

## 진균독소 Gliotoxin에 의한 세포고사에서 Zinc의 예방적 역할

원광대학교 의과대학 미생물학교실<sup>1</sup>, 혈액종양내과<sup>2</sup>, 예방의학교실<sup>3</sup>, 신경과학교실<sup>4</sup>

박지선<sup>1</sup> · 소홍섭<sup>1</sup> · 김명선<sup>1</sup> · 정병학<sup>2</sup> · 최익준<sup>1</sup> · 진경호<sup>3</sup>  
진성호<sup>3</sup> · 김남송<sup>3</sup> · 조광호<sup>4</sup> · 박래길<sup>1</sup>

=Abstract=

### The Protective Mechanism of Zinc in Fungal Metabolite Gliotoxin-induced Apoptosis

Ji Sun Park<sup>1</sup>, Hong Seob So<sup>1</sup>, Myung Sunny Kim<sup>1</sup>, Byung Hak Jung<sup>2</sup>, Ik Jun Choi<sup>1</sup>,  
Gyung Ho Jin<sup>3</sup>, Sung Ho Jin<sup>3</sup>, Nam Song Kim<sup>3</sup>, Kwang-Ho Cho<sup>4</sup> and Raekil Park<sup>1</sup>

Department of Microbiology<sup>1</sup>, Hematology/Oncology<sup>2</sup>, Preventive Medicine<sup>3</sup>, Neurology<sup>4</sup>  
School of Medicine, Wonkwang University, Iksan Chonbuk 570-749, Korea

Gliotoxin, a fungal metabolite, is one of the epipolythiodioxopiperazine classes and has a variety of effects including immunomodulatory and apoptotic agents. This study is designed to evaluate the effect of zinc on gliotoxin-induced death of HL-60 cells. Here, we demonstrated that treatment of gliotoxin decreased cell viability in a dose and time-dependent manner. Gliotoxin-induced cell death was confirmed as apoptosis characterized by chromatin margination, fragmentation and ladder-pattern digestion of genomic DNA. Gliotoxin increased the proteolytic activities of caspase 3, 6, 8, and 9. Caspase-3 activation was further confirmed by the degradation of procaspase-3 and PARP in gliotoxin-treated HL-60 cells. Zinc compounds including ZnCl<sub>2</sub> and ZnSO<sub>4</sub> markedly inhibited gliotoxin-induced apoptosis in HL-60 cells (from 30% to 90%). Consistent with anti-apoptotic effects, zinc also suppressed the enzymatic activities of caspase-3 and -9 proteases. In addition, cleavage of both PARP and procaspase 3 in gliotoxin-treated HL-60 cells was inhibited by the addition of zinc compounds. We further demonstrated that expression of Fas ligand by gliotoxin was suppressed by zinc compounds. These data suggest that zinc may prevent gliotoxin-induced apoptosis via inhibition of Fas ligand expression as well as suppression of caspase family cysteine proteases-3 and -9 in HL-60 cells.

**Key Words:** Gliotoxin, Apoptosis, Zinc, Caspase, Fas, FasL, HL-60

### 서 론

Gliotoxin은 *Penicillium*, *Aspergillus species*, *Candida*, *Gliocladium*, 및 *Thermoascus*와 같은 곰팡이

들로부터 생성되어지며<sup>1~4</sup>, epipolythiodioxopiperazine (ETP)의 전형적인 bridged disulphide ring 구조이다<sup>5</sup>. ETP 그룹 중 어떤 것들은 곰팡이 감염에 있어서 직접 또는 간접적으로 영양을 받는 몇몇 질병과 관련이 있다고 보고되고 있다. 그 중

접수 : 2000년 1월 13일, 게재결정 : 2000년 2월 16일

Corresponding author: Raekil Park MD · PhD, Department of Microbiology, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea. Tel: (0653) 850-6777, Fax: (0653) 852-0220, E-mail: rkpark@wonms.wonkwang.ac.kr

가장 잘 알려진 것이 *Pithomyces chatarum*에 오염된 목초를 먹은 동물들에게서 일어나는 facial eczema인데 이 질병은 ETP 그룹 중 *sporidesmins*이며, 이 대사물은 간과 담즙관에 손상을 입혀서 bilirubinemia와 photosensitivity를 일으키며<sup>6,7)</sup>, 또한 *Aspergillus fumigatus*에 의해서 생성되는 gliotoxin은 aspergillosis의 병인에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>8)</sup>.

Gliotoxin이 생체 혹은 세포 내로 유입되었을 경우 그것이 일으킬 수 있는 반응에 대한 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않고 있지만, 몇 가지 가능성들이 제시되고 있다. 그 첫 번째가 활성 산소의 생성이다. Gliotoxin의 disulfide가 glutathione과 같은 환원제에 의해서 쉽게 dithiol 구조가 형성되어지며, 반응성이 큰 dithiol은 다시 disulfide로 산화되면서 superoxide와 hydrogen peroxide가 생성되며 이렇게 생성된 활성 산소물질은 세포 내에서 DNA 손상이나 비정상적인 신호전달을 유발시킬 수 있다<sup>9)</sup>. 두 번째 가능성은 gliotoxin이 free thiol group과 반응하여 disulfide 구조를 형성하여 다른 단백질의 기능을 변화시킬 가능성이 제시되고 있다<sup>7)</sup>. 최근 탐식세포, T 세포, B 세포, 및 흉선세포에서 gliotoxin에 의한 세포독성이 세포고사 (apoptosis) 기전에 의한다는 실험적 근거가 보고되었다<sup>10~12)</sup>.

세포죽음은 물리적 또는 화학적 반응에 대하여 세포괴사 (necrosis)와 세포고사 (apoptosis)로 구분되는데 세포괴사는 세포막의 파괴로 물과 세포 밖 전해질이 세포로 유입되어 mitochondria 등의 세포 내 구조물들이 팽창하여 파괴되는 세포항상성이 상실된 경우이다. 그러나 세포고사 (apoptosis)는 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성을 유지하기 위한 세포의 계획된 세포죽음 (programmed cell death)으로 세포괴사 (necrosis)와는 형태학적으로 구분된다. 세포고사 (apoptosis)시 수반되는 세포의 생화학적인 변화나 유전자활성의 차이는 세포고사과정의 특징적인 현상인 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상 (blebbing), 세포질 내의 칼슘 (calcium) 농도의 증가, 염색질 (chromatin)의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절 (ladder pattern DNA fragmentation, 200 base pairs), transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 apoptotic body의 형성을 동반한다<sup>13~16)</sup>. 세포고사 (apoptosis)의 유도 기전은 종양치사인자 (tumor necrosis factor, TNF)에 의한 세포죽음 연구에서 신

