



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

Disulfiram이 수지상세포에 미치는 독성

濟州大學校 大學院

獸醫學科

韓 鏞

2020年 8月

Disulfiram이 수지상세포에 미치는 독성




指導教授 朱 洪 球

韓 鏞

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2020年 6月

韓鏞의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 강태영 
委 員 고은주 
委 員 우홍구 

濟州大學校 大學院



초록

Disulfiram이 수지상세포에 미치는 독성

(지도교수: 주홍구)

한용

제주대학교 대학원 수의학과

Disulfiram(DSF)은 만성 알코올중독 치료에 사용되었던 약물이다. 최근 DSF이 항
합효과를 가지는 것이 밝혀졌다. 많은 항암제들은 면역억제를 포함한 부작용을 동
반한다. 특히 면역억제는 면역계의 작용을 크게 약화시키고 외부항원으로부터의 감
염위험을 증가시키기 때문에, 매우 심각한 부작용에 해당한다. 항암후보물질인 DSF
역시 이와 같은 부작용을 가질 수 있다. 본 연구에서는 면역세포의 하나인 수지상
세포에서 DSF의 면역억제 유발여부에 대하여 연구하였다. 세포 대사활성도 분석,
유세포 분석, 사이토카인 생산량 분석, 동종이형 혼합림프구반응 시험(allogenic
mixed leucocyte response), 자극인자에 따른 활성 측정을 이용하여 DSF 처리된
수지상세포를 분석하였다. $5\mu\text{M}$ 의 DSF 농도에서는 세포사멸의 증가와 활성을 나
타내는 지표들이 감소하는 결과를 바탕으로 수지상세포의 유의적인 손상을 확인하
였다. 하지만 비장세포를 이용한 이전 실험결과와 비교하였을 때, 수지상세포의 손
상정도가 낮았다. 이러한 차이는 DSF의 작용기전과 연관있는 것으로 추측한다.
DSF의 세포독성은 unfolded protein response (UPR) signaling pathway와 연

관이 있다. DSF은 UPR signaling pathway를 통하여 세포독성을 유발하고, 수지상세포는 전사인자 x-box bind protein-1 (XBP-1)을 가진다. XBP-1은 소포체의 항상성 유지에 관여하는 전사인자이다. 수지상세포의 XBP-1이 DSF의 항암작용기전인 UPR signaling pathway를 방해하여 DSF의 독성을 막는 것으로 추측한다.

Keywords: disulfiram, dendritic cells, cytotoxicity, anti-cancer activity, protective mechanism

Abstract

Cytotoxic Effect of Disulfiram on Dendritic Cells

Supervised by professor Hong-Gu Joo

Yong Han

Department of Veterinary Medicine,
Graduate school,
Jeju National University

Disulfiram (DSF) is a drug that was used for treatment of chronic alcoholism before. Recently, anticancer effect of DSF had discovered. Many anticancer drugs have side effects such as immunosuppression. Immunosuppression is considered to be a very serious side effect because it reduces functions of immune system and increases risks of infection from external pathogens. DSF can also have these side effects. In this study, we investigated whether DSF shows immunosuppression on dendritic cells (DCs), one of immune cells. DSF treated DCs were used for cellular

metabolic activity assay, flow cytometry analysis, the cytokine production, allogenic mixed leukocyte response and measurement of activation by stimulating factors. In common, 5 μ M of DSF caused significant damage of DCs. Cell death increased, and markers that representing cell activation decreased. But compare to previous study that cytotoxic effect of DSF on spleen cells, DCs damaged less than spleen cells. This difference is estimated to be related to the working mechanisms of the DSF. DSF causes cytotoxic effect by unfold protein response (UPR) signaling pathway and DCs have transcription factor x-box bind protein-1 (XBP-1). Function of XBP-1 is maintenance of endoplasmic reticulum(ER) homeostasis. We assume that XBP-1 prevents DSF toxicity by interfering UPR signaling pathway, the mechanisms of DSF toxicity.

Keywords: disulfiram, dendritic cells, cytotoxicity, anti-cancer activity, protective mechanism

목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료	및 방법	-----	2
III. 결	과	-----	5
IV. 고	찰	-----	13
V. 참	고 문 헌	-----	15

I. 서론

Disulfiram (DSF)은 처음에는 고무의 가공에 사용되는 물질이었지만 구리와 함께 작용하였을 때 aldehyde dehydrogenase inhibitor로 작용하는 것이 밝혀졌다 [10]. DSF을 복용하면 숙취가 심해지는 기전을 이용하여 DSF은 임상분야에서 오랫동안 알코올중독치료에 사용되어왔다[15]. 1970년대에 DSF을 복용하던 지방암환자에서 암세포의 대부분이 제거된 것이 발견되었다 [3]. 이후, DSF은 항암 후보물질로 연구되어왔다. DSF의 항암기전은 구리와 DSF이 결합된 DSF-Cu complex가 proteasome inhibitor로 작용하여 endoplasmic reticulum (ER) stress를 야기하고, 암세포의 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져있다 [9, 13, 14].

