

□ 원 저 □

폐포대식세포에서 내독소 자극에 의한 Superoxide Dismutase 유전자 발현의 조절 기전

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

박계영 · 유철규 · 김영환 · 한성구 · 심영수

한림대학교 의과대학 내과학교실

현 인 규

= Abstract =

Superoxide Dismutase Gene Expression Induced by Lipopolysaccharide in Alveolar Macrophage of Rat

Kye Young Park, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D. and Young-Soo Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

In-Gyu Hyun, M.D.

Department of Internal Medicine, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: In the pathogenesis of acute lung injury induced by lipopolysaccharide(LPS), oxygen radicals are known to be involved in one part. Superoxide dismutase(SOD) protects oxygen radical-induced tissue damage by dismutating superoxide to hydrogen peroxide. In eukaryotic cells, two forms of SOD exist intracellularly as a cytosolic, dimeric copper/zinc-containing SOD (CuZnSOD) and a mitochondrial, tetrameric manganese-containing SOD(MnSOD). But there has been little information about SOD gene expression and its regulation in pulmonary alveolar macrophages(PAMs). The objective of this study is to evaluate the SOD gene expression induced by LPS and its regulation in PAMs of rat.

Method: In Sprague-Dawley rats, PAMs obtained by broncholarveolar lavage were purified by adherence to plastic plate. To study the effect of LPS on the SOD gene expression of PAMs, they were stimulated with different doses of LPS(0.01µg/ml~10µg/ml) and for different intervals(0, 2, 4, 8, 24hrs). Also for evaluating the level of SOD gene regulation actinomycin D(AD) or cycloheximide(CHX) were added respectively. To assess whether LPS altered SOD mRNA stability, the rate of mRNA decay was determined in control group and LPS-treated group. Total cellular RNA

본 논문은 1993년도 대한 결핵 및 호흡기학회 추계학술대회석상에서 발표되었음.

extraction by guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform method and Northern blot analysis by using a ³²P-labelled rat MnSOD and CuZnSOD cDNAs were performed.

Results: The expression of mRNA in MnSOD increased dose-dependently, but not in CuZnSOD. MnSOD mRNA expression peaked at 8 hours after LPS treatment. Upregulation of MnSOD mRNA expression induced by LPS was suppressed by adding AD or CHX respectively. MnSOD mRNA stability was not altered by LPS.

Conclusion: These findings show that PAMs of rat could be an important source of SOD in response to LPS, and suggest that their MnSOD mRNA expression may be regulated transcriptionally and require de novo protein synthesis without affecting mRNA stability.

Key Words: MnSOD, CuZnSOD, mRNA, Pulmonary alveolar macrophage, Lipopolysaccharide

서 론

급성 폐손상의 정확한 발병기전은 아직 확실하게 규명되어 있지 못한 상태이지만 여러 종류의 염증세포에서 분비되는 염증매개성 물질의 상호작용에 의해 발생하는 것으로 이해하고 있으며, 산소기가 일부 역할을 하는 것은 많은 연구에 의해 잘 알려져 있다. 체내에는 산소기의 작용을 억제하는 항산화효소가 정상적으로 존재하는데, 산소기의 생성이 증가하면 항산화효소도 같이 증가하여 산소기와 항산화효소가 균형을 이루고 있다.

1980년대 후반에 백서의 항산화효소를 coding하는 유전자(cDNA)가 cloning된 이후^{1~4)}, 급성 폐손상의 방어기전에서 superoxide dismutase (이하 SOD로 약함)의 역할을 규명하기 위하여 SOD 유전자 발현양상에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 실험에 사용한 동물, 자극, 세포 등에 따라 SOD 유전자의 발현양상 및 조절기전에 큰 차이를 보이고 있다. 즉, 사람의 단핵구와 소의 폐동맥내피세포를 내독소로 자극하면 MnSOD mRNA 발현만 증가되고 CuZnSOD mRNA 발현은 변화가 없다는 보고가 있는 반면에^{5,6)}, 내독소로 처치한 백서의 폐장에서는 CuZnSOD mRNA 발현이 증가된다는 보고도 있어^{7,8)}, 실험 조건에 따라 SOD 유전자의 발현양상에 많은 차이를 보이고 있다. 또한 백서의 폐포상피세포를 대상으로한 연구에 의하면 내독소에 의해 MnSOD mRNA는 현저히 증

가하나 CuZnSOD mRNA는 증가하지 않았고, 전사 억제제인 actinomycin D(이하 AD로 약함)의 전처치로 내독소에 의한 MnSOD mRNA의 증가가 완전히 억제되며, 단백질합성 억제제인 cycloheximide(이하 CHX로 약함) 단독 투여시 내독소 투여시 만큼 MnSOD mRNA가 증가하고 CHX로 전처치 후 내독소를 투여하면 MnSOD mRNA가 내독소 단독투여에 비해 훨씬 증가되어 백서의 폐포상피세포에서 내독소에 의한 MnSOD mRNA의 발현은 최소한 부분적이라도 전사 단계에서 조절되고 반드시 단백질합성을 필요로 하지는 않으며, 구조적으로 불안정한 억제 인자 또는 RNase와 같은 물질의 관련 가능성이 시사되고 있는 반면⁹⁾, 돼지의 폐동맥내피세포에서는 내독소 자극으로 백서 폐포상피세포에서와 같이 MnSOD mRNA 발현이 증가하지만 AD와 CHX 각각의 전처치에 의해 MnSOD mRNA 발현이 모두 억제되어 백서의 폐포상피세포와는 달리 전사단계와 단백질합성 단계가 모두 유전자 발현조건에 관여할 것으로 생각되어¹⁰⁾, SOD 유전자 발현의 조절기전에서도 실험조건에 따른 큰 차이를 보이고 있다.

현재까지는 급성 폐손상에서 각각의 세포내 SOD 유전자 발현양상에 대한 연구는 그리 많지 않으며¹¹⁾, 산소기에 대한 체내의 방어기전에서 MnSOD와 CuZnSOD 중 어느것이 주된 역할을 하는지도 정확히 알려져 있지 않다. 더구나 전술한 바와 같이 SOD의 유전자 발현양상 및 그 조절기전은 실험조건에 따라 큰 차이를 보이고 있는 실정인데, 내독소 투여시 백서의

폐포대식세포에서의 SOD 유전자 발현양상에 대해서는 아직 연구된 바 없으며, 폐포대식세포내 MnSOD와 CuZnSOD 유전자의 발현조절기전에 대해서도 밝혀지지 않은 실정이다.