호전달기전이 밝혀지기 시작하였으며<sup>15)</sup>, 최근에는 caspase (cysteine proteases)의 중요성이 제시되고 있다<sup>17,18)</sup>. Caspase는 예쁜꼬마선충 (*C. elegans*)의 유전학적 연구를 통하여 *Ced-3*, *Ced-4* 등의 세포죽음을 유도하는 죽음실행 유전자가 밝혀진 이후 *Ced-3*은 인간에서 interleukin-1 $\beta$  전환효소 (ICE; caspase-1)라는 단백질 분해효소군으로 상응되어 caspase로 명명되면서 지금까지 14 종류가 알려져 있으며 효소가 작용하는 기질액에 따라 3 그룹 또는 pro-domain 길이에 따라 2 그룹으로 나뉜다. 작용기질액으로 W/LEXD를 인지하는 경우 그룹 1 (caspase-1, caspase-4, caspase-5, caspase-11), DEXD인 경우 그룹 2 (caspase-2, caspase-3, caspase-7), L/VEXD인 경우 그룹 3 (caspase-6, caspase-8, caspase-9, caspase-10)으로 분류된다. 긴 pro-domain을 가진 경우 그룹 I (caspase-1, caspase-2, caspase-4, caspase-5, caspase-8, caspase-9, caspase-10, caspase-11)은 세포고사 (apoptosis)의 위 단계에서 작용하며, pro-domain이 짧거나 없는 경우는 그룹 II (caspase-3, caspase-6, caspase-7)로써 아래 단계에서 작용하여 최종 세포고사 (apoptosis) 작용을 나타내게 한다<sup>19~21)</sup>. 이중 caspase-3 (CPP3, Yama, Apopain)는 34 kDa 전구물질로부터 활성화되어 17 kDa과 11 kDa으로 분해되어 DNA 복구와 스트레스 관련 발현 유전자의 활성화와 기능 유지에 중요한 poly ADP-ribose polymerase (PARP)를 분해하여 세포고사 (apoptosis)를 매개하면서 다른 caspase 등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불성화를 유도하여 세포 내의 여러 신호전달활성을 조절한다<sup>22,23)</sup>. PARP는 caspase-3가 작용하는 기질물질로 세포고사 (apoptosis) 유발시 caspase-3에 의하여 분해된다<sup>24,25)</sup>.

Zinc 이온의 세포고사 (apoptosis)에 대한 영향은 현상학적으로는 잘 알려져 있다<sup>26)</sup>. Zinc는 DNA 분절을 초래하는 Ca<sup>++</sup> 및 Mg<sup>++</sup> 의존성 endonuclease를 억제하여 세포를 고사현상으로부터 보호한다<sup>27)</sup>. 또한 endonuclease 활성화보다 상부의 세포고사 신호전달 분자인 caspase 3-like protease도 zinc에 의하여 억제됨이 보고되어 있다<sup>28)</sup>. 본 연구에서는 gliotoxin에 의한 HL-60 백혈구 암세포의 죽음에서 caspase계 cysteine proteases의 활성화, Fas ligand의 발현 그리고 이 과정에서의 zinc의 역할을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. HL-60 세포주 배양

사람 백혈구 세포주인 HL-60 (ATCC, CCL-240)는 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 10% fetal bovine serum (FBS: PAA Laboratories, Austria)이 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 배양하였다. 48시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하며, 분주 후 2시간 후에 gliotoxin을 처리한 뒤 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

### 2. Gliotoxin 및 시약

Gliotoxin은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입했으며 1 mg/ml씩 에탄올에 녹여 -70°C에 보관하였고, 사용시 RPMI 1640에 희석해서 사용하였다. 그리고 ZnCl<sub>2</sub> (Sigma Co.)와 ZnSO<sub>4</sub> (Sigma Co.)는 둘 다 1 mM를 사용하였다.

### 3. 세포 활성도 측정

세포 활성도는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Co.) assay를 이용하였다. 세포 배양판 (96-well plate)에 세포 (1×10<sup>5</sup> 세포수/ml)를 100 µl/well씩 분주하여 3시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음, MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 1/10 되게 첨가하였다. 4시간 후 10% sodium-dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01 N HCl 용액을 100 µl/well 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 ELISA 분석기로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다<sup>29)</sup>.

### 4. Hoechst 염색

Gliotoxin이 처리된 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342 (Sigma Co.) 염색약을 PBS에 10 µM이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS에서 씻어서 형광현미경으로 관찰하였다.

### 5. DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위해 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA kit (Promega Co. Wis-

consin Medicine, WI, USA)을 이용하였다. DNA 5 µg을 1.5% agarose gel에서 전기영동 (50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등하에서 DNA 분절을 관찰하였다.

### 6. Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

HL-60 세포 (1×10<sup>6</sup>)를 4°C에서 15분 동안 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 20,000×g로 15분 원심 분리시켰다. 원심 분리하여 얻은 세포파쇄액은 bicinchoninic acid (BCA; Sigma Co.)법으로 단백질을 정량하고, 세포파쇄액 (단백질 양: 100 µg)을 분석완충용액 (100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석된 형광기질과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer (Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. 먼저 caspase-1과 caspase-3의 활성 측정은 각각 기질로 fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin(AMC)-YVAD (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 50 µM 및 7-amino-4-coumarin(AMC)-DEVD (Calbiochem Co.) 50 µM을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380 nm)와 emission wavelength (460 nm)를 사용하였다. Caspase-6 효소활성은 기질로서 Ac-VEID-AMC (Calbiochem Co.) 50 µM 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 380 nm (excitation wavelength)와 460 nm (emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다. Caspase-9 효소활성은 기질로서 Ac-LEHD-AFC (Calbiochem Co.) 50 µM 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm (excitation wavelength)와 505 nm (emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다.