많은 항암제들은 면역억제를 포함한 심각한 부작용을 동반한다 [12]. 하지만 DSF의 항암제로서의 잠재가능성에도 불구하고 DSF의 부작용에 관한 실험은 거의 연구되어 있지 않다. 면역억제는 외부 항원에 대항하는 면역계의 작용을 크게 약화시키기 때문에, 생명을 위협할 수도 있는 심각한 부작용이다 [7]. 이전 연구를 통하여 DSF이 마우스의 비장세포에 독성이 있는 것을 확인하였고, 특히 B림프구가 T림프구보다 더 DSF 독성에 의해 영향을 많이 받는 것을 확인하였다 [4]. 하지만 지금까지 DSF가 면역세포에 미치는 독성에 대한 연구는 거의 없다.

수지상세포 (Dendritic cell; DC)는 선천적 면역과 후천적 면역을 연결하는 필수적인 antigen presenting cell이며, naive lymphocyte가 면역기능을 갖추도록 항원을 제시하는 것으로 알려져 있다 [1]. 본 연구에서는 DC에 대한 DSF의 독성을 알아보기 위하여 마우스의 골수유래 DC을 사용하여 DSF 처리된 DC의 대사활성도, 표면마커의 발현 정도, 항원 탐식능력을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

실험동물 및 시약

실험에서는 8 ~ 12 주령의 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 실험동물은 오리엔트바이오사(대한민국)에서 분양받아 본 실험실에서 사용하였으며 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 시행하였다(승인번호 2019-0002). Disulfiram (Sigma, USA)은 dimethyl sulfoxide (Sigma)으로 녹인 후 적정 농도로 추가 희석하여 사용하였다.

Dendritic cell의 준비와 물질처리

DC은 현 실험실의 protocol을 따라 준비하였다. CO₂를 이용하여 마우스를 안락사 시킨 뒤 양쪽 대퇴골과 경골로부터 골수세포를 채취하였다. ACK(Ammonium-Chloride-Potassium) lysis buffer를 이용하여 적혈구를 용혈 시킨 뒤 70 μ m cell strainer에 통과시켜 사용하였다. 준비된 골수세포에 10 ng/mL의 murine IL-4와 10 ng/mL의 murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (mGM-CSF; peprotech, USA)를 처리하였다. 4 ~ 8일간 CO₂ incubator에서 배양한 뒤 미부착 세포들을 수확하여 dendritic cell을 준비하였다. Dendritic cell은 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL의 농도로 분주하여 실험하였다.

세포 대사활성도의 측정

DC의 대사활성도는 Cell counting kit-8[®] (CCK-8; Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. DC를 96-well culture plate에 5×10^5 cells/mL의 농도로 분주하여 DSF을 농도별로 계단 희석하여 처리하였다. DC의 활성을 측정하기 위하여 GM-CSF와 anti-CD40 monoclonal antibody (mAb; BD bioscience, USA)를

처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 실험하였다. 약물 처리 후 3일 뒤 CCK-8 시약을 처리한 뒤, microplate reader (Multiskan FC; ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

유세포분석

DC에 DSF을 처리하여 유세포분석에 사용되었다. 유세포분석을 통하여 cell apoptosis, 표면마커 분석, 탐식능력, 미토콘드리아 막전위 (MMP)를 측정하였다 [8]. Cell apoptosis assay를 위하여 약물처리된 DC에 Annexin V-fluorescein isothiocyanate (AnnexinV-FITC; ThermoFisher Scientific, USA)와 propidium iodide (PI; Sigma)를 염색하였다. 세포들은 annexin V binding buffer를 이용하여 세척한 뒤 Annexin-FITC를 2 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가하여 10분 동안 상온 암실의 조건에서 반응시켰다. 이후 유세포분석하기 5분 전에 PI를 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 표면마커 분석을 위해 약물 처리된 DC에 1차 항체 (Biotin labeled I-Ab, CD40, CD54, CD86 mAb; BD bioscience)를 처리하고 이어서 2차 항체로 streptavidin-conjugated phytoerythrin (Strep-PE; BD bioscience)을 처리하였다. 탐식능력 측정을 위해 약물처리된 DC은 FITC-dextran을 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 두 시간 동안 배양하였다. 바닥에 부착된 세포까지 수확하기 위하여 trypsin-EDTA solution을 20분간 처리하였다. MMP의 측정을 위하여 약물 처리된 DC에 Rhodamine 123 solution을 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 30분 동안 상온 암실의 조건에서 배양하였다. 각각 염색된 세포들을 CytoFLEX® flow cytometer와 CytExpert® software를 이용하여 분석하였다.

사이토카인 생성량 측정

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 IL-12 사이토카인의 생성량을 측정하기 위하여 mouse ELISA kit (ThermoFisher Scientific)를 이용하여 효소

면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)를 실시하였다. DC에 DSF을 처리하여 3일간 배양한 뒤 상층액만을 사용하여 ELISA에 사용하였다. 실험은 ELISA키트에 동봉된 실험방법을 따라 진행되었다.