효과적 치료법이 없어 높은 사망률을 보이고 있는 성인성 호흡곤란증후군의 치료법 개발에 앞서 그 기전에 대한 이해는 필수적인 것이다. 저자들은 백서의 폐포대식세포에서 내독소 자극에 의해 황산화효소인 MnSOD와 CuZnSOD의 유전자 발현양상과 조절기전을 밝힘으로서, 내독소에 의한 급성 폐손상시 폐포대식세포에서 유리되는 산소기의 역할을 분자생물학적 수준에서 규명하고, 그 방어기전에 대한 기초적인 지식을 얻고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

육안소견상 건강한 체중 200~300 그램의 Sprague-Dawley 백서는 대상으로 하였으며, 기관지폐포세척술을 시행하고 흉부를 열어 육안소견상 폐렴이 의심되는 백서를 대상에서 제외하였다.

2. 방 법

1) 폐포대식세포의 분리

백서에서 기관지폐포세척술을 시행하여 세포를 분리하였다. 기관지폐포세척술은 4℃의 생리식염수를 5ml 씩 기도에 주입하고 회수하기를 4회 반복하였으며, 이 세척액을 거르러 거른뒤 4℃에서 400g로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시키고 RPMI-1640으로 2번 세척한 후 일부를 취해 trypan blue염색을 하고 hemocytometer로 세포수를 측정하였다. 35mm 플라스틱 배양접시에 3×10^6 개의 세포를 분주하여 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양하여 폐포대식세포를 배양접시에 부착시키고 상층액을 제거하여 다른 세포로부터 폐포대식세포를 분리하였다.

2) 실험 조건

내독소(*Escherichia coli*, 055-B5)에 의한 SOD mRNA 발현의 용량-반응관계를 평가하기 위해 폐포대식세포 배양액에 내독소를 0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/ml의 농도로 첨가하고 8시간이 경과한 후 Northern blot analysis를 시행하였고, 시간경과에 따른 SOD mRNA 발현의 변화를 평가하기 위해 폐포대식세포 배양액에 최종 농도 0.1 μ g/ml의 내독소를 첨가하고 0, 2, 4, 6, 8, 24 시간이 경과한 후 Northern blot analysis를 시행하

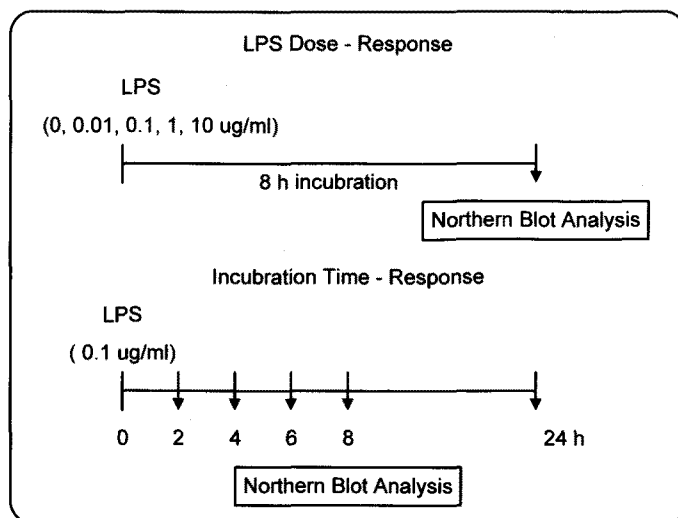


Fig. 1. Experimental design (I): LPS dose and incubation time response to SOD gene expression.

였다(Fig. 1).

내독소에 의한 SOD mRNA 발현이 분자적으로 어느 수준에서 조절되는지를 규명하기 위해 폐포대식세포 배양액에 전사 억제제인 AD(5 μ g/ml), 단백질성 억제제인 CHX(5 μ g/ml)와 0.1 μ g/ml의 내독소를 투여하고 8시간 후에 Northern blot analysis를 시행하였다(Fig. 2).

내독소 처치시 SOD mRNA의 안정성의 변화를 관찰하기 위해 폐포대식세포를 대조군과 내독소 투여군으로 나누어 8시간동안 배양 후 AD를 투여하여 RNA 합성을 중단시키고 0, 2, 4, 6 시간이 경과한 후 SOD mRNA에 대한 Northern blot analysis를 시행하였다(Fig. 2).

3) Northern Blot Analysis

Chomczynski와 Sacchi의 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출법¹²⁾을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 즉, 플라스틱 배양접시에서 상층액을 버리고 2ml의 denaturing 용액을 첨가한 후 주사기를 이용해 homogenize 시켰다. pH 4.0의 2M sodium acetate 0.2ml을 넣은 후 완전히 혼합하고 2ml의 water-saturated phenol을 첨가해 잘 섞은 다음 0.4ml의 49:1 chloroform/isoamyl alcohol을 넣고 잘 흔들어 완전히 혼합하였다. 15분간 얼음에 담구어 incubation시키고 4 $^{\circ}$ C에서 9,000rpm으로 20분간 원심분리 후 아랫층이 섞이지 않도록 윗층만을 pipet으로 얻었다. 100% isopropanol 2ml을 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation하고 4

$^{\circ}$ C에서 9,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 따라버리고 RNA pellet을 0.3ml의 denaturing 용액에 완전히 용해한 후 1.5ml microcentrifuge tube에 옮겨 100% isopropanol 0.3ml을 첨가하였다. 잘 섞은 후 -20 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation 하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 9,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 따라버리고 RNA pellet을 75% ethanol에 담귀 vortexing한 후 상온에서 10~15분간 방치하여 pellet에 함유되어 있는 guanidinium을 제거하였다. 상온에서 9,000rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 따라버리고 진공상태에서 5~15분간 말려 ethanol을 완전히 제거한 후 RNA pellet을 DEPC로 처리한 25 μ l에 녹이고 일부를 따 260nm와 280nm에서 흡광도를 구하고 나머지는 다음 단계의 실험에 이용할 때 까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 동량의 RNA를 formaldehyde를 함유하는 1.2%의 agarose gel에 전기영동을 시행하여 분리시켰다. 전기영동한 gel의 RNA를 밤색 nylon membrane으로 transfer 시키고, RNA가 transfer된 membrane을 UV crosslinking을 시행하여 RNA를 membrane에 고정시켰다. Prehybridization후 65 $^{\circ}$ C에서 ³²P로 labeling한 백서의 MnSOD, CuZnSOD cDNA를 표지자로 사용하여 hybridization을 시행하였다. 백서의 MnSOD와 CuZnSOD cDNA는 미국 Duke대학의 Dr. Ho에게서 기증받았다. 동량의 RNA loading을 확인하기 위하여 house keeping gene인 GAPDH를 ³²P로

