

혈관내피세포의 Apoptosis에 대한 Pyruvate의 억제효과

정 세 진 · 강 영 희

한림대학교 자연과학대학 생명과학부 식품영양학과

Antiapoptotic Role of Pyruvate in Vascular Endothelial Cells

Chung, Sejin · Kang, Younghee

Department of Food and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

ABSTRACT

Apoptotic cell death, characterized by DNA fragmentation and morphological changes, has previously been shown to occur in vascular endothelial cells cultured with hydrogen peroxide. The present study examined the induction of apoptosis by hydrogen peroxide and whether pyruvate, a key glycolytic intermediate and α -keto-monocarboxylate, can inhibit the apoptotic effects in bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAECs). Culture with 500 μ M hydrogen peroxide resulted in 30% cell death and induced morphological changes and DNA fragmentation. Cell injury was inhibited by the treatment with pyruvate. Pyruvate (0.1 – 5.0mM), and cell viability increased in a dose-dependent manner. In the presence of pyruvate (10~20mM), the viability was improved to over 95%. In contrast, treatment with lactate, a reduced form of pyruvate, did not protect against cell death caused by hydrogen peroxide and BPAECs remained more susceptible. The cytoprotective mechanism of pyruvate against oxidative stress-induced loss of viability and apoptosis was examined with α -cyano-3-hydroxycinnamate (COHC) as a selective mitochondrial monocarboxylate transport blocker. Incubation with COHC (500 μ M) did not significantly affect cell viability in the presence of hydrogen peroxide. The cytoprotection by pyruvate (3mM) against hydrogen peroxide stress was abolished by COHC. This indicates that the cytoprotection by pyruvate against oxidative stress in endothelial cells is mediated, at least in part, by mitochondrial pyruvate uptake and hence endothelial energetics. However, cytosolic mechanisms related to the glutathione system may also contribute. The results suggest that pyruvate has therapeutic potential in the treatment of oxidative stress-induced cytotoxicity associated with increased apoptosis. (*Korean J Nutrition* 32(3) : 318~326, 1999)

KEY WORDS : apoptosis · pyruvate · hydrogen peroxide · endothelial cells.

서 론

Apoptosis는 개체에 따라 불필요해진 세포를 교체하기 위하여 일어나는 적극적인 현상인 세포죽음을 일컫으며, 다양한 생물학적 시스템에서 나타나는 중요한 과정이다. 그러나, apoptosis는 노화현상과 관련되어 나타나는 퇴행성 질환의 원인이 되고 면역작용과 신경전달체계의 혼란 등의 치명적인 질환들을 일으키게 된다.¹⁾ 이러한 질환에서의 apoptosis는 활성산소종 (oxygen reactive species)의 산화적 독성에 의하여 초래된다고 많은 연구에서 보고하고 있다.^{2,3)} 활성산소종은 세포내의 여러 suborganelles에 변화를 초래하고 세포내 calcium overload를 유발시키며 세포막의 ion exchange를 증가시킨다. 또한, 이것은 세포막의 신호 전달체계와 관련된 adenylate cyclase, protein kinase 채택일 : 1999년 2월 18일

C와 phospholipase C 등의 활성도를 변화시키는 것으로 보고되고 있다.^{4,5)} 이러한 변화과정은 활성산소종의 산화적 연쇄반응에 의하여 증폭된다.

Pyruvate는 해당작용의 주요한 중간산물인 α -keto-monocarboxylate이며 혐기성 상태에서는 lactate로 전환되고, 생리적 농도 이상에도 독성이 없으며 수용체 매개작용 없이 운반체에 의해 세포내로 이동한다. Pyruvate는 다른 에너지산물인 lactate나 짧은 탄소사슬의 fatty acids와는 달리 관상혈류/혈압 자동조절능을 거의 온전하게 수행하는 능력을 가지고 있으며,⁶⁾ 또한 심장 허혈상태로부터 심장근의 수축력 회복과 심근경색의 감소에 있어서 그리고 sarcoplasmic reticulum의 calcium 조절에 있어서, 탁월한 능력을 가지고 있다고 밝혀져 있다.^{6,7)} Pyruvate의 이러한 심혈관계에서의 기능개선효과는 pyruvate가 cytosolic energy phosphorylation potential을 온전히 유지할 수 있기 때문으로 해석되고 있다. Pyruvate는 만성심부전증을

가진 환자에서 심장기능을 호전시킬 수 있다는 것이 발표되었다.⁹⁾

본 연구에서는 혈관성 내피세포인 bovine pulmonary artery endothelial cells(BPAECs)에서 산화적 독성에 의하여 혈관손상을 수반하는 apoptosis 과정이 pyruvate의 외부적 도입에 의하여 억제될 수 있는지를 규명하고자 하였다. 활성산소종과 관련된 후발 허혈성 심혈관손상(postischemic injuries)에서 나타나는 혈관내피조직의 손상을 유도하기 위하여 BPAECs를 과산화수소에 노출하여 산화적 독성을 유발하였다. 과산화수소는 강력한 반응성을 지닌 활성산소종인 hydroxyl radicals과 oxygen singlet을 형성한다. 여기에 pyruvate를 가하여 apoptosis에 대한 억제효과를 조사하였으며, 이것의 환원형태인 lactate의 apoptosis 과정에 대한 효과를 규명하여 이들의 apoptosis 억제효과에 대한 대사적인 역할을 비교분석하였다. 또한, 본 연구에서는 pruvate의 apoptosis에 대한 억제효과에 있어서 pyruvate가 미토콘드리아내로 이동하는 것을 차단시키는 α -cyano-3-hydroxy-cinnamate(COHC)를 사용하여 미토콘드리아내에서의 pyruvate의 역할을 밝히고자 하였다.