### 7. Western blotting

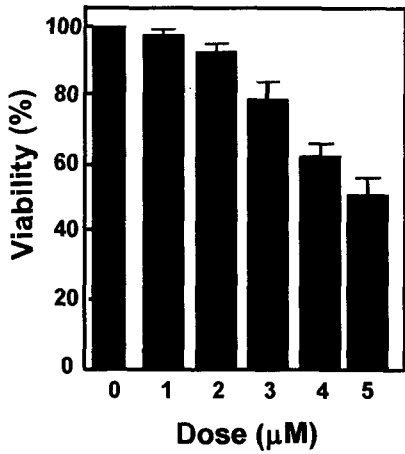
배양된 HL-60 세포에 gliotoxin을 처리한 일정 시간 후에 세포를 채취하여, cold Hank's balanced salt solution (HBSS)로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 RIPA 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)으로 얼음 속에서 30분 용해하였다. 동량의 세포파쇄액 (단백질: 200 µg)에 2 X

박지선 등: 진균독소 Gliotoxin에 의한 세포고사에서 Zinc의 예방적 역할

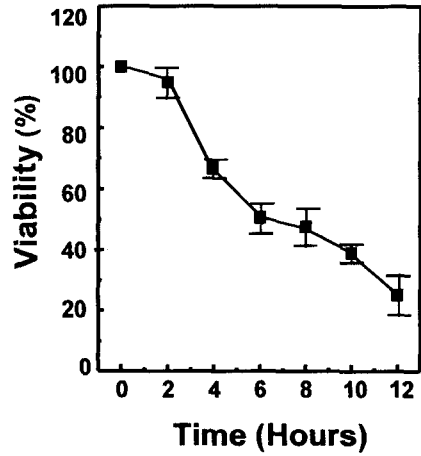
sample buffer와 섞어 100°C에서 3분 끓인 후, 12.5% sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V에서 16시간 이동시킨 후 blocking buffer (10% skim milk)로 상온에서 2시간 반응시켰다. Anti-procaspase-3 (Santa Cruz Co, CA, USA), anti-PARP

(Santa Cruz), 그리고 anti-Fas ligand (Santa Cruz) 항체를 0.05% (v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered sample buffer (TBST)에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시킨 후 PARP와 Fas-L는 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase (HRP) (Santa Cruz)를 상온에서 1시간 반응시키고, Procaspase-3의 이

**A**

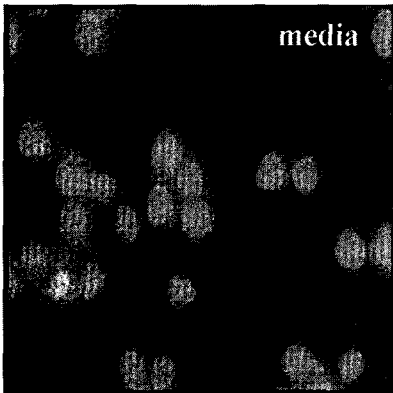


**B**

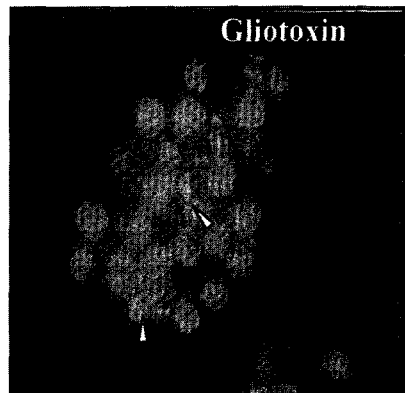


**Figure 1.** Gliotoxin decreased the viability of HL-60 cells in a dose and time-dependent manner. **A**, cells were treated with different concentrations of gliotoxin and cell viability was measured by MTT assay at 6 hours after gliotoxin treatment. **B**, time dependent effect of gliotoxin (5 µM) on the viability of HL-60 cells. Data represent the mean ± SD from quadruplicates.

**A**

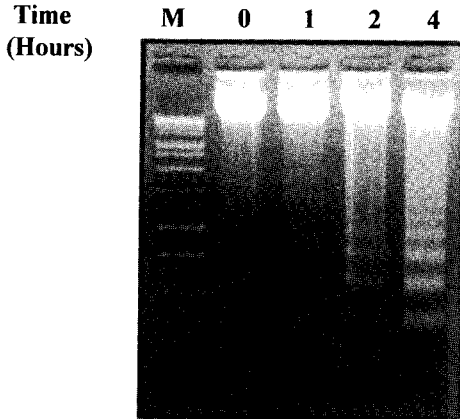


**B**



**Figure 2.** Gliotoxin induced chromatin fragmentation in HL-60 cells. Cells were treated with gliotoxin (5 µM) for 5 hours. Then, cells were stained with Hoechst dye 33342 and observed by fluorescence microscopy (**B**). Non-treated control showed normal nuclear morphology by diffused chromatin structure (**A**).

차항체는 TBST로 1:5,000으로 희석된 anti-mouse IgG conjugated HRP (Santa Cruz) 항체를 상온에서 1시간 반응시킨 후, Enhanced chemiluminescence kit (ECL kit: Amersham)를 이용하여 필름에 노출시켰다.



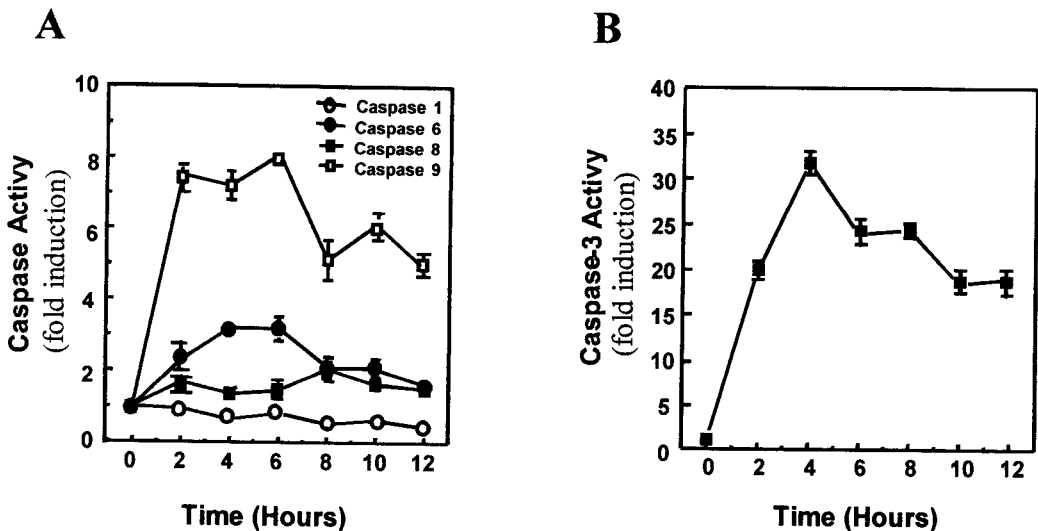
**Figure 3.** Gliotoxin induced ladder pattern of DNA fragmentation in HL-60 cells. HL-60 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with gliotoxin ( $5 \mu\text{M}$ ) for 4 hours and DNA fragmentation was determined by agarose-gel electrophoresis.