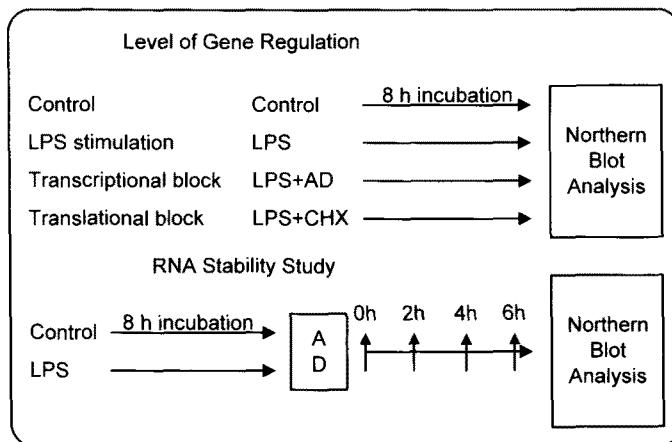


Fig. 2. Experimental design (II): Regulation level of SOD gene expression and SOD mRNA stability study.

labeling하여 hybridization을 시행하였다. cDNA의 labeling은 Random Primed DNA Labeling Kit를 이용하였다. Hybridization을 시행한 후 nylon membrane을 intensifying screen이 들어 있는 X-ray film cassette에 넣고 -70℃에서 1~2일간 autoradiography를 시행하고 laser densitometry로 정량하였다.

결 과

1) 내독소 투여용량에 따른 SOD mRNA의 발현 양상

MnSOD와 CuZnSOD mRNA는 기저 상태의 폐포대

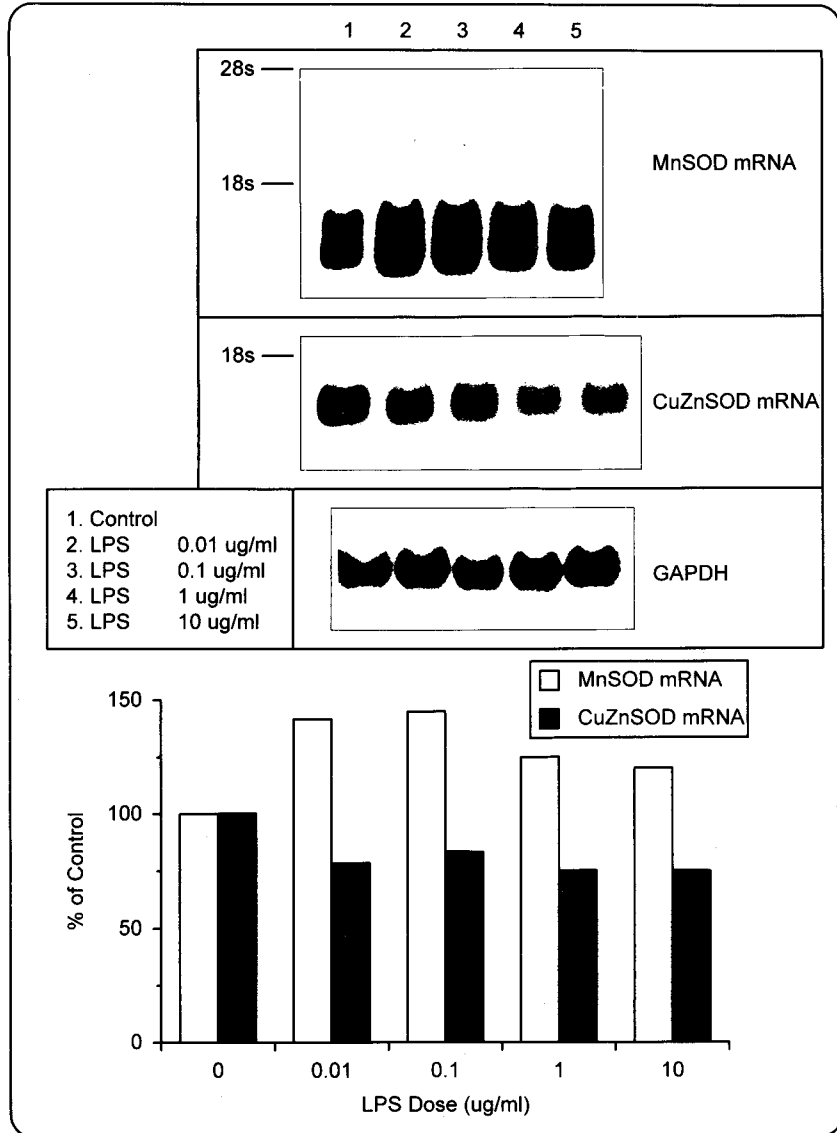


Fig. 3. Expression of SOD mRNA 8 hours after exposure to various doses of LPS. The upper portion is autoradiograph reflecting MnSOD and CuZnSOD mRNA levels. Middle part is GAPDH mRNA to demonstrate equal loading of RNA per well. The lower part is laser densitometry and expressed as the percentage of control level.

식세포에서 발현됨을 알 수 있었고 내독소의 농도 증가에 따라 MnSOD mRNA의 발현은 증가하였으나 CuZnSOD mRNA의 발현은 감소하는 경향을 보였다. MnSOD mRNA의 발현은 내독소의 농도가 0.1 μ g/ml에서 최고치에 도달하였고, 그 이상의 농도에서 더 이상의 발현은 관찰되지 않았다(Fig. 3).

2) 내독소 투여후 시간경과에 따른 SOD mRNA의 발현양상

폐포대식세포 배양액에 0.1 μ g/ml의 내독소를 첨가하고 2시간 후부터 MnSOD mRNA 발현이 증가되기 시작하여 8시간 후에 최고치에 도달하였고 24시간 후까지 지속되었다(Fig. 4). CuZnSOD mRNA 발현은 시간경과에 따라 변화하지 않았다(Data not shown).

3) AD 또는 CHX 전처치가 내독소에 의한 SOD mRNA 발현에 미치는 영향

내독소 투여로 증가되었던 MnSOD mRNA의 발현이 AD 또는 CHX 전처치에 의해 모두 감소되었고 CuZnSOD mRNA의 발현도 대조군 및 내독소 투여군보다 감소하였다(Fig. 5)

4) SOD mRNA의 안정성 여부에 대한 검증

대조군과 내독소 투여군 사이에 시간경과에 따른

MnSOD mRNA의 분해속도의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 6).

