

## Molt-4 T세포에 있어서 Mycophenolic Acid에 의한 세포고사의 신호전달 기전

전남대학교 의과대학 외과학교실

최수진나 · 정상영 · 김신곤

### Mycophenolic Acid Induced Apoptotic Signal Transduction in Molt-4 T-cells

Soo Jin Na Choi, M.D., Sang Young Chung, M.D. and Shin Kon Kim, M.D.

**Purpose:** Mycophenolic acid (MPA), a selective inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), is the active metabolite of the immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil (MMF). MMF is used to prevent an immune-mediated rejection response following organ transplantation via the inhibition of the IMPDH and GTP biosynthesis pathway. This study was designed to elucidate the mechanism by which MPA exerts its cytotoxic effect on human T lymphocytic and monocytic cell lines.

**Methods:** MOLT-4 and U937 cell lines were treated with MPA. Cell viability, expression of Bcl<sub>2</sub> family proteins and Fas/Fas-L, effects of antioxidants and intracellular Ca<sup>2+</sup> regulating agents and apoptosis were measured using a variety of microscopic and biochemical techniques.

**Results:** MPA induced the death of U937 and MOLT-4 cells in dose and time dependent manners, which was revealed an apoptosis with a characteristic ladder pattern of DNA fragmentation. In addition, BAPTA/AM, an intracellular Ca<sup>2+</sup> chelator protected MOLT-4 cells from MPA treated apoptosis, although it did not have an additive with thapsigargin, and increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> stores. However, antioxidants including reduced glutathione (GSH) and N-acetyl-L-cysteine (NAC) did not inhibit the apoptosis of cells by MPA. Furthermore, guanosine suppressed MPA induced apoptosis of MOLT-4 lymphocytes, although adenosine did not. MPA also increased the catalytic activity of caspase family cysteine proteases including caspase-8, 9 and 3 proteases in MOLT-4 cells. Sequential activation indicated that the

cleavage of caspase-8 and 9 precedes those of caspase-3. **Conclusion:** The results suggest that MPA induces the apoptotic death of MOLT-4 lymphocytes via the activations of caspase family proteases and the depletion of GTP. (*J Korean Surg Soc* 2002;62:8-17)

**Key Words:** Mycophenolic acid, Apoptosis, Bcl<sub>2</sub> family proteins, Caspase family cysteine proteases, GTP  
**중심 단어:** Mycophenolic acid, 세포고사, Bcl<sub>2</sub> family 단백질, Caspase family cysteine proteases, GTP

Department of Surgery, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

### 서론

Mycophenolic acid (MPA)는 장기이식 후에 발생하는 거부반응을 예방하기 위해 임상적으로 널리 사용되는 면역억제제인 mycophenolate mofetil (MMF)의 활성 화합물이다.(1) MMF는 이식항원 자극에 대한 T 및 B 림프구의 증식을 억제하여 장기이식 거부반응을 막는다고 밝혀져 있다.(2)

MPA는 guanosine 합성단계에 있어서 제한효소인 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH)에 선택적으로 작용하는 억제제이다.(1) IMPDH는 2종류가 있으며 Type I 효소는 주로 휴식기 림프구에서 발견되는 것에 반하여, Type II 효소는 주로 활성화기 림프구에서 발견되는데, MPA는 Type I보다 Type II IMPDH에 5배 정도의 친화도를 갖고 있다.(3,4) MPA는 Type II IMPDH와 guanosine의 수준의 감소를 초래하여 세포의 성숙을 억제한다고 알려져 있다.(5) 또한 MPA는 T 및 B 림프구의 DNA 합성을 방해하여 세포고사(apoptosis)를 유도함으로써 면역기능을 억제한다고 보고되고 있으나 그 작용기전에 대한 신호전달계는 밝혀져 있지 않다.

세포고사는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)이라고 알려져 있

책임저자 : 최수진나, 광주광역시 동구 학동 8번지  
☎ 501-191, 전남대학교 의과대학 외과학교실  
Tel: 062-220-6473, Fax: 062-227-1635  
E-mail: choisjn@chonnam.ac.kr  
접수일 : 2001년 11월 15일, 게재승인일 : 2001년 12월 8일  
본 논문의 요지는 2001년도 대한외과학회 춘계학술대회에서  
구연되었음.

다.(6) 세포 죽음에서 이와 구분되는 세포괴사(necrosis)는 세포막의 파괴로 물과 전해질이 세포 내로 유입되어 미토콘드리아 등 세포 내 구조물이 팽창하여 파괴되는 특징을 가지고 있다. 이에 반하여 세포고사는 빠른 탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질 내의 칼슘 농도의 증가, chromatin의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절(ladder pattern of DNA fragmentation) 형성 및 핵의 절단과 세포고사 소체(apoptotic body)의 형성을 동반한다.(7) 세포고사는 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF)에 의한 세포 죽음 연구로부터 신호전달 기전이 밝혀지기 시작하였으며, 최근에는 caspase family cysteine proteases의 중요성이 제시되고 있다.(7,8) Caspase는 지금까지 14종류가 알려져 있으며, 이 중 caspase-3 proteases (CPP32, Yama 및 Apopain으로 알려짐)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 신호 활성을 증폭하면서 다른 caspase 등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포 내의 여러 신호전달 분자의 활성을 조절한다.(9,10) 특히 caspase-3 protease는 세포 핵산 합성에 중요한 효소인 PARP를 분해하여 세포고사를 초래한다.(11)

본 연구의 목적은 MPA에 의해 유도되는 면역세포의 세포죽음의 성격과 세포고사의 신호전달 기전을 밝히고자 T 림프구 세포주인 MOLT-4 세포와 promonocytic leukemia 세포주인 U937 세포에 MPA를 처리한 후 세포 생존율, caspase family cysteine proteases 활성, Bcl-2 family 단백질, PARP, Fas 및 Fas-L 단백질 등의 발현과 활성을 측정하였다.

## 방 법

### 1) 세포주 및 시약

(1) 세포주: 사람 T 림프구 세포주인 MOLT-4 세포와 promonocytic leukemia 세포주인 U937 세포를 한국 세포주은행에서 분양 받아 실험하였다.

(2) MPA와 Guanosine: MPA와 guanosine은 Sigma사 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. MPA는 0.01M 농도가 되도록 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였고, 사용 시 RPMI-1640 배지를 희석하여 사용하였으며, guanosine은 DMSO에 녹여 0.1 M 농도가 되게 한 후 최종 농도는 RPMI-1640 배지로 희석하였다.

### 2) 세포 배양

MOLT-4 세포와 U937 세포를  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island,

NY, England)이 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, England) 배양액을 넣어 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 MPA를 처리한 후 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학 및 분자생물학적 실험을 수행하였다.

