J Korean Soc Transplant
2007;21:49-57

□ 원 저 □

마이코 페놀산에 의한 췌도세포주 사멸의 기전

연세대학교 의과대학 [1]장기이식연구소 및 [2]외과학교실, [3]연세대학교 BK21 세포기반 나노이식재 연구팀

김준예[1,3] · 박제현[1] · 윤소영[1,3] · 김명수[1,2] · 장혜경[2] · 안형준[1] · 송재숙[1] · 박윤종[1] · 서 활[3] · 김유선[1,2,3]

목적: Mycophenolic acid (MPA)는 췌장이식을 포함한 다양한 종류의 장기이식에 사용되는 면역억제제로 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH)의 선택적이고 비경쟁적인 억제제이나 췌도세포주에서는 세포 사멸을 유도한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 인슐린을 분비하는 췌도 세포주인 HIT-T15 세포를 사용하여, MPA가 세포 사멸을 일으키는 기전을 규명하고자 하였다. **방법**: 세포주는 American Type Culture Collection에서 구입하였으며 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI-1640을 사용하여 배양하였다. 세포 활성은 methylthiazoletetrazolium (MTT) assay, 세포 사멸은 annexin V와 PI 염색법, mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성화와 caspase-3 분절은 Western blot 분석으로 측정하였다. **결과**: MPA 1μM과 10μM을 처리하였을 때 MTT, caspase-3 분절 그리고 annexin V 염색이 24시간에 농도 의존적으로 증가하였으며, 이는 외부에서 함께 투여한 guanosine 500μM에 의하여 부분적으로 회복되었으나 adenosine 500μM 투여에서는 변화가 없었다. 또한 MPA는 extracellular- regulated protein kinase (ERK), p38 MAPK 그리고 c-jun N-terminal protein kinase (JNK)의 활성화를 8시간과 24시간에서 증가시켰고 guanosine 투여는 이를 부분적으로 회복시켰다. ERK의 억제제인 PD98059, p38 MAPK 억제제인 SB203580 그리고 JNK 억제제인 SP600125는 MPA와 함께 처리하였을 때 각 시간에 증가된 MAPK 활성을 감소시켰지만 MTT와 caspase-3 분절을 살펴본 결과 PD98059는 영향이 없었으며 SB203580은 세포 사멸을 증가시켰고, SP600125만이 MPA가 일으킨 세포 사멸을 일부 환원시켰다. Pan-caspase 억제제인 Z-VAD-FMK 또한 세포 사멸을 환원시켰다. **결론**: MPA는 MAPK 활성을 IMPDH 의존적으로 증가시키지만, ERK1와 p38 MAPK와는 상관없이, JNK 활성화를 통한 caspase- 3 증가의 경로로 췌도 세포 사멸을 유도함을 알 수 있었다. **(대한이식학회지 2007;21:49-57)**

중심 단어: 췌도세포, 세포 사멸, 마이코페놀산

책임저자 : 김유선, 서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 외과학교실, 120-752
Tel: 02-2228-2115, Fax: 02-313-8289
E-mail: yukim@yumc.yonsei.ac.kr

본 논문은 기왕에 영문으로 요약발간된 Mycophenolic acid induces islet apoptosis by regulating mitogen-activated protein kinase activation (Kim JY et al. Transplant Proc 2006;38:3277-79)의 내용에서 실험방법을 추가하고 보완하였으며 보충 확인실험을 추가로 시행하여 기왕에 발표된 약제의 기전을 좀더 명확히 규명하였기에 한글판으로 발행함.

본 논문은 연세대학교 2005년도 BK21 의과학사업단 교수연구비와 2006년도 장기이식연구소 연구비 지원으로 이루어졌음.

안형준의 현소속: 관동대학교 의과대학 외과학교실

서 론

제 1 형 당뇨병에서 혈당 조절을 위한 선택은 외부에서 인슐린을 투여하는 방법이 보편적으로 사용되고 있으나 인슐린에 대한 저항성 발생과 각종 합병증의 발생으로 인하여 궁극적으로는 인슐린을 생산, 공급할 수 있는 생체시스템의 이식이 필요하다. 전체 췌장을 이식하는 방법과 췌도이식이 대안으로 제시되고 있지만 장기수급의 불균형으로 인하여 전체 췌장 이식을 하는 기회는 제한적이다. 췌도이식은 직접적으로 전체 췌장을 이식하는 것보다 시술이 간편하고 반복적으로 시행할 수 있으며 이식편의 생존율을 높이기 위하여 다양한 조작이 가능하다. 사람에서 동종 췌도이식은 1980년에 최초로 시행되어,(*1*) 약 11% 정도만이 1년간 인슐린 치료가 필요하지 않고 혈당조절이 가능하였으나,(*1,2*) 2000년에 Edmonton 그룹이 혈당조절이 불량한 7명의 제 1 형 당뇨병 환자를 대상으로 췌도이식 후 1년간 인슐린 치료를 필요로 하지 않는 결과를 보고하여 당뇨병의 새로운 치료법으로써 췌도이식에 대한 관심이 집중되었다.(*3*) 그러나 후속 연구결과 충분한 수의 췌도(9,000 IE/kg)를 이식함에도 불구하고 당뇨병이 재발하는 환자 수가 증가되며,(*4*) 동물모델에서도 이식 후 이식췌도의 기능이 점차 떨어지고,(*5*) 이식췌도가 고혈당과 저산소상태 등의 환경에 노출됨으로써 정상적인 췌도와는 다르다는 것이 밝혀짐에 따라 췌도 기능에 영향을 미치지 않는 분리배양 및 투여환경의 개발 및 독성이 없는 면역억제제의 개발이 시급히 요청되고 있다.(*6*)

Mycophenolic acid (MPA)는 세포 내 de novo guanosine 합성에 중요한 효소인 2형 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH)에 대한 선택적이고 비경쟁적인 억제제로 GTP의 생산을 방해함으로써 궁극적으로 세포의 대사 방해,

증식 억제 및 세포 사멸을 유도한다. 특히 림프구는 guanosine 생산에서 IMPDH 의존비율이 높기 때문에 MPA가 강력한 면역억제 효과를 나타낼 수 있다.(*7-9*) 또한 이러한 면역억제 작용 이외의 효과는 기존의 주 면역억제제인 cyclosporine이나 tacrolimus가 가지고 있는 신독성이나 혈관합병증을 극복할 수 있는 새로운 대안으로 제시되고 있으며,(*10*) 췌장이식에서도 MPA는 현재 임상에서 사용 중이다.(*11*) 췌도세포에서도 MPA는 IMPDH 의존적이고 caspase 의존적인 경로로 세포 사멸을 유발하지만,(*9*) 새로운 면역억제제의 개발 및 면역억제 프로토콜 개발을 위하여 구체적인 기전의 이해는 필수적이다.