## 결 과

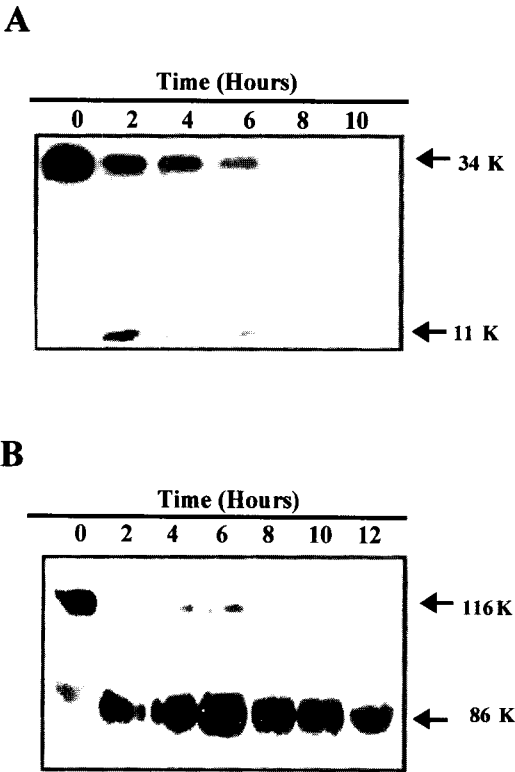
### 1. Gliotoxin이 HL-60 세포의 생존율에 미치는 영향

Gliotoxin의 HL-60 세포 생존율에 대한 영향을 알아보기 위해 HL-60 세포에 gliotoxin 처리 후 세포 활성도를 MTT 방법으로 측정하였다. Gliotoxin  $2 \mu\text{M}$  이하의 농도에서는 HL-60 세포의 생존율에는 유의한 변화가 없었으나  $3 \mu\text{M}$  이상의 gliotoxin을 6시간 처리시에 세포 생존율이 유의하게 감소하기 시작하여  $5 \mu\text{M}$ 의 농도에서 50% 이상 생존율이 감소하였다 (Fig. 1A). 또한, gliotoxin에 의한 HL-60 세포죽음의 시간 의존적 변화를 측정하기 위하여  $5 \mu\text{M}$ 의 gliotoxin 처리 후 HL-60 세포의 생존율을 시간별로 조사하였다. HL-60 세포의 생존율은 gliotoxin  $5 \mu\text{M}$  처리 3시간 이후에 현저히 저하되기 시작되어 6시간 경과 후 50%의 생존율을 나타냈으며, 점차 시간 의존적으로 감소하였다 (Fig. 1B).

Gliotoxin에 의한 세포죽음이 세포고사 (apoptosis) 기전에 의하여 매개될 가능성이 제시되었기에<sup>12)</sup>, 이를 확인하기 위해 HL-60 세포의 DNA 분절을 Hoechst 염색과 genomic DNA의 agarose gel

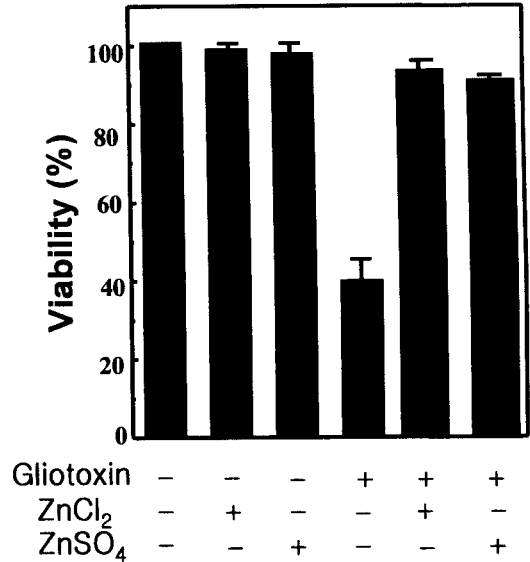


**Figure 4.** Gliotoxin increased the activity of caspase family cystein proteases. HL-60 Cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with  $5 \mu\text{M}$  gliotoxin for various periods and activities of caspase proteases were measured using cell lysate and fluorogenic substrates for caspase-1, 6, 8, 9 protease (A) and caspase 3-like protease (B). Data represent the mean  $\pm$  SD of quadruplicates.



**Figure 5.** Digestion of procaspase-3 and PARP by gliotoxin activated caspase 3-like protease in HL-60 cells. Cells were treated with 5  $\mu$ M gliotoxin for various periods and equal amount of protein (200  $\mu$ g) from cell lysate was subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-procaspase 3 (A) and anti-PARP antibodies (B). The immunoreactive signals were visualized by Enhanced chemiluminesce (ECL) kit.

electrophoresis 방법으로 확인하였다. Gliotoxin (5  $\mu$ M) 처리 6시간 후 HL-60 세포를 Hoechst 염색하였다. 형광현미경을 이용한 검사에서 대조군 HL-60 세포핵은 타원형 모양의 온전한 형태로 균질한 형광 염색을 나타낸 반면, gliotoxin 처리군은 핵이 여러 조각으로 분절된 형광 절편을 나타냈다 (Fig. 2). 또한 gliotoxin (5  $\mu$ M)을 처리한 HL-60 세포에서 분리한 genomic DNA의 1.5% agarose 전기영동에서 gliotoxin 처리 2시간 후부터 세포고사 (apoptosis)의 전형적인 특징인 사다리 모양의 DNA 분절이 관찰되다가 4시간 gliotoxin 실험군에서는 더욱 현저한 사다리 모양의 분절이 형성되었다 (Fig. 3). 이상의 결과는 gliotoxin이 암세포주 HL-60의 생존율을 저하시키며, gliotoxin에 의한 HL-60 세포죽음은 세포고사 (apoptosis) 기전에 의

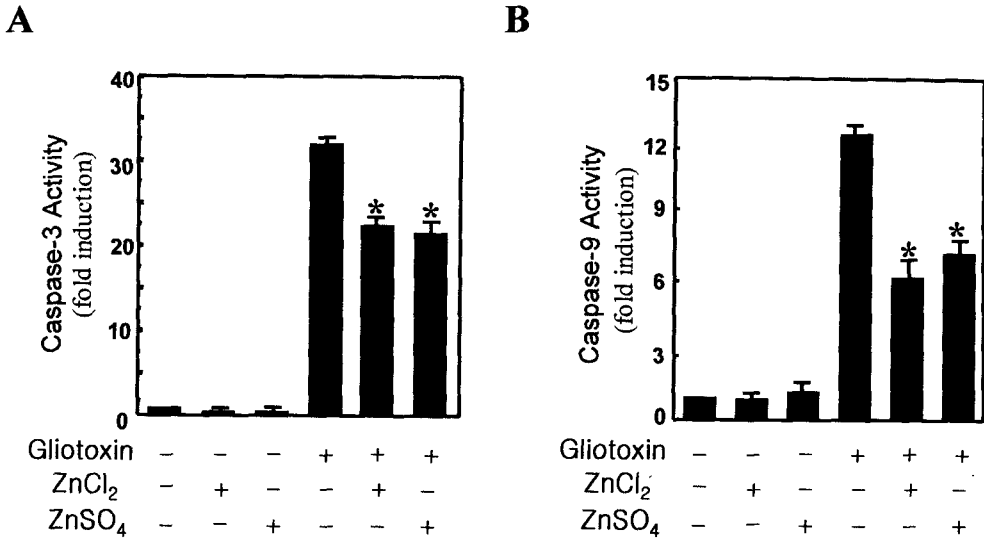


**Figure 6.** Effect of zinc compounds on gliotoxin-induced apoptosis. The cells were pretreated with ZnCl<sub>2</sub> (1 mM) and ZnSO<sub>4</sub> (1 mM) for 1 hour and followed by stimulated with 5  $\mu$ M of gliotoxin for 6 hours. Cell viability was assessed by the MTT assay. Data represent the mean  $\pm$  SD of quadruplicates.