재료 및 실험방법

1. 세포배양 실험

혈관내피세포인 BPAECs의 cell line은 American Type Culture Collection으로부터 구입되었다. 단세포용으로 자란 BPAECs는 12 well plates에 well 당 3.0×10^5 수로 10% FBS가 첨가된 M199 배양액에 분주되어 24~48시간 배양되었다. 주어진 농도(100 μ M~20mM)의 pyruvate가 첨가된 세포배양액에서 30분간 배양시킨 다음 300~500 μ M의 과산화수소와 함께 30분간 계속 더 배양하여 apoptosis에 의한 세포죽음을 유도하였다. 과산화수소의 반응을 100U/ml catalase를 가하여 중지시키고 세척하여 다시 같은 농도로 pyruvate가 첨가된 M199 배양액에서 24시간 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 대조 세포배양은 pyruvate와 과산화수소를 가하지 않은 상태에서 실시되었다. 또한, lactate 배양시는 같은 실험방법에서 pyruvate 대신에 첨가되었다. 실험에 도입된 pyruvate의 전후처리에 대한 배양시간과 농도, 그리고 과산화수소의 apoptosis 유도를 위한 농도와 반응시간은 예비실험을 통하여 설정되었다.

2. 세포생존률 조사

혈관내피세포인 BPAECs를 pyruvate, lactate 또는 과

산화수소에 대한 세포배양실험을 거친 후에 세포생존률을 측정하기 위하여 자동 microplate reader spectrophotometer를 이용한 MTT 분석이 이루어졌다. 이 분석법은 tetrazolium MTT salt(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 미토콘드리아 효소인 succinate dehydrogenase에 의하여 불용성의 formazan으로 변하는 과정을 이용하여 세포증식을 측정하게 된다. Formazan의 형성은 살아있는 세포내에서만 일어나고 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포수와 비례하게 된다.⁹⁾

MTT 용액 50 μ l(5mg/ml)가 첨가된 배양액 1ml에서 세포배양실험을 거친 세포를 3~4시간 배양시켰다. 그런 후에, acidic isopropanol 1ml을 가하여 조심스럽게 흔들어 주면서 형성된 formazan을 용해시키고 $\lambda=560$ nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 세포형태학적 변화실험

세포배양실험에서 나온 세포를 phosphate buffer saline(PBS)로 잘 세척하고 여기에 차가운 4% formaldehyde 용액을 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 고정시켰다. 그런 후에, 15분간 찬 100% methanol을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에 두어 세포막을 통한 투과성을 증가시켰다. PBS로 세척하고는 ethidium bromide 용액(10 μ g/ml)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양하고 조심스럽게 다시 세척하였다. 세포의 morphology는 형광필터가 장착된 현미경으로 관찰하였다.¹⁰⁾

4. Genomic DNA 추출과 전기영동법

Apoptosis의 생화학적인 특징인 DNA fragmentation은 apoptosis 말기에 나타나는 현상으로 핵산분해효소의 활성화에 의하여 180bp의 다양한 oligomers으로 잘려 agarose 전기영동법에 의하여 ladder mode를 나타낸다. DNA fragmentation은 agarose gel 전기영동법으로 이루어질 수 있다.¹¹⁻¹⁴⁾

과산화수소 처리후에 pyruvate 또는 lactate와 24시간 배양된 세포를 PBS로 조심스럽게 세척하였다. Trypsin + EDTA 용액을 처리하고 5분간 원심분리하여(500 \times g) 세포 pellets을 준비하였다. 이에 lysis buffer(50mMTris-HCl(pH 8), 10mM EDTA(pH 8), 0.5% sodium N-lauroyl sarcosinate, 100 μ g/ml proteinase K)를 각각 1ml씩 넣은 후에 부드럽게 흔들어 주었다. 그런 다음, 50 $^{\circ}$ C에서 5시간 흔들어주면서 배양하였다. 같은 부피의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25 : 24 : 1)을 넣어 잘 흔들어 주고 1700 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 생긴 수용성층을 모아서 phenol : chloroform :

isoamyl alcohol으로 반복처리하여 한번 더 원심분리하였다. 나온 수용성층을 새 튜브에 거두어 0.3mM sodium acetate를 넣어주었다. 여기에 찬 100% ethanol을 2배 부피로 넣어 DNA를 침전시키고 이를 1700×g에서 2분간 원심분리하여 공기 중에 건조시켰다. DNA pellets을 65°C 30μl TE buffer(10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA)에 녹였다. 여기에 1μg/ml RNase를 넣고 3시간 37°C에서 배양하였다. Optical density를 λ=260nm에서 측정하고 추출된 DNA를 ethidium bromide(0.4μg/ml)가 함유된 1.8% agarose gel 상에서 전기영동하였다. 분리된 DNA는 UV(302nm) transilluminator로 가시화하여 DNA ladder mode를 확인하였다.

5. 세포안에서의 apoptosis 검출

Apoptosis의 생화학적인 현상인 DNA fragmentation을 in situ 상태에서 특이적으로 검출하는 방법¹⁵⁾인 TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) 분석을 본 연구에서 시도하였다.