세포 사멸(apoptosis)은 세포 괴사(necrosis)와 함께 세포 사망(cell death)의 한 방식이지만 일시적인 세포손상으로 발생하는 세포 괴사와 구별된다. 세포 사멸이 일어나는 세포는 탈수에 의하여 세포 수축(cell shrinkage), 세포 내 칼슘 이온 농도의 증가 및 DNA 분절(DNA fragmentation), 염색질 응축(chromatin condensation) 및 phosphatidylserine이 세포막 외부로 전환되는 등 다양한 생리적 현상이 동반되며 최종적으로 apoptotic body를 형성하며 사멸하게 된다. 이러한 세포 사멸은 mitochondria에서 배출된 cytochrome c에 의해 caspase-9, -3을 활성화시키는 intrinsic pathway와, TNF-α (tumor nerosis factor-α)와 Fas ligand 등의 death receptor에 의하여 caspase-8과 -10이 활성화되는 extrinsic pathway의 두 가지 경로로 나뉜다. 이외에도 caspase와는 무관한 다양한 단백의 활성화가 세포사멸 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있다.(*12,13*)

Mitogen-activated protein kinases (MAPK)에는 extracellular-regulated protein kinase (ERK), p38 MAPK 그리고 c-jun N-terminal protein kinase (JNK) 등의 세 가지 serine-threonine kinases가 있다. 외부자극에 의하여 활성화된 MAPK는 세포의 생존, 사멸, 이동 등 다양한 세포의 생리현상에 관여한다.(*14-17*) ERK는 세포의 분열과 생존, matrix-integrin interaction 등 주로 세포의 생존과 관련된 기전에 관여하며,(*14,17*) p38 MAPK와 JNK는 stress-activated protein kinase (SAPK)라고도 하며 사이토카인, 고온, 삼투압 충격(osmotic shock), 내독소(endotoxin), 자외선 등에 의해 활성화된다.(*15-17*) 따라서 이들은 주로 여러 세포 형태에서 세포 사멸 유도와 관련되어있으나 세포나 조직의 종류 및 자극에 따라 다양한 양상을 나타낸다.(*14,18*) 특히 JNK의 경우는 apoptosis의 intrinsic pathway에 일부 관여한다.(*15*)

본 연구는 췌도세포주인 HIT-T15를 이용하여 MPA가 췌도 세포주에 일으키는 세포 사멸에 있어 3가지 종류의 MAPK 활성이 어떠한 역할을 하는지에 대하여 살펴보고자 한다.

방 법

1) 시약 및 기구

실험에 사용한 시약 및 기구는 따로 명시하지 않는 한 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), Calbiochem (San Diago, CA, USA)와 Nalge Nunc International (Naper Ville, IL, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) 세포 배양

췌도세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입한 HIT-T15를 사용하였다. 세포는 10% (v/v) 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)과 100 U/mL penicillin, 100μg/mL streptomycin이 포함된 RPMI-1640으로 37°C, 5 % CO_2 세포 배양기에서 배양하였다. 세포가 배양용기에 찼을 때 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)으로 2회 세척 후 0.25% trypsin/EDTA에서 2분간 반응하여 부유된 세포를 1,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 수거하였다. 계대배양은 일주일마다 한 번씩 시행하였으며, 배양액은 매 2～3일마다 교환하였다.

3) 약물 처리

계대배양 한 세포가 배양용기의 약 80% 가량 찼을 때 혈청을 배재한 RPMI-1640으로 교환하여 24시간 동안 배양시켜 세포성장을 동일화하였다. 새로운 혈청 배재 배양액에 각각의 실험 조건에 따른 시약들, 즉 MPA (0, 1, 10, 30μM), guanosine (500μM), adenosine (500μM), PD98059 (15μM), SP600125 (15μM), SB203580 (15μM), Z-VAD-FMK (50μM)를 실험 조건에 맞도록 희석하여 세포에 투여하였다. 각 약물의 유효 농도는 선행 실험으로 적정농도를 정하여 수행하였다.

4) 세포 활성; methylthiazoletetrazolium (MTT) assay

96 well 세포 배양용기에 각 well당 4×10^4개의 세포가 되도록 분주하여 5회 실험하였다. 실험이 종료되면 각 well에 MTT 1 mg/mL을 첨가하여 세포 배양기에서 2시간 동안 반응시켜 formazan을 침착시킨 후 extraction buffer (20% SDS, 50% N,N-dimethylformamide, pH 4.7)를 첨가하였다. 세포가 완전히 용해되도록 12시간 이상 37°C 세포 배양기에서 방치한 후 microplate reader (SpectraMax 340, Molecular Devices Co., CA, USA)를 이용하여 560 nm에서 Optical density를 측정하였다.

5) 세포 사멸 측정; annexin Ⅴ-FITC and propidium iodide (PI) staining

6 well 세포 배양용기에 각 well당 3×10^5개의 세포가 되도록 분주하여 5회 실험하였다. Annexin V-FITC와 PI 염색

은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 제공하는 Vybrant apoptosis assay kit으로 시행하였다. 실험방법은 제조자의 지침에 따라 수행하였다. 요약하면, 실험이 종료되면 trypsin/EDTA로 세포를 분리한 후 Ca^{2+}과 Mg^{2+}가 포함된 차가운 PBS로 세포를 세척한 후 0.25μg/mL annexin과 1μg/mL PI로 세포를 재부유시키고 15분간 상온에서 반응시킨다. 반응이 종료된 후 1,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 반응시약(100 mM HEPES, 140 mM NaCl, 0.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4)에 재부유시켜 4°C 상태를 유지하여 fluorescence-activated cell sorter (FACS; Becton Dickinson Immunocytometry system, Mountain View, CA, USA)로 형광(excitation; 488 nm, emission; 530 nm)을 분석하였다.

