

프레닐 페놀계 항생제인 4-O-methyl-ascochlorin에 의한 호중구 세포사멸의 유도

손동훈¹ · 이선영 · 이민정 · 박주인 · 홍영섭² · 이용환³ · 장영채⁴ · 곽종영*

동아대학교 암분자치료연구센터, ¹의과대학 생화학교실, ²의과대학 예방의학교실, ³고신대의 예방의학교실, ⁴대구가톨릭의대 병리학교실

Received October 13, 2005 / Accepted November 28, 2005

Induction of Spontaneous Neutrophil Apoptosis by 4-O-Methyl-Ascochlorin, A Prenyl Phenol Compound. Dong-Hoon Son¹, Sun-Young Lee, Min-Jung Lee, Joo-In Park, Young-Seob Hong², Yong-Hwan Lee³, Young-Chae Chang⁴ and Jong-Young Kwak*. *Medical Research Center for Cancer Molecular Therapy, ¹Department of Biochemistry, ²Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Dong-A University, Busan 602-714, Korea, ³Department of Preventive Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan 602-702, Korea, and ⁴Department of Pathology, College of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-034, Korea* – Neutrophils are short-lived leukocytes that play a vital role in immune responses to bacteria, yeast, and fungi. This study was performed to investigate the effect of 4-O-methyl-ascochlorin (MAC), an anti-tumor, antibiotic, and anti-fungal prenyl-phenol compound on the spontaneous apoptosis of human neutrophils. MAC time- and dose-dependently accelerated the spontaneous apoptosis of human neutrophils. The effect of MAC on neutrophil apoptosis was blocked by pre-treatment of the neutrophils with specific inhibitors of pancaspase (zVAD-fmk), caspase-8 (zIETD-fmk), or caspase-3 (zDEVD-fmk). The cleavage of procaspase-8 and procaspase-3 was increased by MAC. Mitochondrial permeability, which was measured by the retention of DiOC₆(3), was dose-dependently increased by MAC but the change of mitochondrial permeability was not blocked by pre-treatment of neutrophils with zIETD-fmk. These results suggest that MAC induces neutrophil apoptosis by caspase-8-dependent but mitochondria-independent manner.

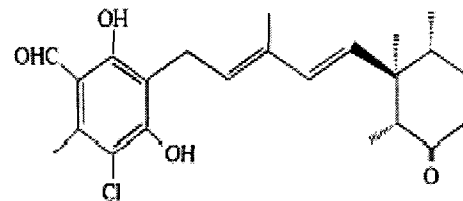
Key words – methyl-ascochlorin, neutrophils, apoptosis, caspase-8

호중구는 전체 백혈구의 50-60%를 차지하며 체내로 침입하는 세균, 효모, 진균 등을 탐식하고 다량의 활성 산소종을 생성하여 세균 등을 사멸시키는 역할을 가지는 세포로서 생체 방어 작용을 하는데 우선적으로 동원된다. 그러나 이러한 생성물에 의하여 조직의 손상을 동반하기도 하므로 염증의 종결을 위하여 활성화된 기능을 억제하는 것과 함께 호중구의 세포사멸의 조절은 필수적이며 더욱 중요하다고 알려져 있다[14,18]. 정상 호중구는 자가적으로 세포사멸에 들어가거나 주위 대식세포 등의 염증세포들에서 분비되는 FasL에 의하여 세포사멸이 되어 대식세포에 의하여 탐식되어 소멸된다[15]. 그러나 말초 혈액이나 조직에서 호중구의 생존 기간은 자극제들에 의하여 다양하게 나타난다. 이러한 호중구의 생존 기간의 연장은 조직 손상을 유발하거나 만성적 염증 상태를 지속하는가에 대한 중요한 결정 인자라는 것이 보고되었다[22].

Ascochlorin은 균류인 *Ascochyta visciae*에서 분리된 프레닐 페놀 유도체로서 항바이러스, 항암, 및 항생제의 활성을 가지고 있다(Fig. 1)[19]. 여러 가지 ascochlorin 유도체들이 개발되었는데 이들은 핵 내의 호르몬 수용체의 자극제로 알

려져 있다[20]. Ascochlorin의 유도체 중의 하나인 ascofur-anone은 사람이나 생쥐의 골수 계열 세포주의 세포분화를 유도한다[12]. Ascochlorin의 유도체인 4-O-methyl-ascochlorin (MAC)은 고지혈증이나 고혈압의 증상을 완화시키는 작용뿐만 아니라 면역 조절 기능을 나타내는 것으로 보고되었다 [5,12]. MAC는 다른 ascochlorin 유도체와 비교하여 perox-

Ascochlorin



4-O-Methyl Ascochlorin (MAC)

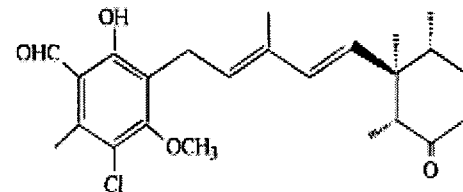


Fig. 1. Structure of ascochlorin and MAC.

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-2702, Fax : +82-51-241-6940

E-mail : jkwak@dau.ac.kr

isome proliferator-activated receptor (PPAR γ)의 활성화는 가지고 있지 않다[20].

