19) Ghosh, T. K., Bian, J., and Gill, D. L. : Sphingosine-1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J. Biol. Chem.* **269**, 22628 (1994).

20) Okazaki, T., Bielawska, R. A., Bell, R. M., and Hannun, Y. A. : Role of ceramide as a lipid mediator of 1α-25-dihydroxy vitamin D_3-induced cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 265, 15823 (1990).

21) Livingston, P., Natoli, J. E., Calves, M. J., Stockert, E., Oettgen, H. F., and Old, L. J. : Vaccines containing purified GM_2 ganglioside elicit GM_2 antibodies in melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 1911 (1987).

22) Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A., and Hannun, Y. A. : Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769 (1993).

23) Riley, R. T., Goeger, D. E., Showker, J. L., Cole, R. J., and Doner J. : Age and growth related changes in cyclopiazonic acid-potentiated lipophilic cation accumulation by cultured cells and binding to freeze-thaw lysed cells. *J. Biochem. Toxicol.* **2**, 251 (1987).

24) Merrill, A. H., Jr., Wang, E., Mullins, R. E., Jamison, W. C., Nimkar, S., and Liotta, D. C., Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **171**, 373 (1988).

25) Lambeth, J. D., Burnham, D. N., and Tyagi, S. R. : Sphinganine effects on chemoattractant-induced diacylglycerol generation, calcium fluxes, superoxide production, and on cell viability in the human neutrophil. *J. Biol. Chem.* **263**, 3818 (1988).

26) Stevens, V. L., Nimkar, S., Jamison, W. C., Liotta, D. A., and Merrill, A. H., Jr : Characteristics of the growth inhibition and cytotoxicity of long-chain (sphingoid) bases for Chinese hamster ovary cells: evidence for involvement of protein kinases C. *Biochim. Biophys. Acta* **1051**, 37 (1990).

27) Choi, O. H., Kim, J.-H., and Kinet, J.-P. : Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the FcεR1 antigen receptor. *Nature*, **380**, 634 (1996).