

면역억제제가 Lipopolysaccharide에 의한 생쥐의 간 및 뇌조직의 Nitric Oxide Synthase 활성도의 변화에 미치는 영향

경북대학교 의과대학 약리학교실¹, 계명대학교 의과대학 정형외과학교실²

민병우² · 한형수¹ · 박정숙¹ · 김중영^{1*}

= Abstract =

Effect of Immunosuppressants on Lipopolysaccharide-Induced Changes of Nitric Oxide Synthase Activity in Liver and Brain of Mice

Byung Woo Min², Hyng Soo Han¹, Jung Sook Park¹ and Choong Young Kim¹

*Department of Pharmacology, School of Medicine, Kyungpook National University¹ and
Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Keimyung University²
Taegu, Korea*

To verify the effect of immunosuppressants on the endotoxin-induced increase in iNOS activity, the action of immunosuppressants, dexamethasone (1.5 mg/kg), azathioprine (5 mg/kg/day) and cyclosporine (10 mg/kg), were evaluated in mice pretreated with LPS.

The intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (10 mg/kg) increased the nitric oxide synthase (NOS) activity in the brain and liver to maximum at 1 and 3 hours, respectively. The increase in NOS activity was blocked by the treatment with NOS inhibitor, LNAME(300 mg/kg) and aminoguanidine(100 mg/kg); a protein inhibitor, cycloheximide(10 mg/kg); and a transcription inhibitor of inducible NOS(iNOS), dexamethasone(1.5 mg/kg).

Immunosuppressants, azathioprine (5 mg/kg) and cyclosporine (10 mg/kg), effectively blocked the increase in NOS activity.

These results suggest that iNOS expression plays an important role in LPS-induced the increase in NOS activity and that immunosuppressants can be used as candidate for therapeutic agents in endotoxemia.

Key Words: Lipopolysaccharide, Nitric oxide synthase activity, Azathioprine, Cyclosporine, Endotoxemia

서 론

면역억제제는 신체의 정상적인 면역기전을 억제

하여 치료작용을 나타내는 약제로서, 임상적으로
는 장기이식분야와 자가면역질환의 치료에 이용되
고 있다. 흔히 사용되는 면역억제제로는 dexa-
methasone, cyclosporine, azathioprine등이 있는

데, 세포 수준에서의 작용기전은 각기 다르지만 면역기능 억제라는 공통된 작용을 나타낸다. 즉, dexamethasone은 면역세포들의 작용을 조절하는 cytokine들의 유전자 발현을 조절하며, cyclosporine은 T세포의 활성화를 억제하며, azathioprine은 핵산합성을 억제한다.

근래에 많은 연구가 진행되고 있는 nitric oxide (NO)는 대식세포와 혈관내피세포에서 각각 면역반응, 혈관이완반응 등의 생리적 작용을 나타내며, 아직까지 생리적 작용은 잘 모르지만 중추신경계, 간, 평활근 등에도 존재하는 것으로 알려져 있다 (Furchgott, 1990; Garthwaite, 1991; Lowenstein & Snyder, 1992). NO는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine이 L-citrulline과 NO로 전환될 때 생성되는데 (Moncada, 1992), 신경세포와 내피세포에서 발견되는 NOS는 주로 cNOS(constitutive NOS)에 속하고, 중성구, 대식세포, 간세포에서 발견되는 것들은 주로 iNOS(inducible NOS)에 속한다(Moncada, 1992). 즉, cNOS는 항상 존재하지만 iNOS는 lipopolysaccharide(LPS)나 interferon-gamma와 같은 cytokines에 의해 자극될 때만 유도된다.

한편 패혈성충 치료에 사용되는 dexamethasone은 혈관평활근을 이용한 실험에서 내독소(LPS)에 의한 iNOS 발현을 억제한다고 한다(Salter 등, 1991; Thiernemann과 Whittle, 1990). 그런데 iNOS의 발현을 억제하는 작용이 dexamethasone에만 국한된 것인지 아니면 모든 면역억제제에 공통된 작용인지를 밝힌다면 면역억제제의 약리학적 작용과 부작용을 이해하는데 많은 진전이 있을 것이다.