세포사멸은 세포사멸 수용체를 통한 외부 경로와 미토콘드리아를 통한 내부적 경로의 두 가지 주요 경로에 의하여 일어난다고 알려져 있다[7]. 호중구는 사이토카인이나 성장인자 등에 의하여 세포의 생존 기간이 변하고 이들에 의하여 더욱 자연 세포사멸이 영향을 받는다[14]. 그러나 아직 호중구의 자연 세포사멸의 기전이나 약물에 의한 세포사멸의 유도의 기전 등은 잘 알려져 있지 않다. Ascochlorin은 유방암 세포의 세포사멸을 유도하여 세포 독작용을 나타낸다[17]. 따라서 본 연구에서는 항암, 항생제로 개발된 MAC이 호중구의 생존 기간에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다.

재료 및 방법

시약

MAC는 Chugai 제약 회사(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. Giemsa 시약은 Fluka사(Bushes, Switzerland) 제품을 사용하였으며 dextran은 Amersham Pharmacia Biotech사(Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였다. Interleukine-8(IL-8), Fas 항체(IgM), 및 granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)는 R&D Systems Inc. 회사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. zVAD-fmk, zIETD-fmk, 및 zDEVD-fmk는 Calbiochem사(San Diego, Ca, USA)로부터 구입하였다. RPMI-1640 배양액은 Gibco-BRL사(Rockville, MD, USA)로부터 구입하였다. Histopaque 및 propidium iodide (PI)와 다른 기초 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

호중구 분리 및 배양

혈액(100 ml)은 0.1 M EDTA (pH 7.4)와 0.9% NaCl이 들어 있는 수혈용 팩에 채혈한 후 이 혈액에 dextran을 넣고 조심스럽게 섞은 다음 플라스틱 실린더에서 1 시간 동안 실온 상태에서 방치하여 적혈구를 가라 앉혔다. 호중구를 포함하는 혈장 성분 층을 분리하여 4°C에서 850×g로 15분 동안 원심 분리하고 침전된 세포를 20 ml의 완충액(8.0 mM Na₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.6 mM CaCl₂, pH 7.4)에 부유시킨 다음 증류수를 넣어 혼재된 적혈구를 제거하였다. 임파구 분리 용액(Hespan)을 세포 층 밑에 넣고 850×g에서 30 분간 원심 분리하여 중간층에 존재하는 임파구는 버리고 침전된 과립구 층은 다시 RPMI-1640 배양액에 부유하여 사용하였다. 5% fetal bovine serum이 함유된 100 μ l의 RPMI-1640 용액에 2×10⁵ 세포를 넣고 각각의 약물을 처리한 후 37°C에서 CO₂ 배양기에서 20시간 까지 배양하였다.

호중구 세포사멸의 형태 관찰

호중구는 여러 가지 형태의 핵을 가진 세포로서 세포사멸이 일어날 경우 핵 모양의 변화가 일어난 세포의 수로서 그 정도를 측정하였다[16]. Cytospin에서 500×rpm으로 1분간 원심 분리한 다음 methanol로 고정시키고 May-Grunwald Giemsa 염색액으로 염색하였다. 호중구의 세포사멸 정도는 400배 현미경 시야에서 최소한 300 개의 세포 중에서 특이적인 변화가 나타난 세포를 확인하여 %로 표시하였다.

Flow cytometry 측정

세포사멸의 양적 측정은 phosphatidylserine의 세포막으로의 노출과 PI 염색 정도를 apoptosis detection kit (Onco-gene Research Products, Boston, MA, USA)를 사용하여 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) 결합으로 측정하였다. 호중구(1×10⁶)를 채취하여 인산완충액으로 1회 세척한 후, annexin V-FITC와 PI로 15분간 배양하였다. 반응시킨 세포의 일부(1×10⁴)를 flow cytometry를 이용하여 측정하였다.

DNA 전기영동

세포사멸된 세포에서 특징적으로 나타나는 DNA 조각을 전기영동으로 확인하였다. 5×10⁵의 호중구를 약물 처리한 다음 13,000×g에서 2분간 원심하여 분리한다. 인산염 완충액으로 세척하고 세포 용해 완충액(10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100)에 500 μ g/ml proteinase K를 첨가하여 55°C에서 12시간 처리하였다. 28,000 rpm에서 2시간 원심 분리한 후 상층 액을 분리하여 DNA를 phenol/chloroform으로 추출하고 isopropanol로 침전시켰다. 20 μ g/ml RNase A를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 1% agarose 겔에서 전기영동(50 V)을 3시간 시행하였다.

미토콘드리아 막 투과성 측정

막 투과도의 정도는 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide [DiOC₆(3), Molecular probe, Eugene, OR, USA]를 사용하여 사용법에 따라 측정하였다. 약물 처리 후 배양된 호중구(1×10⁶)를 40 nM의 DiOC₆(3)으로 30분간 37°C에서 처리한 후 인산 완충액으로 1회 세척하고 flow cytometry로 측정하였다[8].