6) Western blot 분석

6 well 세포 배양용기에 각 well당 3×10^5개의 세포가 되도록 분주하여 5회 실험하였다. 실험이 종료되면 각 well을 차가운 PBS로 2회 세척한 후 용해완충액(lysis buffer; 10 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM sodium fluoride, 20 mM $Na_2P_2O_7$, 2 mM sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% deoxycholate, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1μg/mL leupeptin, 1μg/mL aprotinin, 1 mM β-glycerophosphate)으로 4°C에서 30분간 반응시켰다. 수거한 세포는 13,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 단백을 취하고 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 정량하였다. ERK, p38 MAPK 및 JNK는 20μg, caspase-3는 40μg을 취하여 sample buffer (12 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% glycerol, 0.4% SDS, 2.88 mM 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue)와 혼합하여 95°C에서 7분 동안 가열하여 변성시켰다. 변성된 단백은 10% 또는 12%의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 전개 분리한 후 nitrocellulose 흡착지 (Bio-Rad)에 전이시켰다. 흡착지는 5% non-fat dry milk (Becton, Dickinson and company, Sparks, MD, USA)가 함유된 Tris 완충액으로 1시간 동안 반응시킨 뒤 0.1% Tween 20이 포함된 Tris 완충액으로 10분간 세 번 세척하였다. ERK, p38 MAPK, JNK 그리고 caspase-3 분절 항체(cell signaling)는 3% non fat dry milk가 함유된 Tris 완충액에 1 : 1,000으로 희석하였고, β-actin은 1 : 2,000으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 15분간 3회 세척하였다. 인산화 형태의 MAPK는 각각의 전체 형태를 인식하는 항체(cell signaling)로 보정하였고, caspase-3는 β-actin 항체로 보정하였다. 이차 항체는 horseradish-peroxidase (HRP)가 conjugation된 이차 항체(HRP-conjugated anti-rabbit or mouse IgG; Santa Cruz)를 3% non fat dry milk의 Tris 완충액에 1 : 2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 15분씩 3회 세척하였다. 항체 반응이 완료된 흡착지는 enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham, Buckinghamshire, UK) kit를 이용하여 이차 항체를 검출하였다.

7) 자료 분석

통계 분석은 SPSS, version 12.0 프로그램을 이용하여 분석하였으며 모든 자료는 '평균±표준오차'로 기술하였다. 각 실험군 간의 측정값 평균치를 비교는 먼저 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값이 의의가 있을 때 Fisher's 최소유의차 검정법으로 사후 다중 비교 분석을 하였다. P값이 0.05 미만일 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1) MPA가 HIT-T15 세포 활성과 세포 사멸에 미치는 영향

MPA가 HIT-T15 세포의 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 MTT 분석을 시행하였다. MPA 1, 10 그리고 30μM은 투여 후 24시간에 대조군의 MTT를 각각 0.72, 0.55 그리고 0.49로 감소시켜 농도 의존적이고 통계적으로 유의한 세

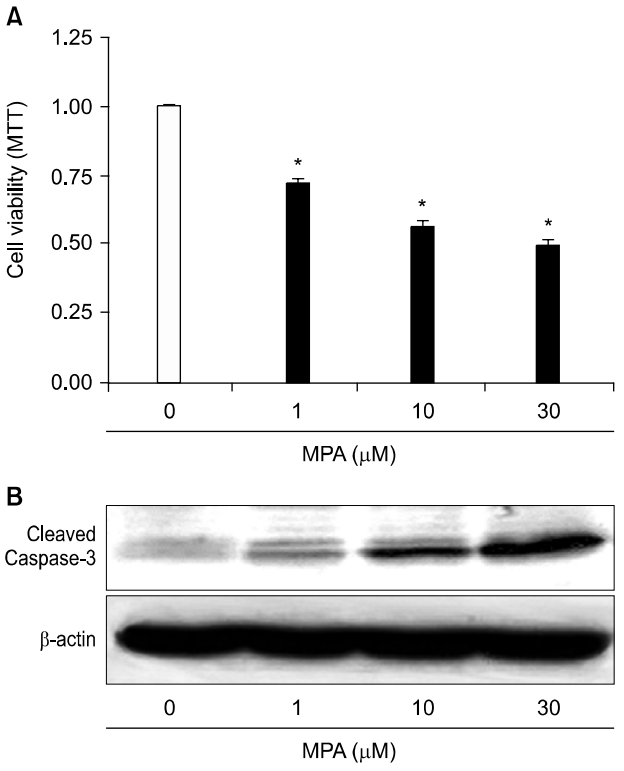

Fig. 1. Effect of MPA on HIT-T15 cell and caspase-3 activation. (A) MTT assay *P＜0.05 versus control (n=5), (B) cleaved caspase-3 Western blot analysis.