따라서 본 실험에서는 내독소혈증 치료에 면역억제제가 응용될 수 있는지를 관찰하기 위하여 iNOS를 발현하는 간과 뇌 조직에서 NOS 활성도에 대한 면역억제제의 효과를 검토하여 보았다.

재료 및 방법

실험동물: 30 g 정도의 ICR계 생쥐 수컷을 이

용하였다.

약물투여: LPS 10 mg/kg을 복강내 주사하고, 1, 3, 6, 12, 24시간이 경과한 후 척추탈골법으로 동물을 죽인 뒤 간과 뇌를 적출하여 즉시 실험에 이용하였다. Cycloheximide(10 mg/kg)와 dexamethasone(1.5 mg/kg)은 뇌조직의 경우는 LPS 투여 30분 전에 주사하였으며 간조직의 경우는 LPS 투여 후 1시간이 경과한 후 주사하였으며, cyclosporine(10 mg/kg)은 LPS 투여 30분 전에 투여하였으며, N-nitro-L-arginine methyl ester(LNAME, 300 mg/kg)는 조직을 적출하기 30분 전에 투여하였고 aminoguanidine(100 mg/kg)은 50분 전에 투여하였다. Azathioprine(5 mg/kg)은 LPS 투여 12시간 전부터 약물을 경구 투여하여 LPS에 의한 NOS 활성도 변화에 대한 영향을 확인하였다.

NOS 활성도 측정: 적출한 조직을 10배 용량의 homogenizing buffer(320 mM sucrose, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DL-dithiothreitol, 100 μ g/ml phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ /ml soybean trypsin inhibitor, 2 μ g/ml aprotinin)에 넣은 후 homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄액은 4°C에서 12,000 g로 20분 동안 원심분리한 후 -20°C에 보관하였다. 상층액 70 μ l을 채취하여 280 μ l의 reaction buffer(1.6 μ M oxyhemoglobin, 200 μ M CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 100 μ M L-arginine, 100 μ M NADPH, 50 mM L-valine, 40 mM potassium phosphate)와 혼합하여 37°C에서 5분 동안 반응시킨 뒤 광전분광광도계(Gilford Model 2600, U.S.A)를 이용하여 407과 417 nm에서 흡광도 차이를 비교하여 NO의 양을 정량하였다.

NADPH diaphorase 염색: 생쥐에 pentobarbital(35 mg/kg)을 복강내 주사하여 마취시키고 심장을 통해 차가운 인산 완충용액을 관류시켜 사혈시킨다. 4% paraformaldehyde 용액으로 고정시킨 뒤 간과 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde 용액에 담구었다가 40 μ m 두께로 잘라 NADPH(2.2 mM)와 nitroblue tetrazolium(0.6

mM)이 포함된 Tris 완충용액(37°C, 1시간)에 서 반응시켜 NOS의 존재를 확인하였다.

시약: 모든 시약은 Sigma사의 시약을 이용하였다.

통계: 각 실험군과 대조군은 unpaired t-test를 이용하여 비교하였고, p값이 0.05이하인 경우 유의하다고 보았다.

결 과

LPS 투여에 의한 NOS 활성도의 변화: LPS를 투여한 뒤 뇌에서는 1시간($125 \pm 3.7\%$), 간에서는 3시간($122 \pm 4.4\%$)에 NOS 활성도가 최대로 증가되었다. 뇌에서는 3시간이 지나면서 NOS의 활성도가 정상 수준으로 돌아왔고 간에서는 6시간이 지나면 LPS 투여 전의 수준으로 돌아왔다(Fig. 1). 따라서 이 후의 실험은 LPS 처치 후 뇌의 경우는 1시간, 간의 경우는 3시간 뒤에 장기를 적출하여 실험에 사용하였다.

