

In Vitro에서 PMA와 LPS로 활성화된 흰쥐 간내 Kupffer-와 Endothelial 세포에서의 NO 형성에 관한 연구

김기성*

동방 생명과학연구소

NO Formation of the PMA and LPS-activated Rat Kupffer- and Endothelial Cells *in vitro*

Ki-Sung KIM

Bioscience Research Institute of Eastern Pharm. Co. Ltd., 547-9, Seungdu-Ri, Gongdo -Myun, Anseong-Kun, Kyungki-Do 456-820, Korea

(Received June 14, 1995; accepted August 29, 1995)

Abstract—The present study was undertaken to indicate the major source of NO by liver cells *in vitro*. Even at early stages of induction or low LPS concentrations, NO was produced at high rates by LPS(Lipopolysaccharide) on the isolated rat kupffer cells. PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate) induced NO formation at low rates in the same cells. IFN- γ (Interferon- γ) alone had not induced NO formation but it stimulated the effects of LPS. Calcium ionophore A23187 caused no stimulatory effect. It suggests that LPS has especially strong NO inducer on the kupffer cells and its mechanism is related to those on macrophage in other organs. In other nonparenchymal liver cells, sinusoidal endothelial cells were not stimulated to produce NO either by inducers of aortic endothelium(A23187, ATP and ADP) or by effectors of macrophages(LPS, IFN- γ). This results suggest that rat liver kupffer cells appear to be the major source of NO by liver cells *in vitro*. But *in vivo*, liver endothelial cells may still be capable of producing NO. Furthermore, kupffer cells may produce factors that facilitate NO production by the endothelial cells.

Keywords □ NO, Kupffer -and endothelial cells, PMA, LPS, IFN- γ .

간의 sinusoid에 존재하는 kupffer cell은 생체내 중요한 macrophage의 원동력이며(Decker, 1990) 외부 면역활성물질의 제거제(scavengers)로서 중요한 역할을 한다. Kupffer cells은 LPS(lipopolysaccharide) 고농도(10 $\mu\text{g/ml}$)로 장기간 활성화 시킬때 다른 포유동물의 macrophages(Billiar 등, 1990)와 같이 생물학적 활성 물질인 NO(nitric oxide)를 생성한다(Stuehr 등, 1989). 더욱이 kupffer cell은 다른 중요 비실질 간세포(nonparenchymal cell)인 미세혈관의 내피(sinusoidal microvascular endothelial)세포와 밀접한 관계를 가지고 있다. 비록 일반 혈관 내피세포(endothelial cell)에서 NO유리능력은 비교적 상세하게 보고되었지만(Furchgott와 Vanhoutte, 1989) 미세혈관 내피세포에서의 NO형성은 거의 알려져

있지않다(Koller 등, 1990). 그러나 비실질 간세포에서의 NO는 간 면역 활성화와 혈류 조절에 관여하는 것으로 여겨진다. NO형성 억제제로서 N^G 로 치환된 L-arginine 유도체들이 NO synthase에 의한 NO형성 억제작용을 가진다고 보고된 이래(Hibbs 등, 1987), L-NMMA(N^G -monomethyl-L-arginine)과 L-NNA(N^G -nitro-L-arginine) 등이 현재 그의 억제제로서 사용되고 있다.

그러므로 본 실험에서는 rat kupffer cells, rat sinusoidal microvascular endothelial cells을 분리하여 NO형성을 비교하였으며 더 나아가 macrophages(LPS, PMA, IFN- γ)또는 aortic endothelial cells(A23187, ATP, ADP)에서 NO를 합성하는 물질들의 반응을 흰쥐 간내 kupffer cells과 endothelial cells을 분리하여 *in vitro*에서 비교하여 간세포에서 NO의 형성 부위를 알아보코자 하였다.

* To whom correspondence should be addressed.