Western blot법

전기영동 후 Western blot법을 사용하여 각각의 항체를 이용하여 procaspase-3 및 -8의 단백질의 양을 측정하였다. 처리한 호중구는 2.5% mercaptoethanol과 1.2% SDS를 넣고 100°C에서 5 분간 가열하여 처리한 다음 12% polyacrylamide 겔에서 전기영동 후 겔의 단백질을 nitrocellulose 막으로 전이시켰다. Nitrocellulose 막을 10 mM Tris HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% NaN₃으로 구성된 완충액에 5% 탈지 분유를 포함하는 완충액으로서 2시간 처리하며 1차 항체로 procas-

pase-3 항체(Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), procaspase-8 항체(Oncogene Research Product, San Diego, CA, USA), procaspase-9 항체(Oncogene Research Product), Fas-associated death domain (FADD) 항체(Santa-Cruz Biotech), 및 Mcl-1 항체(Santa-Cruz Biotech)를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Horse-radish peroxidase가 결합된 2차 항체를 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 Triton X-100이 들어 있지 않는 Tris 용액으로 세척하고 ECL chemiluminescence (Amersham, Sweden) 발색 방법으로 전개시켰다.

통계 처리

세포사멸의 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 통계학적 유의성은 자료들의 분포를 확인하고 Student's t-test를 이용하여 검정하였고 *p*값이 0.05 이하이면 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

호중구의 자연 세포사멸에 대한 MAC의 영향

호중구의 형태적 관찰은 Fig. 2A에서 나타낸 바와 같이 호중구 세포사멸의 현상을 가장 특징적이고 간단하게 확증할 수 있는 방법이다. 이 방법은 호중구의 세포 특성상 다른 어떠한 세포보다도 세포사멸 동안 핵이 농축되고 그 후 분획으로 된 것이 잘 나타나고 세포질에 액포가 나타나는 것을 쉽게 관찰할 수 있다. 호중구를 분리하여 배양 상태에서 20시간을 방치하면 50-60%의 세포는 핵의 응축 등 세포사멸의 형태를 보인다[8,16]. 6시간 동안 배양한 호중구는 거의 형태적 변화를 보이지 않았으나 20 μM 농도의 MAC를 6시간 투여하였을 때 50% 정도에서 세포사멸의 형태를 보였다. Fig. 2B에서와 같이 이러한 세포사멸을 annexin-V와 PI 염색으로 관찰하였을 때도 MAC를 처리한 경우 annexin-V와 PI에 염색되는 세포의 비율이 처리하지 않은 대조군에 비교하여 현저히 증가하는 것으로 나타났다(60±5% vs 1±0.5%, *P*< 0.001). 이러한 결과는 MAC에 의하여 호중구의 자연 세포사멸이 유도된다는 것을 알 수 있다. Fas와 결합하여 세포사멸을 유도하는 Fas 항체(IgM 형)를 6시간 처리하였을 때도 60-70% 정도의 세포사멸을 보이는 것과 비교하여[8] MAC는 Fas 자극에 의한 세포사멸과 유사한 것으로 보인다. 또한 세포사멸이 일어나는 세포에서 특징적으로 나타나는 DNA 조각들이 전기영동에서 뚜렷하게 나타났다(Fig. 2C). MAC의 세포사멸에 대한 효능을 농도별로 측정하였을 때 20 μM의 농도에서 현저히 세포사멸이 증가하여 30 μM의 농도에서 95% 이상 세포사멸을 보였다(Fig. 3). 시간에 따른 세포사멸을 관찰하였을 때 배양 6시간 후 대부분의 호중구는 생존하였으나 20 μM의 농도에서 54±10%의 세포사멸을 보임으로써 배양 후 빠른