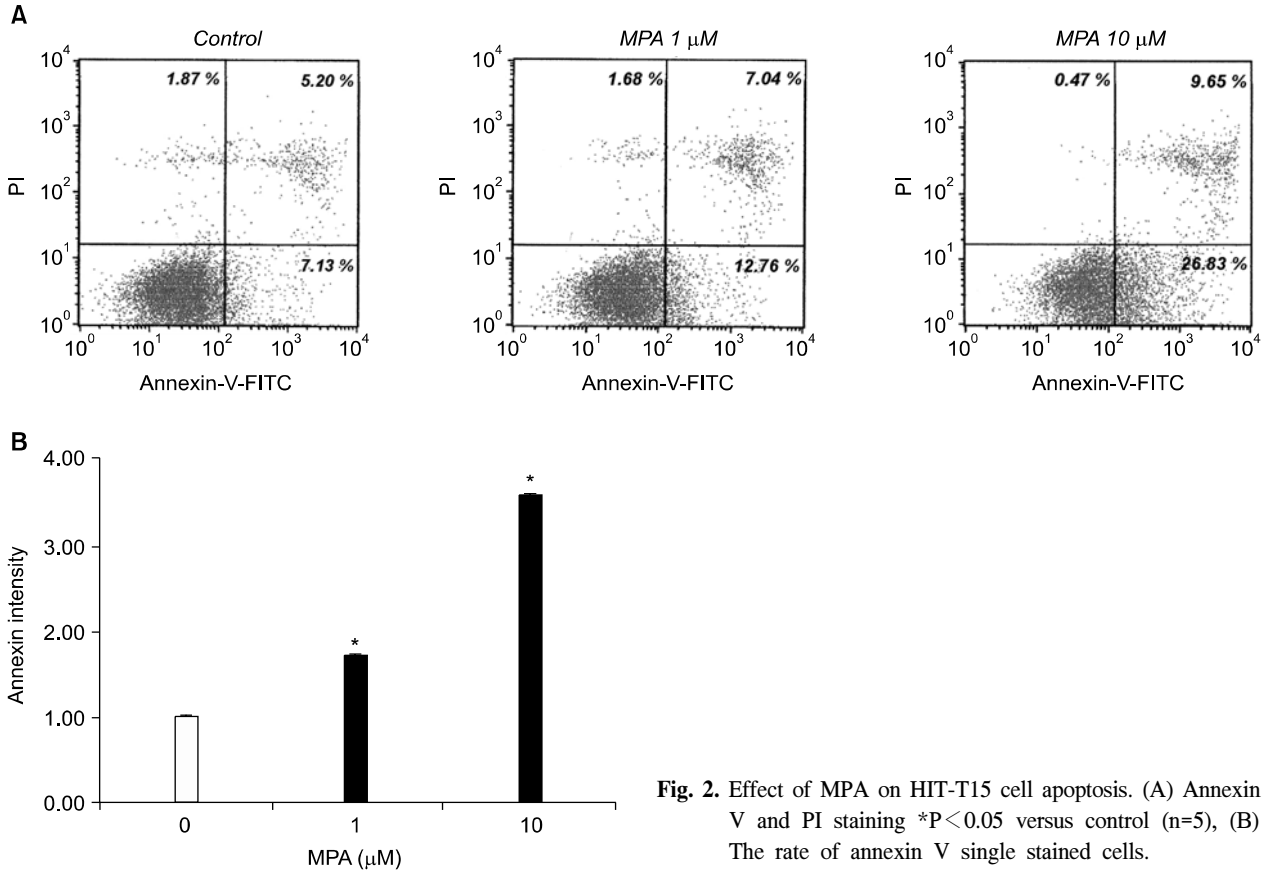

Fig. 2. Effect of MPA on HIT-T15 cell apoptosis. (A) Annexin V and PI staining *P＜0.05 versus control (n=5), (B) The rate of annexin V single stained cells.

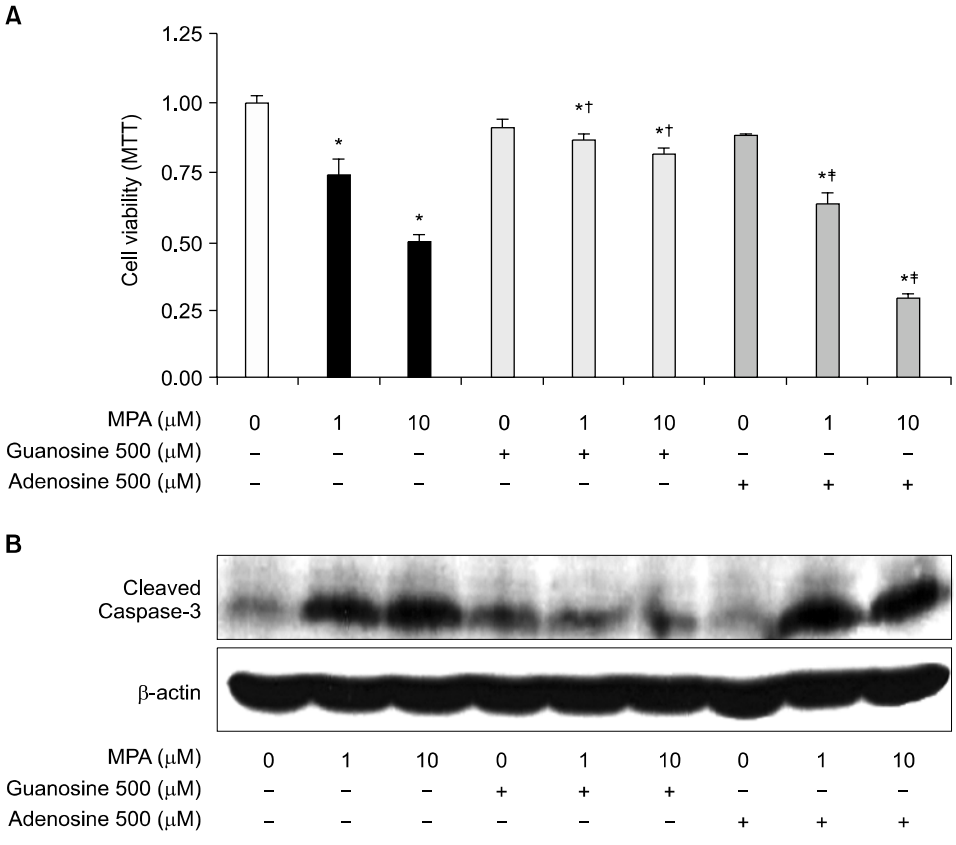

Fig. 3. Effect of exogenous guanosine on HIT-T15 cell and caspase-3 activation induced by MPA stimulation. (A) MTT assay *P＜0.05 versus control, † P＜0.05 versus each dose MPA (1 and 10 μM), ‡ P＜0.05 versus adenosine single treatment (n=5), (B) cleaved caspase-3 Western blot analysis.

포활성의 감소를 유발하였다(Fig. 1A, P＜0.05). Caspase-3 분절은 Western blot 분석으로 관찰하였다. Caspase-3 분절 또한 MTT의 결과와 유사한 경향을 나타내어 MPA 1, 10 그리고 30μM 투여 후 24시간에 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 1B). 세포 사멸을 관찰하는 annexin V와 PI 염색은 FACS로 분석하였다. Annexin V 단독염색은 대조군에 비해, MPA 1μM에서 1.70배, 그리고 MPA 10μM에서 3.57배 증가시켜 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게 세포 사멸이 증가하였다(P＜0.05). PI 단독 또는 annexin V와 PI 이중 염색된 세포 수는 통계적으로 유의한 변화가 없었다(Fig. 2, P＞0.05).

2) 외부 투여 guanosine이 MPA에 의하여 유도된 HIT-T15 세포의 활성과 사멸에 미치는 영향

MPA의 약리학적 작용이 IMPDH 억제를 통한 guanosine 생산 감소에 의하여 유발되기 때문에 외부에서 guanosine과 adenosine을 투여하여 MPA의 세포 사멸 기전을 관찰하였다. MPA는 세포 활성 수준을 각각 1μM과 10μM에서 대조군에 비하여 0.73과 0.49로 감소시켰고, 외부에서 투여한 guanosine 500μM은 대조군에 비하여 유의한 영향을 미치지 않았지만, MPA 1μM에 의하여 감소된 MTT를 각각 대조군의 0.86과 0.81로 부분적으로 회복시켰다(P＜0.05). 반면에 adenosine 500μM은 대조군과 MPA 투여군에 비하여 유의한 영향을 나타내지 않았다(Fig. 3A, P＞0.05). MPA에 의한 caspase-3 분절 증가는 외부투여 guanosine 500μM에 의하여 대부분 회복되었지만 adenosine은 영향이 없었다(Fig. 3B). Annexin V 염색에서도 유사한 경향을 나타내어 guanosine 500μM은 MPA에 의하여 대조군의 2.83배로 증가된 annexin V 염색을 대조군의 1.70배로 감소시켜 부분적인 회복을 보였다(P＜0.05). 반면에 adenosine은 MPA에 의하여 증가된 annexin V 염색에 유의한 효과가 없었다(Fig. 4, P＞0.05).