하여 매개됨을 제시하고 있다.

## 2. Gliotoxin이 caspase 활성화에 미치는 영향

세포고사에 의한 세포죽음의 신호전달기전 중 caspase family cysteine proteases의 중요성은 이미 잘 알려져 있다<sup>30)</sup>. Gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사가 caspase의 활성화에 의한 것인지를 확인하기 위하여 caspase계 cysteine proteases 중에서 ICE-like cysteine protease라고 알려진 caspase-1 (YVAD-specific protease), CPP32-like cysteine protease라고 알려진 caspase-3 (DEVD-specific cysteine protease), caspase-6, FLICE라고 알려진 caspase-8 그리고 caspase-9의 효소적 활성을 이들 caspases의 fluorogenic substrates를 이용하여 조사하였다. 즉, gliotoxin 5  $\mu$ M을 HL-60 세포에 처리한 후 12 시간 여러 caspase계 효소의 활성을 HL-60 세포 파쇄액으로부터 측정하였다. Caspase-3와 caspase-9은 gliotoxin 처리 2시간 이내에 대조군에 비교하여 20배 그리고 8배 증가된 효소적 활성을 보였다. Caspase-6는 gliotoxin 처리 4~6시간에 대조군에 비교하여 2~3배 증가된 효소적 활성을 나타냈다. 또한 caspase-8도 gliotoxin 처리 6시간 이후에 대조군에 비교하여 2배 증가된 효소적 활성을



**Figure 7.** Zinc compounds suppressed the catalytic activation of caspase-3 and caspase-9 in HL-60 cells treated with gliotoxin. Cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were pretreated with ZnCl<sub>2</sub> (1 mM) and ZnSO<sub>4</sub> (1 mM) for 1 hour and followed by stimulation with 5  $\mu$ M of gliotoxin for 3 hours. And then cell lysate was used to measure the activity of caspase-3 proteases (A) and caspase-9 proteases (B) by using fluorogenic biosubstrates. Data represent mean  $\pm$ SD of quadruplicates. \* Significantly different from gliotoxin alone at  $p < 0.05$ .

보였다 (Fig 4).

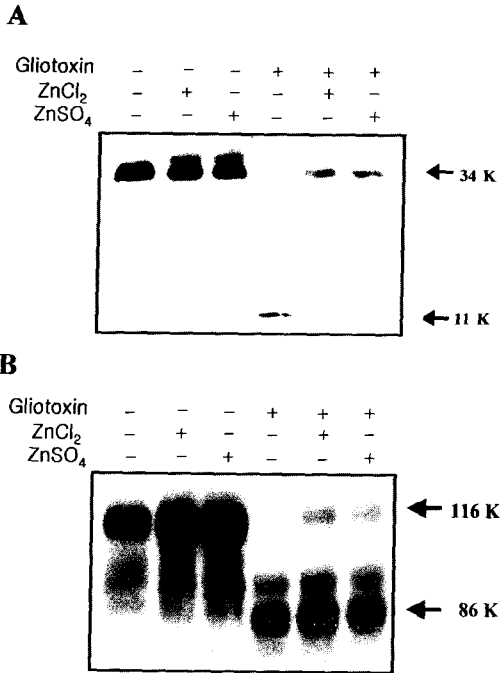
Caspase-3 활성화에 의한 세포 내 단백질의 변화를 Western blot 분석으로 조사하였다. Gliotoxin 5  $\mu$ M을 HL-60 세포에 처리 후, 세포를 파쇄하고 세포질 단백질 농도를 정량하여 세포질의 procaspase-3 및 poly (ADP-riboseyl) polymerase 양을 측정하였다 (Fig. 5). Gliotoxin 처리 2시간 후부터 34 kDa 분자량의 procaspase-3의 분해가 시작되어 8시간 이후에는 온전한 형태의 procaspase-3는 나타나지 않았다. 또한 세포 내 caspase-3의 기질 중의 하나인 PARP도 gliotoxin 처리 2시간 이후부터 116 kDa의 온전한 형태의 단백질이 86 kDa로 분절되었다. 이상의 결과에서 gliotoxin은 HL-60 세포에서 caspase의 활성을, 특히 caspases-3, 6, 8, 그리고 9의 효소적 활성 증가를 통하여 HL-60 세포고사를 유도했음을 알 수 있었다.

### 3. Zinc가 gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사의 생존율 및 caspase 활성화에 미치는 영향

최근의 많은 연구는 세포고사 과정에서 Zinc 이온의 중요성을 제시하고 있다<sup>26)</sup>. 그래서 gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사에 미치는 zinc의 역할을 조사하기 위하여 gliotoxin과 함께 zinc 화합물인 ZnCl<sub>2</sub> 및 ZnSO<sub>4</sub>를 처리한 후에 MTT 방법으로 세

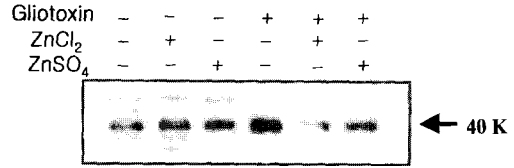
포 생존율을 조사하였다 (Fig. 6). ZnCl<sub>2</sub> 및 ZnSO<sub>4</sub>의 단독 처리는 HL-60 세포의 생존율에 유의한 변화를 초래하지 않았다. 5  $\mu$ M gliotoxin을 6시간 처리시 HL-60 세포의 생존율은 40% 정도 감소하였으나 zinc 화합물인 ZnCl<sub>2</sub>와 ZnSO<sub>4</sub> 처리는 gliotoxin에 의한 세포고사를 억제하여 HL-60의 생존율을 90% 이상으로 회복시켰다.