고 찰

내독소를 실험동물에 투여하면 폐혈관투과성의 증가, 폐부종 및 호흡부전 등의 급성 폐손상이 유발되며^{13~15}, 호중구, 폐혈관내피세포, 폐포상피세포, 폐포대식세포 등에서 생성되는 산소기가 발병기전에서 일부 중요한 역할을 한다는 사실은 실험을 통하여 잘 알려져 있다. 과산소증에 의한 급성 폐손상의 발병기전에서도 산소기가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁶. 산소기에 의한 세포의 주된 손상기전으로는 sulfhydryl기를 가지고 있는 단백질과의 반응, 핵산염기의 변형 및 DNA strand의 분해, 지질과산화 등을 들 수 있는데, 정상적 상태의 세포들은 이러한 산소기에 의한 손상으로부터 화학적 및 효소적 항산화방어기전에 의해 보호된다. 가장 널리 알려져 있는 효소로는 SOD, catalase, glutathione peroxidase와 glutathione reductase를 들 수 있다. 이들 중 SOD가 처음 단계의 방어기전을 담당하고 있다. 즉, superoxide radical이

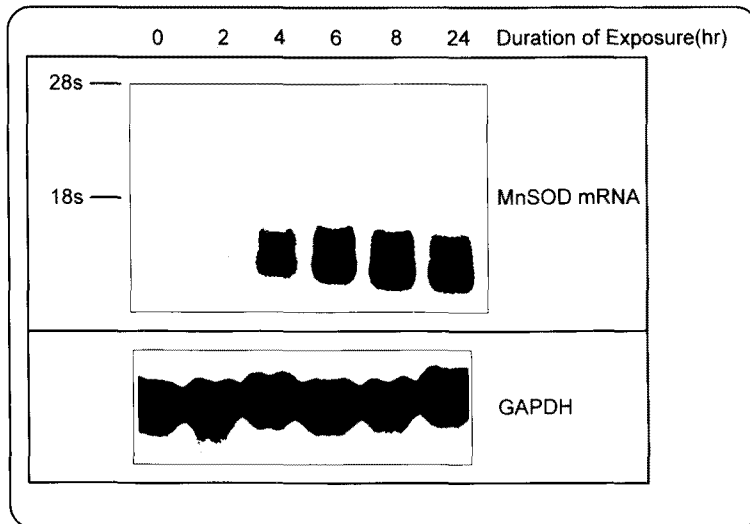


Fig. 4. Expression of MnSOD mRNA after exposure to 0.1 μ g/ml of LPS for various incubation time. The upper portion is autoradiograph reflecting MnSOD mRNA levels. The lower part is GAPDH mRNA to demonstrate equal loading of RNA per well.

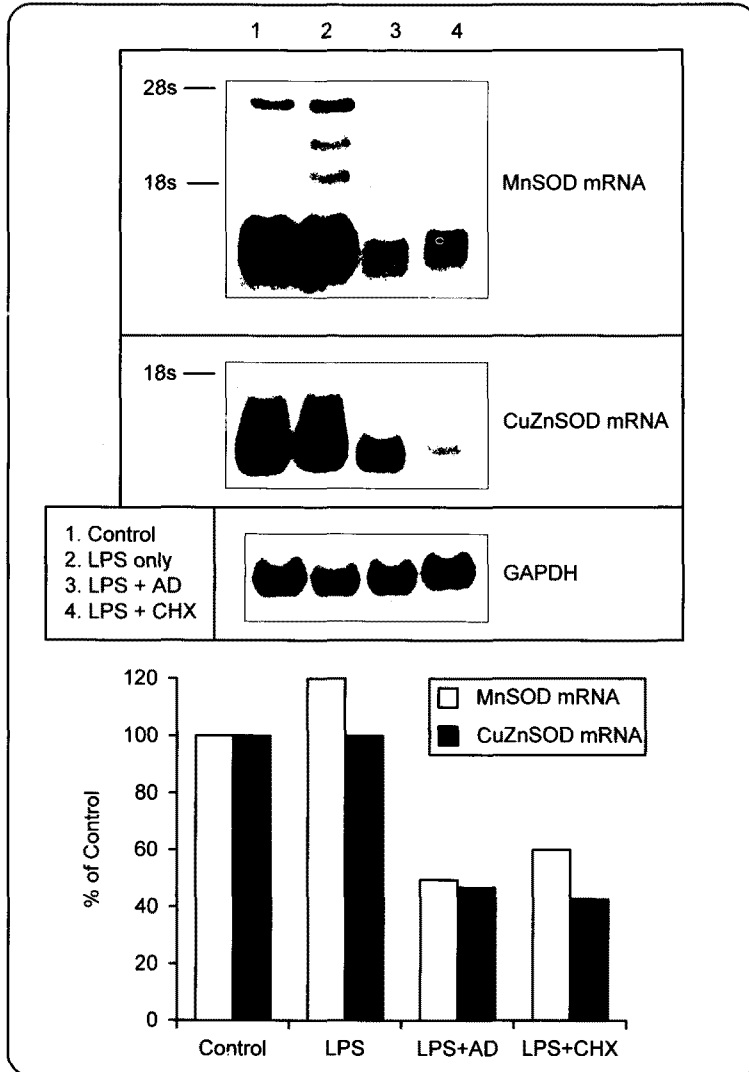


Fig. 5. Effect of AD(5 μ g/ml) and CHX(5 μ g/ml) on LPS-induced SOD mRNA expression. The upper portion is autoradiograph reflecting MnSOD and CuZnSOD mRNA levels. Middle part is GAPDH mRNA to demonstrate equal loading of RNA per well. The lower part is laser densitometry and expressed as the percentage of control level.

SOD에 의해 hydrogen peroxide와 산소로 변환되고 이 때 형성된 hydrogen peroxide는 catalase와 glutathione peroxidase에 의해 이차적으로 중화된다^{16~21}. 포유류에는 세가지 종류의 SOD가 존재한다. 즉, 이중체의 형태로 세포질에 존재하는 Cu, Zn을 함유한 CuZnSOD와 사중체의 형태로 세포내의 미토콘드리아에 존재하는

Mn을 함유한 MnSOD, 그리고 세포외에 존재하고 사중체의 형태로 Cu, Zn을 함유한 ECSOD(extracellular SOD)의 세종류가 있다^{17,18,22~25}. 이들은 분자량과 아미노산 구성이 서로 상이하지만 같은 반응을 촉매하는 기능을 보유하고 있다.