Fibronectin으로 코팅된 chamber slides에 BPAECs를 chamber well 당 3.0×10^5 수로 분주하여 과산화수소, pyruvate 또는 lactate 세포배양실험을 실시하였다. 배양된 BPAECs를 0.2% bovine serum albumin(BSA)이 첨가된 PBS로 조심스럽게 2번 세척하고, 고정액 10% formaldehyde 용액을 가하여 4°C에서 30분간 방치한 다음 다시 세척하였다. TdT buffer(30mM Trizma base, pH 7.2, 140mM sodium cacodylate, 1mM cobalt chloride) 50~70μl를 각 chamber slide well에 가하고 이를 실온의 습윤상자 안에 10분간 방치하였다. 여기에 TdT 용액인(TdT buffer : biotinylated dUTP : TdT=360 : 20 : 20)을 각각 첨가하여 37°C에서 90분간 배양하였다. 다시 여기에 TB buffer(300mM NaCl, 30mM sodium citrate)를 가하여 다시 습윤상자 안에 20분간 방치하였다. 그런 다음, 3차 증류수에 담가서 2분간 세척하였다. Blocking 용액인 2% BSA를 가하여 실온에 20분간 두었다. 이에 extra-avidin alkaline phosphatase를 10~30μg/ml의 농도로 넣어주고 37°C에서 60분간 배양하고 10분간 세척하였다. 물기를 제거하고 AT buffer(100mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, pH 9.5)에 NBT 용액(70% DMF에 50mg/ml)과 BCIP 용액(100% DMF에 50mg/ml)이 첨가된 기질용액으로 발색시켰다. 다시 PBS에 담가서 5분 정도 세척하고 흐르는 수돗물로 세척하였다. 마지막으로 gel mount 용액을 가하고 cover glass로 덮어 발색의 정도를 현미경으로 관찰하였다.

6. Pyruvate 효과에 대한 COHC를 이용한 interventions

Pyruvate의 apoptosis 억제효과에 대한 미토콘드리아 내부에서의 pyruvate 역할을 규명하기 위하여 pyruvate가 미토콘드리아 내부로 이동하는 것을 억제하는 COHC를 세포배양실험에 도입하였다. 미토콘드리아 내부로 pyruvate이 이동하는 것을 차단하기 위하여 pyruvate를 첨가하기 30분전에 COHC로 BPAECs를 미리 전처리 배양하였다. 본 실험에서 COHC의 적정농도는 예비실험을 통하여 500μM로 설정하였는데, 이 농도에서 COHC 자체는 세포의 생존률에 있어서 유의적인 변화를 초래하지 않았다. 대신, COHC로 pyruvate의 이동을 충분히 차단시키기 위하여 COHC 배양실험에서는 pyruvate의 농도를 10mM 대신에 3mM로 택하였다.¹⁶⁾

7. 통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차로 표시되었고 통계 분석은 Statistical Analysis System package 통계프로그램을 이용하여 이루어졌다. 각 세포배양에 이용된 pyruvate, lactate 및 COHC의 과산화수소에 의하여 초래된 세포독성에 대한 효과는 ANOVA two way analysis로 분석하였고 평균치간의 차이에 대한 유의성은 p<0.05의 수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

실험결과

1. 산화적 세포독성에 대한 pyruvate의 효과

BPAECs cell line을 300~500μM 과산화수소와 세포배양하여 산화적 독성을 유발시키고, 이에 pyruvate 또는 lactate를 처리하여 세포생존률을 조사하였다. 예상한 바에 따라, 주어진 농도에서의 과산화수소에 의하여 세포생존률이 70~76%로 감소되었다. Pyruvate와의 세포배양시는 BPAECs의 과산화수소에 의한 세포죽음을 억제하여 세포생존률이 증가함을 알 수 있다(Fig. 1). Pyruvate 10~20mM 전처리 경우에는 세포생존률이 과산화수소를 가하지 않은 경우의 생존률과 비슷한 수준으로 도달하였다. 과산화수소에 의한 산화적 세포독성에서 30분간 전처리된 pyruvate의 농도를 증가시키기에 따라 세포생존률이 증가하여 dose response 양상을 보여주었다. 그 반면에, 주어진 모든 농도(10~20mM)에서 lactate는 pyruvate의 경우와는 달리 세포독성에 대한 억제효과를 전혀 나타내지 못하였다. 오히려 lactate의 전처리 농도가 증가함에 따라 세포생존률은 감소하는 경향을 보여주며, 이로써 lactate는 과산화수소에 의한 산화적 세포독성을 상승시키는 경향을 보이고 있다.

2. 과산화수소에 의한 세포형태변화에 대한 pyruvate의 효과

Fig. 2는 과산화수소에 의한 변화된 세포 morphology에 대하여 pyruvate와 lactate의 세포배양이 어떠한 영향을 미치는지를 보여준 것이다. 과산화수소 500 μ M을 BPAECs에 30분간 처리하였을 때, 세포의 shrinkage, nuclear condensation, nuclear fragmentation 및 membr-

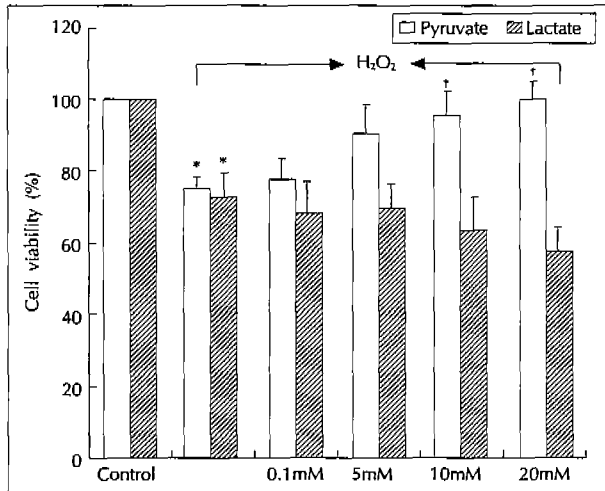


Fig. 1. Bovine pulmonary artery endothelial cells were incubated with 500 μ M hydrogen peroxide(H₂O₂) for 30 minutes. Control, no treatment of hydrogen peroxide. Pyruvate or lactate was preincubated for 30 minutes and thereafter posttreated for 24 hours after incubation with hydrogen peroxide. Data(means \pm SEM, n=8 separate experiments) are expressed as percent of cell survival of respective control pyruvate or lactate. *p<0.05, compared to respective control pyruvate or lactate value. [†]p<0.05, compared to hydrogen peroxide alone.

ane blebbing의 형태를 가진 apoptotic bodies가 주로 관찰되었다. 그러나, 여기에 pyruvate를 전처리한 세포배양에서 BPAECs는 정상적인 morphology를 보여주었다. 이와는 달리, lactate와의 세포배양시는 과산화수소 단독으로 처리한 것과 비교하여 보았을 때 BPAECs의 형태학적인 변화에 별다른 효과를 나타내지 못하였고 오히려 nuclear fragmentation이 나타난 많은 apoptotic bodies를 형성하였다.