Zinc의 gliotoxin에 의한 HL-60 세포고사 현상의 억제 기전이 caspase proteases 활성 조절을 통한 결과인지를 확인하기 위하여 zinc 이온의 caspase 활성화에 대한 영향을 조사하였다. 5  $\mu$ M gliotoxin을 3시간 처리한 HL-60 세포질에서 caspase-3, 6, 8, 및 9의 효소적 활성을 Fig. 4와 동일한 방법으로 측정하였다. Gliotoxin에 의한 caspase계 proteases 활성화에 대한 zinc의 효과는 caspase-6와 caspase-8에는 변화가 없었으나 caspase-3 및 9만을 억제시켰다 (Fig. 7). HL-60 세포에서 gliotoxin에 의하여 약 33배 이상 증가된 caspase-3의 효소적 활성은 두 zinc 화합물에 의하여 약 22배 정도로 저하되었다. Caspase-9의 활성 역시 gliotoxin은 13배 이상 증가시켰으나, zinc 화합물인 ZnCl<sub>2</sub>와 ZnSO<sub>4</sub> 6~8배 정도로 유의한 감소 ( $p < 0.05$ )를 보였다. 위의 결과와 유사하게 Gliotoxin 처리 8시간에는 온전한 형태의 procaspase-3는 나타나지 않았으나,



**Figure 8.** Zinc suppressed the digestion of procaspase-3 and PARP in HL-60 cells by gliotoxin. Zinc compounds including ZnCl<sub>2</sub> (1 mM) and ZnSO<sub>4</sub> (1 mM) were preincubated in HL-60 cells and followed by the addition of 5 μM gliotoxin for 8 hours. After cell lysis, equal amount of protein was used to subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-procaspase 3 (A) and anti-PARP antibodies (B). The immuno-reactive signals were visualized by Enhanced chemiluminesce (ECL) kit.

ZnCl<sub>2</sub> (1 mM)과 ZnSO<sub>4</sub> (1 mM)를 1시간 전처리 한 후 gliotoxin을 8시간 처리했을 때는 procaspase-3 band가 관찰되어졌다. 또한 세포 내 caspase-3의 기질 중의 하나인 PARP도 gliotoxin 처리 8시간에는 116 kDa의 온전한 형태의 단백질이 86 kDa로 분절으나, ZnCl<sub>2</sub> (1 mM)과 ZnSO<sub>4</sub> (1 mM)를 1시간 전처리 한 후 gliotoxin을 8시간 처리했을 때는 116 kDa의 온전한 형태의 단백질이 나타나고 있다 (Fig. 8). 이상의 결과에서 gliotoxin에 의한 HL-60 세포의 세포고사가 zinc에 의하여 억제되었으며, 이는 zinc의 gliotoxin에 의한 caspase-3 및 caspase-9의 효소적 활성을 zinc가 억제하여 세포를 생존하게 해 줌을 시사한다.



**Figure 9.** Zinc suppressed the expression of FasL in HL-60 cells by gliotoxin. Zinc compounds including ZnCl<sub>2</sub> (1 mM) and ZnSO<sub>4</sub> (1 mM) were preincubated in HL-60 cells and followed by the addition of 5 μM gliotoxin for 5 hours. After cell lysis, equal amount of protein was used to subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-FasL.

#### 4. Zinc가 gliotoxin에 의한 HL-60 세포의 Fas ligand 발현에 미치는 영향

Fas/Fas ligand의 결합은 Fas-associated death domain protein (FADD) 단백질을 활성화시키고, 이는 연이어 caspase-8의 활성 유도로 이어져 caspase cascade를 활성화시킨다<sup>31)</sup>. Gliotoxin에 의하여 caspase proteases 신호전달계가 활성화되었기 때문에 gliotoxin의 Fas ligand 발현에 미치는 영향과 이에 대한 zinc의 역할을 HL-60 세포에서 조사하였다 (Fig. 9). 대조군의 HL-60 세포에서도 Fas ligand의 발현이 관찰되었으나, zinc 화합물의 gliotoxin과의 병용처리는 gliotoxin에 의하여 증가된 Fas ligand의 발현을 저하시켰다. 이상의 결과는 gliotoxin에 의한 Fas ligand 발현 증가는 HL-60 세포의 세포고사 유도 기전 중 하나이며, zinc에 의한 gliotoxin 유도성 세포고사에 대한 방어효과는 zinc 화합물의 Fas ligand 발현 억제 작용도 영향을 미칠 가능성을 제시하고 있다.

## 고 찰

곰팡이 대사산물의 하나인 ETP 그룹에 속하는 gliotoxin은 전신성 독성효과 때문에 임상적 사용에는 문제가 있지만 항미생물 및 항진균 효능이 있다<sup>32)</sup>. 또한 *in vitro* 및 *in vivo*상에서 보여지는 면역억제효과는 또한 설치류의 골수이식 거부반응을 효과적으로 예방할 수 있음을 보여주었으며 이는 장기이식에 의하여 활성화된 림프구만을 선택적으로 제거한 결과라 알려져 있다<sup>33)</sup>. Gliotoxin의 세포독성은 혈액세포 특히 면역세포에서 심하며 그 기전은 아직까지 부분적으로만 밝혀져 있



다<sup>10,11,33</sup>). 또한 이러한 면역억제 기전은 침윤성 aspergillosis 등의 감염시 치료에 어려움을 초래할 수 있는 것으로 여겨지고 있다. 실제로 amphotericin B 같은 곰팡이 감염 치료제가 있음에도 불구하고 aspergillosis 등의 감염에 의한 치사율은 75% 이상이나 된다<sup>30</sup>). *Aspergillus fumigatus*나 다른 병원성 곰팡이류에서 생성되는 gliotoxin이 쥐를 이용한 실험적 모델의 aspergillosis에서 검출되지만 aspergillosis에 직접적인 원인이라는 증거는 아직 없고, 그 정확한 병인학적 기전은 밝혀지지 않고 있다. 그러므로 gliotoxin에 의해서 유발되는 면역세포들에 대한 억제 기능이나 세포고사 (apoptosis)의 기전을 밝히는 것은 aspergillosis와 같은 질병을 이해하는데 필수적이며, gliotoxin의 임상적 응용에 유용하게 이용될 수 있다.