실험방법

Kupffer와 endothelial cells의 추출 및 배양 방법

180~220 g 정도의 Wistar 웅성 흰쥐를 가지고 collagenase perfusion으로 추출하였다 (Rymasa 등, 1991; Smedsrød와 Pertoft, 1985). 흰쥐를 ether로 마취시키고 pentobarbital(60 mg/kg)을 복강내로 주사하였다. 마취된 후 개복하여 진신 heparinization(500 IU)하고 portal vein에 cannular를 삽입하고 6 ml/min 속도로 Ca^{2+} -free buffer(NaCl 142 mM, KCl 67 mM, NaCl 6 mM, HEPES 10 mM, pH 7.5)를 간으로 주입하였다. 간 울혈을 방지하기 위해 inferior vena cava를 즉시 자르고 thoracotomy를 하여 right atrium vessel을 반 정도 절단하여 cannulate하였다. 이렇게 배수로를 만들고 vena cava를 묶고 관류 속도를 20 ml/min로 증가시켰다. Ca^{2+} -free buffer 350 ml을 주입한 후 Ca^{2+} 과 collagenase 함유 buffer(NaCl 68 mM, KCl 67 mM, $CaCl_2$ 5 mM, NaOH 7 mM, HEPES 100 mM, collagenase B 0.01%, pH 7.6)를 15 ml/min 속도로 6~7분간 재순환 시켰다. 간을 분리하여 1.5% bovine serum albumin을 추가한 Ca^{2+} -free buffer에 옮긴 다음 잘라서 nylon mesh로 여과하였다.

여러가지 원심분리와 선택적인 부착방법등을 이용하여 각각의 세포를 분리하였다. 간세포를 8°C에서 5분간 50 ×g로 원심분리하여 제거하고 비지지(nonparenchymal) 조직(endothelial-과 kupffer세포)을 함유하는 상등액과 cell debris를 다시 10분간 300 ×g로 원심분리하였다. Pellet는 RPMI 1640 medium(+2 mM L-glutamine, 100 µg/ml gentamycin, 10 µg/ml cefotaxine, 5 µg/ml amphotericin B)으로 재현탁 시킨 후 37°C, 5% CO_2 /95% air에서 30분간 배양시켜서 uncoated plastic surface에 부착되는 것은 kupffer cell이고 부착되지 않는 endothelial cell을 함유한 상등액을 10분간 30 ×g로 원심분리한다. 세포를 RPMI 1640 medium(+20% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml cefotaxine, 5 µg/ml amphotericin B, 5 µM dexamethasone)에 재현탁하고 미리 0.2% collagen R로 씌운 culture flask에 옮긴다. 37°C 2시간 배양한 후 세포를 3번 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution)용액으로 강하게 세척하여 kupffer cell 오염을 방지하고 cell debris에 신선한 culture medium을 제공한다. 배양 medium은 20% fetal calf serum(FCS, kupffer cell 배양액에서는 열로 불활성화시킴)을 함유한 RPMI 1640과 2 mM L-glutamine, 항생제 등을 추가하여 5% CO_2 /95% Air, 37°C에서 평형을 유지시켰다. Kupffer cells은 실험 시작전 48시간 동안 배양하였다. Kupffer cell 배양액 순도는 positive peroxidase staining과 latex particles phagocytosis가 98% 이상으로 판정하였다. Sinusoidal endothelial cell은 collagen-coated tissue culture flask와 tube로 1, 2차 배양을 하였고 모든 계대 접종 배양에서 간접적 immunofluorescence에 의한 von Wil-

lebrand factor(Stel 등, 1983)를 측정하여 특성화하였으며 배양은 20~30일 정도 4번째 계대 접종까지를 실험에 사용하였다.

NO 형성 측정

NO에 의해 oxyhemoglobin이 methemoglobin으로 stoichiometric하게 전환하는 것을 spectrophotometrically하게 측정하는 방법 (Feelisch와 Noack, 1987)과 Murphy 등에 의해 변형된 방법(Murphy 등, 1991)을 사용하였다. 즉 kupffer cells($0.1\sim 4.7 \times 10^5$ cells/tube), liver endothelial cells($2.0\sim 3.0 \times 10^5$ cells/tube)에 10 mM glucose와 20 mM HEPES(pH 7.4)를 함유한 Krebs-Henseleit Hydrogen Carbonate로 처음 2번 세척한 후 세포를 7 µM oxyhemoglobin, 40 µg/ml catalase, 20 µg/ml SOD를 함유하는 1 ml buffer에 배양하였다. oxyhemoglobin은 표준방법(Cassoly, 1981)으로 만들었으며 대조군의 NO형성 측정비율은 hemoglobin (4~8 µM)에 의해 변화되지 않았다. 습기있는 5% CO_2 /95% Air와 37°C에서 2시간을 배양한 후 배양액을 모아서 다른 spectrum에서 측정하였다. L-NNA-inhibitable oxyhemoglobin-methemoglobin conversion(NO 형성과정)을 $12.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ molar absorption coefficient를 사용하여 578 nm와 592 nm absorbance 변화에 의해 측정하였다.