간과 뇌조직에서의 NADPH diaphorase 염색: 뇌조직에서는 주로 대뇌피질의 신경교세포가, 간조직에서는 간문맥과 간동맥과 같은 혈관 조직 주위의 세포들이 짙게 염색된 반면 간세포는 거의 염색되지 않았다. 따라서 뇌에서는 신경교세포보다는 신경교세포가 그리고 간에서는 간세포보다는 Kupffer세포나 혈관내피세포 등이 LPS의 주된 작

용 부위로 보인다(Fig. 2).

LNAME와 aminoguanidine의 효과: LPS에 의한 NOS 활성도의 증가율은 LNAME 처치로 뇌 및 간에서 각각 $54.3 \pm 5.4\%$ 및 $82.6 \pm 6.5\%$ 이

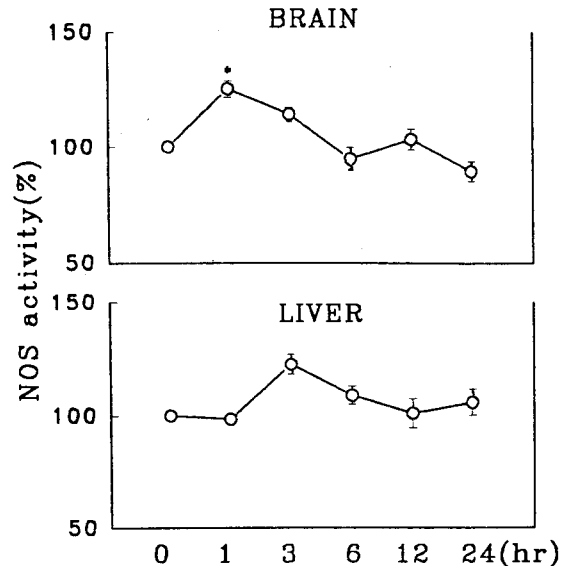


Fig. 1. NOS activity in brain and liver at 0, 1, 3, 6, 12, 24 hours after LPS(10 mg/kg) administration. The data were shown as percentage of the value at 0 hour. Each value show the mean of 6-10 experiments with SEM shown by vertical bars.

*, $P < 0.05$ vs 0 hour

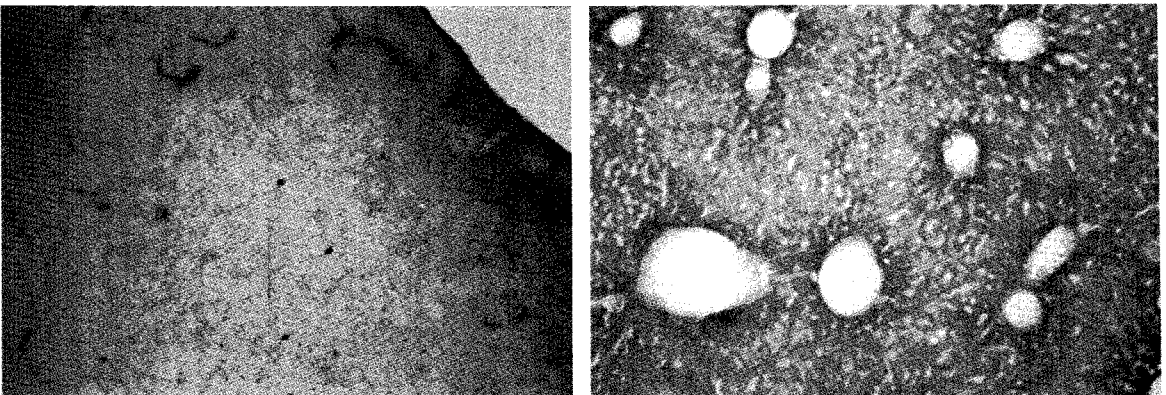


Fig. 2. NADPH diaphorase staining of brain and liver tissues 3 hours after LPS treatment.