### 3) 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 MTT assay를 이용하였다. 세포 배양판(96-well plate)에 세포( $1 \times 10^5$  세포수/ml)를  $100 \mu\text{l/well}$ 씩 분주하여 18시간 이상  $\text{CO}_2$  세포 배양기에서 안정시킨 후 실험에 사용하였다. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액(5 mg/ml in PBS)은 세포 배양액 부피에 최종 1/10 부피가 되게 첨가하였다. 반응 4시간 후 10% sodium dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액을  $100 \mu\text{l/well}$ 에 첨가하여 살아 있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 ELISA 분석기로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.(12)

### 4) DNA 분절 확인

MPA 처리 후 세포를 원심분리하여 채집, PBS로 세척한 후 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 세포 파쇄액에 RNase를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응시켜 RNA를 제거하였다. 세포 내 단백질은 단백질 침전 완충용액을 이용하여 제거한 후, isopropanol을 이용한 침전에 의하여 응축된 genomic DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공 건조기로 건조하였다. 여기에 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 DNA pellet을 용해한 후 UV 분광광도계를 이용하여 260 nm와 280 nm 파장에서 genomic DNA의 농도 및 순도를 측정하였다. 분리된 genomic DNA  $5 \mu\text{g}$ 은 1.5% agarose gel에서 50 V, 2시간 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 적외선하에서 DNA 분절현상을 관찰하였다.

### 5) Caspase family cysteine proteases 활성도 측정

MOLT-4 세포와 U937 세포를  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 lysis buffer로 용해하고,  $20,000 \times \text{g}$ 로 15분간 원심 분리시켰다. 원심분리하여 얻은 세포 파쇄액은 bicinchoninic acid (BCA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 방법으로 단백질을 정량하고, 세포 파쇄액(단백질 양:  $100 \mu\text{g}$ )을 분석 완충용액에 희석된 형광기질과  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 반응시킨 후 fluorometer로 측정하였다. Caspase 효소 활성 측정을 위한 형광기질은 Calbiochem사(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 먼저 caspase-3 효소 활성 측정은 형광기질인 Ac-DEVD-AMC  $50 \mu\text{M}$ 을 사용하였으며, 이것의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성 정도를 결정하였다. 이 때의 파장은 380 nm excitation wavelength와 460 nm emission wavelength를 사용하였다. Caspase-6 효소

활성은 기질로서 Ac-VEID-AMC 50 μM을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 380 nm excitation wavelength와 460 nm emission wavelength의 파장하에서 측정하였다. Caspase-2 효소 활성은 기질로서 Z-VDVAD-AFC 50 μM을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm excitation wavelength와 505 nm emission wavelength의 파장하에서 측정하였다. Caspase-8 효소 활성은 기질로서 Ac-VEID-AFC 50 μM을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm excitation wavelength와 505 nm emission wavelength의 파장하에서 측정하였다. Caspase-9 효소 활성은 기질로서 Ac-LEHD-AFC 50 μM을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm excitation wavelength와 505 nm emission wavelength의 파장하에서 측정하였다.

6) Western blotting

배양된 MOLT-4 세포 및 U937 세포에 MPA를 처리한 후 세포를 채취하여, cold Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 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 30분간 용해하였다. 동량의 세포 파쇄액(단백질; 200 μg)에 2배의 sample buffer와 혼합하여 100°C에서 3분 동안 반응시킨 후, 12.5% sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane으로 semidry electrotransfer system을 이용하여(4°C, 30 V에서 16시간) 이동시킨 후 blocking buffer (10% skim milk)로 상온에서 2시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 0.05% (v/v)의 Tween-20이 함유된 Tris-buffered sample buffer (TBST)에 1 : 1,000으로 희석된 anti-PARP, anti-Bcl<sub>2</sub>, anti-Bax, anti-Fas, anti-Fas-L 및 anti-Bcl<sub>X<sub>L</sub></sub> 항체와 상온에서 2시간 반응시킨 후 이차 항체 horse-radish peroxidase (HRP) conjugated anti-rabbit IgG를 상온에서 1시간 반응시켰으며, immune-reactive bands는 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)를 이용하여 필름에 현상하였다.

결 과

1) MPA에 의한 MOLT-4와 U937 세포 생존율 측정

T 림프구인 MOLT-4 세포와 단핵구인 U937 세포에 MPA를 다양한 농도로 처리하여 24시간 배양한 다음 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다. MPA 처리농도 0.5 μM에서부터 U937 세포의 생존율은 25% 이상 감소하기 시작하여 5 μM 농도에서는 50% 정도로 감소하였으며, 농도 의존적인 세포 생존율 감소를 보였다. 또한 MPA는 T 림프구인 MOLT-4 세포에서 0.05 μM의 농도에서부터 유의한 세포독성을 나타내어 0.5 μM 농도에서 50% 정도 그리

고 1 μM에서는 약 80%의 생존율 감소를 초래하였다. 이상의 결과는 MPA가 MOLT-4 및 U937 세포의 생존율을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 또한 MPA에 의한 세포독성에 T 림프구인 MOLT-4 세포가 더욱 민감하게 반응함을 시사하였다.

MPA에 의한 세포독성의 시간 의존적인 변화를 확인하기 위하여 U937 세포는 5 μM 농도로, MOLT-4 세포는 0.5 μM 농도로 처리한 후 세포 생존율의 변화를 관찰하였다. U937 및 MOLT-4 세포는 MPA 처리 4시간 이후부터 유의한 세포 생존율 감소가 시작되어 30시간 이후에는 약 50% 미만의 세포만이 생존하였다. 이상의 결과는 MPA에 의한 세포독성이 U937 및 MOLT-4 세포에서 시간 의존적으로 축적됨을 의미하였다.

2) MPA에 의한 MOLT-4 T 림프구 핵의 분절화 (fragmentation) 현상

MOLT-4 세포에서 MPA에 의한 세포독성이 세포고사 혹은 세포괴사 중 어떤 기전에 의하여 이루어졌는지를 규명하기 위해 핵산의 분절현상을 확인하였다. MOLT-4 세포에 0.5 μM MPA를 처리한 각 시간대에 genomic DNA를 추출하여 1.5% agarose gel상에서 전기영동하였다. 핵산 분절의 확인은 genomic DNA를 ethidium bromide로 염색하여 조사하였으며, 그 결과 MPA 처리 25시간 이후부터 세포고사의 전형적인 특징인 사다리 모양의 DNA 분절(ladder-pattern of DNA fragmentation) 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