3) MPA가 HIT-T15 세포의 MAPK 활성화에 미치는 영향

MAPK 활성화는 Western blot 분석으로 수행하여 살펴보았다. MPA 10μM 투여 후 ERK 활성화는 8시간과 24시간에 시간 의존적으로 증가하였으며 외부에서 투여한 guanosine 500μM은 MPA에 의한 ERK 활성화를 억제하였다(Fig. 5A). ERK 억제제인 PD98059 15μM은 MPA 10μM에 의하여 증가된 ERK 활성화를 억제하였다(Fig. 5B). p38 MAPK의 활성화는 MPA 10μM 투여 후 대조군에 비하여 8시간과 24시간에 증가하였고 guanosine 500μM은 각 시간대에 증가한 p38 MAPK 활성화를 감소시켰다(Fig. 6A). p38 MAPK의 억제제인 SB203580 15μM 또한 각 시간에 활성화된 p38 MAPK를 억제하였다(Fig. 6B). JNK는 8시간과 24시간에 시

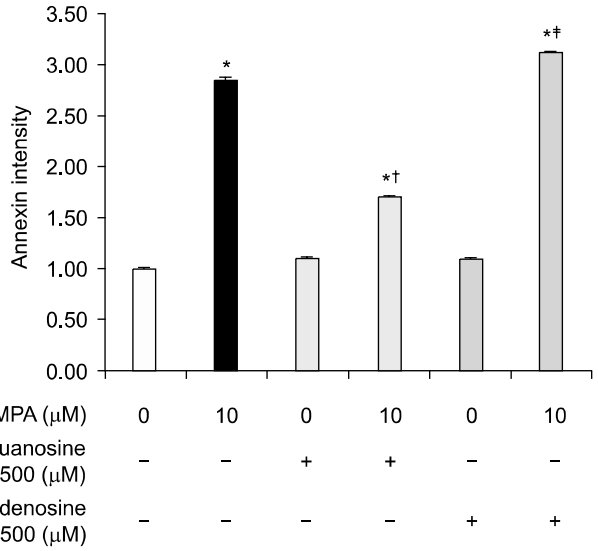

Fig. 4. Effect of exogenous guanosine on HIT-T15 cell apoptosis induced by MPA stimulation. Annexin V staining analysis *P＜0.05 versus control, † P＜0.05 versus MPA 10μM, ‡ P＜0.05 versus adenosine single treatment (n=5).

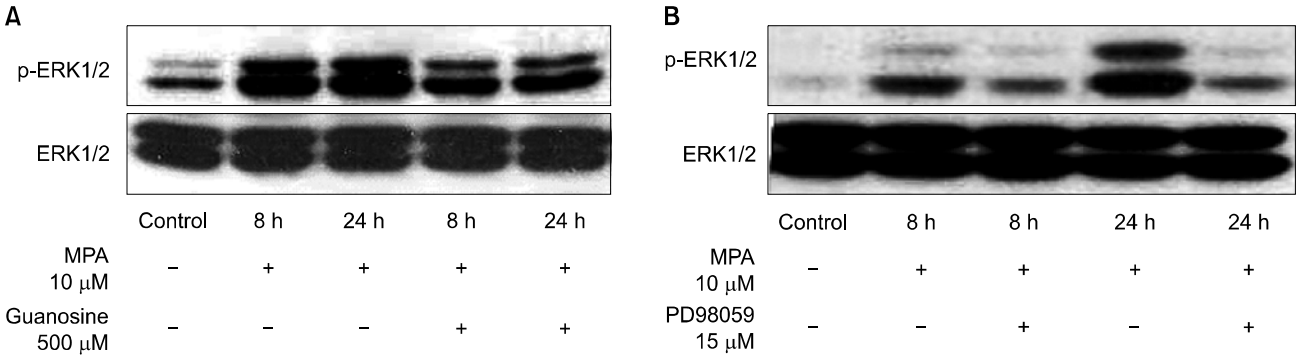

Fig. 5. Activation of ERK induced by MPA stimulation. (A) effect of exogenous guanosine on ERK activation induced by MPA stimulation, (B) effect of ERK inhibitor (PD98059) on ERK activation induced by MPA stimulation, Western blot analysis.

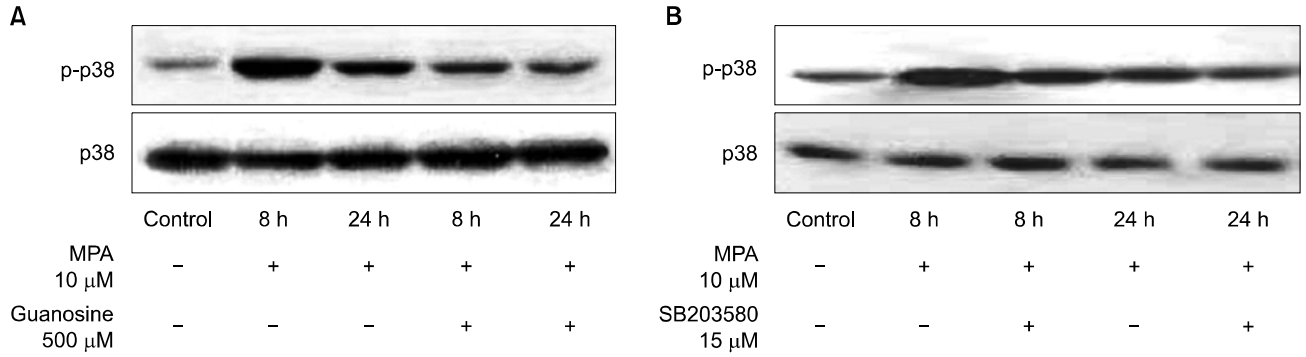

Fig. 6. Activation of p38 MAPK induced by MPA stimulation. (A) effect of exogenous guanosine on p38 MAPK activation induced by MPA stimulation, (B) effect of p38 MAPK inhibitor (SB203580) on p38 MAPK activation induced by MPA stimulation, Western blot analysis.