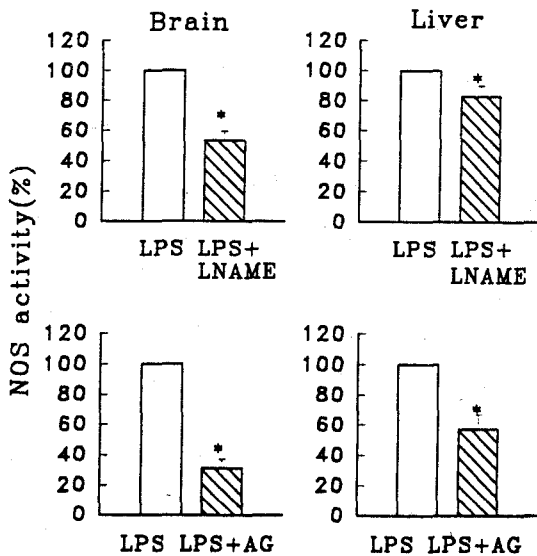


Fig. 3. NOS activity in brain (1 hour after LPS) and liver (3 hour after LPS) treated with or without LNAME (300 mg/kg) or aminoguanidine (100 mg/kg). The data were expressed as percentage of LPS alone, and the columns show the mean of 6-10 experiments with SEM shown by vertical bars. *, $P > 0.05$ vs LPS alone

었고, aminoguanidine 처치로서는 각각 $30.4 \pm 5.5\%$ 및 $56.9 \pm 9.4\%$ 로서 LPS에 의한 NOS 활성도의 증가가 LNAME 및 aminoguanidine에 의하여 억제되었다(Fig. 3).

Cycloheximide와 dexamethasone의 효과: LPS에 NOS 활성도의 증가율은 cycloheximide 처치로서 뇌 및 간에서 각각 $30.4 \pm 9.4\%$ 및 $85.2 \pm 5.2\%$ 이었고, dexamethasone 처치로서는 각각 $84.6 \pm 3.1\%$ 및 $66.5 \pm 7.1\%$ 로서 LPS에 의한 NOS 활성도의 증가가 cycloheximide와 dexamethasone에 의하여 억제되었다(Fig. 4).

Cyclosporine과 azathioprine의 효과: LPS에 의한 NOS 활성도의 증가율은 cyclosporine 처치로서 뇌 및 간에서 각각 $37.6 \pm 10.6\%$ 및 $69.8 \pm 7.8\%$ 이었고, azathioprine 처치로서는 각각 $74.5 \pm 6.7\%$ 및 $64.1 \pm 7.3\%$ 로서 LPS에 의한 NOS 활성도의 증가가 cyclosporine과 azathioprine에 의

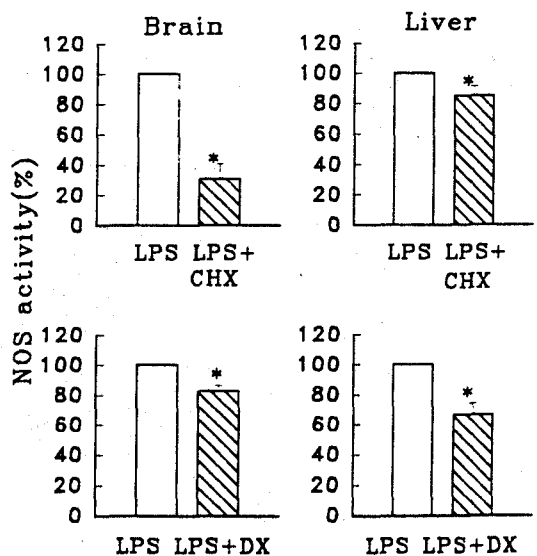


Fig. 4. NOS activity in brain (1 hour after LPS) and liver (3 hour after LPS) treated with or without cycloheximide (10 mg/kg) or dexamethasone (1.5 mg/kg). The data were expressed as percentage of LPS alone, and the columns show the mean of 6-10 experiments with SEM shown by vertical bars. *, $P < 0.05$ vs LPS alone

하여 억제되었다(Fig. 5).

