

Murine macrophage RAW264.7에서 과산화수소가 유발형 산화질소 합성효소의 발현에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

안중현, 송정섭

= Abstract =

The Effect of Hydrogen Peroxide on Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Murine Macrophage RAW264.7 Cells

Joong Hyun Ahn, M.D., Jeong Sup Song, M.D..

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Nitric oxide is a short-lived effector molecule derived from L-arginine by the nitric oxide synthase(NOS). Nitric oxide plays a role in a number of physiologic and pathophysiologic functions including host defense, edema formation, and regulation of smooth muscle tone. Some kinds of cells including macrophage are known to produce large quantities of nitric oxide in response to inflammatory stimuli such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and lipopolysaccharide(LPS). Reactive oxygen species are also known to be important in the pathogenesis of acute cell and tissue injury such as acute lung injury model.

Methods : Using the RAW264.7 cells, we have examined the ability of oxidant hydrogen peroxide(H₂O₂) to stimulate nitric oxide production and inducible NOS mRNA expression. Also, we have examined the effects of NOS inhibitors and antioxidants on H₂O₂ induced nitric oxide production.

Results : Stimulation of RAW264.7 cells with combinations of 100 ng/ml IL-1 β 100 ng/ml TNF- α and 100 U/ml IFN- γ or 100 U/ml IFN- γ and 1 μ g/ml LPS induced the synthesis of nitric oxide as measured by the oxidation products nitrite(NO₂⁻) and nitrate(NO₃⁻). Addition of 250 μ M-2 mM H₂O₂ to the cytokines significantly augmented the synthesis of NO₂⁻ and NO₃⁻ (p<0.05). When cells were incubated with increasing concentrations of H₂O₂ in the presence of IL-1 β TNF- α and IFN- γ at constant level, the synthesis of NO₂⁻ and

Address for correspondence :

Ahn Joong Hyun, M.D.

Department of Internal Medicine, Our Lady of Mercy Hospital

#665 Bupyung-Dong, Bupyung-Gu, Incheon, 403-016, Korea

Phone : 032-510-5500-5608 Fax : 032-510-5683 E-mail : ajhcmcim@netsgo.com; ajhcmcim@cmc.cuk.ac.kr

NO_3^- was dose-dependently increased ($p < 0.05$). N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), dose dependently, significantly inhibited the formation of NO_2^- and NO_3^- in cells stimulated with LPS, IFN- γ and H_2O_2 at constant level ($p < 0.05$). Catalase significantly inhibited the H_2O_2 -induced augmentation of cytokine-induced NO_2^- and NO_3^- formation ($p < 0.05$). But, boiled catalase did not produce a significant inhibition in comparison with the native enzyme. Another antioxidant 2-mercaptoethanol and orthophenanthroline dose-dependently suppressed NO_2^- and NO_3^- synthesis ($p < 0.05$). Northern blotting demonstrated that H_2O_2 synergistically stimulated the cytokine-induced iNOS mRNA expression in RAW264.7.

Conclusion : These results suggest that H_2O_2 contributes to inflammatory process by augmenting the iNOS expression and nitric oxide synthesis induced by cytokines. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 172-183)

Key words : Nitric oxide, Hydrogen peroxide, Inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA.

서 론

산화질소는 대식세포, 호중구, Kupffer cell, 성상세포, 미세아교세포, 관절연골세포 및 혈관평활근세포 등에서 산화질소 합성효소가 L-arginine을 전구물질로 이용하여 생성되며¹⁻³ 혈관의 이완, 신경전달, 혈액응고, 종양세포나 기생생물에 대한 숙주면역계의 방어기능 등을 나타내고 염증반응의 매개물로도 작용한다⁴⁻⁶. 특히 폐내의 폐포 상피세포, 폐동맥 평활근세포, 폐포 대식세포 등에서 생성되는 산화질소는 기도이완과 외부자극에 대한 기도과민반응 및 기도염증 등에 관여한다^{7,8}.

대식세포가 내독소(endotoxin)나 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β) 및 interferon- γ (IFN- γ) 등의 자극에 의해 활성화되면 superoxide와 과산화수소 등 반응성 산소대사물질(reactive oxygen species)을 분비하게 되는데, 이들에 의해서 대식세포활성화가 진행되고 미생물 살균효과와 세포용해기능 등을 나타낸다⁹. 또한 자극된 대식세포에서는 산화질소합성이 증가하고 그 산화물인 nitrite(NO_2^-)와 nitrate(NO_3^-)도 증가하며, 반응성 산소대사물질과 산화질소가 반응하여 peroxynitrite (ONOO^-)를 형성하는데^{10,11} 이들이 단백질의 tyrosine을 질소화시키고 sulfhydryl기를 산화시키며 세포

막지질을 과산화시켜서 세포손상에 결정적인 역할을 한다^{12,13}.

산화질소와 그 산화물의 합성은 세포내에서 유발형 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)에 의해서 이루어지는데 여러가지 cytokine들과 세균내독소 등의 자극으로 세포내 산화질소합성이 증가된다¹⁴⁻¹⁶.