생체내, 외 실험에서 소량의 내독소, IL-1 및 TNF로

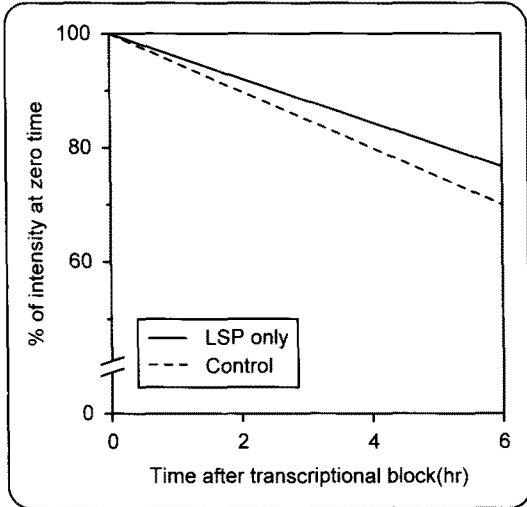


Fig. 6. Degradation rate of LPS-induced MnSOD mRNA after transcriptional block with actinomycin D.

전처치하면 세포내 항산화효소가 증가하고 고농도의 산소에 의한 손상이 예방되어^{26~28)}, 산소기에 대한 항산화 방어기전으로서 SOD를 포함한 항산화효소의 중요성이 인식되었다. 그러나 이들 효소의 발현을 조절하는 분자적 기전에 대해서는 거의 알려져 있지 못하였다. 1980년대 후반에 백서의 항산화효소를 coding하는 유전자가 cloning된 이후^{~4)}, 급성 폐손상의 방어기전에서 SOD의 역할을 규명하기 위하여 분자생물학적 기법을 이용한 SOD 유전자 발현양상에 대한 연구가 많은 관심을 끌게 되었다.

내독소는 폐포대식세포에 여러가지 영향을 미치는데, 폐포대식세포가 내독소의 자극에 의해 활성화되면 IL-1, TNF, neutrophil chemotactic factor 등을 분비하여 폐실질내로 호중구, 림프구, 단핵구 등의 염증세포를 끌어들이어 염증반응을 강화시킬 뿐 아니라²⁹⁾, 직접 또는 간접적으로 폐포대식세포에서의 산소기 및 단백질분해효소의 분비가 증가되어 폐포상피세포에 손상을 가져온다.

많은 연구에서 폐포대식세포가 내독소 등에 의해 활성화되면 산소기를 생성하는 것은 잘 알려진 사실이며^{30,31)}, 생성된 산소기의 작용을 중화시키기 위해 SOD가 일차적 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 아직 폐

의 면역반응 및 염증반응의 조절에서 중추적인 역할을 하는 폐포대식세포내에서 내독소 투여시 SOD mRNA의 발현양상 및 그 조절기전에 대한 연구는 알려져 있지 않은 실정이다.

본 연구는 네 단계의 실험으로 구성되어 있다. 첫번째 단계에서는 백서의 폐포대식 세포에서 내독소의 농도에 따른 MnSOD 및 CuZnSOD mRNA 발현의 용량-반응관계를 평가하였고, 두번째 단계에서는 내독소 투여 후 시간경과에 따른 MnSOD 및 CuZnSOD mRNA 발현의 변화를 평가하였으며, 세번째 단계에서는 내독소에 의한 MnSOD 및 CuZnSOD mRNA 발현이 분자적으로 어느 수준에서 조절되는지를 평가하였고, 네번째 단계에서는 내독소 투여에 의한 MnSOD mRNA 발현의 변화가 MnSOD mRNA 안정성의 증가에 의한 것인지를 검증하였다.

본 연구에서는 1.4 kb의 백서 MnSOD cDNA와 0.6 kb의 백서 CuZnSOD cDNA를 probe로 사용하였는데, CuZnSOD는 약 0.7 kb의 단일 mRNA band가 관찰된 반면에 MnSOD는 다섯개의 mRNA band가 관찰되어 Visner 등⁹⁾의 연구결과와 같았다. 즉 SOD mRNA의 수는 동물의 종에 따라 차이가 있는데, MnSOD mRNA 및 CuZnSOD mRNA는 백서에서는 각각 5개, 1개인 반면 돼지 및 사람에서는 각각 4개, 2개가 관찰된다³²⁾. 일반적으로 다수의 mRNA가 관찰되는 경우는 다수의 유전자가 존재하거나, 전사의 시작부위가 여러 군데이거나, mRNA의 접합이 고대로 또는 불완전하게 일어나거나, 차별적인 polyadenylation에서 기인할 수 있는데, 백서의 MnSOD mRNA의 경우에는 차별적인 polyadenylation의 결과로 생각되고 있다⁹⁾.

기저상태 및 내독소 자극시의 MnSOD 및 CuZnSOD mRNA 발현은 실험마다 상당한 차이를 보였으나 전체적으로 일정한 경향을 나타내었다. 그 원인은 대상 백서에 따른 차이, 폐포대식세포의 순수분리를 위해 사용한 플라스틱 표면부착에 의한 폐포대식세포의 활성화, 혈청을 사용하지 않은데 따른 폐포대식세포 생존율의 변화 등에 기인할 가능성이 있다. 본 실험에서는 여러 마리의 백서에서 분리한 폐포대식세포를 혼합한 후 다시 각 배양접시당 3×10^6 개의 세포로 나누어 실험을 시행함으로써 대상 백서에 따른 차이는 최소화

되었다고 생각된다. 폐포대식세포는 표면부착 자체에 의해 활성화되어 superoxide 등의 산소기 생성과 MnSOD mRNA 발현이 증가된다고 알려져 있어 플라 스틱 표면부착에 따른 활성화가 실험결과에 어느정도 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 장기간의 세포배양에 서 세포의 생존율을 유지하기 위해 혈청첨가가 반드시 필요하지만, 폐포대식세포의 배양시 혈청을 첨가하지 않더라도 24시간 내에서는 세포의 생존율에 큰 영향을 주지 않으며, 오히려 혈청속에 함유된 물질들에 의한 폐포대식세포의 활성화가 실험 결과에 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있어³³⁾, 본 실험에서는 혈청을 사용하지 않았다.

백서의 폐포대식세포에서 내독소 농도에 따른 MnSOD 및 CuZnSOD mRNA 발현을 관찰한 결과 MnSOD mRNA는 내독소의 농도 증가에 따라 발현이 증가하여 용량 - 반응관계가 관찰되었으나 CuZnSOD mRNA 발현은 감소하는 경향을 보였다. MnSOD mRNA의 발현은 내독소의 농도가 0.1 μ g/ml에서 최고 치에 도달하여 이후의 실험에서는 내독소의 농도를 0.1 μ g/ml로 사용하였다. SOD의 mRNA 발현양상 및 그 조절기전은 실험동물의 종과 각각의 세포마다 다르다 고 알려져 있어 직접적인 비교는 곤란하나, Shiki 등은 소의 폐혈관내피세포에 내독소를 10⁻⁸ μ g/ml에서 10⁻¹ μ g/ml까지의 농도로 투여후 용량-반응관계를 관찰하여 MnSOD 활성도가 10⁻⁴ μ g/ml부터 증가되기 시작하여 10⁻¹ μ g/ml까지 지속적으로 증가된 반면 CuZnSOD 활 성도는 변화가 없어⁶⁾, 본 연구에서와 유사한 결과였다. 본 연구에서 CuZnSOD mRNA의 발현이 내독소 투여 후 농도에 따른 차이는 없었지만 감소하는 경향을 보인 것은 폐혈관내피세포에 내독소 투여 후 CuZnSOD mRNA 발현이 감소 또는 증가하지 않았던 다른 연구 결과^{9,10)}와 상반되는데, 0.1 μ g/ml 농도의 내독소가 폐포 대식세포의 생존율에 영향을 주지는 않을 것으로 생각 되나 실험조건에 따른 차이일 가능성이 있다.