고 찰

Lipopolysaccharide(LPS)는 중성구, 대식세포, 간세포, 신경교세포, 혈관평활근에서 iNOS를 유도하는 대표적인 물질로 많이 이용되며 이들 세포가 많이 분포해 있는 간과 뇌는 LPS에 의한 iNOS의 유도를 연구하기 위한 적합한 장기라 생각되어 뇌 및 간을 이용하였는데, LPS를 복강내 주사했을 때, 뇌에선 1시간, 간에서는 3시간에 NOS 활성도가 가장 높았으며, 이후로는 서서히 감소하여 LPS 투여전 수준으로 회복되었다. LPS 투여 전에 나타나는 NOS 활성도는 간에서는 혈관내피세포, 뇌에서는 신경세포에 있는 cNOS의 작용으로 보이며, 이것은 NADPH diaphorase 염색에서도 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 LPS 투여후

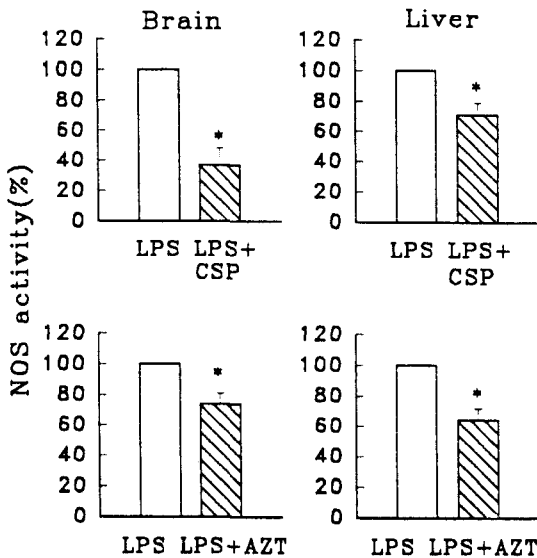


Fig. 5. NOS activity in brain(1 hour after LPS) and liver(3 hour after LPS) treated with or without azathioprine(10 mg/kg) or cyclosporin (5 mg/kg/day). The data were expressed as percentage of LPS alone, and the columns show the mean of 6-10 experiments with SEM shown by vertical bars. *, $P > 0.05$ vs LPS alone

간 조직이나 뇌 조직에서 증가된 NOS 활성도는 대식세포(Kupffer세포), 간세포 또는 신경교세포에서 유도된 iNOS 활성화에 기인하는 것 같다.

Nitric oxide(NO)는 활성도가 높은 자유 라디칼로서 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine이 L-citrulline과 NO로 전환될 때 생성된다(Moncada, 1992). 생리학적으로는 혈관의 수축성 조절, 신경 전달 물질로서의 작용, 면역반응 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Furchgott, 1990; Garthwaite, 1991; Lowenstein & Snyder, 1992). NOS는 여러 종류가 다양한 조직에 존재하는데 크게 constitutive NOS(cNOS)와 inducible NOS(iNOS)의 두 종류로 구분된다(Moncada, 1992). cNOS는 유전자 발현이 constitutive하고 calcium과 calmodulin에 의존적인 특성이 있는 반면, iNOS는 LPS나 interferon-gamma와 같은 cyto-

kine등에 의해 발현된다. 신경세포와 내피세포에서 발견되는 NOS는 주로 cNOS에 속하고, 중성구, 대식세포, 간세포에서 발견되는 것들은 주로 iNOS에 속한다(Moncada, 1992).