과산화수소(H_2O_2)는 상대적으로 비반응성의 산소류로서 철이온(Fe^{2+})이나 구리이온(Cu^{2+})이 존재할 때 세포내로 수동적으로 들어가서 반응성이 큰 hydroxyl radical로 전환되거나¹⁷ 항산화제인 catalase에 의해 물(H_2O)과 산소(O_2)로 전환된다. 반응성 산소대사물질이 세포와 조직손상의 대표적인 호흡기 모델인 급성폐손상에서도 세포손상의 병태생리기전에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는바^{18,19}, 이러한 대표적인 산화물인 과산화수소가 유발형 산화질소 합성효소의 발현과 산화질소의 생산에 어떤 영향을 주는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 마우스 대식세포주 RAW264.7의 배양 및 자극

마우스 대식세포주인 RAW264.7(ATCC, Rock-

ville, MD)을 L-glutamine(2 mM), penicillin(100 U/ml)-streptomycin(100 $\mu\text{g/ml}$; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 5% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; Gibco)등을 포함한 RPMI 1640(JRH Biosciences, Lenexa, KS)배지의 플라스크에 넣어 37°C, 95% air, 5% CO₂ 배양기에서 증식 배양한 후 여러개의 60-mm dish(Falcon, Lincoln Park, NJ)에 1×10^7 개의 RAW264.7 세포를 각각 분주하고 다음과 같은 조건으로 24시간 또는 48시간 동안 자극한 후 Northern analysis하였고 그 상청액에서 nitrite와 nitrate를 측정하였다. 즉, cytokine 자극군에서 그 자극 농도는 Robbins들²⁰의 실험에서 자극하였던 cytokine 농도를 참고하여 각각의 농도는 100 ng/ml IL-1 β (Endogen, USA), 100 ng/ml TNF- α (Biosource, USA), 100 U/ml IFN- γ (Gibco), 1 $\mu\text{g/ml}$ E. coli LPS(serotype 0128:112; Sigma)로 하여(Lyons et al, 1992; Lorsbach et al, 1993) 대조군(1군), IL-1 β +TNF- α +IFN- γ 자극군(2군), IL-1 β +TNF- α +IFN- γ +H₂O₂ 자극군(3군), IFN- γ +LPS 자극군(4군), IFN- γ +LPS+H₂O₂ 자극군(5군)으로 하였다. 또한 산화질소 형성에 대한 L-NAME의 효과를 알아보고자 L-NAME의 농도를 500 μM , 1 mM, 2 mM, 4 mM로 나누어 내독소, cytokine, H₂O₂와 같이 자극하였다. 항산화제 실험에서는 cytokine, H₂O₂ 자극에 catalase와 boiled catalase를 추가 자극하였고, mercaptoethanol, phenanthroline을 3시간 전처리한 후 cytokine과 H₂O₂로 자극하였다.

2. iNOS cDNA 탐식자(probe) 제작

RAW264.7 세포로부터 Ultraspec™-II RNA Isolation System(Biotechx, Houston, Texas, USA)을 이용하여 RNA를 분리하고 1st strand cDNA synthesis Kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 역전사반응을 시켰다. 즉, 역전사반응은 1 μg RNA sample에 100 mM Tris와 500 mM

KCl(pH 8.3)를 포함한 10 \times reaction buffer 2.0 μl , 25 mM MgCl₂ 4.0 μl , dNTP(10 mM) mix 2.0 μl , RNase inhibitor 1.0 μl (50 unit), AMV 역전사효소 0.8 μl 그리고 Oligo-p(dT)₁₅ primer 2.0 μl , gelatin 0.4 μl 를 섞어서 vortex하고 원심 분리한 후 25°C에서 10분간 반응시키고 이어서 42°C 60분, 99°C 5분, 4°C 5분 반응시킨 후 -20°C에 보관하였다. 이 중 cDNA 5 μl 를 PCR DIG Probe Synthesis Kit(Boehringer Mannheim)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)에 사용하였다. 즉 PCR은 cDNA 5 μl 에 MgCl₂를 포함한 10 \times PCR buffer 2 μl , dNTP mixture(200 μM) 4 μl , DIG-[11]-dUTP (70 μM) 1.4 μl , 3' primer(20 μM) 2 μl , 5' primer(20 μM) 2 μl , Taq polymerase(0.5 U) 1 μl , sterile water 5.6 μl 를 넣고 light mineral oil(Sigma)을 한방울 넣은 후 Turbo thermal cycler™(Bioneer, Korea)를 이용하여 시행하였으며 이 때 사용한 primer들은 다음 Table 1과 같다.

Thermal cycler는 94°C에서 1분간 predenature 시키고, denaturation은 94°C에서 45초, annealing은 55°C에서 45초, elongation은 72°C에서 60초로 조정하였고 총 35 cycle을 시행한 후 10 μl 의 sample로 1.0% 한천겔에 전기영동한 후 ethidium bromide(Sigma)로 염색하여 단일 띠를 확인하고 제작물 크기를 확인하였다.

3. 산화질소 산화물(Nitrite와 Nitrate)의 측정

위와 같이 각기 다른 조건하에 24-48시간 자극한 후 세포군의 상청액을 수집하여 형성된 산화질소의 지표로서 nitrite(NO₂⁻)와 nitrate(NO₃⁻)를 측정하였다.