3. Apoptosis에 대한 pyruvate의 억제효과

Fig. 3은 BPAECs에서 과산화수소에 의한 apoptosis의 생화학적인 특징인 internucleosomal DNA ladder 형성과 이것에 대한 pyruvate와 lactate의 효과를 나타낸 것이다. 과산화수소가 처리된 BPAECs에서 추출된 DNA는 agarose gel 상에서 DNA ladder mode를 이루고 있어서 핵산분해효소에 의하여 DNA fragmentation이 일어난 것을 보여주었다. 과산화수소 500 μ M에 의하여 유도된 세포죽음(Fig. 1)은 apoptosis 과정에 의한 것임을 알 수 있다. 한편, pyruvate와의 세포배양에서 gel 상에서의 DNA ladder는 사라지는 것으로 관찰되어 과산화수소에 의하여 초래된 DNA fragmentation은 pyruvate에 의하여 억제된다는 것을 보여주었다. 반면에, 10mM lactate를 처리한 경우에는 이러한 apoptosis 억제기능이 발견되지 못하였다.

Apoptosis를 in situ에서 시도한 TUNEL 검출에서도 비슷한 결과를 확인하였다(Fig. 4). Pyruvate를 처리하였을 때는 in situ DNA fragmentation이 거의 일어나지 않

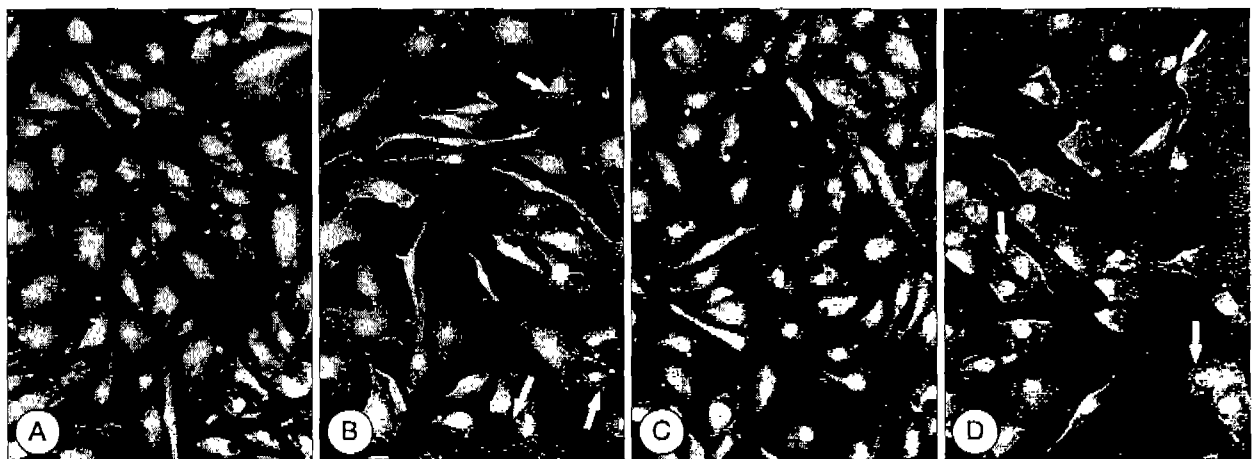


Fig. 2. Effect of pyruvate and lactate on morphological changes in hydrogen peroxide-treated bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAECs). Panel A shows normal BPAEC morphology stained with ethidium bromide. BPAECs treated with 500 μ M hydrogen peroxide for 30 minutes induced morphological changes characteristic of apoptosis(panel B) Apoptotic bodies with cell shrinkage and condensed nuclei (arrow) were mainly observed. Panel C demonstrates morphology in BPAECs treated with 10mM pyruvate before and after exposure to hydrogen peroxide. Panel D shows cell morphology when treated with 10mM lactate before and after exposure to hydrogen peroxide. Lactate incubation did not prevent against hydrogen peroxide-induced morphological changes characteristics of apoptosis, showing fragmented nuclei(arrow).

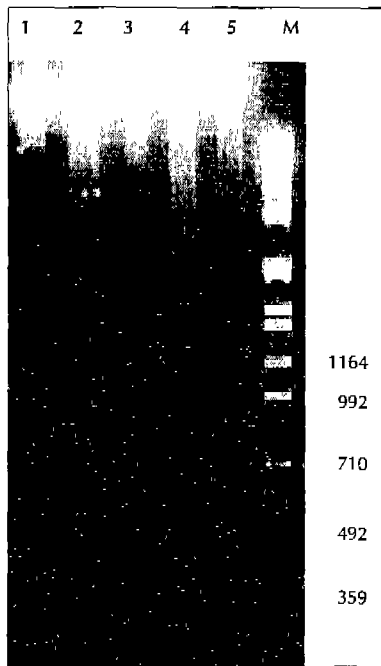


Fig. 3. Protective effect of pyruvate on hydrogen peroxide induced internucleosomal DNA fragmentation in bovine pulmonary artery endothelial cells. Fragmented DNA was extracted and electrophoresed as described in the text. Lane 1, DNA mode from normal cells ; lane 2, DNA mode from 500 μ M hydrogen peroxide-treated cells ; lane 3, DNA mode from cells after incubation with 10mM pyruvate ; lane 4, DNA mode from cells after incubation with 10mM lactate ; lane 5, DNA mode from cells after incubation with 3mM pyruvate and 500 μ M α -cyano-3-hydroxycinnamate ; lane 6, standard DNA marker. Internucleosomal DNA fragmentation was observed with 500 μ M hydrogen peroxide and in cells treated with lactate, whereas DNA ladders were little detected in untreated cells or in cells treated with pyruvate.