Gliotoxin은 흉선세포, T 아세포, 탐식세포, P 815 세포주, 및 WEHI 7과 같은 세포주에서 세포고사 (apoptosis)를 일으킨다<sup>10,12</sup>). 본 연구에서도 gliotoxin에 의해서 사람 백혈구 암세포주 HL-60에서 세포고사 (apoptosis)가 일어남을 알 수 있었다. Gliotoxin의 농도가 높을수록 DNA ladder가 더 많이 생겼고, 같은 농도라도 시간이 지날수록 DNA ladder가 더 많이 발생하였다. 또한 세포고사 (apoptosis)를 유발시키는 신호전달기전에서 중요한 기전 중 하나가 바로 caspase의 활성화이다. Caspase는 효소활성 부위에 모두 cysteine을 가지고 있는 단백질 분해효소로서 알려져 있다. Gliotoxin에 의한 세포고사 (apoptosis)에서도 역시 caspase 활성이 증가함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 세포고사 (apoptosis)는 caspase에 의존적인 경우와 비의존적인 경우로 나눌 수 있는데 본 연구에서는 caspase의 활성추이와 세포의 치사도추이를 비교해 볼 때 HL-60 세포에서 gliotoxin에 의한 세포고사 (apoptosis)는 caspase 작용에 의존적인 것으로 추정된다. 또한 본 연구 결과와 같이 caspase family cysteine protease 3, 6, 8, 및 9의 효소적 활성이 gliotoxin에 의하여 증가하고 caspase 3-like protease의 세포 내 기질의 하나인 PARP의 절단 관찰은 아직까지 보고된 바가 없다. 또한, Fas 단백질은 Fas-L에 의해 급격한 세포의 죽음을 유도한다. 세포의 종류에 따라 이 상호작용은 세포독성과정에서 표적세포 파괴 및 면역반응의 억제 등에 영향을 준다<sup>34</sup>). Fas를 통한 세포고사 (apoptosis)는 많은 과정을 거치는데 그 중에서 신호전달자로 caspase가 있다. 최근의 여러 실험들을 통

하여 이들 cysteine protease의 중요성이 대두되고 있는데, 세포고사 (apoptosis)가 일어난 세포의 DNA의 절편화에 관련된 endonuclease의 활성화에 직접적으로 관여한다는 것이 밝혀졌다<sup>35</sup>). 이들 단백질은 Fas의 결합에 의해 활성화되며 이들에 대한 anti-sense RNA의 처리나 Interleukin- $\beta$  converting enzyme (ICE) 결핍생쥐를 통한 실험에서 항-Fas 항체에 의한 세포고사 (apoptosis)의 억제가 보고되었다<sup>36</sup>). Gliotoxin에 의한 세포고사에서도 Fas-L의 발현이 증가됨을 관찰하였다 (Fig. 9). 이는 발현된 Fas-L가 표적세포에 존재하는 Fas와 결합하여 세포의 죽음을 유도하는 caspase와 이에 의해 조절되어지는 endonuclease의 활성을 유도하는 것으로 사료된다. 그러나 gliotoxin에 의한 Fas의 발현 변화는 확인되어야 할 것이다. 또한 Fas ligand 및 Fas의 결합이 gliotoxin에 의한 세포고사에 기여한 정도를 확인하기 위해서는 Fas ligand에 대한 중화항체 (neutralizing antibody)나 Fas 수용체를 자극하지 못하는 anti-Fas 항체에 의한 세포고사 여부가 확인되어야 할 것이다.

Zinc는 *in vivo* 및 *in vitro* 실험 모델에서 세포고사를 억제한다고 알려져 있다<sup>37,38</sup>). Zinc 결핍 시 성장 세포는 쉽게 세포고사에 빠진다<sup>39</sup>). 본 실험의 결과에서 zinc 화합물인  $ZnCl_2$ 와  $ZnSO_4$ 는 gliotoxin에 의한 HL-60 세포의 생존율 저하를 대조군의 90%까지 회복시켰다. 그리고 zinc 화합물은 caspase-9 및 3-like protease의 효소적 활성과 caspase 3-like protease 활성화에 의한 pro-caspase 3 protease 및 PARP 절단을 억제하였다. 이러한 zinc의 caspase protease 활성억제에 대한 효과는 Perry 등의<sup>28</sup>) 연구 결과와 일치하였다. 또한 gliotoxin에 의한 Fas ligand 발현 증가도 zinc 화합물에 의하여 억제되었다. 그러나,  $ZnCl_2$ 와  $ZnSO_4$ 는 gliotoxin에 의한 HL-60 세포의 생존율 저하를 대조군의 90%까지 회복시켰으나 caspase-3 및 9의 효소적 활성은 gliotoxin 단독 처리군에 비하여는 통계적으로는 유의하게 감소하였으나 caspase-3와 9의 효소적 활성은 여전히 대조군의 20배, 6배 이상 증가되어 있으며, Fas-L의 발현도 대조군에 비해 여전히 증가되어 있다. 이는 caspase 효소적 활성 및 Fas-L의 조절 이외에 세포고사 (apoptosis)를 일으키는 많은 신호전달기전에 있어서 zinc가 관여하고 있음을 시사하고 있다. 또한 본 실험은 gliotoxin에 의한 세포고사 (apoptosis) 신호전달기전에 있어서 caspase 활성을 밝히고, zinc가 caspase

활성 뿐만 아니라 Fas ligand 발현의 억제를 통하여 gliotoxin에 의한 세포고사 (apoptosis)를 억제함을 보여주는 최초의 결과이기 때문에 큰 의의를 가지고 있다고 사료된다. 그러나 반응성이 큰 thiol기 등을 가지는 물질은 zinc와 같은 중금속과 쉽게 결합하므로 gliotoxin도 활성의 thiol기가 zinc와의 결합에 의한 반응으로 세포독성 작용을 하지 못할 수 있다는 가능성도 고려해야 할 것이며, 본 실험에서는 세포고사에 있어서 대표적으로 알려져 있는 caspase와 위 단계인 Fas-L에 초점을 맞추어 실험을 실시하였지만 차후 실험에서는 gliotoxin의 세포고사시 관여하는 다방면에 걸친 신호전달기전을 규명하고 이 신호전달기전에 있어서 zinc의 역할에 관해 더욱 연구되어야 할 것이다.

## 결 론

진균의 대사물질 epipolythiodioxopiperazine (ETP) class인 gliotoxin은 백혈구 암세포주 HL-60의 생존율을 농도 및 시간 의존적으로 감소시켰다. Gliotoxin은 HL-60 세포에서 핵산의 분절과 전기영동상의 사다리형 DNA 분절을 통하여 세포고사를 유도하는 것을 확인할 수 있었다. Gliotoxin은 HL-60 세포의 caspase-3, 6, 8, 및 9 protease의 효소적 활성을 현저하게 증가시켰으며, PARP의 분해도 증가되었다. Zinc 화합물인 ZnCl<sub>2</sub>와 ZnSO<sub>4</sub>의 처리는 gliotoxin에 의한 HL-60 세포의 생존율을 40%에서 90%로 회복시켰다. 그리고 zinc 화합물은 caspase-3 및 9 protease의 효소적 활성을 현저히 억제하였으며 pro-caspase 3, PARP 및 Fas ligand 발현을 억제하였다. 이상의 결과는 gliotoxin에 의한 HL-60의 세포고사는 caspase cysteine proteases 활성화 및 Fas ligand 발현 유도로 매개되며 zinc 화합물 ZnCl<sub>2</sub>와 ZnSO<sub>4</sub>은 caspase-3 및 9 protease 활성, PARP 분해 그리고 Fas ligand 발현 억제를 통하여 gliotoxin에 의한 세포고사를 억제할 수 있음을 제시하였다.