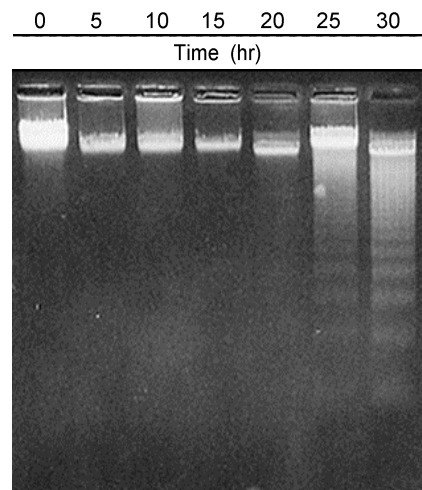
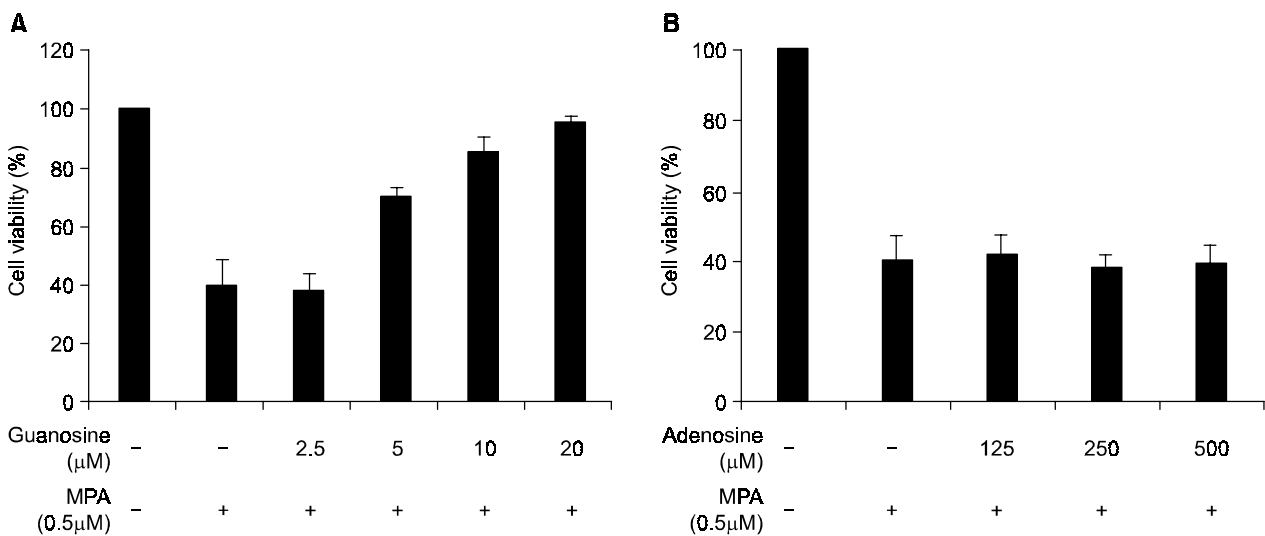


Fig. 1. MPA induced the ladder-pattern fragmentation of genomic DNA in MOLT-4 cells. The cells were treated with 0.5 μM of MPA for various periods. The genomic DNA was isolated from the cells and separated on 1.5% agarose gels. The DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

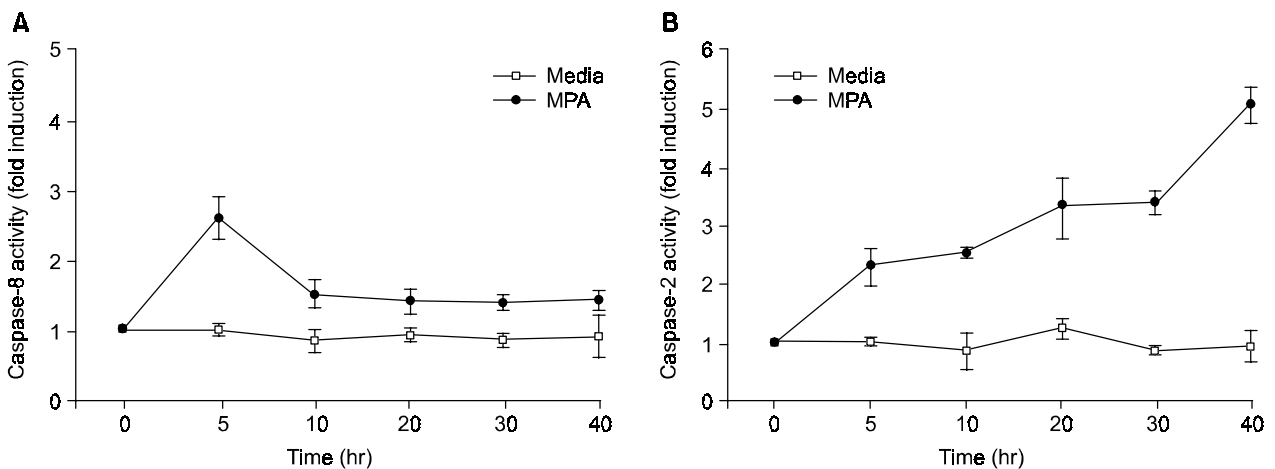
**3) MPA에 의해 유도되는 MOLT-4 T 림프구 세포고사에 미치는 항산화제의 효과**

반응성 산소기(reactive oxygen species; ROS) 등을 포함한 산화적 손상(oxidative stress)은 세포고사 현상을 유도하는 작용 기전의 하나로 잘 알려져 있다.(13) 이에 본 연구에서는 MOLT-4 T 림프구의 세포고사를 유도하는 MPA에 의한 세포독성의 작용 기전에서 산화적 손상의 관련 여부를 조사하고자 항산화제인 reduced glutathione (GSH)과

N-acetyl-L-cysteine (NAC)을 다양한 농도로 처리한 1시간 후, MPA 0.5  $\mu$ M를 부가하여 24시간 후에 세포 생존율을 조사하였다. MPA 단독 처리에 의하여 MOLT-4 세포의 생존율이 70% 정도 감소하였으며, 다양한 농도의 항산화제, GSH 및 NAC 처리는 MPA에 의한 세포독성에 유의한 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과는 MPA에 의해 유도되는 MOLT-4 T 림프구 세포고사는 산화적 세포 손상의 기전에 의하여 매개되지 않음을 의미하였다.



**Fig. 2.** The effect of guanosine and adenosine on MPA-induced apoptosis in MOLT-4 lymphocytes. The cells were pretreated with various concentrations of guanosine (A) and adenosine (B) for 10 hours and followed by the addition of 0.5  $\mu$ M of MPA. The cell viability was measured by MTT assay 24 hours later. The results represented as the mean  $\pm$  SD of quadruplicates.



**Fig. 3.** MPA induced the activation of caspase-8 and 2 proteases in MOLT-4 T lymphocytes. Cells were treated with 0.5  $\mu$ M of MPA for various periods. The lysate from the cells were used to measure the activity of caspase-8 and 2 proteases activity by using fluorogenic peptide Z-IETD-AFC (A) and Z-VDVAD-AFC (B) as substrates. Each value represented as the mean  $\pm$  SD of quadruplicates.