모든 시약들은 Krebs-Henseleit buffer에 용해시켰고 실험 후 일반적으로 사용되는 세포활성은 trypan blue로 염색되는 세포수를 측정하였다(Jauregui 등, 1981). 본 실험에서의 통계처리는 2~3번 실험의 3~6개 분리된 배양에서 means ± S.E.M을 구했고 significant differences를 확인하기 위해 Student's t-test에 의해 자료를 분석하였다.

실험결과

PMA로 유도된 NO형성은 L-arginine이 필수적이며 용량에 의존하며 1~2 mM L-arginine에서 NO형성이

Table I. NO-formation in the PMA-activated rat liver kupffer cells

PMA concentration (nM)	NO formation (nmol/h × 10 ⁶ cells)
0	2.0 ± 1.4
10	3.6 ± 1.8
25	5.8 ± 1.0
50	7.8 ± 2.7*
100	9.0 ± 0.6*
250	9.0 ± 0.8*
50 + L-NNA (1 mM)	4.2 ± 1.2
50 + L-NMMA (1 mM)	5.3 ± 1.5

PMA was added at 2 min. before the beginning of the experiments. L-arginine concentration was 2 mM. Other incubation parameters were described in the methods section. * $p < 0.05$, significantly different from controls without PMA. * $p < 0.05$ significantly different from sample with L-NNA or L-NMMA.

Table II. Various compounds-induced NO formation in rat liver kupffer-and endothelial cells (*in vitro*).

Activators	NO formation (nmol/h × 10 ⁶ cells)	
	Kupffer cells	Endothelial cells
control	2.1 ± 1.2	<0.4
LPS (0.5 µg/ml, 2 h)	15.8 ± 0.7*	<0.4
LPS (0.5 µg/ml, 20 h)	27.2 ± 0.9*	<0.4
IFN-γ (500 U/ml, 20 h)	2.8 ± 0.8	N.D.
LPS+IFN-μ (0.5 µg/ml + 500 U/ml, 20 h)	42.4 ± 1.7**	<0.4
PMA (50 nM)	7.2 ± 1.8*	<0.4
A23187 (10 µM)	2.7 ± 1.3	<0.4
ADP, ATP (0.2 mM)	N.D.	<0.4

LPS(0.5 µg/ml) induced NO-formations in the absence of SOD and catalase were 14.9 ± 1.2 (2 h), 26.9 ± 1.6 (20 h). PMA, A23187, ADP, ATP were added at the beginning of the experiments. L-arginine concentration was 2 mM. N.D. Not determined. *p<0.05, significantly different from controls without activators. **p<0.05, significantly different from samples with LPS or IFN-γ alone.

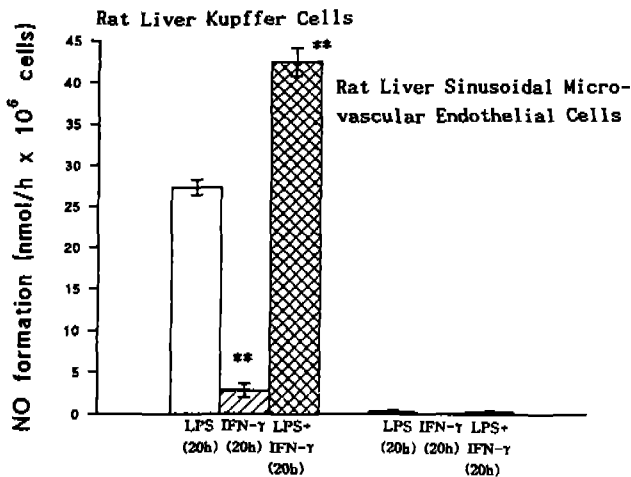


Fig. 1. Various agents-induced NO formation in rat liver kupffer- and endothelial cells (as described in Table II). **indicates significantly difference at p<0.05 levels when compared with LPS groups.