동종이형 혼합 림프구 반응 시험

약물 처리된 DC의 항체발현능력을 측정하기 위하여 동종이형 (allogenic)의 비장세포와 섞어서 배양하는 Allogenic MLR(mixed leukocyte response)을 실시하였다. DC는 C57BL/6 마우스에서, 비장세포는 Balb/c 마우스에서 수확하였다. 배양 기간 동안 DC의 성숙 (maturation)으로 인한 오차발생을 방지하기 위하여 mitomycin C를 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 30분 간 처리하여 배양하여 DC의 성숙을 정지시켰다. 현 실험실의 protocol을 따라 비장세포를 수확하여 [6] 2×10^6 cell/mL의 농도로, DC은 농도 별로 계단희석하여 섞어주었다. 5일 동안 배양한 후, CCK-8 solution을 각 well마다 10 μL 씩 추가하여 4시간 배양한 뒤 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

CCK-8 assay, ELISA, MLR의 데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며 one way-ANOVA 분석 후 InStat (GraphPad Software Inc., USA) 프로그램을 이용하여 Tukey-Kramer multiple comparison test로 유의성을 확인하였다. 0.05 미만의 p value를 갖는 경우 유의한 것으로 판단하였다. *, **, *** 은 각각 대조군과 비교하여 $p < 0.05$, 0.01, 0.001임을 나타낸다.

III. 결과

DSF이 DC의 대사활성도에 미치는 영향

DSF이 대사활성도에 영향을 주는지 확인하기 위하여 DC에 DSF를 5배 계단 희석하여 농도별로 처리하였다 (0 ~ 5 μM). 0 ~ 1 μM 의 농도에서는 DSF의 처리가 대사활성도 변화에 유의적인 영향을 주지 않았다 (Fig. 1). 하지만, 5 μM 의 DSF 농도에서는 세포활성도가 뚜렷하게 감소하였다. 이는 DSF가 DC의 대사활성도를 감소시키는 특정 농도가 존재하는 것을 의미한다.

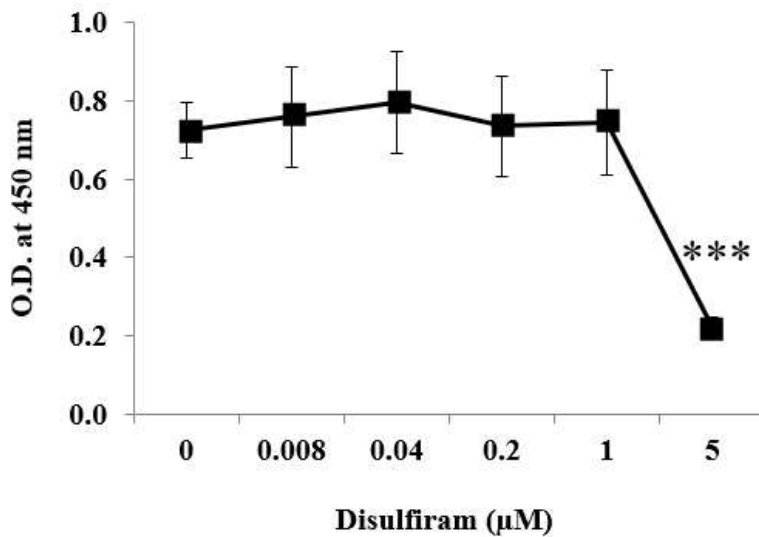


Fig. 1. The activity of dendritic cells was affected by disulfiram. Dendritic cells were seeded at a concentration of 1×10^5 cells /well in 96-well culture plates and treated with disulfiram for 3 days. CCK-8 assay was performed as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean \pm SD. Significant difference is expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for a comparison of the control group and DSF treated group.

DSF이 DC의 cell death에 미치는 영향

DSF이 cell death, apoptosis, necrosis를 유발하는지의 여부를 확인하기 위하여 DC에 DSF를 5배 계단희석하여 농도별로 처리하였다 (0 ~ 5 μ M). Annexin V-FITC/PI 염색을 통하여 early/late apoptosis, necrosis의 비율을 알아보는 cell death assay를 실시하였다 (Fig. 2A). 0 ~ 1 μ M의 농도에서는 DSF의 처리가 cell death 비율 변화에 유의적인 영향을 주지 않았다. 하지만 5 μ M의 DSF 농도에서는 대조군과 비교하였을 때 early apoptosis (annexin V+/ PI-)와 late apoptosis (annexin V+/ PI+)의 비율이 증가하는 것을 확인하였다. DSF가 어떻게 cell death에 영향을 주는지 알아보기 위하여 Rhodamine 123 solution을 이용하여 약물처리된 DC의 MMP를 측정하였다 (Fig. 2B). 5 μ M 농도의 DSF가 처리된 DC는 대조군과 비교하여 33% 감소된 MMP수치를 확인하였다. 이 MMP의 수치변화는 cell death assay의 수치변화와 일관되는 결과이다.