**4) MPA에 의한 MOLT-4 T 림프구 세포고사에 미치는 세포 내 Ca<sup>2+</sup>의 영향**

세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 변화는 세포고사 현상을 매개하는 여러 신호전달 분자의 효소 활성화, 세포 주기(cell cycle)의 조절, 세포 증식과 분화 등의 다양한 세포 기능을 변화시킨다.(14,15) 본 연구에서는 세포 내부 혹은 세포 밖의 Ca<sup>2+</sup> 농도의 변화가 MPA에 의한 MOLT-4 T 림프구 세포고사에 미치는 영향을 확인하고자 EDTA, EGTA, BAPTA/AM, 및 thapsigargin 등을 처리한 후 세포 생존율을 조사하였다. 세포밖에 존재하는 Ca<sup>2+</sup>을 chelation해서 농도를 저하시키는 EDTA 및 EGTA는 MPA에 의하여 저하된 MOLT-4 세포의 생존율을 유의한 정도로 회복시켰다. 또한 세포질 Ca<sup>2+</sup> 농도를 변화시키는 BAPTA/AM과 thapsigargin를 이용한 실험에서 BAPTA/AM는 MPA에 의한 세포독성으로부터 MOLT-4 세포의 생존율을 회복시킨 반면에, thapsigargin의 MPA 세포독성에 미치는 유의한 영향은 관찰할 수 없었다. 이상의 결과는 Ca<sup>2+</sup>이 MPA에 의한 MOLT-4 림프구의 세포고사 과정에 관여하며, 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가를 억제하면 이에 비례하여 세포고사 정도가 감소됨을 시사하였다.

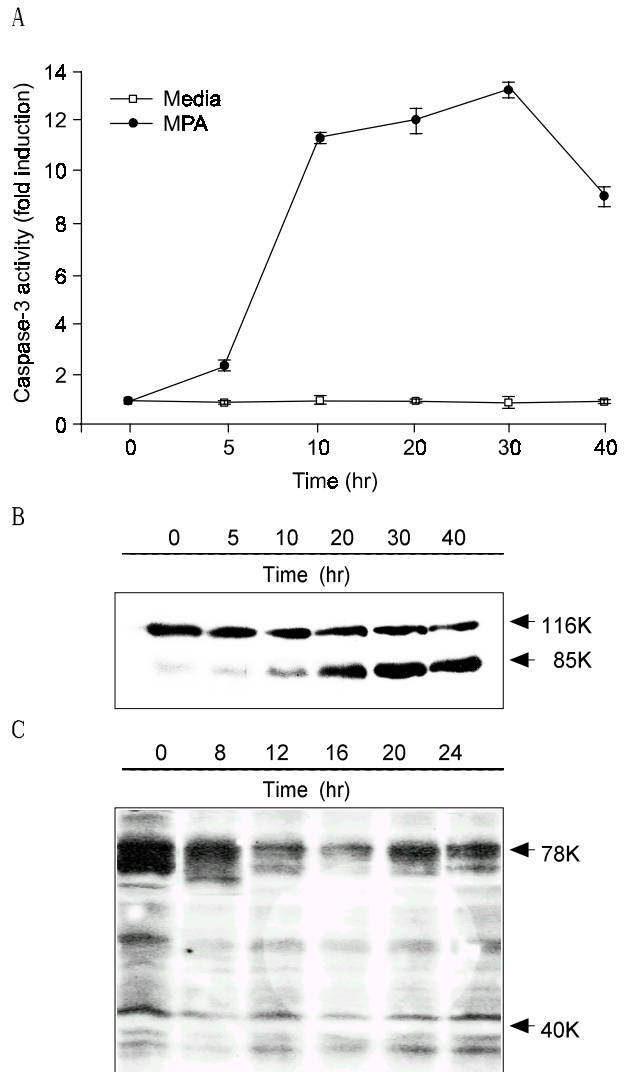
**5) MPA에 의해 유도되는 세포고사에 미치는 guanosine의 영향**

MPA는 IMPDH의 억제제로서 guanosine 합성을 억제한다고 잘 알려져 있다.(1,16) MPA에 의한 세포고사 기전에서 guanosine의 관련 여부를 판단하고자 다양한 농도의 guanosine 10시간 전 처리가 0.5 μM MPA에 의한 MOLT-4 림프구 세포독성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 2A의 결과에서처럼 0.5 μM MPA 단독처리는 MOLT-4 세포의 생존율을 60% 이상 감소시켰으나 guanosine 5 μM 이상의 농도에서 농도 의존적으로 세포 생존율을 회복하였다. Guanosine에 의한 효과가 MPA 세포독성에 선택적인지 여부를 확인하기 위하여 다른 핵산 염기인 adenosine을 다양한 농도로 24시간 처리한 후 세포 생존율을 조사하였다 (Fig. 2B). Adenosine은 MPA에 의한 MOLT-4 림프구의 세포고사에 유의한 영향을 미치지 못했다. 이상의 결과는 MPA에 의한 MOLT-4 림프구의 세포고사는 guanosine 합성의 억제로 인한 guanosine의 고갈이 중요한 작용 기전임을 시사하고 있다.

**6) MPA에 의한 MOLT-4 림프구 세포고사에 있어서 caspase family cysteine proteases 활성화**

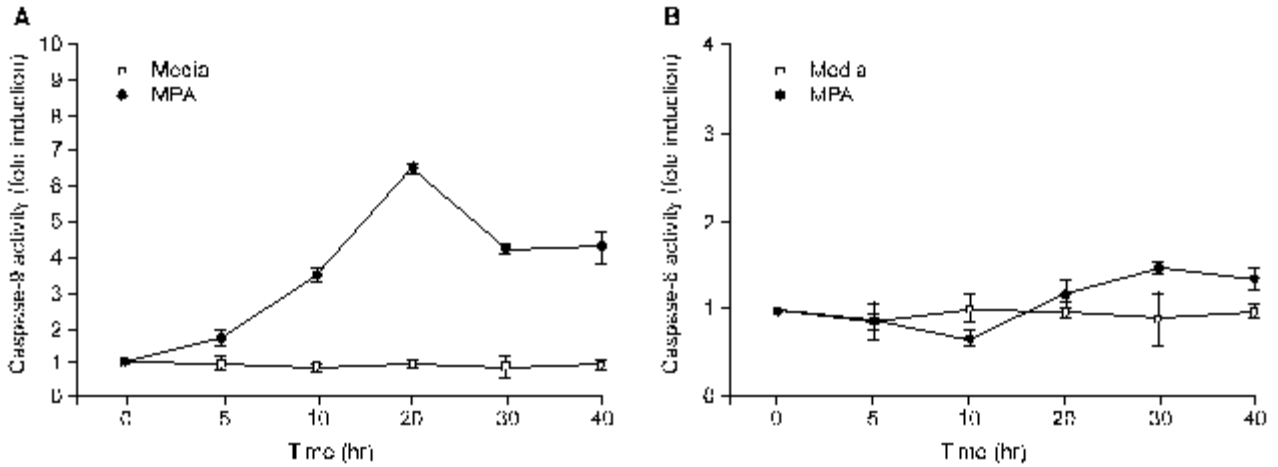
MPA에 의한 MOLT-4 림프구 세포고사의 작용기전을 알아보기 위하여 caspase family cysteine protease인 caspase-2, 3, 6, 8 및 9의 효소 활성을 fluorogenic substrates를 이용하여 측정하였다. MPA 처리에 의하여 caspase-8 protease의