최대치를 기록하였다(data not shown). Kupffer 세포에서는 L-NNA가 L-NMMA보다 더 강력하게 NO형성을 억제하였다(Table I). Table II에서 보는 바와 같이 50 nM PMA로 활성화된 kupffer cell은 LPS (0.5 µg/ml, 20 h)로 활성화된 세포에서 보다 약 4배 정도 낮은 비율로 NO가 형성되었으며 IFN-γ는 kupffer cell에서 자체적으로 NO를 형성하지 않으나 LPS와 동시 투여시 LPS 단독 투여시 보다 약 50%정도의 현저한 NO형성증가를 보였다(Fig. 1). Calcium ionophore인 A23187은 kupffer cell에서 NO합성을 직접 흥분시키지 못하였다(Table II). LPS로 활성화된 세포에서 SOD와 catalase 부재는 NO형성 측정에 영향을 미치지 않았다. 20~30일 정도 장

기간 배양한 liver sinusoidal endothelial cells에서도 혈관 endothelial cell의 NO형성 촉진물질들(A23187, ATP, ADP)과 macrophage의 NO형성 유도물질들(LPS, IFN-γ) 등에 의해 NO의 형성은 흥분되지 않았다(Table II).

고 찰

Macrophage의 NO합성은 LPS와 같은 물질의 유도능력에는 관여하나 calcium에는 비의존적이며 (Hibb 등, 1988) 이는 본 연구결과인 rat kupffer cells에서도 적용될 수 있다. Kupffer cells에 의한 NO형성은 calcium ionophore인 A23187 에 의해 변화되지 않으나 대량의 NO가 이미 LPS 투여 초기 단계와 낮은 농도에서 생성되며 LPS와 IFN-γ를 동시 투여시 NO형성은 더욱 더 현저한 증가를 나타낸다(Fig. 1). Kupffer cells에 의한 NO형성은 PMA투여로도 나타난다.

50~250 nM PMA는 강력하게 $\cdot O_2^-$ 유리를 흥분시키는데 충분하며 작지만 NO의 중요한 양을 생성한다(Table I). 이것은 PMA가 주요한 NO량을 유도하지 못한다는 중성구에서의 연구 보고(Wright 등, 1989)와는 다르다. 본 연구에서 PMA로 활성화된 kupffer cell에서의 NO형성의 직접적인 측정은 luminol chemiluminescence의 실험 결과와 유사하다(Wang 등, 1991). Luminol chemiluminescence는 L-arginine에 의해 거의 두배가 되고 L-NNA에 의해 현저하게 억제되므로 인해 이런 chemiluminescence에 NO가 관여하고 있다는 것을 나타낸다. NO형성 억제제들(L-NNA, L-NMMA)이 여러 종류 macrophage세포에서 효력의 정도 차이를 나타내고 있으며 peritoneal macrophage(Cross 등, 1990)와는 달리 rat liver kupffer cells에서는 L-NNA가 더 강력하게 억제하였다(Table I). 이것은 이런 억제제의 cellular uptake와 세포내 대사에서의 차이점이 아직 부정되지 않고 있기 때문에 NO합성효소의 arginine 결합 부위 친화력에 대한 정도 차이인 것으로 여겨진다. 본 실험에서는 LPS로 활성화된 세포에서 SOD와 catalase 부재는 NO형성에 영향을 미치지 못하였다(Table II). 그것은 아마 LPS가 kupffer cells에서 $\cdot O_2^-$ 와 H_2O_2 생성을 유도하지 못하는 것으로 생각되며(Birmelin 등, 1986) 이는 aortic endothelial cell에서도 관찰되었다(Murphy 등, 1991). 그러나 이와는 달리 이 두가지 효소의 존재는 kupffer cell을 $\cdot O_2^-$ 의 강력한 유도물질인 PMA로 활성화 할때 최대 NO타입에 필수 불가결하다(Decker, 1990).

본 실험은 순수하게 분리된 흰쥐 간내 sinusoidal microvascular endothelial cell은 aortic endothelium이나 kupffer세포에서 NO형성을 유도하는 여러 약물에 의해 *in vitro*에서 NO형성이 흥분되지 않았으며, 세포 특이적 signal transduction 경로와 무관하게 세포내 calcium ions을 증가시키는 A23187도 NO형성을 흥분시키지 못

했다.