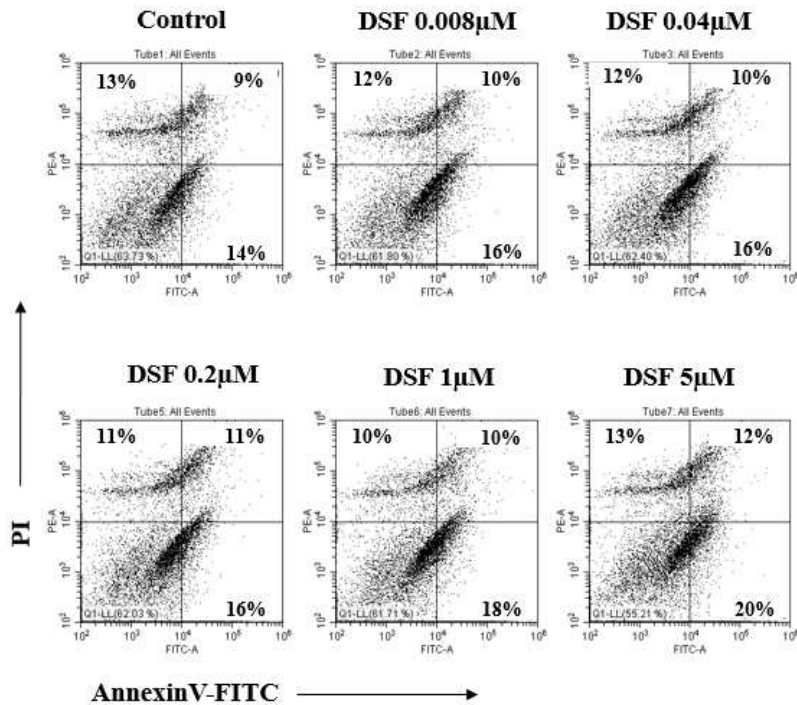


Fig. 2A. The viability of dendritic cells was decreased by disulfiram. Dendritic cells were cultured with disulfiram for 2 days. The cells were

seeded at a concentration of 2×10^5 cells /well in 24-well culture plates and stained with Annexin V-FITC/PI. The cells in quadrants indicates necrosis (upper left), late apoptosis (upper right), viable (lower left) and early apoptosis (lower right) cells.

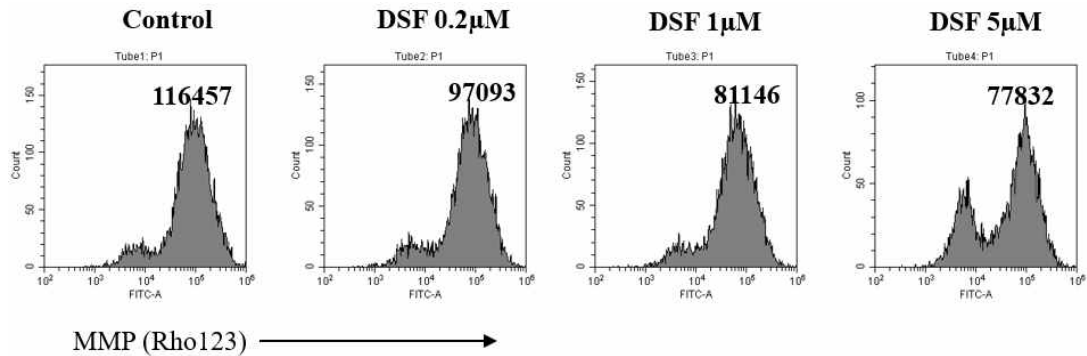


Fig. 2B. Disulfiram decreases mitochondrial membrane potential of dendritic cells. Dendritic cells were seeded at a concentration of 1×10^5 cells /well in 24-well culture plates and treated with disulfiram for 3 days. After 3 day treatment, the cells were stained with Rhodamine 123 solution and analyzed using flow cytometry as described in Materials and Methods. The number of histogram indicates mean fluorescence intensity.

DSF이 DC의 표면마커 발현에 미치는 영향

DSF의 처리에 따른 DC의 성숙정도와 활성화정도를 나타내는 표면마커의 변화를 측정하였다. 약물 처리된 DC에 anti-MHC class II, CD40, CD54, CD86, mAb로 염색하여 유세포분석기로 분석하였다(Fig. 3). 0.008 - 0.2 μM 농도의 DSF는 MHC class II의 발현에 영향을 주지 않았지만 1 ~ 5 μM 농도에서는 대조군 (0 μM)과 비교하여 감소한 것을 확인하였다. CD40과 CD54의 발현은 1 μM과 5 μM 농도에서 상대적으로 감소하였다. 흥미롭게도 0 ~ 5μM의 모든

DSF 농도군에서 CD86의 발현은 변화가 없었다. 이 결과는 DSF이 DC의 성숙과 활성화마커의 발현에 각각 다르게 영향을 미칠 수 있음을 뜻한다.