효소 활성화는 처리 5시간에 최고치(대조군의 2.5배)를 나타냈으나 이후 점차 감소하여 10시간 실험군에서는 대조군의 수준으로 복귀하였다(Fig. 3A). MPA는 caspase-2 protease의 효소 활성을 MPA 처리 5시간 후부터 지속적으로 증가시켰다(Fig. 3B). Caspase-3 protease의 효소 활성화는 MPA 처리 5시간 후부터 증가하기 시작했으며, 10시간째에는 대조군의 11.5배 정도의 활성을 나타낸 후 30시간까지 활



**Fig. 4.** MPA induced the enzymatic activation of caspase-3 protease of MOLT-4 cells in a time-dependent manner. The cells were treated with 0.5 μM of MPA for various periods. (A) The lysate from the cells were used to measure the activity of caspase-3 protease activity by using fluorogenic peptide Ac-DEVD-AMC as a substrate. Each value represented as the mean ± SD of quadruplicates. (B) PARP cleavage was measured by Western blotting analysis with anti-PARP antibodies. (C) PKC-δ cleavage was measured by Western blotting with anti-PKC-δ antibodies.



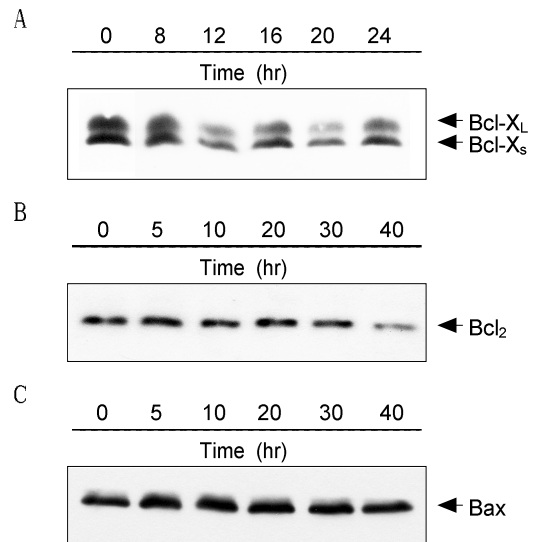


**Fig. 5.** The enzymatic activity of caspase-9 and 6 proteases in MPA-treated MOLT-4 lymphocytes. The cells were treated with 0.5 μM of MPA for various periods. The lysate from the cells were used to measure the activity of caspase-9 and 6 proteases activity by using fluorogenic peptide Ac-LEHD-AFC (A) and Ac-VEID-AMC (B) as substrates.

성이 진행되다 서서히 감소하였다(Fig. 4A). 또한 caspase-3 protease의 활성화에 의한 세포질 내 기질의 변화를 관찰하기 위하여 MPA 처리 후 MOLT-4 림프구의 PARP 및 PKC-δ 단백질의 발현 상태를 Western blotting analysis로 조사하였다. Caspase-3 protease의 기질 중의 하나인 116 kDa PARP는 MPA 처리 5시간 후부터 85 kDa의 분자량을 갖는 비활성 fragment로 분해가 시작되어 20시간 처리군에서는 50% 이상이 분해되어 있었다(Fig. 4B). 또 다른 기질의 하나인 PKC-δ는 MPA 처리 8시간 이후부터 78 kDa의 온전한 효소가 분해되기 시작하여 12시간 실험군에서 40 kDa의 catalytic fragment가 확인되었다(Fig. 4C). Caspase-9 protease의 효소 활성은 MPA 처리 5시간 이후부터 서서히 증가하기 시작하여 20시간 처리군에서는 최고치(6.5배) 활성을 나타낸 후 급격하게 감소하였다(Fig. 5A). Caspase-6 protease의 효소 활성은 MPA 처리 시 유의한 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 5B).

**7) MPA에 의한 MOLT-4 림프구 세포고사에 있어서 Bcl<sub>2</sub> family 단백질의 발현 양상의 변화**

세포고사를 조절하는 세포 내 중요 신호전달분자인 Bcl<sub>2</sub> family 단백질은 다른 암유전자 단백질과는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포의 생존을 조절, 즉 세포의 죽음을 억제하거나 촉진하는 기능이 있다. 본 실험에서는 MPA 처리 시 MOLT-4 림프구의 Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>S</sub>, Bcl<sub>2</sub> 그리고 Bax의 발현의 영향을 알아보기 위하여 MOLT-4 림프구에 0.5 μM MPA를 처리한 후 세포 파쇄액을 얻었다. 단백질 정량 후 anti-Bcl-X<sub>L</sub>, anti-Bcl-X<sub>S</sub>, anti-Bcl<sub>2</sub> 그리고 anti-Bax 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. 세포사멸 억제단백질로 알려진 Bcl-X<sub>L</sub>의 발현은 MPA 처리 12시간 이후부터 현저한 감소를 보였으나 세포사멸 촉진 단



**Fig. 6.** The expression of Bcl<sub>2</sub> family proteins including Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>S</sub>, Bcl<sub>2</sub> and Bax in MPA-treated MOLT-4 lymphocytes. The cells were treated with 0.5 μM of MPA for the indicated periods. Then, cell lysates were probed with antibodies for Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>S</sub>, Bcl<sub>2</sub> and Bax proteins. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence.

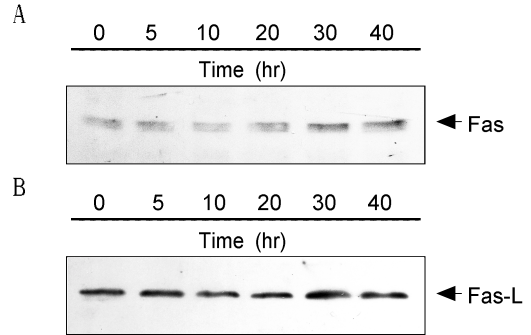
백질로 알려진 Bcl-X<sub>S</sub>의 발현은 MPA 처리 시 시간 의존적인 발현 변화 양상을 관찰할 수 없었다(Fig. 6A). 그러나 Bcl-X<sub>L</sub>과 Bcl-X<sub>S</sub>의 상대적인 비율(Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-X<sub>S</sub>)은 세포고사를 촉진하는 Bcl-X<sub>L</sub>의 발현 감소로 인하여 MPA 처리 12시간 이후부터 감소하였다. Bcl<sub>2</sub> 단백질은 MPA 처리 40시간 실험군에서만 28 kDa Bcl<sub>2</sub> 단백질의 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 6B). 그러나 세포고사를 촉진하는 Bax 단백

질의 발현 양상은 MPA 처리 시간에 따른 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 6C).