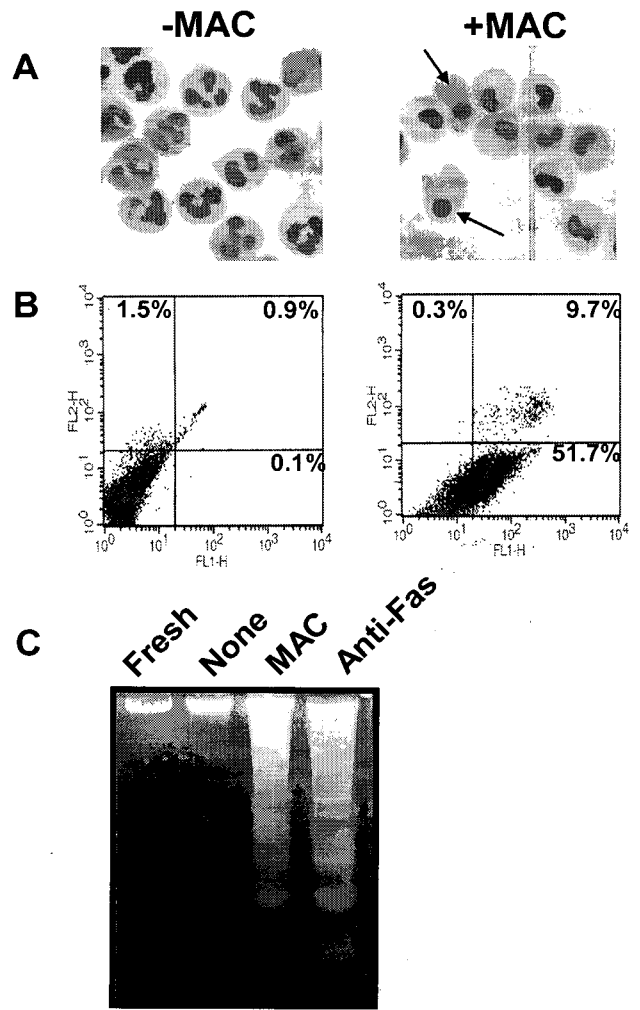


Fig. 2. Induction of neutrophil apoptosis by MAC. (A) Cytospin preparations of neutrophils after incubation *in vitro* for 6 hrs in the presence or absence of 20 μM MAC were stained with Giemsa solution. Solid arrows indicate apoptotic cells. (B) Neutrophils were cultured for 6 hrs as in panel A and cell death was assessed by annexin-V/PI staining. (C) Neutrophils were cultured for 6 hrs with or without 20 μM MAC or 1 μg/ml anti-Fas antibody (IgM). Nucleosomal DNA fragmentations in freshly isolated (Fresh) or cultured neutrophils were analyzed by agarose gel electrophoresis. Results are representatives of two or three independent experiments.

시간 내 세포사멸이 일어난다는 것을 알 수 있으며 Fas-항체에 의한 세포사멸 유도도 비슷한 의존 형태를 보였다[8].

호중구의 세포사멸 지연에 대한 MAC의 영향

호중구의 세포사멸을 지연시킨다고 알려진 LPS, GM-CSF, dibutyryl-cAMP, dexamethasone, 및 IL-8로 호중구를 20시간 처리하였을 때 세포사멸된 세포의 수가 현저히 감소

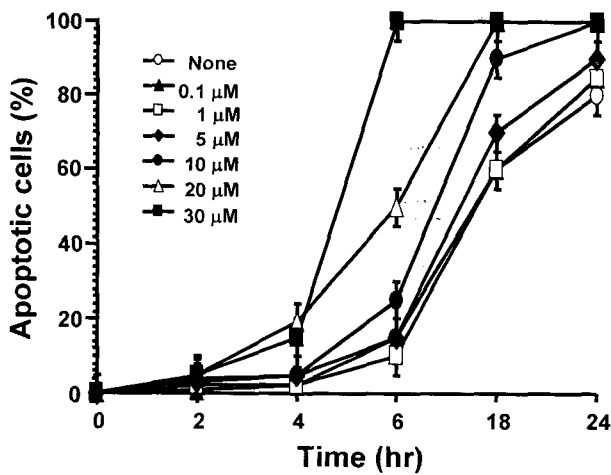


Fig. 3. Dose- and time-dependent effects of MAC on the spontaneous apoptosis of neutrophils. Neutrophils were incubated with various concentrations of MAC for the indicated times at 37°C and the apoptotic cells were identified by their morphology under light microscopy and counted. Data are reported as the percentage of cells showing the morphologic features of apoptosis. Results represent means±SD of three independent experiments.

하였다. 이들 약물을 처리하기 1시간 전에 10 μM 농도의 MAC를 투여하고 20시간 배양 후 세포사멸을 측정하였다. MAC를 처리한 세포에서는 이들 세포사멸 지연 약물이나 사이토카인들이 들어 있다라도 세포사멸이 현저히 일어나지 않음으로써 MAC는 세포사멸의 지연에는 큰 영향이 없다는 것을 알 수 있다(Fig. 4). Serine protease의 억제제인 4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride (AEBSF)는 자연 세포사멸을 현저히 억제하였으나 MAC에 의한 세포사멸 유도를 충분히 막지는 못하였다.

MAC에 의한 세포사멸 유도에서 caspase의 영향

본 연구에서는 caspase에 대한 억제제가 MAC에 의한 세포사멸에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였을 때 pancaspase 억제제인 zVAD-fmk에 의하여 MAC의 세포사멸에 대한 영향은 충분히 봉쇄되었다. 또한 caspase-3 및 caspase-8에 특이적인 억제제인 zDEVD-fmk 및 zIETD-fmk를 100 μM의 농도로 전처리하였을 때도 MAC에 의한 세포사멸은 억제되었다(Fig. 5A). Fig. 5B의 Western blot 결과에서 보는 바와 같이 MAC를 처리한 세포에서 procaspase-8과 procaspase-3의 단백질이 절단되어 그 양이 약물을 처리하지 않은 세포들에서 보다 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 procaspase-9의 양은 anti-Fas 항체를 처리한 경우 현저히 감소하였으나 MAC를 처리한 경우에는 약물을 처리하지 않고 20시간 배양한 경우와 차이를 보이지 않았다. 이들 결과는 MAC에 의한 세포사멸은 caspase-8과 caspase-3를 통한 세포사멸이라는 것을 제시하고 있다. 본 연구진들은 그전