1) nitrite의 측정

RAW264.7 세포에 cytokine과 H₂O₂등으로 자극한 후 그 상청액을 각각 400 μl 씩 취하고 control로는

Table 1. Molecular sequences and expected length (in bp) of RT-PCR products for iNOS and β -actin primers in this study

		Sequences (5' → 3')						Size (bp)
iNOS	CAC	AAG	GCC	ACA	TCG	GAT	TTC	741
	TGC	ATA	CCA	CTT	CAA	CCC	GAG	
β -actin	TCC	TGT	GGC	ATC	CAT	GAA	ACT	187
	CTT	CGT	GAA	CGC	CAC	GTG	CTA	

RPMI 1640을 400 μ l 취한 후 Griess reagent²¹를 이용하여 diazo chromophore가 생기는 것을 spectrophotometer(UV-240, Graphicord, Shimadzu, Japan)로 530, 540, 550 nm에서 absorbance를 측정하여 nitrite standard와 비교하여 측정했다. 표준 곡선은 sodium nitrite(Sigma)를 0.1 μ M 농도부터 1000 μ M 농도까지 만들어 이용하였다.

2) nitrite 와 nitrate의 측정

Nitrate는 aspergillus에서 얻은 nitrate reductase (최종농도 0.1 U/ml; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)를 이용하여 nitrite로 환원시킨 뒤 Griess reaction을 이용하여 측정하였다. Nitrate reductase의 조효소로 NADPH(최종농도 50 μ M; Calbiochem)를 이용하여 2시간 동안 반응시켰으며 nitrite와 nitrate의 양은 μ M/10⁷ cells로 표시했다.

4. 유발형 산화질소 합성효소(iNOS) mRNA의 발현

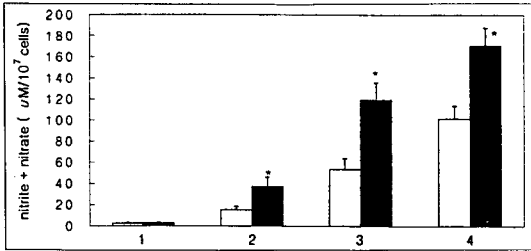
1) 총 RNA 분리

RNA의 추출방식은 Chomczynski와 Sacchi의 방법²²에 따라 Ultraspec™-II RNA isolation system (Biotecx, Houston, Texas, USA)을 이용하여 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출법으로 하였다. 추출된 RNA의 양과 순도를 spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서 absorbance를 측정하여 정량하였다.

2) Northern Analysis

동량의 RNA(10 μ l)에 25 μ l의 RNA loading

buffer를 넣고 끓는 물에 5분간 가열한 후 급히 얼음 위에 방치하고 37% formaldehyde(Sigma)를 함유한 1.0% 한천겔에 loading한 후 5 volts/cm로 1-2 시간 정도 전기영동하여 bromophenol blue dye가 겔판의 3/4정도 이동하게 하였다. 겔 판을 이동분하여 일부는 ethidium bromide로 염색하여 자외선조사하에 18S, 28S rRNA band를 확인하였다²³. 다른 겔판은 10x SSC(1.5 M NaCl, 0.15 M Na-citrate)에 10분 동안 3번 세척하여 formaldehyde를 제거한 후 모세관 전이법을 이용하여 Nylon 막(Nylon membranes, positively charged, Boehringer Mannheim)에 밤새도록 이동시켰다. 그 후 Nylon 막을 2x SSC에 5분 동안 세척하고 건조시킨 후 UV Crosslinker(FB-UVXL-1000, Fisher Biotech, USA)로 교차결합(crosslink)시켰다. 이를 5 ml의 전교잡 용액(prehybridization solution; 50% formamide, 5x SSC, 2% blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 50 mM sodium phosphate, 7% SDS)으로 500C에서 1시간 동안 Hybridization incubator(HI-16000, Tyler, Canada)를 이용하여 전교잡 시키고 나서 전교잡 용액을 버린 뒤 열로 변성시킨 DIG(digoxigenin)-labeled iNOS probe를 넣어 50°C에서 밤새도록 반응시켰다. 실온에서 washing solution(solution I: 1x SSC/0.1% SDS 10분, solution II: 0.1x SSC/0.1% SDS 15분)으로 수세하고 alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG Fab fragment(1:10,000)로 30분간 반응시키고 CSPD(chemiluminescence substrate)용액에 15분간 반응시킨 후 화학발광신호를 X-선 필름(Fuji, HR, Japan)에 감광시켰다. 각 lane간의 오



IL-1β	-	+	+	-
TNF-α	-	+	+	-
IFN-γ	-	-	+	+
LPS	-	-	-	+

Fig. 1. Nitrite and nitrate production in response to cytokines with or without H₂O₂. Cells were incubated with combinations of 100 ng/ml IL-1β, 100 ng/ml TNF-α, 100 U/ml IFN-γ, or 1 µg/ml lipopolysaccharide (LPS) (open bars) for 24h. Cells were also stimulated with same combinations plus 2 mM H₂O₂ (solid bars). Results are means ± SE; n = 4 experiments. *p < 0.05 cytokine pair vs. same cytokine pair with H₂O₂.

차를 줄이기 위하여 β-actin probe를 교잡시킨 후 자가방사기록을 하여 각각의 iNOS band와 비교하였다.

5. 통계분석

모든 측정치는 평균과 표준오차로 표시하였고 각 실험군과 대조군에서 nitrite와 nitrate 측정치를 비교 분석하기 위해서 Sigma Plot for Windows Version 3.0 프로그램을 이용하여 Student's t-test를 하였으며 그 통계학적 유의 수준은 p < 0.05로 하였다.