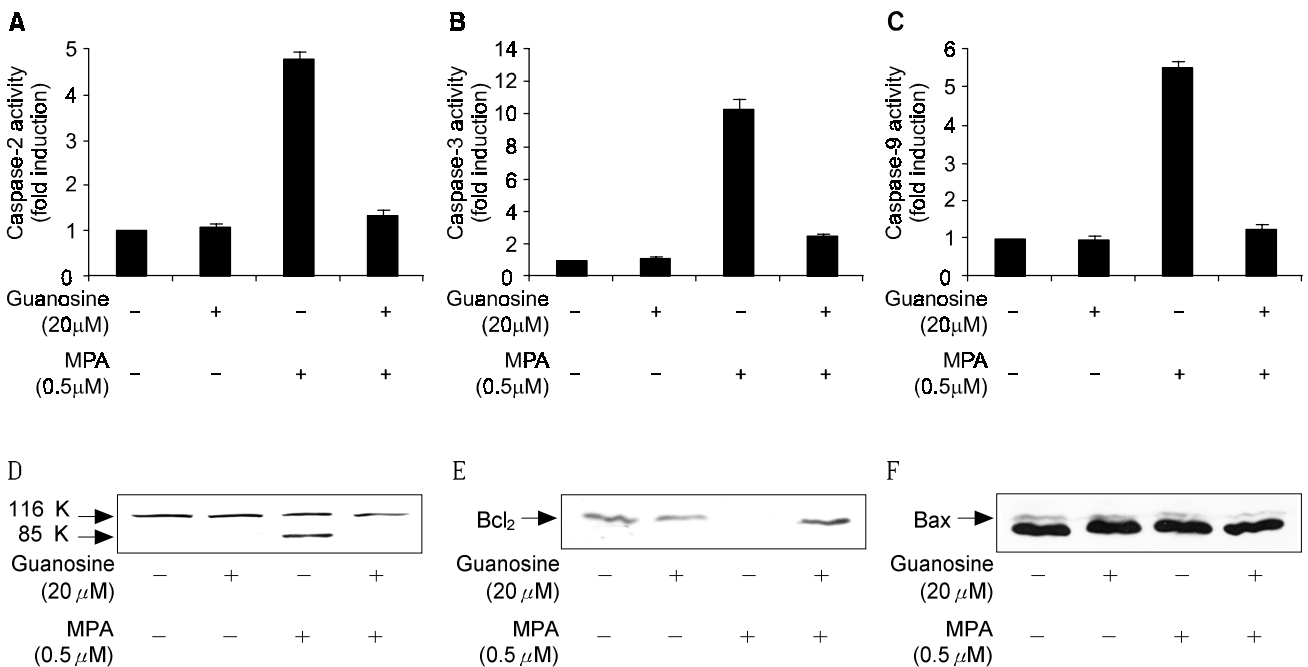
**8) MPA에 의한 MOLT-4 세포 죽음에 있어서 Fas/Fas-L 단백질의 발현 양상 변화**

Fas 항원은 tumor necrosis factor (TNF) 및 nerve growth factor (NGF) 수용체속(receptor family)에 속하며, 세포막 외부에 cysteine이 풍부한 3개의 domain (cysteine rich domain) 이 있는 단백질로서 Fas ligand에 특이적으로 결합하여 세포고사 신호를 전달한다. Fig. 3에서 caspase-8 protease의 효소 활성 증가의 결과는 이 효소가 신호전달체계 중에서 상방에 위치한 Fas 및 Fas-L의 영향을 받을 수 있음을 암시하였기 때문에 MPA를 처리한 MOLT-4 림프구에서 Fas 및 Fas-L 발현을 조사하였다. MPA는 MOLT-4 세포에서 처리 30시간 이후부터 현저하게 45 kDa의 Fas 단백질 발현을 증가시켰다(Fig. 7A). 동일한 시간대의 실험군에서 Fas-L의 발현 역시 약간 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 7B). 이상의 결과는 MPA가 MOLT-4 세포의 Fas 항원의 발현을 증가시켰으며, 이로 인하여 caspase-8 protease의 효

소 활성을 증가시켜서 caspase 신호전달계의 최하방인 caspase-3 protease의 활성을 유도하여 세포죽음을 매개하였으리라 추정되었다.



**Fig. 7.** The expression of Fas/Fas-L in the MPA-induced death of MOLT-4 lymphocytes. Cells were treated with 0.5  $\mu$ M MPA for the various periods. The expression of Fas and Fas-L by the MPA in cell lysates was detected by Western blotting analysis using anti-Fas (A) and anti-Fas-L antibodies (B).



**Fig. 8.** The guanosine suppressed the catalytic activation of caspase protease, including caspase-2, 3 and 9, as well as Bcl<sub>2</sub> degradation in MOLT-4 cells by MPA. The cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were pretreated with 20  $\mu$ M guanosine for 10 hours and followed by stimulated with 0.5  $\mu$ M of MPA. And then cell lysate was used to measure the activity of caspase-2 proteases (A) caspase-3 proteases (B) caspase-9 proteases (C) by using fluorogenic biosubstates. The datas represent mean  $\pm$  SD of quadruplicates. The Guanosine was preincubated in MOLT-4 cells and followed by the addition of 0.5  $\mu$ M MPA for 20 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-PARP antibodies (D). The Guanosine was preincubated in MOLT-4 cells and followed by the addition of 0.5  $\mu$ M MPA for 40 hours. After cell lysis, equal amount of protein was used to subjected on 14% SDS-PAGE and immunoblotted with anti-Bcl<sub>2</sub> (E) and anti-Bax (F) antibodies. The immuno-reactive signals were visualized by enhanced chemiluminesce kit.

### 9) Guanosine이 MPA에 의한 MOLT-4 세포 죽음에 미치는 효과

MPA에 의한 MOLT-4 세포고사에 미치는 guanosine의 영향을 조사하기 위하여 guanosine을 전 처리한 후 MPA에 의한 세포죽음을 MTT assay로 조사하였다(Fig. 2). Guanosine 전 처리는 MPA (0.5  $\mu$ M, 24시간)에 의하여 40% 정도로 감소된 MOLT-4 세포의 생존율을 90% 이상으로 회복시켰다. 이에 본 실험에서 guanosine에 의한 MOLT-4 세포 생존율 회복이 MPA에 의한 세포고사 신호전달계의 caspase proteases 활성 조절의 결과인지를 확인하였다. Guanosine (20  $\mu$ M)을 단독 혹은 MPA (5  $\mu$ M)에 전 처리한 후에 MOLT-4 세포의 caspase-2, 3 및 9의 효소 활성을 측정하였다. MPA에 의하여 MOLT-4 세포에서 약 4.5배 증가된 caspase-2 protease의 활성은 guanosine 전 처리 시 대조군 수준을 나타냈다. 두 약제의 단독처리 시 MOLT-4 세포에서 caspase-2 protease의 활성에는 아무런 변화가 없었다(Fig. 8A). 또한 MPA는 MOLT-4 세포에서 caspase-3 protease의 활성은 10배 그리고 caspase-9 protease의 활성은 5배 이상 증가시켰으나, guanosine 전 처리에 의하여 두 효소의 활성이 대조군 수준으로 저하되었다(Fig. 8B, 8C). Fig. 8B의 결과와 유사하게 guanosine 전 처리(20  $\mu$ M, 10시간) 시 MPA (5  $\mu$ M, 20시간)에 의한 PARP 단백질의 분해를 억제하였다(Fig. 8D).