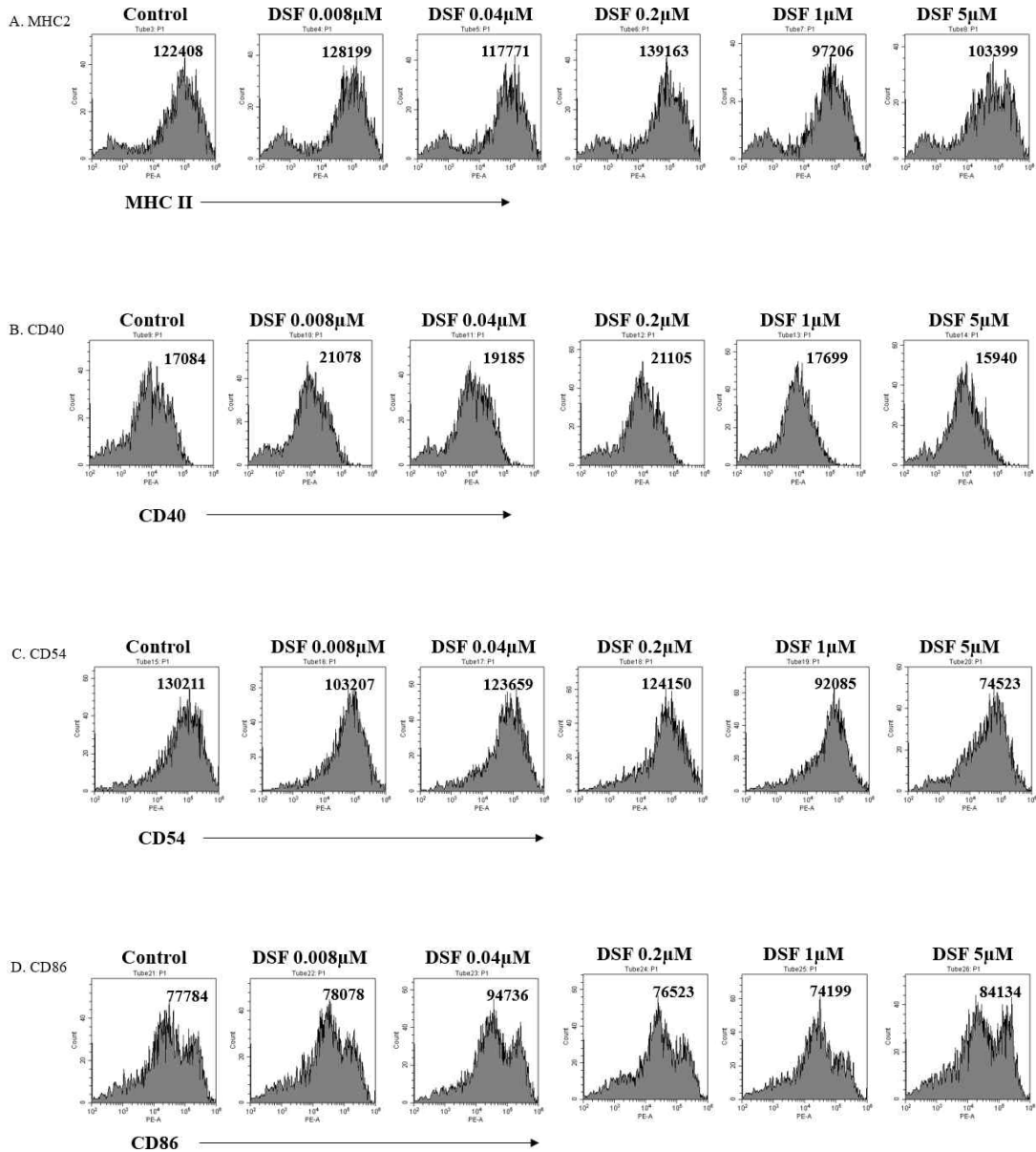


Fig. 3. High concentration of disulfiram decreases the expression of MHC class II, CD40, CD54 but not affected the expression of CD86. The cells were setup and treated as described in Fig.2B. After 3 day treatment, the cells were stained for surface marker and analyzed using flow cytometry as described in Materials and Methods. The number of

histogram indicates mean fluorescence intensity.

DSF이 DC의 항원탐식능력에 미치는 영향

DC의 항원탐식능력을 조사하기 위하여 약물 처리된 DC에 FITC-dextran을 처리하여 배양하였다. 세 번의 반복 실험동안 0 ~ 1 μM 의 DSF 농도군에서 DC의 항원탐식능력에 변화를 확인하지 못했고, 5 μM 의 DSF 농도군에서는 항원탐식능력의 감소를 확인하였다 (Fig. 4).

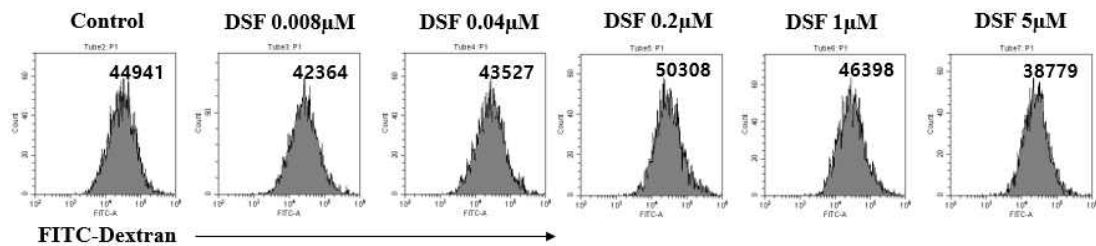


Fig. 4. Antigen uptake ability was decreased by high concentration of disulfiram. Dendritic cells were setup and treated as described in Fig.2B. FITC-Dextran was added for 2 hours and the cells were analyzed using flow cytometry. The number of histogram indicates mean fluorescence intensity.