결 과

1. RAW264.7 세포주에서 cytokine과 과산화수소 자극에 의한 산화질소 형성

Cytokine을 주지 않은 control군에서 NO₂⁻ + NO₃⁻

의 양은 2.8 ± 0.6 µM/10⁷ cells 이었고 H₂O₂를 추가하였을 때 3.1 ± 1.1 µM/10⁷ cells로 큰 변화가 없었다. 그러나 IL-1β, TNF-α로 24시간 자극했을 때 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 15.7 ± 3.2 µM/10⁷ cells에서 H₂O₂를 추가했을 때 37.4 ± 8.7 µM/10⁷ cells로 2배 이상 증가하였다. 또한 IL-1β, TNF-α, IFN-γ로 자극했을 때 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 53.8 ± 10.1 µM/10⁷ cells로 더욱 증가하였고 여기에 H₂O₂를 추가했을 때 120.0 ± 16.1 µM/10⁷ cells로 2배 이상 유의하게 증가하였다. LPS와 IFN-γ로 자극했을 때 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 101.8 ± 12.3 µM/10⁷ cells였는데 여기에 H₂O₂를 추가했을 때 170.8 ± 16.8 µM/10⁷ cells로 1.7배 정도 증가하였다(Fig. 1).

2. RAW264.7 세포주에서 과산화수소의 자극농도에 따른 산화질소 형성

RAW264.7 세포주에 IL-1β, TNF-α, IFN-γ로 48시간 자극했을 때 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 48.6 ± 9.4 µM/10⁷ cells이었고 여기에 추가로 자극하는 H₂O₂의 농도를 250 µM, 500 µM, 1 mM, 2 mM로 증가시켰을 때 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 각각 60.1 ± 8.3, 99.4 ± 13.7, 121.5 ± 12.4, 135.6 ± 28.3 µM/10⁷ cells로 증가하여 H₂O₂농도 증가에 따라 산화질소 생산도 유의하게 증가함을 보여주었다(Fig. 2).

3. RAW264.7 세포주에서 Cytokine과 세균내독소로 유발된 산화질소 형성에 대한 NG-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)의 효과

LPS와 IFN-γ로 24시간 자극한 군에서 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 148.6 ± 19.4 µM/10⁷ cells 이었고 비특이적 유발형 산화질소 합성효소억제제[®]인 L-NAME의 농도를 각각 500 µM, 1 mM, 2 mM, 4 mM로 하여 LPS, IFN-γ와 같이 자극하였을 때 생산된 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 101.2 ± 15.6, 75.3 ± 7.8, 51.7 ± 4.2, 44.5 ± 10.3 µM/10⁷ cells로 L-NAME의 농도를

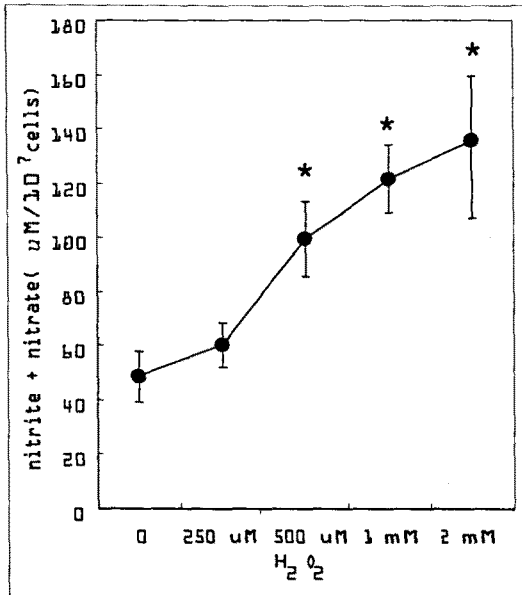


Fig. 2. Dose-response relationship of \cdot NO production depending on the H_2O_2 concentrations. Cells were stimulated with combinations of 100 ng/ml $IL-1\beta$, 100 ng/ml $TNF-\alpha$, and 100 U/ml $IFN-\gamma$ and increasing concentrations of H_2O_2 for 48h. Results are means \pm SE; $n=3$ experiments. * $p<0.05$ combination of cytokines vs. combination of cytokines plus H_2O_2 .

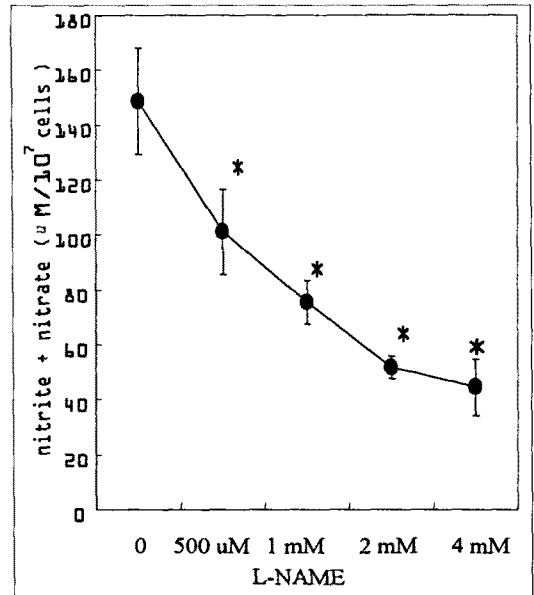


Fig. 3. Inhibition of $IFN-\gamma$ and LPS induced \cdot NO production by L-NAME (depending on the NG-nitro-L-arginine methyl ester) concentrations. Cells were stimulated with 1 μ g/ml LPS plus 100 U/ml $IFN-\gamma$ and increasing concentrations of L-NAME for 24h. Results are means \pm SE; $n=3$ experiments. * $p<0.05$ LPS plus $IFN-\gamma$ vs. LPS and $IFN-\gamma$ plus L-NAME.