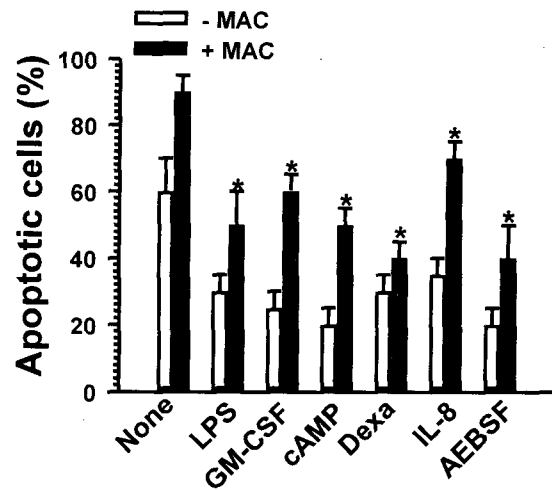


Fig. 4. Effects of MAC on the delayed apoptosis of neutrophils. Neutrophils were incubated with 20 μM MAC for 1 hr at 37°C prior to the addition of media alone (None), or media containing lipopolysaccharide (LPS, 1 μg/ml), GM-CSF (GM-CSF, 10 ng/ml), dibutyryl-cAMP (cAMP, 300 μM), dexamethasone (Dexa, 5 μM), interleukin-8 (IL-8, 100 ng/ml), or AEBSF (800 μM). The cells were cultured for 20 hrs and apoptotic cells were identified by their morphology under light microscopy. Data are reported as the percentage of cells showing the morphologic features of apoptosis. Results represent means ±SD of three independent experiments. *P<0.05 vs None.

의 연구에서 호중구의 세포사멸에서 FADD의 양이 배양 후 짧은 시간에서 증가하고 항세포사멸 단백질로서 bcl-2군에 속하는 Mcl-1의 양은 현저히 감소한다고 보고하였는데 MAC 처리 6시간 후 이들 단백질의 양적 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 5C).

MAC에 의한 세포사멸에서 미토콘드리아 막의 손상과의 관계

Fig. 6은 배양된 호중구에서 DiOC₆(3)의 세포 내 염색이 줄어드는 것을 보여 주고 있다. 이러한 사실은 호중구의 자연 세포사멸은 미토콘드리아 막 투과성이 증가하여 막전위가 소실됨으로써 일어날 수 있다는 것을 보여 준다. MAC를 처리한 세포에서 이러한 DiOC₆(3)의 소실이 농도에 따라서 현저히 증가하는 것은 MAC에 의한 세포사멸이 미토콘드리아의 손상에 의하여도 일어난다는 것을 알 수 있다(Fig. 6). 그러나 caspase-8의 억제제인 zIETD-fmk를 전처리한 경우 MAC에 의한 막 전위의 소실은 억제되지 않는 것으로 보아 비록 MAC가 미토콘드리아의 막 손상을 유발하나 세포사멸에는 직접적으로 영향을 주지는 못하는 것으로 추측된다.

MAC에 의한 세포사멸에서 항산화제의 영향

항산화제인 n-acetylcystein과 glutathione은 호중구의 자

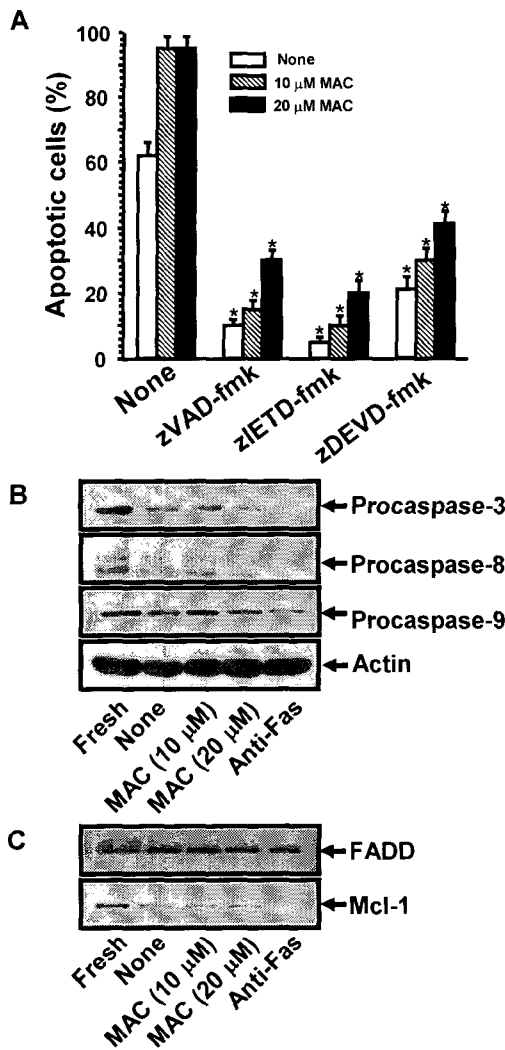


Fig. 5. Involvement of caspase-8 and -3 in the MAC-induced apoptosis of neutrophils. (A) Neutrophils were pre-incubated with 100 μ M of zVAD-fmk, zDEVD-fmk, or zIETD-fmk for 1 hr and further incubated for 20 hrs in the absence (None) or in the presence of 10 μ M or 20 μ M of MAC. (B) Neutrophils were cultured for 20 hrs in the absence (None) or presence of MAC (10 μ M or 20 μ M) or anti-Fas antibody (1 μ g/ml). (C) Neutrophils were cultured for 6 hrs as in panel B. The cell lysates from freshly isolated (Fresh) or cultured neutrophils were electrophoresed and Western blotted using specific antibodies. β -actin was used for positive control. Results are representatives of three independent experiments. $P < 0.01$ vs None

연 세포사멸을 지연시키는 작용을 보였으나 MAC에 의한 세포사멸은 억제시키지 못하였다(Fig. 7). 또한 NADPH-oxidase의 활성화에 의한 O_2^- 의 생성을 억제하는 diphenylene iodonium을 전처리하였을 때도 MAC에 의한 세포사멸은 억제되지 않았다.