DSF 처리에 의한 DC 사이토카인 생산의 변화

DC로부터 생성되는 TNF- α 와 IL-12의 양을 ELISA를 통하여 정량하였다. 염증상황에서 DSF이 DC의 사이토카인 생산에 영향을 주는지 여부를 확인하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS)가 없는 실험조건에서 DC에 DSF을 처리하였다. TNF- α 생산량은 LPS의 유무에 관계없이 대조군과 비교하여 5 μM 의 농도에서 유의적으로 감소하였다 (Fig. 5). IL-12 생산량은 LPS 존재시 DSF의 처리농도에 비례하여 감소하였다 (Fig. 5). 특히 5 μM 농도의 DSF는 대조군과 비교하였을 때 IL-12 생산량이 54% 감소한 것을 확인하였다. ELISA의 결과, DC에서의 IL-12 생산량의 변화가 TNF- α 생산량의 변화보다

DSF의 처리에 의한 영향을 더 많이 받았다. 이는 DSF가 DC의 사이토카인에 따라 다르게 작용할 수 있음을 의미한다.

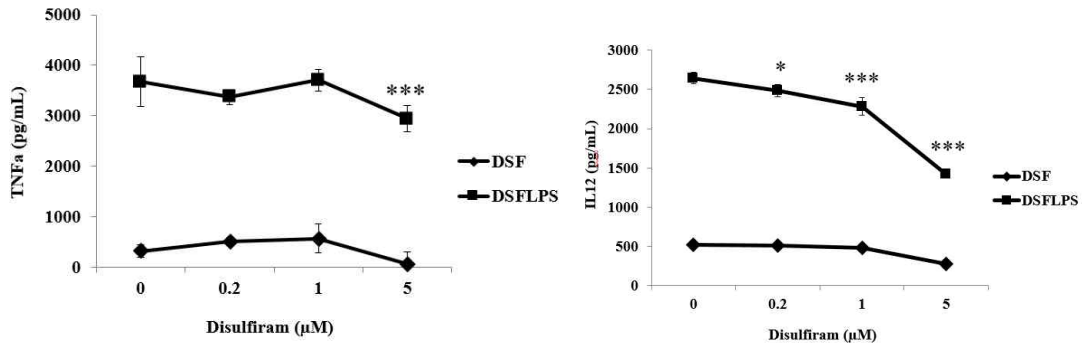


Fig. 5. Cytokine (TNF α , IL12) production was decreased by Disulfiram. Dendritic cells were treated with disulfiram in 96-well culture plates and the culture supernatants were used for TNF α , IL12 ELISA. Data are mean \pm SD from four individual wells. Significant difference is expressed as * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 for a comparison of the control group and DSF treated group.

DSF이 DC의 항원제시기능에 미치는 영향

DSF이 항원제시기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 allogenic MLR을 수행하여 CCK-8 assay로 분석하였다. 약물처리된 DC을 동종이형의 비장세포와 섞어 5일간 배양하였다. MLR의 결과, 1 μ M과 5 μ M의 DSF 농도에서 DC의 항원제시기능이 대조군에 비하여 크게 감소하였다 (Fig. 6). 이 실험결과로 DSF가 DC의 항원제시기능을 감소시키는 것을 확인하였다.

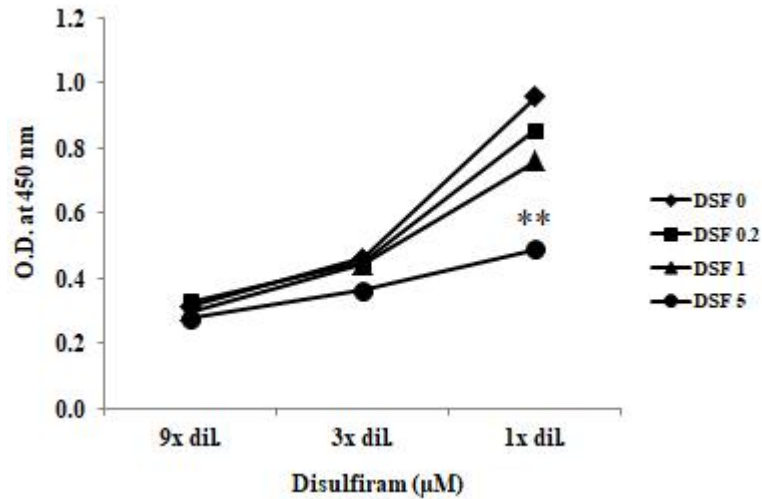


Fig. 6. Antigen presenting ability was decreased by high concentration of disulfiram. Dendritic cells of C57BL/6 mouse were treated with disulfiram for 3 days. Mitomycin C was added on the DSF treated DCs. Spleen cells of Balb/C mouse were co-cultured with prepared DCs in the ratio of 20:1 (spleen cell: 2×10^6 cells/mL, DC: 1×10^5 cells/mL). CCK-8 assay was performed after 5 day incubation. Significant difference is expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for a comparison of the control group and DSF treated group.

DC의 성장인자인 GM-CSF가 DSF의 독성에 미치는 효과

DC에서 DSF에 의한 독성을 완화시킬 수 있는 요소를 확인하기 위하여 DC에 DSF이 처리된 상태에서 GM-CSF 또는 anti-CD40 mAb를 첨가하였다. 처리 후 CCK-8 assay를 통하여 DC의 세포활성도를 측정하였다 (Fig. 7). 실험결과, GM-CSF가 DC에 미치는 DSF의 독성을 유의적으로 완화시키는 것을 확인하였다.