증가시킬수록 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

4. RAW264.7 세포주에서 cytokine과 과산화수소로 유발된 산화질소 형성에 대한 NG-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)의 효과

RAW264.7 세포주를 $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ 로 24시간 자극한 군에서 $NO_2^- + NO_3^-$ 의 양은 $48.9 \pm 5.0 \mu M/10^7$ cells 이었고, 이 조건에 2 mM H_2O_2 자극을 같이 주었을 때 $101.9 \pm 9.1 \mu M/10^7$ cells로 증가하였다. 이들 cytokine과 H_2O_2 자극에 더하여 L-NAME의 농도를 각각 1 mM 과 2 mM로 나누어 추가 자극하였을 때 $NO_2^- + NO_3^-$ 의 양은 59.6 ± 14.3 ,

$35.0 \pm 9.4 \mu M/10^7$ cells로 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

5. cytokine과 과산화수소로 자극된 RAW264.7 세포주에서 항산화제가 산화질소 형성에 미치는 효과

$IL-1\beta$, $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ 등의 cytokine으로 RAW264.7 세포를 48시간 자극했을 때 생산된 $NO_2^- + NO_3^-$ 의 양은 $48.4 \pm 6.1 \mu M/10^7$ cell이었고, 여기에 H_2O_2 자극을 추가하였을 때 $138.6 \pm 18.3 \mu M/10^7$ cells로 유의하게 증가하였다. 또한 이 cytokine과 H_2O_2 자극에 추가로 3,000 U/ml의 catalase를 넣고 자극했을 때 $NO_2^- + NO_3^-$ 의 양은 $53.6 \pm 10.2 \mu M/10^7$

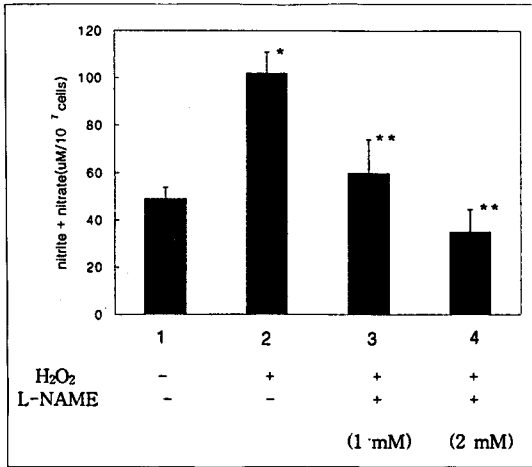


Fig. 4. Inhibition of H₂O₂ induced \cdot NO production by L-NAME. In column 1, cells were stimulated with combinations of 100 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml TNF- α , and 100 U/ml IFN- γ for 24h. In column 2, cells were stimulated with same cytokines plus 2 mM H₂O₂. In column 3, \cdot NO induced by cytokines and H₂O₂ was inhibited by 1 mM L-NAME. In column 4, \cdot NO was also inhibited by 2 mM L-NAME. Results are means \pm SE; n=3 experiments. *p<0.05 IL-1 β , TNF- α , IFN- γ vs. same cytokines plus H₂O₂. ** p<0.05 same cytokines plus H₂O₂ vs same cytokines plus H₂O₂ plus L-NAME.

cells로 감소하여 catalase가 H₂O₂의 산화질소 형성에 대한 증강효과를 억제하였다. 반면에 boiled catalase를 넣어 자극하였을 때는 NO₂⁻+NO₃⁻의 양이 146.9 \pm 14.4 μ M/10⁷ cells로 H₂O₂의 산화질소 형성에 대한 증강효과를 억제하지 못하였다(Fig. 5). Mercaptoethanol과 phenanthroline을 각기 다른 농도로 준비하여 3시간 전처리 시킨 후 IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , H₂O₂로 48시간 동안 자극시켜 보았을 때 생산된 NO₃⁻+NO₂⁻의 양은 이들 항산화제의 농도가 높을수록 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