왔고(panel C), lactate의 경우에는 거의 모든 BPAECs가 발색되었다(panel D). agarose gel 상에서의 DNA ladder 양상과 TUNEL 검출에 의한 in situ DNA fragmentation에서 pyruvate는 apoptosis를 억제시키는 기능을 지니고 있지만, 과산화수소에 의하여 초래된 BPAECs의 apoptosis 과정에서 pyruvate의 환원형태인 lactate는 오히려 과산화수소의 산화적 세포독성에 대한 synergy 작용을 지니고 있다는 것을 알 수 있다.

4. Pyruvate의 apoptosis 억제효과에 대한 COHC의 작용

Pyruvate의 apoptosis 억제효과에 대한 작용기전으로 미토콘드리아에서 pyruvate의 역할은 Table 1과 Fig. 5에 제시하였다. 미토콘드리아 내부로 pyruvate가 이동하는 것을 방해하는 COHC 500 μ M의 전처리 는 세포생존률에 유의적인 변화를 초래하지 않았고, pyruvate와 함께 전처리한 경우에도 감소하는 경향은 보이지만 유의적인 생존률 감소는 보이지 않았다. 이것으로 주어진 농도에서의 COHC

그 자체는 BPAECs에 독성을 유발하지 않는다고 볼 수 있다. 한편, COHC 500 μ M의 전처리는 3mM pyruvate에 의한 세포생존률의 증가를 억제한다는 것을 알 수 있다 (84 \pm 3% versus 71 \pm 4%). 이러한 사실은 미토콘드리아 내에서의 pyruvate가 과산화수소에 의한 산화적 세포독성을 억제하는 데에 관여한다는 것을 암시하고 있다. 또한, COHC의 전처리는 강력한 in situ DNA fragmentation을 초래하였으며(Fig. 5), 미토콘드리아 내부로 이동한 pyruvate가 과산화수소에 의하여 수반된 BPAECs의 apoptosis 과정을 억제하는 작용에 적어도 어느 정도는 관여하고 있다는 것을 말해주고 있다.

고 찰

혈관내피세포는 혈관벽의 해부학적인 특수구조로 인하여 혈관운동 및 cytokines과 성장인자들의 분비 등과 같은 기능적 역할에 있어서 매우 중요하다. 활성산소종(oxygen reactive species)에 의한 산화적 독성으로 수반되는 혈관성 내피세포의 apoptosis는 혈관손상을 초래하여 생리적인 기능장애 뿐만 아니라 치명적인 심혈관질환을 유발시킨다.^{17,18)} 본 연구는 apoptosis 과정이 해당작용의 대사적 중간산물인 pyruvate의 외부적 도입에 의하여 억제될 수 있는지를 규명하고자 하였다. 본 실험에서는 혈관성 노화현상과 허혈성 심혈관질환 등의 병리상태와 유사한 상황을 유도하기 위하여 활성산소종 hydroxyl radicals의 형성을 유도하는 산화적인 자극으로서 과산화수소를 BPAECs에 도입하였다.

1. Pyruvate의 apoptosis 억제효과

본 연구에서 pyruvate는 과산화수소에 의한 세포독성에 있어서 억제기능을 지닌다는 것을 보여주었다. BPAECs를 500 μ M 과산화수소에 30분간 노출하였을 때 70~76% 정도의 세포생존률을 보이지만, pyruvate의 전처리 농도를 달리하여 세포배양을 한 경우에는 pyruvate의 농도가 증가함에 따라 세포생존률은 증가하고, 10mM pyruvate와의 배양은 과산화수소를 처리하지 않았을 때의 생존률과 비슷한 수준에 도달하게 하였다(Fig. 1). Pyruvate의 전처리 농도에 따라 과산화수소의 세포독성은 dose response 양상으로 줄어들고, 과산화수소에 의하여 초래된 BPAECs의 손상은 20mM까지 pyruvate의 전처리 농도가 높을수록 억제된다는 사실을 알 수가 있었다. 따라서, pyruvate는 혈관내피세포의 산화적 세포독성에 대한 억제기능을 가지고 있음을 알 수가 있다.