### 감사말씀

본 연구는 1999년도 원광대학교의 교내연구비 지원을 받았습니다.

## 참 고 문 헌

- 1) Richard JL, Peden WM, Williams PP: Gliotoxin inhibits transformation and its cytotoxic to turkey peripheral blood lymphocytes. *Mycopathologia* **126(2)**: 109-114, 1994.
- 2) Johnson JR, Bruce WF, Dutcher JD: Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. Production, physical and biological properties. *J Amer Chem Soc* **65**: 2005-2009, 1943.
- 3) Waring P, Eichner RD, Tiwari-Palni U, Mullbacher A: Gliotoxin E: a new biologically active epipolythiodioxopiperazine from *Penicillium terlikowski*. *Aust J Chem* **40**: 991-997, 1987.
- 4) Shah DT, Glover DD, Larsen B: In situ mycotoxin production by *Candida albicans* in women with vaginitis. *Gynecol Obstet Invest* **39(1)**: 67-69, 1995.
- 5) Beecham AF, Fridrichsons J, Mathieson A: The structure and absolute configuration of gliotoxin and sporidesmin. *Tetrahedron Lett* **27**: 3131-3138, 1966.
- 6) Jordan TW, Cordiner SJ: Fungalepithiodioxopiperazine toxins have therapeutic potential and roles in disease. *TIPS* **8**: 144-149, 1987.
- 7) Cordiner SJ, Jordan TW: Inhibition by sporidesmin of hepatocyte bile acid transport. *Biochem J* **212(1)**: 197-204, 1983.
- 8) Bodley G, Bueltmann B, Duguid W, Gibbs D, Hanak H, Hotchi M: Fungal infections in cancer patients: an international autopsy study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11**: 99-109, 1992.
- 9) Eichner RD, Waring P, Geue AM, Braithwaite AW, Mullbacher A: Gliotoxin causes oxidative damage to plasmid and cellular DNA. *J Biol Chem* **263(8)**: 3772-3777, 1988.
- 10) Waring P, Eichner RD, Mullbacher A, Sjaarda A: Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties. *J Biol Chem* **263(34)**: 18493-18499, 1988.
- 11) Waring P: DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J Biol Chem* **265(24)**: 14476-14480, 1990.
- 12) Beaver JP, Waring P: Lack of correlation between early intracellular calcium ion rises and the onset of apoptosis in thymocytes. *Immunol Cell Biol*

- 72(6): 489-499, 1994.
- 13) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**: 251-306, 1980.
  - 14) Searle J, Kerr JF, Bishop CJ: Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* **17**: 229-259, 1982.
  - 15) Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P: Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* **138**: 447-453, 1991.
  - 16) Klaus SO, Davide F: Apoptosis signal by death receptors. *Eur J Biochem* **254**: 439-459, 1998.
  - 17) Jacobsen MD, Weil M, Raff MC: Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol* **133**(5): 1041-1051, 1996.
  - 18) Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S: Sequential activation of ICE-like and CPP32-like protease during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **380**: 723-726, 1996.
  - 19) Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis H, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *cde-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* **75**: 641-652, 1993.
  - 20) Wilson KP, Black JA, Thomason JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, Livingstone DJ: Structure and mechanism of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Nature* **370**: 270-275, 1994.
  - 21) Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, et al: Identification and characterisation of Ich-3, a member of the interleukin-1 $\beta$ converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and upstream regulator of ICE. *J Biol Chem* **271**: 20580-20587, 1996.
  - 22) Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK: Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *CMLS* **54**: 427-445, 1998.
  - 23) Widmann C, Gibson S: Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J Biol Chem* **273**(12): 7141-7147, 1998.
  - 24) Margolin N, Raybuck SA, Wilson KP, Chen W, Fox T, Livingstone DJ: Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme and related caspase. *J Biol Chem* **272**: 7223-7228, 1997.
  - 25) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gareau Y, Griffin PR, et al: Identification and inhibition of the ICE/Ced3-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43, 1995.
  - 26) Waring P, Egan M, Braithwaite A, Mullbacher A, Sjaarda A: Apoptosis induced in macrophages and T blasts by the mycotoxin sporidesmin and protection by Zn<sup>2+</sup> salts. *Int J Immunopharmacol* **12**(4): 445-457, 1990.
  - 27) Cohen JJ, Duke RC: Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* **132**(1): 38-42, 1984.
  - 28) Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA: Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* **272**(30): 18530-18533, 1997.
  - 29) Konstantinov SM, Topashka-Ancheva M, Benner A, Berger MR: Alkylphosphocholines: Effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells. *Int J Cancer* **77**(5): 778-786, 1998.
  - 30) Burch PA, Karp JE, Merz WG, Kuhlman JE, Fishman EK: Favorable outcome of invasive aspergillosis in patients with acute leukemia. *J Clin Oncol* **5**(12): 1985-1993, 1987.
  - 31) Salvesen GS, Dixit VM: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**(4): 443-446, 1997.
  - 32) Taylor A: The toxicology of sporidesmins and other epipolythiodioxopiperazines. *Microb Toxins* **7**: 337-376, 1971.
  - 33) Mullbacher A, Hume D, Braithwaite AW, Waring P, Eichner RD: Selective resistance of bone marrow-derived hemopoietic progenitor cells to gliotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(11): 3822-3825, 1987.
  - 34) Singer GG, Abbas AK: The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* **(5)**: 365-371, 1994.

- 35) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391(6662)**: 43-50, 1998.
- 36) Tewari M, Telford WG, Miller RA, Dixit VM: CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **270(39)**: 2705-22708, 1995.
- 37) Thomas DJ, Caffrey TC: Lipopolysaccharide induces double-stranded NA fragmentation in mouse thymus: protective effect of zinc pretreatment. *Toxicology* **68(3)**: 327-337, 1991.
- 38) Matsushita K, Kitagawa K, Matsuyama T, Ohtsuki T, Taguchi A, Mandai K, Mabuchi T, Yagita Y, Yanagihara T, Matsumoto M: Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Brain Res* **743(1-2)**: 362-365, 1996.
- 39) Treves S, Trentini PL, Ascanelli M, Bucci G, Di Virgilio F: Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp Cell Res* **211(2)**: 339-343, 1994.
-