폐포대식세포에서 내독소를 투여하고 시간경과에 따 른 SOD 유전자 발현의 변화는 내독소를 투여하고 2시 간 후부터 MnSOD mRNA가 발현되기 시작하여 8시 간 후에 최고치에 도달하였고 24시간 후까지 계속되었 으나, 내독소 투여 0, 2, 4, 6, 8, 24시간후에 측정하였

으므로 8시간 후부터 24시간후 사이에 MnSOD mRNA 발현이 더 증가했을 가능성을 배제할 수 없다. 배양시간 경과에 따른 CuZnSOD mRNA의 발현 증가는 관찰되지 않았다. 내독소에 의한 MnSOD mRNA 발현의 선택적인 증가는 폐혈관내피세포를 이용한 다 른 실험에서도 mRNA 수준과 단백질수준 모두에서 유사 한 결과가 알려져 있다. 즉, 돼지의 폐혈관내피세포를 이용한 Visner 등의 실험에서는 MnSOD mRNA의 발 현이 내독소를 투여하고 8시간 후부터 증가되어 24시 간 후까지 계속 증가되었고 CuZnSOD mRNA 발현의 증가는 관찰되지 않았고¹⁰⁾, 또한 폐혈관내피세포에서 내독소에 의해 MnSOD 활성도가 4시간 후부터 증가되 어 24시간 후까지 지속적으로 증가되었으나 CuZnSOD 활성도는 큰 변화가 없었다⁶⁾.

내독소에 의한 MnSOD mRNA의 발현은 과거에는 미토콘드리아의 활성화에 따른 비특이적 현상으로 생 각했으나, Shiki 등의 연구에 의하면 내독소에 의해 MnSOD는 증가되지만 미토콘드리아 활성도의 지표인 fumarase와 cytochrome-c oxidase 활성도는 증가되지 않아 현재는 MnSOD의 증가가 미토콘드리아의 활성화 에 의한 비특이적 현상이 아니고 내독소에 의해 유발된 특이 현상으로 이해되고 있다⁶⁾. 내독소에 의해 MnSOD mRNA만 선택적으로 발현된 본 연구의 결과 로는 CuZnSOD와 MnSOD가 세포내에서 서로 다른 역할을 분담하고 있는 것으로 이해할 수 있는데, 외부 의 여러 자극에 직접 노출되어 있는 폐장 및 폐포대식 세포의 환경적 요인으로 인해 일상적으로 노출되어 있 는 자극에 의해 CuZnSOD는 기저상태에서 이미 발현 되어 있고 CuZnSOD는 이때 생성되는 산소기의 중화 에 주로 관여하고 MnSOD는 내독소 자극에 의해 추가 로 생성되는 산소기의 중화에 주로 관여하는 것으로 추 측할 수 있다.

내독소에 의한 폐장 및 여러 세포에서의 CuZnSOD 활성도와 mRNA 발현에 대하여는 본 연구와 다른 연 구 결과도 알려져 있어 쉽게 결론을 내리기가 곤란한 실정이다. 즉, Hass 등의 연구에 의하면 백서의 폐장에 내독소를 투여하고 95% 산소에 72시간동안 노출시키 면 CuZnSOD 활성도가 증가하였고³⁴⁾, Iqbal 등의 연구 에 의하면 백서에 내독소를 투여하고 48시간 후에 폐

장의 CuZnSOD mRNA 발현의 증가가 관찰되지만 95% 산소에 추가로 24시간 노출시켜야만 CuZnSOD mRNA의 지속적 발현증가와 CuZnSOD 활성도의 증가가 관찰되었다⁸⁾. 또한 백서에 내독소를 투여하고 시간 경과에 따른 폐장의 SOD mRNA 발현을 관찰한 유등의 연구에 의하면 내독소를 투여하고 4시간 후부터 MnSOD mRNA가 발현되기 시작하여 6시간에 최고치에 도달하였고 약 12시간 후까지 지속된 반면 CuZnSOD mRNA도 내독소 투여 1시간 후부터 발현하기 시작하여 24시간 후까지 지속되었다고 하였다¹¹⁾. 장기에 따라 CuZnSOD의 발현에 많은 차이가 관찰되는데 CuZnSOD mRNA와 효소활성도가 각 조직의 산소분압과 연관성을 보이지 않고 공기에 직접적으로 노출된 폐와 산소소모량이 많은 뇌에서 CuZnSOD mRNA 발현이 적은 반면 비교적 낮은 산소분압을 보이는 간에서 CuZnSOD mRNA 발현이 높은 사실은³⁵⁾, 산소분압과 산소소모량 외의 다른 요인이 CuZnSOD 유전자의 발현을 조절하는 것으로 생각된다. 이러한 상반된 결과들은 생체내, 외의 실험조건, 실험에 사용한 세포, 자극의 종류 및 농도 등의 차이에 따른 것으로 생각된다. 이러한 차이가 생체내에서 어떤 의미를 갖는지에 대해서는 아직 확실치가 않은 상태로서 향후 규명해야 할 과제로 생각된다.