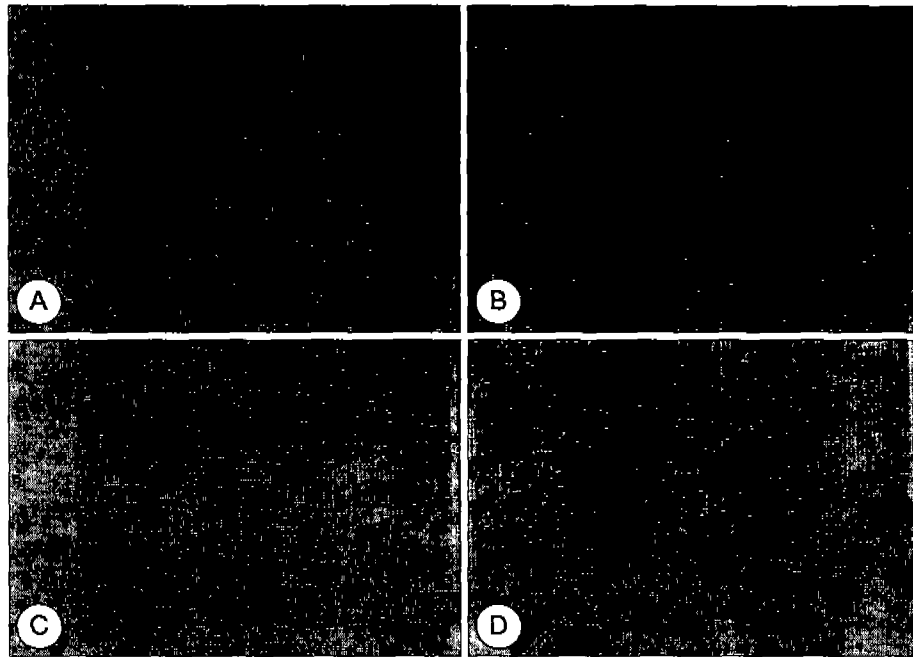


Fig. 4. Micrographs of TUNEL-stained bovine pulmonary artery endothelial cells(see in the text). Panel A, normal cells ; panel B, cells treated with 500µM hydrogen peroxide for 30 minutes ; panel C, cells treated with 10mM pyruvate before and after exposure to hydrogen peroxide, in which few cells were stained. In contrast, 10mM lactate did not have these effects(panel D) and most of cells were strongly stained.

Table 1. Effects of pyruvate mitochondrial transport inhibitor α -cyano-3-hydroxycinnamate(COHC) on enhancement of viability by pyruvate in hydrogen peroxide-treated bovine pulmonary artery endothelial cells

Hydrogen peroxide (μ M)	Pyruvate (mM)	COHC (μ M)	Viability (%)
0	0	0	100
0	0	500	92 \pm 3
0	3	0	101 \pm 3
0	3	500	90 \pm 2
500	0	0	76 \pm 3*
500	0	500	72 \pm 3*
500	3	0	84 \pm 3*
500	3	500	71 \pm 4**

The viability data are means \pm SEM from five separate experiments and expressed as percent of the viability value of untreated bovine pulmonary artery endothelial cells(BPAECs). α -cyano-3-hydroxycinnamate(COHC) was preincubated as a specified dose for 30 minutes prior to the incubation with pyruvate given. The cells were then reincubated in a fresh medium for 24 hours(see in the text). *p < 0.05, compared to the viability value of untreated cells † p < 0.05, compared to the viability value of cells incubated with pyruvate prior to treatment of hydrogen peroxide in absence of COHC.

활성산소종은 apoptosis와 necrosis의 두가지 작용기전을 통하여 세포죽음을 일으키게 된다. 활성산소종의 수준이 necrosis를 일으킬 수 있는 역치이하인 경우에는 apoptosis가 유발된다.¹⁹⁾ Necrosis는 갑작스런 세포죽음을 일컫으며, 미토콘드리아의 산화적 손상에 의하여 ATP 수준이

감소하고 세포의 부종현상과 세포의 disruption이 나타나고 다량의 calcium이 세포내로 유입되는 것이 특징이다. 한편, apoptosis는 형태학적으로는 핵의 condensation, nuclear fragmentation, endothelial microvilli의 손실과 membrane blebbing 등이 나타나고, 생화학적으로는 핵산분해효소의 활성화로 인한 chromosomal DNA fragmentation으로 세포죽음에 있어서 necrosis와는 뚜렷이 구별된다.¹¹⁾¹³⁾¹⁴⁾

본 연구에서는 pyruvate의 apoptosis에 대한 억제효과에 주목하여 과산화수소 500µM에 의한 apoptosis 과정에서 나타나는 형태적인 변화를 조사하였고, 이러한 변화를 pyruvate가 억제한다는 것을 보여주었다. Ethidium bromide를 이용하여 500µM 과산화수소를 30분간 처리한 세포에서는 세포의 shrinkage와 핵의 condensation을 가진 apoptotic bodies를 뚜렷이 관찰할 수가 있었다. 여기에 10mM pyruvate를 처리하면 과산화수소를 처리하지 않은 경우와 같이 apoptotic bodies는 거의 나타나지 않았다. 한편, pyruvate의 환원형태인 lactate를 배양한 경우에는 nuclear fragmentation을 가진 apoptotic bodies를 더 뚜렷하게 발견할 수 있었으며 세포 수적인 면에서도 현저히 감소하였다(Fig. 2). 이것으로 lactate는 과산화수소에 의한 세포독성을 오히려 가중시킨다는 것을 알 수 있다. 이러한 사실은 Fig. 1에서 보여주는 lactate가 과산화수소와 synergy 작용을 하는 세포독성의 결과를 뒷받침하고 있