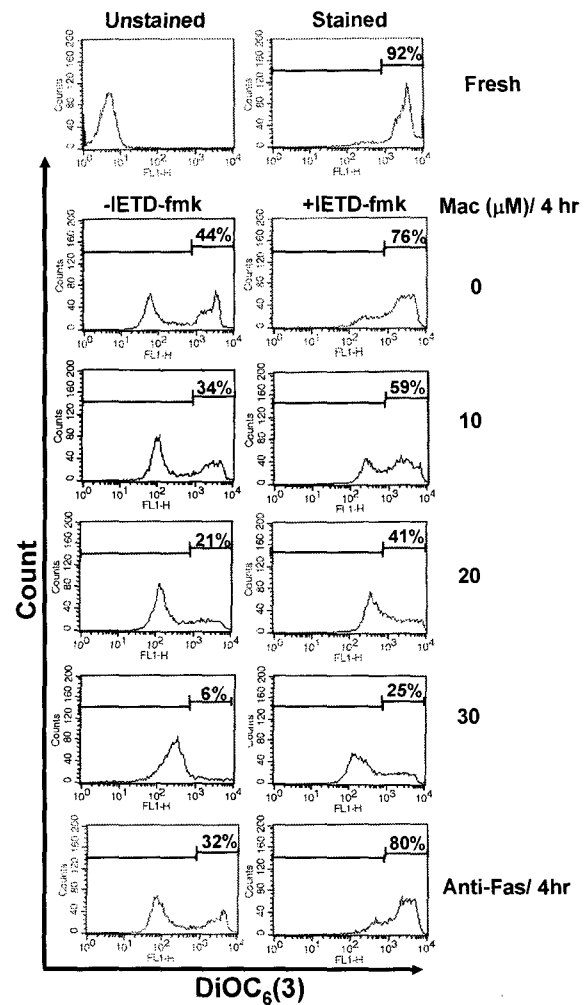


Fig. 6. Increased mitochondrial permeability in MAC-treated neutrophils. Freshly isolated (Fresh) or cultured neutrophils in the absence or presence of various concentrations of MAC for 4 hrs were treated with or without DiOC₆(3) for 30 min at 37°C. The retention of DiOC₆(3) was assessed by flow cytometry. Results are representative of three independent experiments.

고찰

호중구는 생체 내 염증이 일어나는 경우 가장 먼저 동원되는 탐식 세포로서 다량의 활성 산소종을 생성하여 세균 등을 사멸시키지만 이러한 생성물에 의하여 조직의 손상을 동반하기도 한다. 따라서 최근 들어 호중구의 세포사멸을 조절하는 것이 염증의 종결을 위하여 더욱 중요하다고 제안되고 있으므로 항암제나 항생제 등의 약물이 호중구 등의 면역세포의 생존에 어떠한 영향이 있는가를 밝히고 그 특성의 규명이 필요하다[22].

Ascochlorin이 종양 세포에 독작용을 나타내는 것은 호중구나 대식세포와 같은 탐식 세포의 활성화에 의한 것이라는 보

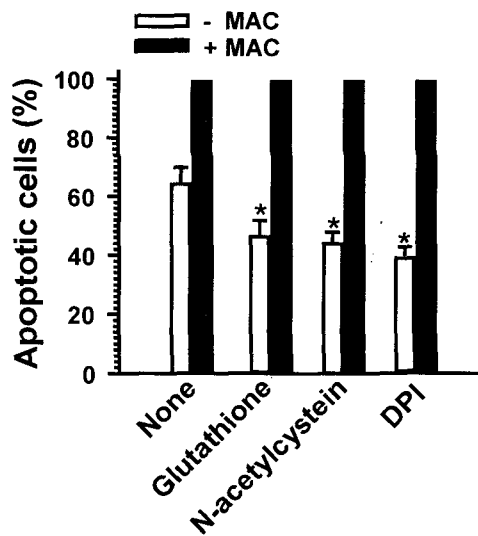


Fig. 7. Effects of antioxidants on the MAC-induced neutrophil apoptosis. Neutrophils were pretreated with or without glutathione (10 μ M), N-acetylcystein (10 μ M), or diphenylene iodonium (DPI, 100 nM) for 1 hr and further cultured in the absence or presence of MAC (20 μ M) for 20 hrs.