Kupffer cells에서 NO형성조절은 macrophage의 중요 특성을 내포하고 있으며 억제제의 약리학적 특성은 NO 합성 경로를 가지는 모든 다른 세포들과 연관되어 있다. 따라서 kupffer cells은 비실질 간조직에서 NO의 중요한 발생 부위로 여겨진다. 그러나 이런 가능성은 sinusoidal endothelial세포가 *in vivo*에서 kupffer세포나 인접세포로부터 미확인된 signal에 의해 NO를 형성할 수 있는 가능성과 kupffer 세포가 endothelial세포에 의한 NO형성을 촉진시키는 인자들을 생산할 수 있다는 가능성을 배제할 수 없다.

감사의 말씀

본 논문은 독일 정부 DAAD(Deutsch Akademische Austausch Dienst, German academic exchange program, No.324 313 010 0) 재단 후원으로 수행되었으며 본 연구결과를 확인하여 주신 독일 튜빙겐 대학 약리독성 연구소와 에센 대학 병원 생화학 교실에 감사드립니다.

참고문헌

- Billiar, T. R., Curran, R. D., Ferrari, F. K., Williams, D. Z. and Simmons, R. L. (1990). Kupffer cell:hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J. Surg. Res.* **48**, 349-353.
- Birmelin, M., Karck, U., Dieter, P., Freundberg, N. and Decker, K. (1986). Distribution of endotoxin-stimulated prostanoïd production in primary cultures of rat kupffer cells. In: Kirn, A., Knook, D.L., Wisse, E., eds. *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Vol.I. Rijswijk: *Kupffer Cell Foundation* 295-300.
- Cassoly, R. (1981). Preparation of hemoglobin hybrids carrying different ligands: valency hybrids and related compounds. *Methods Enzymol.* **76**, 106-113.
- Decker, K. (1990). Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* **192**, 245-261.
- Feelish, M. and Noack, E. A. (1987). Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **139**, 19-30.
- Furchgott, R. F. and Vanhoutte, P. M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**, 2007-2018.
- Gross, S. S., Stuehr, D. J., Aisaka, K., Jaffe, E. A., Levi, R. and Griffith, O. W. (1990). Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell type selective inhibition by N^G-aminoarginine, N^G-nitroarginine and N^G-methylarginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 96-103.
- Hibbs, J. B., Taintor R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, E. M. (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87-94.
- Hibbs, J. B., Vavrin, Z. and Taintor, R. R. (1987). L-arginine is required for the expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* **138**, 550-565.
- Jauregui, H. O., Hayner, N. T., Driscoll, J. L., Williams-Holland, R., Lipskiy, M. N. and Galleti, P. M. (1981). Tryphan blue uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes: freshly isolated cells, cell suspensions and primary monolayer cultures. *In Vitro* **17**, 1100-1110.
- Koller, A., Wolin, M. S., Messina, E. J., Cherry, P. D. and Kaley, G. (1990). Endothelium-derived vasodilator factors in skeletal muscle microcirculation. *Endothelium-derived relaxing factors*. Basel: Karger 309-314.
- Murphy, M. E., Piper, H. M., Watanabe, H. and Sies, H. (1991). Nitric oxide production by cultured aortic endothelial cells in response to thiol depletion and replenishment. *J. Biol. Chem.* **266**, 19378-19383.
- Rymsa, B., Wang, J. F. and de Groot, H. (1991). ·O₂⁻ release by activated kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol.* **261**, G602-G607.
- Saran, M., Michel, C. and Bors, W. (1990). Reaction of NO with O₂⁻. Implications for the action of endothelial derived relaxation factor (EDRF). *Free Rad. Res. Commun.* **10**, 221-226.
- Smedsrød, B. and Pertoft, H. (1985). Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in a high yield from a single rat liver by means of percoll centrifugation and selective adherence. *J. Leucocyte Biol.* **38**, 213-230.
- Stel, H. B., van der Kwast T. H. and Veerman E. C. J. (1983). Detection of factor VIII/coagulant antigen in human liver tissue. *Nature* **303**, 530.
- Stuehr, D. J., Gross, S. S., Sakuma, I., Levi, R. and Nathan, C. F. (1989). Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.* **169**, 1011-1020.
- Wang, J. F., Komarov, P., Sies, H. and de Groot, H. (1991). Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol ester-activated kupffer cells. *Biochem. J.* **279**, 311-314.
- Winterbourn, C. C. (1985). Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. *Environ. Health Perspect.* **64**, 321-320.
- Wright, C. D., Mulsch, A., Busse, R. and Osswald, H. (1989). Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 813-819.