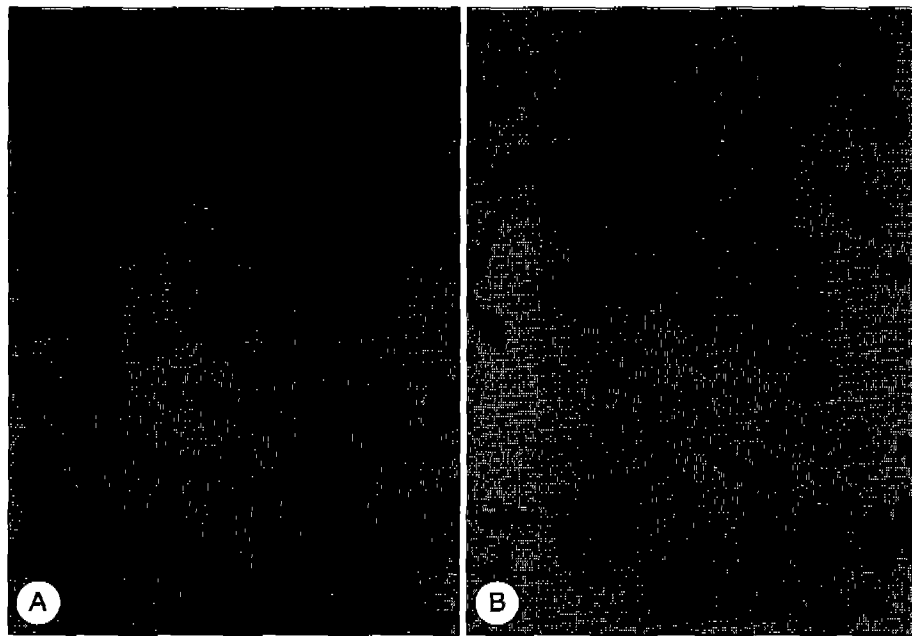


Fig. 5. Micrographs of TUNEL-stained bovine pulmonary artery endothelial cells(see in the text). Panel A shows TUNEL micrograph of normal cells. Panel B indicates TUNEL micrograph of cells pretreated with 500 μ M α -cyano-3-hydroxycinnamate prior to incubation of 3mM pyruvate, and then treated with 500 μ M hydrogen peroxide for 30 minutes.

다. 또한, 이러한 결과는 적출된 심장에서 허혈성 심혈관 손상에서 pyruvate는 탁월한 회복능력을 가지지만, lactate는 심장근의 수축력과 관상혈류량 회복을 저해한다는 사실과 부합한다고 볼 수 있다.⁶⁾

형태학적인 변화 뿐만 아니라 본 연구에서는 agarose gel 상에서 그리고 in situ 상태에서의 DNA fragmentation을 조사하였다. 예상한 바와 같이, 500 μ M 과산화수소를 처리한 경우에는 뚜렷한 DNA ladder를 형성하고 internucleosomal DNA fragmentation을 초래하였지만, pyruvate가 배양된 경우에는 이러한 현상이 나타나지 않았다. 이것으로 pyruvate는 과산화수소에 의하여 초래된 apoptosis를 억제시킨다는 것을 알 수 있다. 여기서 500 μ M 과산화수소는 BPAECs에서 necrosis를 일으키는 역치이하의 농도이며, BPAECs에서 나타난 세포독성은 apoptosis 과정에서 초래되었다고 볼 수 있다. 한편, lactate는 pyruvate의 경우와는 달리 DNA fragmentation이 현저하게 나타나고 있음을 알 수 있다. 이것은 lactate가 과산화수소에 의한 세포죽음을 가중시키고 apoptosis 현상을 통하여 BPAECs의 수적 감소(Fig. 2)를 초래하였다고 볼 수 있다.

2. Apoptosis 억제효과에 대한 pyruvate의 작용기전

Apoptosis에 대한 pyruvate의 억제기능을 규명한 문헌은 극히 드물고 그 작용기전은 여전히 확인되지 못하고 있

다. 그러나, pyruvate가 apoptosis에 의한 세포죽음을 경감 또는 억제시키는 작용은 추정되고 있는 몇가지 기전으로 설명될 수 있으리라고 본다. 본 연구에서는 apoptosis에 대한 pyruvate의 억제효과에 있어서 미토콘드리아내에서의 pyruvate역할을 규명하기 위하여 COHC를 도입하였다. 여기서 500 μ M COHC를 30분간 전처리하였을 경우에, 3mM pyruvate가 보여준 과산화수소에 대한 세포생존률의 증가현상과 apoptosis의 억제효과가 사라졌다(Table 1, Fig. 5). 그러므로, pyruvate의 산화적 독성으로 인한 apoptosis에 있어서의 억제기능은 일부 미토콘드리아내에서의 pyruvate가 관여한다는 사실을 암시하고 있다. 그러나, COHC 500 μ M은 세포막에서도 pyruvate의 이동을 차단할 수 있는 가능성이 있기 때문에 세포질내에서 pyruvate의 역할을 완전히 배제할 수는 없으리라고 본다. 이것에 대해서는 좀 더 부차적인 연구가 필요하리라 본다.

최근에 발표된 한 논문²⁰⁾에서, 고농도 glucose 상태에서 pyruvate의 외부적인 공급은 혈관내피세포의 pentose phosphate pathway의 활성화와 함께 NADPH/GSH system에서 glutathione redox cycle을 원활히 하여 고농도 glucose 상태에서 과산화수소에 의한 세포손상을 억제한다고 보고되었다. 이러한 논문결과를 본 연구에서도 적용할 수 있으리라 본다. Pyruvate와의 세포배양은 pentose phosphate pathway의 활성화와 glutathione redox system을 통한 과산화수소의 분해를 촉진하고 과산화수소

로부터 hydroxyl radicals의 생성을 감소시키므로서 apoptosis에 의한 세포죽음을 억제시키는 것으로 추정된다.

DNA fragmentation은 apoptosis 과정의 말기에 나타나는 현상으로 세포의 신호전달경로를 통하여 먼저 핵산분해효소에 의해 DNA strands가 50~300kbp로 잘려지고, 이어서 calcium 의존성 핵산분해효소에 의하여 180bp의 oligomers 크기로 잘려지게 된다.²¹⁾²²⁾ 활성산소종은 세포내에서 calcium overload를 가중시키고 세포막의 ion exchange를 증가시키며 calcium 의존성 핵산분해 효소의 활성을 촉진하여 apoptosis를 초래한다고 보고되고 있다.²³⁾²⁴⁾ 이러한 연구자료를 통하여 또다른 작용기전을 추정할 수 있다. Pyruvate는 대사산물로서 해당과정을 원활하게 하고 Na⁺/Ca²⁺ antiport 작용을 향상시켜 세포내 calcium overload를 억제하여 활성산소종에 의한 산화적 독성을 경감시킨다고 볼 수 있다.