고가 있는데[10], ascochlorin에 의한 호중구 세포사멸의 증가가 이와 연관되었을 가능성도 있을 것으로 추측된다. Ascofuranone을 투여한 흰쥐에서 복강액 내 호중구가 현저히 증가하는 것은 호중구에 대한 chemotactic 활성이 증가한다는 것을 알 수 있으며 다른 탐식 세포인 대식세포의 활성도 증가한다는 것으로 보고되었다[13]. 따라서 MAC는 호중구를 포함한 탐식 세포의 이동, 세포 활성의 증가와 더불어 세포사멸도 현저히 증가시키며 이 약물의 항암 작용은 호중구의 세포사멸 전에 효능을 나타내는 항생제라는 것을 시사한다. Ascofuranone을 투여한 흰쥐의 복강에서 호중구는 투여 후 24 시간에 최대 수를 나타내었으나 암세포에 대한 독성은 4일 후에 나타났다고 하였다[10]. 그러나 시간이 경과한 후 복강에서 관찰된 호중구는 대부분 조각이 난 핵을 가진 형태를 가지고 있었다고 보고하였는데, 이번 연구 결과와 비교하면 이들 세포는 세포사멸되는 호중구일 가능성이 높다.

호중구의 자연 세포사멸은 미토콘드리아에서도 조절된다고 보고되었다[2]. 또한, 호중구의 세포사멸은 caspase-8의 활성화에 의하여 일어나기 때문에 세포사멸 수용체를 통하여 일어날 것으로도 제안되었다[6]. 세포사멸 수용체를 통한 신호 전달은 활성화된 caspase-8에 의하여 절단된 Bid 단백질에 의하여 미토콘드리아 막으로부터 caspase-9의 분리로 일어날 수 있다[9]. MAC를 처리한 Jurkat 세포에서 caspase-8의 억제제인 zIETD-fmk에 의하여 세포사멸은 억제되지만 caspase-8이나 FADD를 제거한 유전자 변형 세포를 이용한 경우에서도 세포사멸이 일어나는 것으로 보아 MAC에 의한 세포사멸은 전형적인 세포사멸의 경로와는 다를 것으로 제안

되었다[21]. 본 연구에서 MAC에 의하여 caspase-8이나 caspase-3의 활성이 일어나고 이들의 억제제에 의하여 세포사멸이 억제되거나 미토콘드리아의 막 손상이 caspase-8 억제제에 의하여 봉쇄되지 않았으며, procaspase-9의 양적 변화가 일어나지 않았고, FADD의 양적 변화도 일어나지 않는 것으로 보아, MAC는 caspase-8의 활성을 통한 caspase-3의 경로를 통하여 세포사멸을 유도하는 것으로 추측할 수 있다.

MAC가 호중구의 세포사멸을 일으키는 작용 기전은 아직 연구 중이나 다음과 같은 가능성이 있다. 1) MAC은 실험 동물에서 고지혈증이나 고혈압의 증세를 완화시키는 약물이므로[5] 세포사멸도 지질의 대사와 연관되어 일어날 가능성이 있다. Ascofuranone은 백혈병 세포인 L5178Y 세포의 지질 대사와 막 성분의 이상을 초래한다고 하였으며[11] 인지질 대사의 변화가 호중구의 세포사멸에 영향을 준다는 것은 보고된 바가 있다[8,16]. 2) Ascochlorin 유도체는 대식세포의 해당 과정을 증가시킨다고 하였는데[13], 호중구에서 해당 과정의 증가가 일어나면 세포 내 당질의 소모가 증가할 것이다. 최근에 호중구의 세포사멸이 글루코즈의 투여로 감소한다는 것이 보고됨으로써[3] MAC에 의한 세포사멸이 세포 내 에너지 결핍에 의한 가능성도 높다. 3) Ascochlorin은 phorbol ester에 의한 extracellular stress regulated kinase (Erk)의 활성을 억제시킨다고 보고되었는데[4], 호중구의 세포사멸이 mitogen activated kinase에 의하여 조절을 받으므로[1] MAC에 의한 mitogen activated kinase의 활성이나 억제에 의하여 세포사멸이 유도될 가능성도 있다.

본 연구에서 관찰된 바와 같이 MAC는 호중구의 세포사멸을 증가시키므로 고지혈증이나 암의 치료를 위한 MAC의 투여 시 호중구에 의한 면역 반응이 변화될 것으로 추측된다.

요 약

호중구의 세포사멸은 자연적으로 일어나지만 여러 외부 자극에 의한 신호의 전달에 의하여 증가하거나 지연된다. 본 연구에서는 항암, 항생제로 개발된 프레닐 페놀계인 ascochlorin의 유도체 중에서 백혈구 암의 세포사멸을 유도하는 4-O-methyl-ascochlorin (MAC)이 호중구의 자연 세포사멸 및 지연되는 세포사멸에 어떠한 영향을 미치는가와 그 작용 기작을 연구하였다. 호중구의 세포사멸은 사람 말초 혈액으로부터 분리하여 세포 배양 시간에 따라 형태 변화, annexin-V/propidium iodide의 염색, 및 DNA 전기영동 등으로 조사하였다. MAC는 농도 및 시간 의존 형으로 호중구의 세포사멸을 증가시켰다. 그러나 granulocyte macrophage-colony stimulating factor나 lipopolysaccharide 등에 의한 세포사멸의 지연은 MAC에 의하여 부분적으로 억제되었다. MAC에 의한 세포사멸의 유도는 pancaspase, caspase-8 및 caspase-3 억제제인 zVAD-fmk, zIETD-fmk, 및 zDEVD-fmk에