LPS 투여에 의해 증가된 NOS의 활성도는 기존 효소의 활성이 증가되거나, 새로운 NOS의 합성으로 볼 수 있다. 따라서 NOS 활성도의 증가는 어떤 종류의 NOS가 활성화되었기 때문인지를 규명하기 위해, 본 실험에서는 cNOS와 iNOS 모두를 억제하는 LNAME와 iNOS만 선택적으로 억제하는 aminoguanidine을 처치하였는데, 이 두 약에 의하여 LPS에 의한 활성도 증가가 봉쇄되었다. 이 결과로 단정적으로 말할 수는 없지만 iNOS에 선택적으로 억제하는 aminoguanidine에 의하여 현저히 억제되는 것으로 봐서 LPS에 의한 NOS 활성도의 증가는 주로 iNOS 활성의 증가에 기인한 것 같다. LNAME와 aminoguanidine에 의한 억제효과는 두 약제 모두 간조직에서보다는 뇌조직에서 더 현저했는데, 그 이유는 약물과 효소의 결합능의 차이에서 비롯될 수도 있으나 어떠한 다른 인자에 의하여 야기될 수도 있어 그 원인을 밝히려면 연구가 좀 더 필요하다.

세균감염으로 내독소혈증이 되면 일반적으로 LPS에 의해 혈관, 대식세포, 간 등에서 대량의 NO가 생성되어 혈관을 이완시키고 결국은 패혈성 속내 빠지게 되는데, 이 내독소혈증 치료를 위해 NOS의 증가를 봉쇄할 수 있는 약제를 사용할 수 있을 것이다. Kilbourn등은(1990a & 1990b) 동물실험에서 N^G-monomethyl-L-arginine을 이용하여 수분 이내에 저혈압을 치료하였다. 그리고 Hotchkiss등(1992)과 Petros 등(1991)도 내독소혈증 환자에서 NOS 억제제를 이용하여 저혈압을 치료할 수 있었으나, 치료 결과와는 무관하게 환자는 곧 사망하였다고 한다. 그 원인은 이들이 사용한 NOS 억제제는 iNOS에 대한 선택성이 없는 NOS억제제를 사용한 것이라 생각되어 본 실험에서 cNOS에는 작용하지 않으면서 iNOS에만 주로 작용하는 aminoguanidine과 같은 약물을 사용하였다. 이는 생리학적 작용에는 영향을 주지않고

저혈압만 치료할 수 있는 한 방법이 될 수 있을 것이며, 또는 iNOS의 발현을 억제하는 약물을 이용하여도 가능할 것이다.

본 실험에서 단백합성을 억제하는 cycloheximide를 처치하였는데, NOS의 활성화도가 억제되었다. 이는 cycloheximide에 의하여 단백질 합성이 억제되므로써 단백질로 구성된 모든 효소의 합성이 억제될 수도 있다는 것을 의미하나 cycloheximide가 iNOS에 대한 선택성이 있다고 단정할 수는 없다.

현재 사용하는 면역억제제중 dexamethasone은 폐혈증 치료에도 사용하고 있는데 이것은 iNOS의 유전자 발현을 억제하여 혈관이완성을 감소시키기 때문이며 한편 dexamethasone은 대색세포에서 탐식작용에 관여하는 NO의 합성을 억제하기 때문에 면역기능을 억제한다고 한다. 이 두가지 사실에서 작용이 다른 면역억제제들이 면역억제라는 공통된 작용을 나타내는 것은 NOS의 억제 또는 저해작용에 기인하기 때문일 것이라는 가설을 검정하여 보았다. Cytokine의 유전자 발현을 억제하는 것으로 알려진 면역억제제 dexamethasone을 본 실험에 사용하였는데 간과 뇌에서 NOS 활성화도 증가를 보였다. 이는 Geller 등(1993), Marumo등(1993)과 Palmer 등(1992)도 glucocorticoids가 LPS에 의한 iNOS의 발현을 억제한다는 보고와 관련이 있는 것으로 보여진다. 본 실험에 사용한 Azathioprine과 cyclosporine은 임상적으로 흔히 사용되는 면역억제제로, purine 유도체인 azathioprine은 핵산 합성을 억제하고, cyclosporine은 cyclophilin에 결합하여 T 임파구 성장인자의 합성을 억제(Gilman 등, 1991)하는 작용이 있는데 cyclosporine과 azathioprine을 처치했을 때도 NOS 활성화도 증가를 억제하는 작용이 나타났다. 이와같이 작용기전이 다른 면역억제제가 다같이 NOS 활성화도를 억제할 수 있다는 것은 내독소혈증에 면역억제제의 이용 가능성과 NOS 억제 작용 자체가 면역억제제의 어떤 기전에 의한 것인지는 알 수 없으나 면역억제 효과에 중요한 역할이 될 수도 있다는 가능성을 제시하였다. 그러나, 면역억제제에