세포고사 신호전달계의 중요분자인 Bcl<sub>2</sub>와 Bax 단백질의 발현에 대한 guanosine의 영향을 조사하였다. MPA (5  $\mu$ M)를 처리한 40시간 후에 사라진 Bcl<sub>2</sub> 단백질이 guanosine을 전 처리군에서는 45 kDa의 온전한 분자량으로 확인되었다(Fig. 8E). 그러나 Bax 단백질의 발현에는 MPA 혹은 guanosine 모두가 아무런 영향을 미치지 못했다(Fig. 8F). 이상의 결과는 guanosine이 MPA에 의한 MOLT-4 세포의 세포고사를 억제하였으며, 그 작용기전은 caspase-2, 3 및 9 protease의 효소 활성억제에 의하였음을 시사한다.

## 고 찰

장기이식을 받은 환자는 조직 항원성 부적합에 의한 거부반응을 방지하기 위하여 면역억제제를 투여 받게 된다.(16) 최근까지 장기이식 후에 사용되는 면역억제제로는 cyclosporine, corticosteroid 및 FK506이 주된 면역억제제이었으나 최근 mycophenolate mofetil (MMF)의 사용이 급격히 증가하고 있다. MMF는 cyclosporine이나 FK506과는 달리 신장독성과 신경독성이 없기 때문에 신장이나 간이식 초기에 발생하는 장기이식의 거부반응을 치료하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.(17) 최근 연구 결과에 따르면 면역억제제로 사용되는 MMF의 활성대사산물인 mycophenolic acid (MPA)는 guanosine 합성에서 중요한 효소인

inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH)의 가역적인 억제제로서(1) 세포고사 기전의 활성화를 통하여 T 세포의 기능을 억제함이 밝혀졌다.(18) 특히 림프구는 다른 종류의 세포와 비교하여 GTP 고갈에 특히 민감하다고 알려져 있다.(19) 본 연구에서 guanosine의 전 처리는 MPA에 의한 MOLT-4 림프구의 생존율 감소를 방지하였다. Guanosine은 MPA에 의하여 활성화되는 caspase-2, 3 및 9 protease의 효소 활성을 억제할 뿐만 아니라 Bcl<sub>2</sub>의 분해를 방지하였다. 이러한 결과는 GTP가 caspase family cysteine protease의 활성화에 중요함을 시사하였다.

본 연구에서 MPA는 사람 T 림프구인 MOLT-4 세포와 단핵구인 U937 세포에서 세포고사를 유도하였으며, MPA의 IC<sub>50</sub>은 U937 세포에 비해 MOLT-4 세포에서 10배 정도 낮았다. 이상의 결과는 MPA의 세포독성이 T 림프구에 더 민감함을 의미한다. MPA에 의한 MOLT-4 림프구의 세포독성은 MPA의 농도와 시간에 의존하였다. 한편, 세포고사 현상에서 반응산소기(reactive oxygen species; ROS)에 의한 산화적 손상(oxidative stress)이 중요하다고 알려져 있다.(13) 본 연구에서도 MPA에 의한 MOLT-4 림프구의 세포독성이 산화적 손상에 의하여 매개됨을 확인하기 위하여 GSH와 NAC 등의 anti-oxidant로 처리하였으나 MPA에 의한 세포고사에는 아무런 영향을 주지 못함을 확인하였다. 이러한 결과는 MPA의 면역억제효과가 면역세포에 대한 산화적 손상과는 무관함을 시사한다. 또한 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 변화도 세포고사 현상에 중요 인자로 알려져 있다.(20) 본 실험에서도 역시 세포질 Ca<sup>2+</sup> chelator로 알려진 BAPTA/AM 처리 시 MPA에 의한 MOLT-4 세포의 세포독성이 억제됨을 관찰하였고, endoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup>-ATPase 저해제로서 세포질 내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시키는 thapsigargin의 처리 시에는 MPA에 의한 MOLT-4 세포의 세포 독성에 아무런 영향을 주지 못하였다. 이것은 MPA에 의한 세포질 내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가는 세포 독성을 일으킬 수 있는 충분한 조건으로 인하여 thapsigargin에 의해서 세포질 내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 더 증가하여도 세포 독성에는 아무런 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

세포고사 신호전달계에서 중요성이 잘 알려진 caspase family cysteine proteases는 현재까지 14종류가 알려져 있으며, 이 중 caspase-3 protease의 역할에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다.(21) Caspase의 작용은 표적 기질(substrate)에 따라 아미노산 배열 중 DEVD를 인식해서 절단하는 caspase-3 protease와 YVAD를 인식해서 절단하는 ICE-like caspase로 대별된다. 활성화된 caspase-3 protease는 PARP, PKC- $\delta$ , lamin, MEKK 및 다른 종류의 caspase 등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포 신호전달 분자의 활성을 조절한다.(9,22) 본 연구에서 MPA에 의한 MOLT-4 림프구 세포고사 현상이 caspase-3 protease의 효소 활성화를 동반함을 확인할 수 있



었다(Fig. 8). 또한 본 연구 결과인 caspase-2, 3, 8 및 9 protease의 효소 활성의 MPA에 의한 증가와 caspase-3 protease의 세포 내 기질인 PARP와 PKC- $\delta$ 의 절단은 아직 까지 보고된 바가 없다. Fas 단백질은 그 ligand인 Fas-L와 결합하면 급격한 세포죽음의 신호를 전달하며, 세포의 종류에 따라 이 상호작용은 차이가 있다고 알려져 있다.(23) 활성 신호를 전달받은 Fas는 세포질의 FADD를 경유하여 caspase-8 protease의 효소 활성을 증가시켜서 최종적으로 caspase-3 protease의 활성화화를 초래하고 이러한 결과는 endonuclease를 활성화시켜서 DNA의 절편화를 유도한다.(24) Fas/Fas-L/FADD를 경유하는 caspase 신호전달계의 중요성은 anti-sense RNA의 처리나 Interleukin- $\beta$  converting enzyme (ICE) 결핍 생쥐를 통한 실험에서 anti-Fas 항체에 의한 세포고사 억제 결과에서 증명되고 있다.(25) 본 연구 결과에서도 역시 MPA가 MOLT-4 세포의 Fas와 Fas-L의 발현을 증가시킴으로써 caspase protease의 활성화를 유도한다고 사료된다(Fig. 7).