6. RAW264.7 세포주에서 과산화수소에 의한 유 발형 산화질소 합성효소 mRNA 발현

Northern analysis로 iNOS mRNA의 발현을 보았

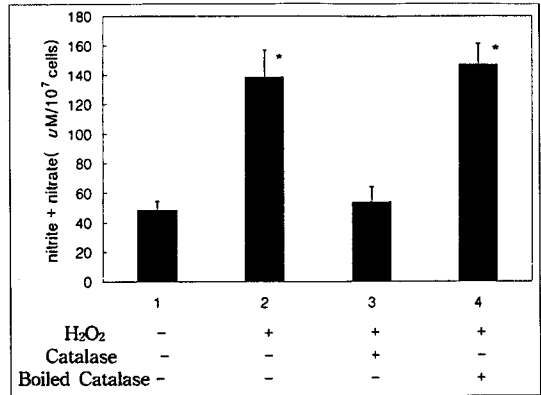


Fig. 5. Effect of catalase on \cdot NO production in response to stimulation with H₂O₂. In *col-umn 1*, cells were stimulated with combinations of 100 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml TNF- α , and 100 U/ml IFN- γ for 48h. In column 2, cells were stimulated with same cytokines plus 2 mM H₂O₂. In column 3, the addition of 3,000 U/ml catalase to same cytokines plus H₂O₂ blocked the effect of H₂O₂. In column 4, boiled catalase did not block the effect of H₂O₂. Results are means \pm SE; n=3 experiments. *p<0.05 cytokines vs. cytokines plus H₂O₂, and cytokines vs. cytokines plus H₂O₂ plus boiled catalase.

을 때 아무런 자극도 가하지 않은 경우에 iNOS mRNA는 거의 보이지 않았고 IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 로 자극시에 뚜렷하였으며, 이 cytokine 자극에 H₂O₂를 추가 자극했을 때 iNOS mRNA 발현은 더욱 증강되었다. 또한 LPS와 IFN- γ 에 추가로 H₂O₂ 자극을 하였을 때 iNOS mRNA의 발현은 가장 높게 증가하였고(Fig. 7) 이런 결과는 자극된 세포의 상청액에서 측정된 nitrite+nitrate의 양(Fig. 1)과도 잘 부합되었다.

고 찰

산화질소는 작고 비교적 불안정하고 독성이 있는 free radical중의 하나로서 과거에는 석탄이나 석유가 연소되면서 생성되는 공해물질 정도로 인식되었으나³

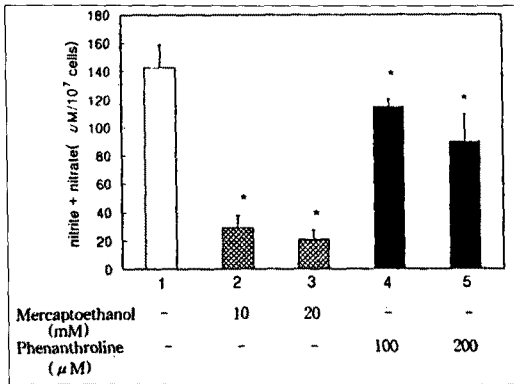


Fig. 6. Effect of antioxidants on cytokine and H_2O_2 induced $\cdot NO$ production. In column 1 (open bar), cells were stimulated with 100 ng/ml IL- 1β 100 ng/ml TNF- α 100 U/ml IFN- γ plus 2 mM H_2O_2 for 48h. Cells were pretreated with 2-mercaptoethanol for 3h as follows(latched bars) : column 2, 10 mM; column 3, 20 mM. Cells were pretreated with phenanthroline for 3h as follows(solid bars) : column 4, 100 μM ; column 5, 200 μM . Medium was replaced with same cytokines plus 2 mM H_2O_2 , and the cells were incubated for 48h. Results are means \pm SE; n=3 experiments. *p<0.05 cytokine plus H_2O_2 vs. cytokines plus H_2O_2 plus antioxidants.

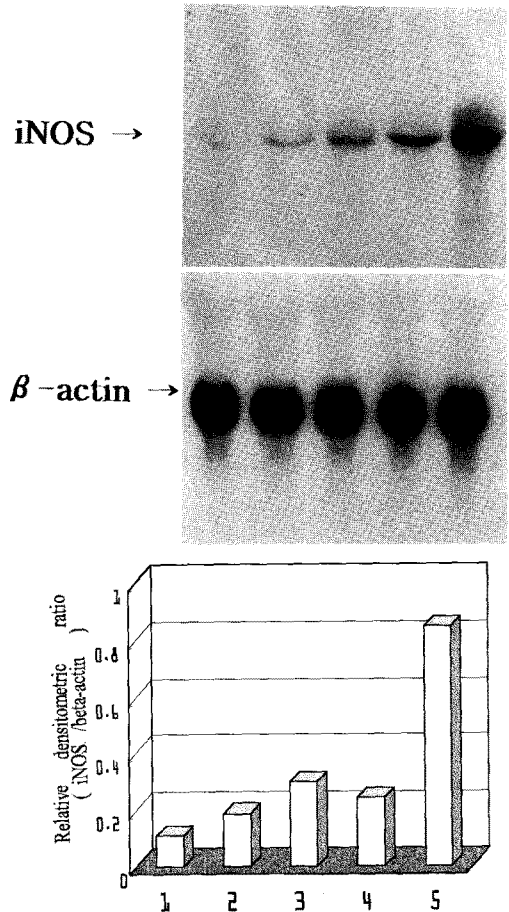


Fig. 7. Northern analysis of iNOS mRNA.