의하여 억제되었으며 procaspase-8과 procaspase-3의 단백질 양도 MAC로 처리한 호중구에서 현저히 감소하였다. 미토콘드리아 막 투과성은 MAC에 의하여 현저히 감소하였으나 zVAD-fmk에 의하여 완전히 봉쇄되지 못하였다. 이들 결과들은 MAC에 의한 호중구 세포사멸의 증가는 caspase-8 및 caspase-3의 활성을 통하여 일어나지만 미토콘드리아의 막 성분에는 영향이 없다는 것을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 기초의과학연구사업(MRC)인 암분자치료연구센터 연구비의 지원을 받아 일부 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Akgul, C., D. A. Moulding and S. W. Edwards. 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* **487**, 318-322.
- Fossati, G., D. A. Moulding, D. G. Spiller, R. J. Moots, M. R. White and S. W. Edwards. 2003. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J. Immunol.* **170**, 1964-1972.
- Healy, D. A., R. W. Watson and P. Newsholme. 2002. Glucose, but not glutamine, protects against spontaneous and anti-Fas antibody-induced apoptosis in human neutrophils. *Clin. Sci. (Lond.)* **103**, 179-189.
- Hong, S., K. K. Park, J. Magae, K. Ando, T. S. Lee, T. K. Kwon, J. Y. Kwak, C. H. Kim and Y. C. Chang. 2005. Ascochlorin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing activator protein-1-mediated gene expression through the ERK1/2 signaling pathway: inhibitory effects of ascochlorin on the invasion of renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 25202-25209.
- Hosokawa, T., T. Okutomi, M. Sawada, K. Ando and G. Tamura. 1981. Unusual concentration of urine and prevention of polydipsia by fungal prenylphenols in DOCA hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **69**, 429-438.
- Khwaja, A and L. Tatton. 1999. Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase C δ plays a central role in neutrophil apoptosis. *Blood* **94**, 291-301.
- Kroemer, G and J. C. Reed. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **6**, 513-519.
- Lee, S. Y., J. Y. Oh, M. J. Lee, M. J. Jang, H. Y. Park, J. W. Kim, D. S. Min, Y. M. Park, Y. C. Chang, Y. S. Bae and J. Y. Kwak. 2004. Anti-apoptotic mechanism and reduced expression of phospholipase D in spontaneous and Fas-stimulated apoptosis of human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2760-2770.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Magae, J., J. Hayasaki, Y. Matsuda, M. Hotta, T. Hosokawa, S. Suzuki, K. Nagai, K. Ando and G. Tamura. 1988. Antitumor and antimetastatic activity of an antibiotic, ascofuranone, and activation of phagocytes. *J. Antibiot. (Tokyo)* **41**, 959-965.
- Magae, J., K. Nagai, K. Ando, M. Yamasaki and G. Tamura. 1983. Effects of an antitumor agent, ascofuranone, on the macromolecular syntheses of intact cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* **36**, 892-899.
- Magae, J., K. Nagai, K. Ando and G. Tamura. 1988. Differentiation of mouse and human myeloid leukemia cells induced by an antitumor antibiotic, ascofurane. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 3143-3147.
- Magae, J., S. Suzuki, K. Nagai, M. Yamasaki, K. Ando and G. Tamura. 1986. In vitro effects of an antitumor antibiotic, ascofuranone, on the murine immune system. *Cancer Res.* **46**, 1073-1078.
- Maianski, N. A., A. N. Maianski, T. W. Kuijpers and D. Roos. 2004. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol.* **111**, 56-66.
- Murray, J., J. A. J. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. V. Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett and E. R. Chilvers. 1997. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor- α : Requirement of TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* **90**, 2772-2783.
- Park, M. A., M. J. Lee, S. H. Lee, D. K. Jung and J. Y. Kwak. 2002. Anti-apoptotic role of phospholipase D in spontaneous and delayed apoptosis of human neutrophils. *FEBS Lett.* **519**, 45-49.
- Sakaguchi, K., H. Nakajima, N. Mizuta, C. Furukawa, S. Ozawa, K. Ando, Y. C. Chang, H. Yamagishi and J. Magae. 2005. Selective cytotoxicity of ascochlorin in ER-negative human breast cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 46-50.
- Simon, H. U. 2003. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev.* **193**, 101-110.
- Tamura, G., S. Suzuki, A. Takatsuki, K. Ando and K. Arima. 1968. Ascochlorin, A new antibiotic, found by the paper-disc agar-diffusion method. I. Isolation, biological and chemical properties of ascochlorin. (Studies on antiviral and antitumor antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)* **21**, 539-544.
- Togashi, M., S. Ozawa, S. Abe, T. Nishimura, M. Tsuruga, K. Ando, G. Tamura, S. Kuwahara, M. Ubukata and J. Magae. 2003. Ascochlorin derivatives as ligands for nuclear hormone receptors. *J. Med. Chem.* **46**, 4113-4123.
- Tsuruga, M., H. Nakajima, S. Ozawa, M. Togashi, Y. C. Chang, K. Ando and J. Magae. 2004. Characterization of 4-O-methyl-ascochlorin-induced apoptosis in comparison with typical apoptotic inducers in human leukemia cell lines. *Apoptosis* **9**, 429-435.
- Ward, C., I. Dransfield, E. R. Chilvers, I. Haslett and A. G. Rossi. 1999. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 503-509.