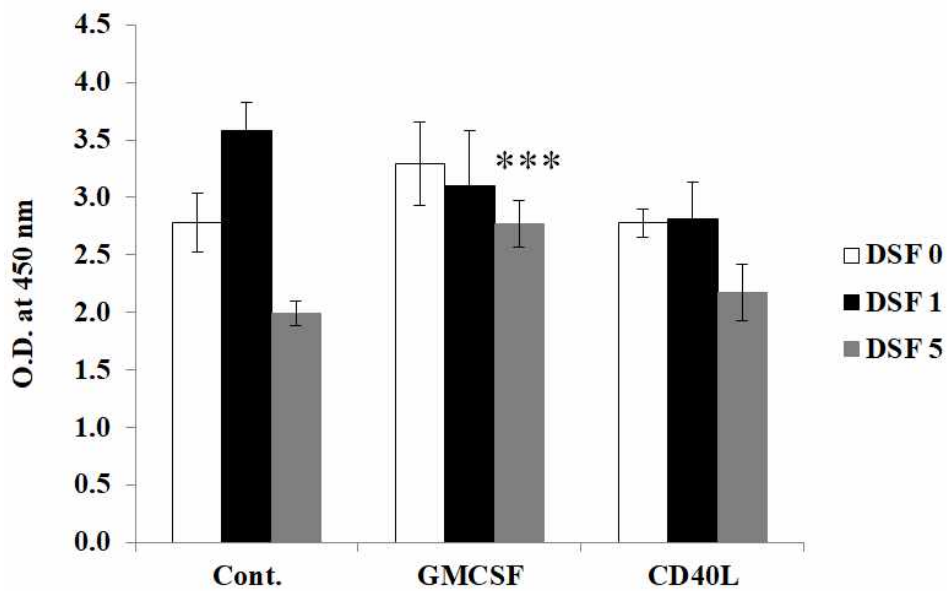


Fig. 7. Stimulation factor (GM-CSF) protects dendritic cells from toxicity of disulfiram. Dendritic cells were seeded at a concentration of 1×10^5 cells /well in 96-well culture plates. Each group was consisted of disulfiram only (control), disulfiram with GM-CSF, disulfiram with CD40 ligand. CCK-8 assay was performed after 3 days. Significant difference is expressed as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for a comparison of the control group and stimulation factor treated group.

IV. 고찰

과거에 알코올중독 치료에 사용되었던 약물인 DSF이 최근 항암효과를 가진다는 것이 밝혀졌다 [14, 16, 18]. 이전 연구에서는 DSF이 주로 림프구로 구성된 비장세포에 독성이 있음을 확인하였다 [4]. 이에 본 연구에서는 DSF이 항원제시와 선천성 면역반응과 cross-presentation을 주관하는 세포인 DC에도 독성을 가지는지 실험을 진행하였다.

본 연구에서는 미토콘드리아 막전위, 표면마커 분석, 사이토카인 생성량, 그리고 항원제시능력을 측정함으로 DC에 대한 DSF의 독성을 확인하였다. 실험결과, 5 μ M의 DSF 농도에서 DC의 세포 대사활성도와 기능이 유의적으로 감소하였고, 이 5 μ M의 DSF 농도가 DC에 독성을 가지는 것으로 생각된다. 반대로 1 μ M이하의 DSF 농도에서는 대조군과 비교하였을 때 큰 변화가 없어, DSF의 독성이 없는 것을 확인하였다. 대조군과 비교하였을 때, 5 μ M의 DSF 농도에서 DC의 cell death 비율이 9% 증가하였는데, 비장세포에 5 μ M의 DSF를 처리한 이전 연구결과는 57% 증가하였다 (31%→89%). 따라서 DC가 비장세포에 비해 DSF 독성에 더 잘 견디는 것을 확인하였다. DSF을 head and neck squamous cell carcinoma cell line (FaDu and Hep2)에 처리한 연구결과에 따르면, DSF은 2 μ M의 농도에서 항암효과가 있는 것으로 밝혀졌다 [11]. 따라서, 1 μ M DSF 농도에서 표면마커를 비롯한 일부 세포 활성지표가 감소한 본 연구결과를 바탕으로 추측할 때, DSF도 면역억제의 부작용을 가질 수 있음을 의미한다.

DSF의 세포독성은 unfolded protein response (UPR) signaling pathway와 연관이 있다 [2]. DSF과 구리이온이 결합한 DSF-Cu complex는 proteasome inhibitor로 작용하여 unfolded protein이 정상적으로 제거되지 않고 세포 내에 축적된다. 세포 내에 축적된 unfolded protein은 세포에 소포체 스트레스 (endoplasmic reticulum stress; ER stress)를 유발시킨다 [3, 19]. 따라서

DSF의 세포독성에 영향을 미치는 요인은 세포의 종류에 따라 세포 내 구리 이온의 농도가 다르거나, UPR signaling pathway를 조절하는 특정 물질의 존재 때문일 수 있다. 전사인자 x-box binding protein-1 (XBP-1)이 UPR signaling pathway를 조절하는 후보물질로 고려해 볼 수 있다. XBP-1은 DC의 성장과 생존에 필수적인 전사인자이다 [5]. 추가로, XBP-1은 UPR signaling pathway와 ER stress의 완화에 밀접하게 연관되어있어 ER 평형을 유지하고 ER stress로 인한 세포의 죽음을 방지한다 [17].