- lane 1 ; unstimulated
- lane 2 ; 100 ng/ml IL- 1β 100 ng/ml TNF- α plus 100 U/ml IFN- γ
- lane 3 ; 100 ng/ml IL- 1β 100 ng/ml TNF- α 100 U/ml IFN- γ plus 2 mM H_2O_2
- lane 4 ; 1 μg /ml LPS plus 100 U/ml IFN- γ
- lane 5 ; 1 μg /ml LPS, 100 U/ml IFN- γ plus 2 mM H_2O_2

1980년대 들어 Furchgott²⁴는 acetylcholine이 혈관을 이완시키는 이유를 혈관내피세포에서 유리되는 endothelium derived relaxing factor(EDRF)가 주위 평활근에 퍼져나가서 혈관을 이완시킴을 보고하였고 Palmer²⁵과 Ignarro²⁶이 EDRF가 바로 산화질소($\cdot NO$)라는 것을 시사하였다. 그후 산화질소의 다양한 기능이 연구되었는데 즉, 신경전달, 혈압의 조절 및 혈소판 응집억제, 중앙세포나 세포내 기생생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능과 체내의 염증반응 외에도 패혈증 등 여러 질환에 관여하는 것이 알려졌다.^{14, 27, 28.}

산화질소는 산화질소 합성효소(NOS)가 L-arginine을 전구물질로 이용하여 만들어지고 이러한 작용은

L-arginine과 비슷한 모양을 갖는 NG-monomethyl-L-arginine(NGMMA)에 의해 소멸됨이 알려져 이 물질이 산화질소 합성효소 억제제임이 알려졌다²⁹. 최근에는 산화질소와 그 산화물들 및 반응성 산소 대사 물질들이 여러 가지 염증성 조직손상시에 그 손상 반응

의 매개물로서 중요성이 커지고 있는데^{30,31}, 역으로 항산화제와 산화질소 합성효소 억제제등을 투여하여 실험적으로 관절염, 만성 소화기 염증질환 및 면역 복합체로 인한 폐손상의 모델들에서 염증과 조직손상을 줄일 수 있다고 보고되었다³².

NOS는 다양한 세포에서 여러 가지 자극에 의해 발현되어 산화질소를 생산하는데 각각의 세포에서 자극되는 시간과 신호전달체계 및 산화질소 생산량이 다르다^{1,20,25}. 예로 신경세포와 내피세포는 calcium에 의존적인 cNOS를 표현하여 자극에 대해 즉시 소량의 산화질소를 생산한다. 반면에 대식세포, 설치류의 EMT-6 선암세포, 간세포 및 활성화된 호중구 등에서는 여러 cytokine과 내독소 자극에 반응하여 iNOS를 발현하며 4-18시간의 지연기를 거쳐 많은 양의 산화질소를 생산한다^{14,16}.

저자들이 RAW264.7 세포주에 IL-1 β TNF- α , IFN- γ , LPS등을 자극했을 때 대조군에 비하여 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 2배 이상 유의하게 증가하였다. IL-1 β 와 TNF- α 로 자극했을 때 보다는 IL-1 β TNF- α IFN- γ 로 복합 자극했을 때와 LPS와 IFN- γ 로 자극했을 때가 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양이 더 높은 것으로 보아 이들 cytokine이 서로 상승효과가 있고 특히 LPS가 산화질소 형성에 가장 큰 자극이 된 것으로 생각된다. 이러한 cytokine의 자극에 H₂O₂를 추가로 자극했을 때 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양은 cytokine만으로 자극했을 때보다 유의하게 2배 이상 증가하였으며, 이때 H₂O₂ 자극농도에 비례하여 NO₂⁻ + NO₃⁻의 양도 증가하였다. 그리고 Northern analysis에서도 H₂O₂의 자극이 추가됨으로써 cytokine과 LPS에 의한 iNOS mRNA 발현이 증가되었다. 저농도의 H₂O₂를 세포에 외적으로 주어 자극할 때 비교적 단기간내에 H₂O₂가 세포에 의해서 대사(catabolized)되어 lag period(4-18시간)가 지나 정작 iNOS 단백질이 발현될 때는 H₂O₂가 거의 없어지므로, H₂O₂가 iNOS cofactor의 형성을 자극해서 iNOS의 합성을 증가시킬 것으로 생각된다.

본 실험 결과에서는 H₂O₂가 염증 환경내에서

cytokine으로 산화질소 형성이 유발되는 것을 더욱 증폭 시켰고, cytokine으로 유발되는 iNOS mRNA의 발현도 증폭시켰다. 이러한 효과는 다른 세포들의 경우에서 알려진 것처럼 부분적이긴 하나 산화제에 민감한 iNOS gene의 전사인자 activator protein-1 (AP-1)과 nuclear factor- κ B(NF- κ B)의 활성화와 연관관계가 있을 가능성이 있다^{33,34}.

Rubanyi³⁵는 O₂⁻와 H₂O₂에 의해서 관상동맥에 산화질소 형성이 증가하고 따라서 관상동맥 확장이 일어나는 현상이 catalase에 의해서 억제된다고 최초로 보고하였다. Catalase는 항산화제로서 본 연구에서 cytokine과 H₂O₂와 catalase를 같이 넣고 세포를 자극했을 때 cytokine으로 유발되는 산화질소 형성에 대한 H₂O₂의 증폭효과를 catalase가 유의하게 억제시켰다. 이것이 catalase의 효소능에 의한 것인지 heme protein이 산화질소와 결합하여 이를 제거했기 때문인지를 확인하기 위해서 boiled catalase를 처치해 보았는데 이 경우에는 효과가 없으므로 catalase가 H₂O₂ 제거에 작용하여 그 효과를 나타낸 것 같다.