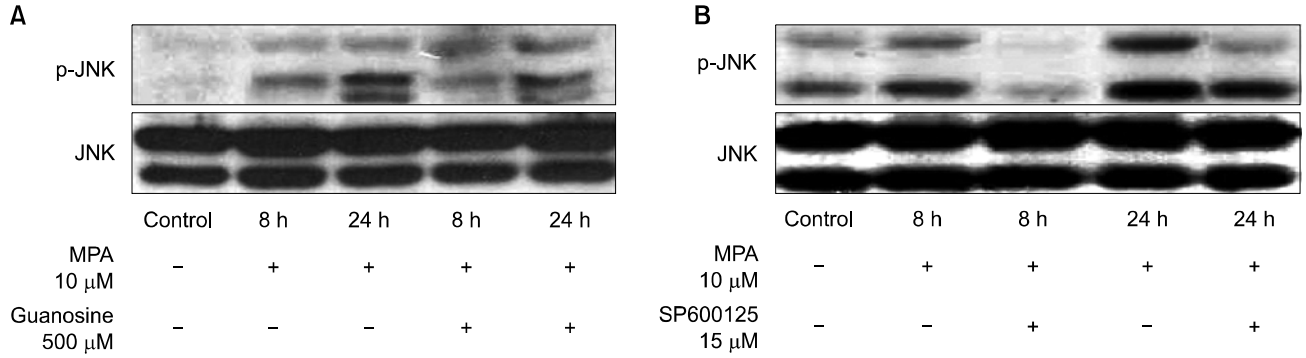

Fig. 7. Activation of JNK induced by MPA stimulation. (A) effect of exogenous guanosine on JNK activation induced by MPA stimulation, (B) effect of JNK inhibitor (SP600125) on JNK activation induced by MPA stimulation, Western blot analysis.

간 의존적으로 증가하였으며 각 시간대에 guanosine 500μM에 의하여 활성화가 감소되었고(Fig. 7A), JNK의 억제제인 SP600125 15μM은 MPA 10μM에 의하여 증가된 JNK의 활성화를 억제하였다(Fig. 7B).

4) MPA에 의하여 유도된 HIT-T15 세포의 사멸에서 ERK, p38 MAPK, JNK 및 caspase의 역할

MPA에 의하여 유도된 HIT-T15 세포 사멸에서 ERK, p38 MAPK, JNK 및 caspase의 역할을 관찰하기 위하여 각각의 억제제인 PD98059, SB203580, SP600125 각각 15μM 및 Z-VAD-FMK 50μM를 MPA 10μM과 함께 투여하여 24시간에 MTT 분석과 caspase-3 분절을 관찰하였다. PD98059는 MPA 10μM에 의하여 대조군의 0.56으로 감소된 MTT를 대조군의 0.55로 변화시켜 통계적 유의성이 없었고($P>0.05$) SB203580는 대조군의 0.47로 MPA에 의한 감소에 더하여 부가적인 MTT 감소를 유발하였다. 반면에 SP600125는 대조군의 0.65, Z-VAD-FMK는 대조군의 0.78로 MPA에 의한 세포 활성 감소를 통계적으로 유의하게 회복시켰다(Fig. 8A, $P<0.05$). Caspase-3 분절의 경우 PD98059 MPA에 의하여 유도된 caspase-3 분절에 영향을 미치지 못하였고 SB-203580은 오히려 caspase-3 분절을 증가시켰으며, SP600125와 Z-VAD-FMK는 부분적으로 회복시켰다(Fig. 8B).

고 찰

MPA는 췌도세포주인 HIT-T15 세포에서 IMPDH 의존적인 경로로 ERK, p38 MAPK 및 JNK 활성화를 증가시키지만, ERK와는 무관하게 p38 MAPK는 세포사멸보다는 세포생존과 관련하여, 그리고 JNK 의존적인 caspase-3 활성화를 통하여 세포사멸을 유발함을 시사하고 있다.

MPA 1과 10μM은 HIT-T15 세포의 MTT를 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게 감소시켰다(Fig. 1). 임상적으로 사용 가능한 MPA의 최대 농도가 10μM인 것을 감안한다면,(*19*) MPA에 의한 세포사멸 유발이 단순한 약제의 독성으로 인식될 수 없다. 면역억제제로서 MPA는 10μM에서 림프구의 사멸을 유도하지만,(*7*) 혈관과 신장세포에서는 기저수준에 별다른 영향을 미치지 않고 세포의 증식, 이동 및 각종 단백의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다.(*20-23*)

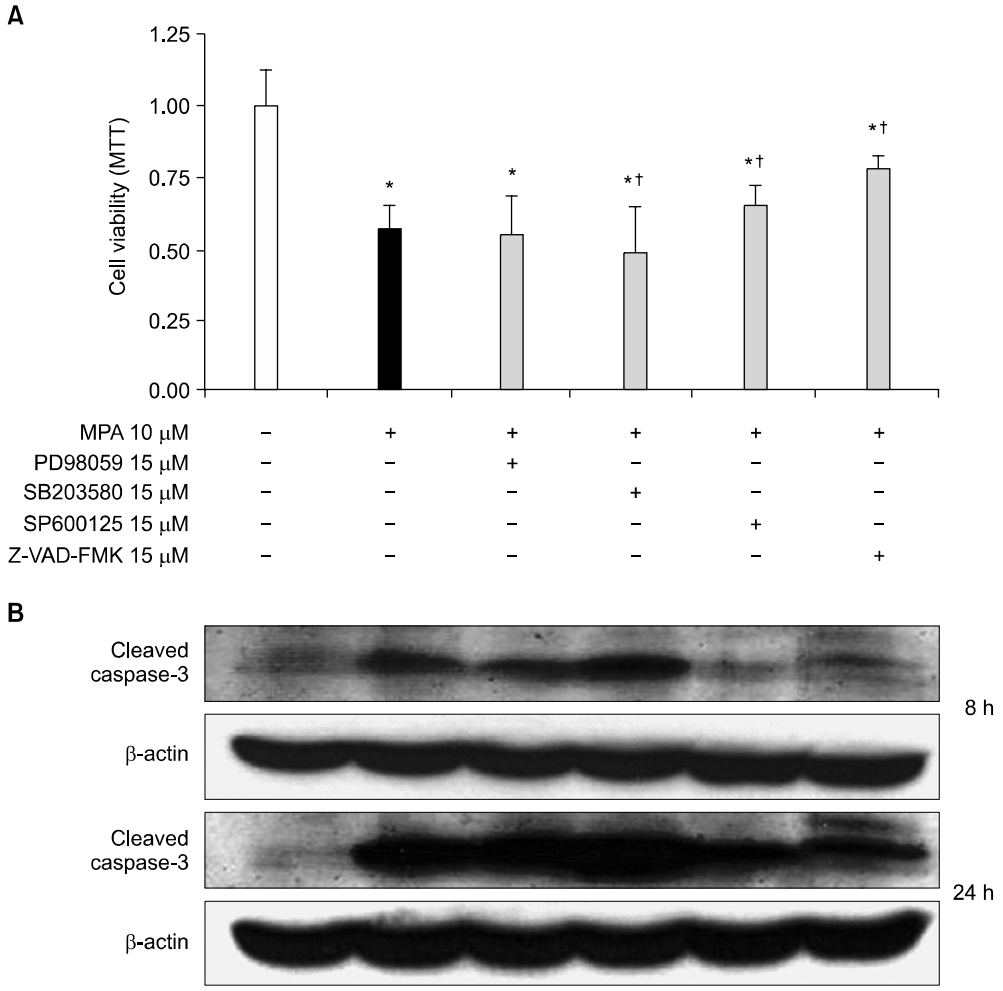

Fig. 8. Effect of ERK, p38 MAPK, JNK and pan-caspase inhibitor on HIT-T15 cell and caspase-3 activation induced by MPA stimulation. (A) MTT assay *$P<0.05$ versus control, †$P<0.05$ versus MPA 10μM (n=5), (B) cleaved caspase-3, Western blot analysis.