Bcl<sub>2</sub>는 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 28 kDa이며, 다른 암유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여하고 있다.(26) 세포고사를 억제하는 Bcl<sub>2</sub>의 작용기전은 산화환원반응의 조절, 세포 내 이온의 분포 조절, caspase protease의 효소 활성 조절, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절, 스트레스 연관 MAP kinase 인 JNK 및 p38 kinase의 효소 활성을 조절한다고 알려져 있다. 한편, Bax 단백질은 Bcl<sub>2</sub>와는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다고 알려져 있다.(27) 본 연구 결과에서 MOLT-4 림프구에서 MPA 의한 Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-X<sub>S</sub> 비의 감소는 세포고사에 직접적인 연관이 있다고 판단되나 Bcl<sub>2</sub>의 분해는 MOLT-4 세포의 생존율이 20% 미만으로 감소된 MPA 처리 40시간 이후에 관찰되었으며, Bax 발현량의 변화도 관찰할 수 없는 것으로 보아 Bcl<sub>2</sub> 및 Bax 단백질의 발현은 MPA에 의한 MOLT-4 세포의 세포고사 현상과 무관하다고 사료된다.

이상의 연구결과는 임상적으로 유용하게 이용되는 장기이식 후 면역억제제의 작용기전을, 부분적으로, 제시할 수 있다고 판단된다. 그러나 세포고사 신호전달계를 구성하는 많은 신호전달분자의 상호작용을 고려하면 추가적으로 분자생물학적인 연구가 요구될 것이다.

## 결 론

면역억제작용을 하는 mycophenolate mofetil (MMF)의 활성 대사산물인 mycophenolic acid (MPA)에 의해서 유도되는 세포고사가 림프구의 면역억제 기능에 있어서 중요한 역할을 한다는 보고가 있어서 이러한 세포고사의 기전에 관하여 알아보려 본 실험을 수행하여 다음의 결과를 얻

었다.

1) MPA는 MOLT-4 세포와 U937 세포의 생존율을 농도 및 시간 의존적으로 감소시켰으며, MPA에 의한 세포독성은 MOLT-4 세포주가 U937 세포주보다 10배 정도 민감하였다.

2) MPA에 의한 세포의 죽음 시 DNA 분절이 관찰되어 세포고사에 의한 세포죽음이 진행됨을 확인할 수 있었다.

3) 다양한 농도의 항산화제(GSH 및 NAC) 처리는 MPA에 의한 세포독성에 유의한 영향을 미치지 않았다.

4) EDTA, EGTA, BAPTA/AM은 MPA에 의하여 저하된 MOLT-4 세포의 생존율을 유의한 정도로 회복시켰으나, thapsigargin은 MPA 세포독성에 유의한 영향을 미치지 않았다.

5) Guanosine을 전 처리했을 때 MPA에 의한 세포고사가 억제되었다.

6) MPA 처리 후 caspase-2, 3, 8, 9의 활성이 시간 의존적으로 증가하였으며, PARP 단백질은 caspase-3 protease의 활성화 시간에 비례하여 절단됨을 관찰하였다.

7) MPA 투여 후 Bcl-X<sub>L</sub>의 발현은 MPA 처리 12시간 이후부터 현저한 감소를 보였으나 Bcl-X<sub>S</sub>의 발현은 MPA 처리 시 현저한 발현 변화 양상을 관찰할 수 없었으며, Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-X<sub>S</sub>의 비는 Bcl-X<sub>L</sub>의 발현 감소로 인하여 MPA 처리 12시간 이후부터 감소하였다.

8) MPA는 MOLT-4 세포에서 Fas 및 Fas-L의 발현을 증가시켰다.

9) MPA에 의하여 MOLT-4 세포에서 증가된 caspase-2, 3, 9 protease의 활성은 guanosine 전 처리 시 대조군 수준을 나타냈다.

이상의 결과로 MPA에 의한 MOLT-4 세포의 세포고사는 GTP의 고갈을 기초로 하며, caspase family proteases를 활성화시키는 과정을 통해서 다양한 신호전달 분자들의 상호작용에 의해 이루어짐을 알 수 있었다.

## REFERENCES

- Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev* 1993;136:5-28.
- Robertson H, Wheeler J, Thompson V, Johnson JS, Kirby JA, Morley AR. In situ lymphoproliferation in renal transplant biopsies. *Histochem Cell Biol* 1995;104:331-4.
- Konno Y, Natsumeda Y, Nagai M, Yamaji Y, Ohno S, Suzuki K, et al. Expression of human IMP dehydrogenase types I and II in *Escherichia coli* and distribution in human normal lymphocytes and leukemic cell lines. *J Biol Chem* 1991;266:506-9.
- Collart FR, Huberman E. Cloning and sequence analysis of the human and Chinese hamster inosine-5'-monophosphate dehydrogenase cDNAs. *J Biol Chem* 1988;63:15769-72.

- 5) Nagai M, Natsumeda Y, Weber G. Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer Res* 1992;52: 258-61.
- 6) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell: death. the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
- 7) Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1991; 138:447-53.
- 8) Jacobsen MD, Weil M, Raff MC. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol* 1996;33:1041-51.
- 9) Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl<sub>2</sub> and caspases. *CMLS* 1998;54: 427-45.
- 10) Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent Cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:7141-7.
- 11) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gareau Y, et al. Identification and inhibition of the ICE/Ced3-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995;376:37-43.
- 12) Konstantinov SM, Topashka-Ancheva M, Benner A, Berger MR. Alkyl-phosphocholines: Effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells. *Int J Cancer* 1998;77: 778-86.
- 13) Tounekti O, Pron G, Belehradek J, Mir LM. Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res* 1993;53:5462-69.
- 14) Clapham DE. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature* 1995;375:634-5.
- 15) Bygrave FL, Roberts HR. Regulation of cellular calcium through signaling cross-talk involves an intricate interplay between the actions of receptors, G-proteins, and second messengers. *FASEB J* 1995;9:1297-303.
- 16) Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 1991;33:161-73.
- 17) Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hoofman L, Barker C. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, doubleblind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation* 1997;63:39-47.
- 18) Kasprzycka M, Wierzbicki P, Nowaczyk M, Gorski A, Serafinowicz A, Durlik M, et al. Cellcept enhances the rate of apoptosis in T cells after renal transplantation. *Transplant Proc* 1999;31:328.
- 19) Glesne DA, Collart FR, Huberman E. Regulation of IMP dehydrogenase gene expression by its end products, guanine nucleotides. *Mol Cell Biol* 1991;11:5417-25.
- 20) Bian X, Hughes FM Jr, Huang Y, Cidlowski JA, Putney JW Jr. Roles of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am J Physiol* 1997;272:C1241-9.
- 21) Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-59.
- 22) Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:7141-7.
- 23) 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* 1994;5:365-71.
- 24) 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* 1998;391: 43-50.
- 25) Tewari M, Telford WG, Miller RA, Dixit VM. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1995;270:2705-8.
- 26) Reed JC. Bcl<sub>2</sub> and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
- 27) Kroemer G, Dallaporta B, Rescherigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Nature Med* 1998;6:614-20.