GM-CSF를 첨가하여 활성화된 상태에서 실험한 activation stimuli 실험의 결과, anti-CD40 mAb 처리군은 약물 처리된 DC의 세포대사활성도가 6% 증가한 반면, GM-CSF는 세포대사활성도가 13 % 증가하였다. GM-CSF는 또한 DSF의 세포독성으로부터 DC를 보호하는 것으로 여겨진다. 실험 결과는 DC의 성장인자 및 분화인자가 DSF의 세포독성을 상쇄하는 것과 연관이 있음을 시사하였다. 하지만, XBP-1과 GM-CSF를 포함한 DC의 성장인자 사이의 상관관계는 아직 밝혀지지 않았다. 향후 연구는 DC에 성장인자 또는 활성화인자를 처리하였을 때 XBP-1의 발현이 어떻게 변화하는지, 그리고 이 발현의 변화가 어떻게 DC의 생존과 기능에 영향을 미치는지 조사할 필요가 있다.

V. 참고문헌

1. Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
2. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. and Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326-332
3. Chen, D., Cui, Q. C., Yang, H. and Dou, Q. P. (2006) Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.* **66**, 10425-10433.
4. Han, Y. and Joo H. G. (2018) Toxicity of disulfiram, a therapeutic agent for chronic alcoholism, to mouse spleen cells. *J. Prev. Vet. Med.* **42**, 177-181.
5. Iwakoshi, N. N., Pypaert, M. and Glimcher, L. H. (2007) The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **204**, 2267-2275.
6. Jang, J. Y., Moon, S. Y. and Joo, H. G. (2014) Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem. Toxicol.* **68**, 234-238.
7. Kidd, B. A., Wroblewska, A., Boland, M. R., Agudo, J., Merad, M.,

- Tatonetti, N. P., Brown, B. D. and Dudley, J. T. (2016) Mapping the effects of drugs on the immune system. *Nat. Biotechnol.* **34**, 47–54.
8. Kim, S. Y. and Joo, H. G. (2015) Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J. Vet. Sci.* **16**, 145-150.
9. Kona, F. R., Buac, D. and M Burger A. (2011) Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr. Cancer Drug Targets* **11**, 338-346.
10. Lipsky, J. J., Shen, M. L. and Naylor, S. (2001) In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 93-102.
11. Park, Y. M., Go, Y. Y., Shin, S. H., Cho, J. G., Woo, J. S. and Song, J. J. (2018) Anti-cancer effects of disulfiram in head and neck squamous cell carcinoma via autophagic cell death. *PLoS One* **9**, e203069.
12. Penn I. and Starzl, T. E. (1973) Immunosuppression and Cancer. *Transplant Proc.* **5**, 943–947.
13. Rae, C., Tesson, M., Babich, J. W., Boyd, M., Sorensen, A. and Mairs, R. J. (2013) The role of copper in disulfiram-induced toxicity and radiosensitization of cancer cells. *J.Nucl. Med.* **54**, 953-960.
14. Shah O'Brien, P., Xi, Y., Miller, J. R., Brownell, A. L., Zeng, Q., Yoo, G. H., Garshott, D. M., O'Brien, M. B., Galinato, A. E., Cai, P., Narula, N.,

Callaghan, M. U., Kaufman, R. J. and Fribley, A. M. (2019) Disulfiram (Antabuse) Activates ROS-Dependent ER Stress and Apoptosis in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *J.Clin. Med.* **8**, pii: E611.

15. Skinner, M. D., Lahmek, P., Pham, H. and Aubin, H. J. (2014) Disulfiram efficacy in the treatment of alcohol dependence: a meta-analysis. *PLoS One* **9**, e87366.

16. Skrott, Z., Majera, D., Gursky, J., Buchtova, T., Hajduch, M., Mistrik, M. and Bartek, J. (2019) Disulfiram's anti-cancer activity reflects targeting NPL4, not inhibition of aldehyde dehydrogenase. *Oncogene* (in press).

17. Tang, C. H., Ranatunga, S., Kriss, C. L., Cubitt, C. L., Tao, J., Pinilla-Ibarz, J. A., Del Valle, J. R. and Hu, C. C. (2014) Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *J.Clin. Invest.* **124**, 2585-2598.

18. Triscott, J., Rose Pambid, M. and Dunn, S. E. (2015) Concise review: bullseye: targeting cancer stem cells to improve the treatment of gliomas by repurposing disulfiram. *Stem Cells* **33**, 1042-1046.

19. Viola-Rhenals, M., Patel, K. R., Jaimes-Santamaria, L., Wu, G., Liu, J. and Dou, Q. P. (2018) Recent Advances in Antabuse (Disulfiram): The Importance of its Metal-binding Ability to its Anticancer Activity. *Curr. Med. Chem.* **25**, 506-524.