요약 및 결론

심혈관계에서 pyruvate의 다양한 기능적 역할에 비추어, 본 연구에서는 BPAECs에서 산화적 독성에 의하여 혈관손상을 수반하는 apoptosis 과정이 해당작용의 대사산물인 pyruvate의 외부적인 도입에 의하여 억제될 수 있는지를 규명하고자 하였다. 심혈관질환에서 일반적으로 나타나는 혈관손상을 인위적으로 유도하기 위하여 과산화수소를 BPAECs와 세포배양하여 산화적 독성을 유발하였다. 여기에 pyruvate를 가하여 산화적 독성으로 초래된 apoptosis에 대한 억제효과를 조사하였으며, 이것의 환원형태인 lactate의 apoptosis 과정에 대한 효과를 규명하여 이들의 apoptosis 과정에 있어서 대사적인 역할을 비교분석하였다. 또한, 본 연구에서는 미토콘드리아 내부로 pyruvate의 이동을 방해시키는 COHC를 사용하여 pyruvate의 apoptosis에 대한 억제효과에 있어서 미토콘드리아내에서의 pyruvate의 역할을 밝히고자 하였다.

본 연구에서는 혈관내피세포인 BPAECs가 과산화수소의 산화적 독성에 의하여 세포죽음을 유발시키는 apoptosis 과정이 pyruvate와의 세포배양에 의하여 pyruvate의 dose response 형태로 억제되는 것을 보여주었다. 그러나, lactate는 오히려 apoptosis 과정을 가중시키는 것으로 나타났다. 여기서 산화적 독성에 의하여 초래되는 apoptosis 과정에서 pyruvate와 lactate의 대사적인 역할이 현저히 다르다는 것을 알 수 있다. 또한, COHC의 연구결과는 apoptosis 과정에 미토콘드리아에서의 pyruvate가 관여한다는 사실을 암시하고 있다. 그러나, 세포질내에서 glu-

tathione system과 관련된 작용기전도 관여할 수 있다는 것을 배제할 수는 없다. 따라서, pyruvate는 혈관내피세포의 산화적 독성을 제거하는 기능을 가지므로 혈관손상을 억제하는 데에 임상적인 활용가능성을 제시하고 있다.

Literature cited

- 1) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 : 1456-1462, 1995
- 2) Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15 : 7-13, 1993
- 3) Sarafian TA, Bredesen DE. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Rad Res* 21 : 1-8, 1994
- 4) Hockenbery DM, Olivai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75 : 241-251, 1993
- 5) Kang YH, Mallet RT, Bunger R. Coronary autoregulation and purine release in normoxic heart at various cytoplasmic phosphorylation potentials : disparate effects of adenosine. *Pflugers Arch* 421 : 188-199, 1992
- 6) Mallet RT, Hartman DA, Bunger R. Glucose requirement for postischemic recovery of perfused working heart. *Eur J Biochem* 188 : 481-493, 1990
- 7) Mallet RT, Bunger R. Energetic modulation of cardiac inotropism and sarcoplasmic reticular calcium uptake. *Biochim Biophys Acta* 1224 : 22-32, 1994
- 8) Hasenfuss G, Hermann P. Influence of pyruvate on hemodynamics and calcium cycling in failing human hearts. *Circulation* 96 : 1-524, 1997
- 9) Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89 : 271-277, 1986
- 10) Arends MJ, Moris RG, Wyllie AH. Apoptosis : the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136 : 593-608, 1990
- 11) Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha : modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 214 : 584-594, 1994
- 12) Harwood AJ. Basic DNA and RNA protocols. *Methods in molecular biology*. vol 58 : pp3-21, Human Press Inc., Totowa, NJ 1996
- 13) Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis : distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Ann* 17 : 229-259, 1982
- 14) Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis : association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142 : 67-77, 1984
- 15) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493-501, 1992
- 16) Bunger R, Mallet RT. Mitochondrial pyruvate transport in working guinea pig heart. Work-related vs. carrier-mediated control of pyruvate oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1151 : 223-236, 1993
- 17) Berliner JA, Terno, MC, Almada L, Carter A, Shafonsky E, Fogelman AM. Monocyte chemotactic factor produced by large vessel endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis* 6 : 254-258, 1986
- 18) Buonassisi V, Bentner JC. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 1612-1616, 1976
- 19) Gardner AM, Xu FH, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tu Y, Lichtenstein A. Apoptotic vs nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Rad Biol Med* 22 : 73-83, 1997

- 20) Kashiwagi A, Nishio Y, Asahina T, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, Takahara N, Taki H, Obata T, Hidaka H, Saeki Y, Kikkawa R. Pyruvate improves deleterious effects of high glucose on activation of pentose phosphate pathway and glutathione redox cycle in endothelial cells. *Diabetes* 46 : 2088-2095, 1997
- 21) Lizard G, Moisant M, Cordelet C, Monier S, Gambert P, Lagrost L. Induction of similar features of apoptosis in human and bovine vascular endothelial cells treated by 7-ketocholesterol. *J Pathol* 183 : 330-338, 1997
- 22) Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 341 : 1251-1254, 1993
- 23) Corretti MC, Korestsune Y, Kusuoka H, Chacko VP, Zweier JL, Marban E. Glycolytic inhibition and calcium overload as consequences of exogenously-generated free radicals in rabbit heart. *J Clin Invest* 88 : 1014-1025, 1991
- 24) Goldhaber JL. Free radicals enhance $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol* 271 : H823-H833, 1993