일반적으로 유전자 발현은 전사, nuclear processing, cytoplasmic stability, 단백질합성의 단계에서 조절되고 있다. 본 연구에서는 내독소에 의한 MnSOD mRNA 발현이 전사 억제제인 AD에 의해 감소하였다. 따라서 백서의 폐포대식세포에서 내독소에 의한 MnSOD mRNA 발현의 증가는 적어도 일부는 단백질합성 이전의 수준에서 조절됨을 알 수 있다. 그러나 이 결과만으로는 내독소에 의한 MnSOD mRNA 발현의 증가가 전사 자체의 증가에 기인하는지 혹은 mRNA 안정성의 증가에 의한 것인지 구분할 수 없다. 이의 구별을 위해서 본 연구에서는 mRNA의 안정성(mRNA stability assay)을 측정하였는데 세포내에서 mRNA의 반감기를 측정하는 방법으로는 pulse-chase labeling법, steady-state labeling법과 inhibitor chase법 등이 이용되고 있다. Pulse-chase labeling법은 세포를 표지자에 잠깐 노출시킨 후 표지자를 제거하고 표지자를 포함한 mRNA를

추적하여 반감기를 추정하는 방법이고 Steady-state labeling법은 세포를 표지자에 지속적으로 노출시키고 시간경과에 따른 표지자를 포함한 mRNA의 세포내 축적 속도로부터 mRNA의 반감기를 측정하는 방법이다³⁶⁾. 이 두가지 방법은 mRNA의 반감기가 3~24시간 인 경우에는 유용하게 사용될 수 있지만 반감기가 짧은 경우에는 부정확해서 사용하기가 곤란한 단점이 있다. Inhibitor chase법은 세포를 전사 억제제로 처리한 후 Northern blot analysis로 시간경과에 따른 mRNA를 측정하여 반감기를 구하는 방법인데 위의 두 labeling법에 비해 반감기가 짧은 경우에도 비교적 정확하게 반감기를 측정할 수 있는 장점이 있는 반면에 전사억제제가 세포의 대사에 영향을 미치지 때문에 inhibitor chase법으로 mRNA 반감기가 짧게 관찰된 경우 전사 억제제에 의한 결과임을 배제할 수 없어 추후 labeling법에 의한 확인을 요하는 단점이 있다³⁶⁾. 본 연구에서는 mRNA 안정성을 측정하기 위하여 inhibitor chase법을 사용하였다. 즉, 폐포대식세포를 대조군과 내독소 투여군으로 나누어 8시간동안 배양후 AD를 투여하여 RNA 합성을 중단시키고 시간경과에 따른 MnSOD mRNA 발현의 변화를 관찰하여 두 군간의 반감기를 비교하였다. 대조군과 내독소투여군 간에 MnSOD mRNA 반감기의 의미있는 차이가 관찰되지 않아 백서의 폐포대식세포에서 내독소에 의한 MnSOD mRNA의 발현은 mRNA 안정성의 증가보다는 전사 자체의 증가에 의한 가능성이 높은 것으로 생각된다. 향후 이의 검증을 위하여 전사 자체를 직접 측정하는 nuclear runoff assay가 필요할 것으로 생각된다.

내독소에 의한 MnSOD mRNA의 발현에 새로운 단백질합성(*de novo protein synthesis*)의 필요 유무를 관찰하고자 폐포대식세포를 단백질합성 억제제인 CHX로 전처리한 후 내독소를 투여하여 MnSOD mRNA 발현의 변화를 관찰하였는데, CHX로 내독소에 의한 MnSOD mRNA의 발현이 완전히 억제되어 내독소에 의한 백서 폐포대식세포에서의 MnSOD mRNA 발현에는 새로운 단백질합성이 필요함을 알 수 있었다. 이 결과는 백서의 폐포상피세포와 폐혈관 내피세포에서 CHX에 의해 MnSOD mRNA의 발현이 증가하여 MnSOD mRNA의 발현은 새로운 단백질합성이 필요없다고 한 Visner

등⁹⁾의 결과와 상이한데, 이러한 조절기전의 차이는 같은 동물에서도 각각의 세포 또는 자극의 종류에 따라 상이한 조절기전을 갖는데 기인할 것이다.

내독소 투여시 감소하는 경향을 보였던 CuZnSOD mRNA의 발현은 AD 또는 CHX 각각의 전처치에 의해 모두 현저히 감소하여, 폐포대식세포내 CuZnSOD mRNA의 발현조절도 전사 및 단백질성 단계 모두가 관여할 것으로 생각된다.

본 연구의 결과만으로는 내독소 자극에 따른 폐포대식세포의 MnSOD mRNA 발현에 관여하는 새로운 단백질의 성상에 관해서는 알 수가 없다. IL-1과 TNF는 내독소에 의한 급성 폐손상의 매개물질로서 내독소에 의해 폐포대식세포에서 분비되고, 여러 종류의 세포에서 MnSOD의 생성을 유발한다고 알려져 있다^{9,37,38)}. 따라서 본 연구에서 내독소에 의한 MnSOD mRNA의 발현에 관여하는 새로운 단백질은 내독소에 의해 폐포대식세포에서 분비된 IL-1과 TNF일 가능성을 배제할 수 없으며 향후 항 IL-1 항체와 항 TNF 항체로 IL-1과 TNF의 영향을 배제한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 내독소에 의한 급성 폐손상의 발병기전에서 산소기가 중요한 역할을 한다는 사실은 잘 알려져 있다. 세포내에는 이러한 산소기에 의한 세포의 손상을 방지하는 정상 방어기전으로 여러 항산화효소가 존재하는데, 이중 SOD는 세포대사과정이나 외부 자극에 의해 생성된 superoxide로부터 세포의 손상을 방지하는 역할을 한다. 세포내 SOD는 주로 이중체의 구조로 세포질에 존재하는 CuZnSOD와 사중체의 구조로 미토콘드리아에 존재하는 MnSOD의 두 종류가 알려져 있으나, 폐포대식세포에서의 SOD mRNA 발현 및 그 조절기전에 대해서는 확실히 규명되어 있지 않다. 본 연구의 목적은 백서의 폐포대식세포에서 내독소 자극에 의한 MnSOD와 CuZnSOD mRNA 발현양상을 관찰하고 내독소 자극시 나타나는 SOD mRNA 발현의 조절기전을 규명하는데 있다.

방법: 백서의 기관지폐포세척액에서 얻은 세포를 plastic plate에 부착시켜 폐포대식세포를 분리한 후 내

독소를 자극하여 내독소 용량(0.01 μ g/ml~10 μ g/ml)과 자극시간(0, 2, 4, 8, 24 hrs)에 따른 MnSOD와 CuZnSOD MnSOD 발현양상을 Northern blot analysis를 시행하여 관찰하였다. 다음 단계로 MnSOD와 CuZnSOD mRNA 발현의 조절기전을 밝히고자 폐포대식세포를 각각 AD(5 μ g/ml) 또는 CHX(5 μ g/ml)로 전처치한 후 내독소로 자극하여 MnSOD와 CuZnSOD mRNA의 발현양상을 관찰하였다. 한편 내독소 투여가 SOD mRNA의 안정성을 변화시키는지 여부를 평가하기 위해 폐포대식세포를 대조군과 투여군으로 나누어 SOD mRNA의 분해속도를 비교하였다. 총 세포내 RNA는 guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform법을 이용하여 추출하였고, Northern blot analysis는 ³²P로 표지된 백서의 MnSOD와 CuZnSOD cDNAs를 이용하여 시행하였다.