그러므로 본 연구에서 사용된 MPA 1과 10μM은 실험에 사용 가능한 적절한 농도로 간주된다.

MPA의 기본적인 약리학적 작용기전은 세포 내 guanosine 생산에 중요한 효소인 IMPDH의 선택적이고 비경쟁적인 억제이다.(*7,24*) Guanosine 500μM을 외부에서 투여하였을 때 MPA에 의한 MTT 감소는 부분적으로 회복되었지만, 같은 purine 계열인 adenosine 500μM은 MPA에 의한 MTT 감소에 영향을 미치지 않았다(Fig. 3A). Guanosine 500μM은 예비실험에서 결정된 농도로 guanosine 500μM 이상의 농도를 사용하여 MPA에 의하여 감소된 MTT의 완전회복을 가정할 수 있지만, 예비 실험에서 대조군에서 guanosine 자체가 세포 독성을 유발하기 때문에 사용하지 않았다.

MTT 실험의 특성상 세포 활성의 감소로 인한 세포 사망을 관찰할 수 있지만 세포사망의 방식을 구분할 수 없다. MPA에 의하여 유발된 HIT-T15의 세포사망이 세포사멸인지 여부를 판별하기 위하여 세포사멸에 중요한 caspase-3의 분절과 생리적 변화 관찰을 위한 annexin V 염색을 병행하였다. MPA 1과 10μM은 MTT 결과와 마찬가지로 caspase-3의 분절과 annexin V 염색을 농도 의존적이고 통계적으로 유의하게 증가시켰고(Fig. 1B, 2), 외부 투여된 adenosine은 별다른 효과가 없었지만 guanosine은 MPA에 의한 caspase-3 분절과 annexin V 염색을 부분적으로 회복되었다(Fig. 3B, 4).

위의 결과를 통하여 MPA에 의한 세포사망이 IMPDH 의존적인 caspase-3 활성화를 경유하여 발생하는 세포사멸임을 확인하였다. Huo 등(*9*)은 MPA에 의한 HIT-T15 세포의 사멸이 다양한 caspase 활성화를 동반하지만 caspase-2 활성화가 중요하게 관여함을 보고하였고, Hui 등(*25*)은 사람 췌도세포에서 MPA가 caspase-3 의존적으로 세포사멸을 유도함을 보고하였다.

외부에서 투여한 guanosine이 MPA에 의하여 유도된 세포사멸을 부분적으로 회복시키는 것은 MPA가 IMPDH 억제 이외의 다른 기전이 존재함을 시사하는 것이다. 비록 췌도에서 정확한 IMPDH의 중요성 및 guanine 또는 guanosine 생산에 대한 역할이 밝혀진 보고는 없지만, 생쥐의 췌도와 HIT-T15에서 MPA는 세포상 GTP를 완전히 제거하지 못하였다.(*26,27*) 이는 췌도세포의 guanosine 생산에서 IMPDH의 역할이 부분적이고 다른 세포 내 신호전달계가 관련될 수 있음을 시사하는 것이다.

MPA가 세포사멸을 유발하는 다른 기전으로서 조혈모세포세포에서 guanosine nucleotide 억제와 관련된 ERK, Akt, mTOR 관련 세포 내 신호전달계 억제(*28*) 및 혈관평활근 세포와 사구체 혈관간세포에서 활성산소족 및 MAPK 활성화 억제가 증식 및 단백합성 저해에 중요함이 보고된 바 있다.(*22,23*)

ERK는 주로 세포의 생존과 관련하여 작용하는 MAPK로 알려져 있으나 세포와 조직의 종류 및 자극에 따라 세포사멸과 연관된다.(*14,18,29*) 본 연구에서 ERK 활성화는 MPA 10μM 투여 후 8시간과 24시간에 증가되었고, guanosine 500μM에 의하여 회복되었다(Fig. 5). 반면에 ERK 억제제는 MTT와 caspase-3 분절에 영향을 미치지 못하였기 때문에 MPA에 의한 ERK 활성화 증가가 직접적으로 세포사멸에 관련되기보다는 caspase와는 무관한 MPA 의존적인 신호전달에 관련되어 있음을 시사하고 있다(Fig. 8).

p38 MAPK와 JNK 활성화는 일반적으로 세포 사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다. 하지만 ERK가 세포 생존에만 관여하지 않듯, 세포와 조직의 종류 및 자극에 따라 다양한 생리현상과 관련되어 있다.(*16,29*) 본 실험에서는 p38 MAPK와 JNK 모두 MPA 10μM 투여 후 활성화가 증가하였고 외부에서 guanosine을 투여한 후 JNK 활성화가 감소된 것으로 보아 MPA에 의한 p38 MAPK 활성화도 IMPDH 의존적임을 확인할 수 있었다(Fig. 6). p38 MAPK 억제제는 MTT와 caspase-3 분절을 증가시켜 p38 MAPK 증가가 직접적으로 세포 사멸보다는 세포 생존에 일부 관여함을 시사하였다(Fig. 8).

JNK 활성화는 MPA 투여 후 증가되어 guanosine에 의하여 회복되었고(Fig. 7), JNK 억제제는 MTT와 caspase-3 분절 감소를 유발하였다(Fig. 8). JNK는 세포 사멸에서 caspase-3와 caspase-9 활성이 관련된 intrinsic pathway에 관여하며 하위 기작으로 Bax 증가와 Bcl-2 family 감소를 유발하여 mitochondria로부터 세포질로 cytochrome c 배출을 유도한다. 이후 caspase-9을 증가시키고 최종적으로 caspase-3의 증가로 세포 사멸을 유도하는 기전에 관여한다.(*15,30*) Huo 등(*9*)은 MPA에 의한 HIT-T15 세포의 사멸에서 mitochondria로부터 세포질로 cytochrome c 배출을 보고한 바가 있다. 따라서 MPA가 유도한 IMPDH 의존적인 세포 사멸에서 JNK 활성화에 의한 caspase 활성이 중요하게 관여함을 시사하는 것이다. 또한 Z-VAD-FMK가 MPA에 의한 세포 사멸을 유의하게 억제한 결과는 caspase의 중요성을 다시 한번 확인하는 것이다. 그러나 JNK 억제제로 MTT의 양과 caspase-3 분절이 일부 회복되는 것으로 보아 MPA에 의한 세포 사멸에서 caspase 의존적인 경로가 일부 관여하며 다른 유기적인 기전들의 복합적인 작용으로 인하여 세포 사멸이 유발됨을 추론할 수 있다.