의한 LPS에 의한 iNOS 활성화도의 억제 작용이 어떤 기전에 의하여 야기되는지 iNOS에 선택적으로 억제하는 작용이 있는지는 추구되어야 할 과제라고 하겠다.

결 론

NOS활성도에 대한 면역억제제의 효과를 알아보기 위해 dexamethasone, cyclosporine, azathioprine을 전처치한 생쥐에 LPS를 투여하여 간과 뇌조직에서 NOS 활성화도를 측정하였다.

LPS(10 mg/kg)를 주사한 뒤 NOS 활성화도를 측정하면 뇌에서는 1시간, 간에서는 3시간에 활성화도가 가장 높게 나타났다. 이러한 NOS 활성화도의 증가는 LNAME(300 mg/kg)와 aminoguanidine(100 mg/kg)에 의해 억제되었고, cycloheximide(10 mg/kg) 처치하에서도 역시 억제되었다. Dexamethasone(1.5 mg/kg), cyclosporine(10 mg/kg), azathioprine(5 mg/kg/day)에 의해서도 NOS 활성화도의 증가가 효과적으로 억제되었다.

이상의 실험 결과에서 LPS에 의한 NOS 활성화도의 증가는 iNOS의 발현에 따른 것이며 내독소혈증을 치료하기 위해 면역억제제인 azathioprine과 cyclosporine을 이용할수도 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Furchgott RF: *The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. Acta Physiol Scand* 139: 257-270, 1990
- Garthwaite J: *Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. Trends Neurosci* 26: 321-326, 1991
- Geller DA, Nussler AK, Di-Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL and Billar TR: *Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA* 90(2): 522-526, 1993

- Gilman AG, Rall TW, Nies AS and Taylor P: *The pharmacological basis of therapeutics*. 8th edition. Maxwell Macmillian int. Editions, pp1264-1276, 1991
- Hotchkiss RS, Karl IE, Parker JL and Adams HR: *Inhibition of NO synthesis in septic shock* *Lancet* 339: 434-435, 1992
- Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A, Adams J, Griffith OW and Levi R: *N^G-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide*. *Proc Natl Acad Sci* 87: 3629-2632, 1990a
- Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R and Adams J: *Reversal of endotoxin-mediated shock by N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 172: 1132-1138, 1990b
- Lowenstein CJ and Snyder SH: *Nitric oxide, a novel biologic messenger*. *Cell* 70: 705-707, 1992
- Marumo T, Nakaki T, Adachi H, Esumi H, Suzuki H, Saruta T and Kato R: *Nitric oxide synthase mRNA in endothelial cells: synergistic induction by interferone- γ , tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide and inhibition by dexamethasone*. *Japan. J Pharmacol* 63: 327-334, 1993
- Moncada S: *The 1991 Ulf von Euler lecture; L-arginine: nitric oxide pathway*. *Acta Physiol Scand* 145: 201-227, 1992
- Palmer RMJ, foxwell BNA and Moncada S: *The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids*. *Br J Pharmacol* 105: 11-12, 1992
- Petros A, Bennett D and Vallance P: *Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock*. *Lancet* 338: 1557-1558, 1991
- Salter M, Knowles RG and Moncada S: *Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthase*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 365-369, 1991
- Thiemermann C and Whittle BJR: *Inhibition of nitric oxide synthesis reduced the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo*. *Eur J Pharmacol* 182: 591-595, 1990