결과: 백서의 폐포대식세포에서 MnSOD mRNA의 발현은 내독소 투여량의 증가에 따라 증가되었고 내독소를 투여하고 8시간후에 정점을 이루었으나, CuZnSOD mRNA의 발현은 내독소의 용량 및 투여후 반응시간에 따라 변화하지 않았다. 내독소 투여후 MnSOD mRNA의 발현증가는 AD 또는 CHX 각각의 전처치에 의해 모두 억제되었다. MnSOD mRNA의 안정성은 내독소 투여에 의해 변화하지 않았다.

결론: 이상의 결과로 백서의 폐포대식세포는 내독소 자극에 반응하여 SOD를 생성하는 중요세포이고, 내독소에 의한 MnSOD mRNA의 발현은 전사단계에서 조절되며 mRNA의 안정성을 변화시키지 않고 새로운 단백질의 합성이 필요한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Ho Y-S, Grapo JD: cDNA and deduced amino-acid sequence of rat copper-zinc-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acids Res* 15:6746, 1987
- 2) Ho Y-S, Grapo JD: Nucleotide sequences of cDNAs coding for rat manganese-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acids Res* 15: 10070, 1987

- 3) Ho Y-S, Howard AJ, Crapo JD: Nucleotide sequence of a rat glutathione peroxidase cDNA. *Nucleic Acids Res* **16**:5207, 1988
- 4) Ho Y-S, Howard AJ, Crapo JD: Isolation and sequence of a cDNA coding for rat glucose-6-dehydrogenase. *Nucleic Acids Res* **16**:7746, 1988
- 5) Asayama K, Janco RL, Burr IM: Selective induction of manganese superoxide dismutase in human monocytes. *Am J Physiol* **249**:C393, 1985
- 6) Shiki Y, Meyrick BO, Brigham KL, Burr IM: Endotoxin increases superoxide dismutase in cultured bovine pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol* **252**:C436, 1987
- 7) Hass MA, Iqbal J, Clerch LB, Frank L, Massaro D: Rat lung Cu, Zn superoxide dismutase: Isolation and sequence of a full-length cDNA and studies of enzyme induction. *J Clin Invest* **83**:1241, 1989
- 8) Iqbal J, Clerch LB, Hass MA, Frank L, Massaro D: Endotoxin increases lung Cu, Zn superoxide dismutase mRNA: Oxygen raises enzyme synthesis. *Am J Physiol* **257**:L61, 1989
- 9) Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS: Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Biol Chem* **265**:2856, 1990
- 10) Visner GA, Block ER, Burr IM, Nick HS: Regulation of manganese superoxide dismutase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* **260**:L444, 1991
- 11) 유철규, 서지영, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철: 내독소에 의한 백서 폐장의 superoxide dismutase 유전자 발현에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* **41**:215, 1994
- 12) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156, 1987
- 13) Brigham KL, Bowers RE, Haynes J: Increased sheep lung vascular permeability caused by *Escherichia coli* endotoxin. *Circ Res* **45**:292, 1979
- 14) Brigham KL, Meyrick B: Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* **133**:913, 1986
- 15) Esbenschade AM, Newman J, Lams P, et al: Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: Lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol* **53**:867, 1982
- 16) Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease. *Lab Invest* **47**:412, 1982
- 17) Davies KJA: Protein damage and degradation of oxygen radicals: general aspects. *J Biol Chem* **262**:9896, 1987
- 18) Davies KJA, Delsignore ME, Lin SW: Protein damage and degradation of oxygen radicals. II. Modification of aminoacids. *J Biol Chem* **262**:9902, 1987
- 19) Davies KJA, Delsignore ME: Protein damage and degradation of oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* **262**:9908, 1987
- 20) Fantone JC, Ward PA: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* **107**:395, 1982
- 21) Fridovich I: Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **23**:239, 1983
- 22) Marklund SL: Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**:7634, 1982
- 23) McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte(hemocuprein). *J Biol Chem* **244**:6049, 1969
- 24) Weisiger RA, Fridovich I: Superoxide dismutase: organelle specificity. *J Biol Chem* **248**:3582, 1973
- 25) Weisiger RA, Fridovich I: Mitochondrial super-

- oxide dismutase: Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* **248**:4793, 1973
- 26) Frank L, Yam J, Roberts RJ: The role of endotoxin in protection of adult rats from oxygen-induced lung toxicity. *J Clin Invest* **61**:269, 1978
 - 27) Thet LA, Wrobel DJ, Crapo JD, et al: Morphologic aspects of the protection by endotoxin against acute and chronic oxygen-induced lung injury in adult rats. *Lab Invest* **48**:448, 1983
 - 28) White CW, Ghezzi P, Dinarello CA, Caldwell SA, McMurtry IF, Repine JE: Recombinant tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 pretreatment decreases lung oxidized glutathione accumulation, lung injury, and mortality in rats exposed to hyperoxia. *J Clin Invest* **79**:1868, 1987
 - 29) Sibille Y, Reynolds HY: Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* **141**:471, 1990
 - 30) Jacobs RF, Kiel DP, Balk RA: Alveolar macrophage function in canine model of endotoxin-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis* **134**:745, 1986
 - 31) Pabst MJ, Johnston RBJ: Increased production of superoxide anion by macrophages exposed in vitro to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J Exp Med* **151**:101-14, 1980
 - 32) Sherman L, Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Groner Y: Human Cu/Zn superoxide dismutase gene: Molecular characterization of its two mRNA species. *Nucleic Acids Res* **12**:9349, 1985
 - 33) Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, et al: Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophage. *Infect & Immun* **56**:1232, 1988
 - 34) Hass MA, Frank L, Massaro D: The effect of bacterial endotoxin on synthesis of (Cu, Zn) superoxide dismutase in lungs of oxygen-exposed rats. *J Biol Chem* **257**:9379, 1982
 - 35) Delabar JM, Nicole A, D'auriol L, Jacob Y, Meunier-Rotival M, Galibert F, Sinet PM, Jerome H: Cloning and sequencing of a rat CuZn superoxide dismutase cDNA: Correlation between CuZn superoxide dismutase mRNA level and enzyme activity in rat and mouse tissues. *Eur J Biochem* **166**:181, 1987
 - 36) Darnell J, Lodish H, Baltimore D: *Molecular cell biology*. 2nd Ed, Scientific American Books, New York, NY. 1990, p438-9
 - 37) Masuda A, Longo DL, Kobayashi Y, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K: Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J* **2**:3087, 1988
 - 38) Wong GH, Goeddel DV: Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* **242**:941, 1988