결 론

본 연구결과 MPA는 췌도세포주인 HIT-T15 세포에서 IMPDH 의존적인 경로로 ERK, p38 MAPK 및 JNK 활성화를 증가시키지만, ERK와는 무관하게 p38 MAPK는 세포사멸보다는 세포생존과 관련하여, 그리고 JNK 의존적인 caspase-3 활성화를 통하여 세포사멸을 유발함을 보여주고 있다. 본 연구를 통해 MPA에 의한 췌도세포 사멸에서 JNK와 caspase 활성화가 중요함이 밝혀짐에 따라, 향후 췌도이식에서 JNK와 caspase 활성화의 억제로 이식편 손상을 최소화할 수 있는 방법의 개발이 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

1) Largiader F, Kolb E, Binswanger U. A long-term functioning human pancreatic islet allotransplant. Transplantation 1980;29:76-7.
2) Kendall DM, Robertson RP. Pancras and islet transplantation. Challenges for the twenty-century. Endocrinol Metab Clin North Am 1997;26:611-30.
3) Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med 2000;343:230-8.
4) Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbutt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM. Clinical outcome an insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. Diabetes 2001;50:710-9.
5) Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC. Vulnerability of islets in the immediate post-transplantation period. Dynamic changes in structure and function. Diabetes 1996;45:1161-7.
6) Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes-a work in progress. N Engl J Med 2004;350:694-705.
7) Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. Immunopharmacology 2000;47:85-118.
8) Laliberte J, Yee A, Xiong Y, Mitchell BS. Effects of guanine nucleotide depletion on cell cycle progression in human T lymphocytes. Blood 1998;91:2896-904.
9) Huo J, Luo RH, Metz SA, Li G. Activation of caspase-2 mediates the apoptosis induced by GTP-depletion in insulin-secreting (HIT-T15) cells. Endocrinology 2002;143:1695-704.
10) Pescovitz MD, Govani M. Sirolimus and mycophenolate mofetil for calcineurin-free immunosuppression in renal transplant recipients. Am J Kidney Dis 2001;38:S16-S21.
11) Frank A, Deng S, Huang X, Velidedeoglu E, Bae YS, Liu C, Abt P, Stephenson R, Mohiuddin M, Thambipillai T,

Markmann E, Palanjian M, Sellers M, Naji A, Barker CF, Markmann JF. Transplantation for Type I diabetes: comparison of vascularized whole-organ pancreas with isolated pancreatic islets. Ann Surg 2004;240:631-43.

12) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980;68:251-306.
13) Hui H, Dotta F, Di Mario U, Perfetti R. Role of caspase in the regulation of apoptosis pancreatic islet beta-cells death. J Cell Physiol 2004;200:177-200.
14) Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors 2006;24:21-44.
15) Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. Cell Res 2005;15:36-42.
16) Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Res 2005;15:11-8.
17) Paraskevas S, Aikin R, Maysinger D, Lakey J, Cavanagh TJ, Hering B, Wang R, Rosenberg L. Activation and expression of ERK, JNK, and p38 MAP-kinases in isolated islets of Langerhans; implications for cultured islet survival. FEBS Lett 1999;455:203-8.
18) Zhuang S, Schnellmann RG. A Death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase. Pharmacol Exp Ther 2006;319:991-7.
19) Allison AC, Eugui EM. Inhibitors of de novo purine and pyrimidine synthesis as immunosuppressive drugs. Transplant Proc 1993;25:8-18.
20) Dubus I, Vendrely B, Christophe I, Labouyrie JP, Delmas Y, Bonnet J, Combe C. Mycophenolic acid antagonizes the activation of cultured human mesangial cells. Kidney Int 2002; 62:857-67.
21) Dubus I, L'Azou B, Gordien M, Delmas Y, Labouyrie JP, Bonnet J, Combe C. Cytoskeletal reorganization by mycophenolic acid alters mesangial cell migration and contractility. Hypertension 2003;42:956-61.
22) Park J, Ha H, Seo J, Kim MS, Kim HJ, Huh KH, Park K, Kim YS. Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor- induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. Am J Transplant 2004;4:1982-90.
23) Ha H, Kim MS, Park J, Huh JY, Huh KH, Ahn HJ, Kim YS. Mycophenolic acid inhibits mesangial cell activation through p38 MAPK inhibition. Life Sci 2006;79:1561-7.
24) Ji Y, Gu J, Makhov AM, Makhov AM, Griffith JD, Mitchell BS. Regulation of the interaction of inosine monophosphate dehydrogenase with mycophenolic acid by GTP. J Biol Chem 2005;281:206-12.
25) Hui H, Khoury N, Zhao X, Balkir L, D'Amico E, Bullotta A, Nguyen ED, Gambotto A, Perfetti R. Adenovirus-mediated XIAP gene transfer reverses the negative effects of immunosuppressive drugs on insulin secretion and cell viability of isolated human islets. Diabetes 2005;54:424-33.
26) Detimary P, Xiao C, Henquin JC. Tight links between adenine and guanine nucleotide pools in mouse pancreatic islet: a study with mycophenolic acid. Biochem J 1997;324:467-71.
27) Li GD, Luo RH, Metz SA. Effects of inhibitors of guanine nucleotide synthesis on membrane potential cytosolic free Ca2 + levels in insulin-secreting cells. Biochem Pharmacol 2000; 59:545-56.
28) Gu JJ, Gathy K, Santiago L, Chen E, Huang M, Graves LM, Mitchell BS. Induction of apoptosis in IL-3-dependent hematopoietic cell lines by guanine nucleotide depletion. Blood 2003;101: 4958-65.
29) Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. Oncogene 2003;22:5885-96.
30) Papadakis ES, Finegan KG, Wang X, Robinson AC, Guo C, Kayahara M, Tournier C. The regulation of Bax by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is a prerequisite to the mitochondrial- induced apoptotic pathway. FEBS Lett 2006;580:1320-26.