본 연구에서는 thiol scavenger인 mercaptoethanol과 metal chelator인 ortho-phenanthroline을 사용하여 RAW264.7 세포에 전처치하고 cytokine과 H₂O₂로 자극하는 실험을 해 보았는데 이들이 cytokine으로 유발된 산화질소 형성에 대한 H₂O₂의 증강효과를 농도에 비례하여 억제하였다. H₂O₂는 세포막을 수동적으로 투과해 들어가 iron-catalyzed Fenton 반응을 거쳐서 반응성이 큰 hydroxyl radical로 대사되는데¹⁷ mercaptoethanol과 ortho-phenanthroline이 이 과정을 억제함으로써 효과를 나타내었다고 생각된다. 즉, H₂O₂를 세포밖에서 자극했을 때 cytokine으로 유발된 산화질소 형성을 증폭시키는 것은 세포밖의 H₂O₂ 자체에 의한 것이 아니고 세포내의 산화제, 아마도 Fenton 반응을 거친 hydroxyl radical이 이러한 효과를 매개했을 가능성도 있다¹⁷.

L-NAME과 L-NG-mono methyl-arginine(L-NMMA)등이 비특이적인 NOS 억제제로 작용하여

산화질소 생산을 억제한다는 사실은 잘 알려져 있으며²⁹ 본 연구에서도 L-NAME의 농도를 높일수록 LPS와 IFN- γ 로 자극된 NO $_2^-$ + NO $_3^-$ 의 생산이 억제되었다. 그러나 cytokine과 H $_2$ O $_2$ 및 L-NAME으로 RAW264.7 세포를 자극한 후 Northern analysis해보았을 때 L-NAME이 iNOS mRNA의 발현을 억제하지는 못하였다(성적을 제시하지 않음).

결론적으로 본 연구에서 H $_2$ O $_2$ 는 cytokine의 iNOS mRNA의 발현유도와 산화질소 생산을 증폭시키며, 이는 염증세포들이 활성화되어 분비하는 H $_2$ O $_2$ 등의 산화물이 cytokine과 내독소로 유발된 염증환경 내에서 산화질소 합성효소를 더욱 자극하여 염증반응을 증폭 및 진행시킬 수 있음을 시사한다.

요 약

연구배경 :

산화질소(\cdot NO)는 여러 세포에서 산화질소 합성효소(NOS)에 의해서 생산되며 다양한 병태생리과정에 관여한다. 여러 cytokine들이 iNOS의 발현을 촉진시키고 산화질소 생산을 증가시킴으로써 염증반응을 증폭시키고 세포와 조직손상을 초래한다고 알려진 바, 과산화수소(H $_2$ O $_2$)가 세포내 NOS의 발현과 산화질소형성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

방 법 :

마우스 대식세포주 RAW264.7에 여러 가지 cytokine과 세균 내독소(LPS)로 자극을 준 세포군과 이에 더하여 H $_2$ O $_2$, NOS 억제제(L-NAME) 및 항산화제(catalase) 등을 사용하여 세포를 자극한 후 생성된 산화질소 산화물의 농도를 측정하고 Northern analysis로 iNOS mRNA의 발현정도를 보아 다음과 같은 성적을 얻었다.

결 과 :

Cytokine과 LPS 자극군에서 대조군보다 \cdot NO 생산이 높았고, 이 자극군에 H $_2$ O $_2$ 를 추가로 자극하였을 때 \cdot NO생산이 2배 이상 유의하게 높았다.

Cytokine자극군에서 H $_2$ O $_2$ 의 자극 농도에 따른

\cdot NO생산은 H $_2$ O $_2$ 의 농도가 증가할수록 유의하게 증가하였다.

LPS와 IFN- γ 자극군에서 L-NAME을 같이 자극 시에 \cdot NO의 양은 L-NAME의 농도증가에 따라 유의하게 감소하였고, Cytokine 및 H $_2$ O $_2$ 자극군에서도 추가로 자극한 L-NAME의 농도증가에 따라 \cdot NO의 양은 유의하게 감소하였다.

Cytokine과 H $_2$ O $_2$ 자극군에 catalase를 같이 자극 하였을 때 \cdot NO의 양은 유의하게 감소했고, Mercaptoethanol과 phenanthroline을 전처리하고 LPS와 IFN- γ 및 H $_2$ O $_2$ 로 자극한 군에서 이들의 전처리한 농도가 높을수록 \cdot NO의 양은 유의하게 감소하였다.

Cytokine자극군과 IFN- γ , LPS 자극군에 H $_2$ O $_2$ 를 추가 자극 후 Northern analysis결과 H $_2$ O $_2$ 는 iNOS mRNA 발현을 현저히 증가시켰다.

결 론 :

이상의 결과로 과산화수소가 cytokine과 내독소 등으로 자극된 마우스 대식세포에서 산화질소생산에 의한 증폭효과를 나타냈고, iNOS mRNA의 발현도 증가시켰음을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Marletta MA, Yoon PS, Iyenger R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite : nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988;27:8706-9.
2. Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. *J Biol Chem* 1989;264:19654-8.
3. Moncada S, Palmer PMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine : A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1709-15.
4. Grisham MB. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. 1st ed. R. G. Landes company, Austin Tx;1992.

5. Moncada S, Palmer PMJ, Higgs EA. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
6. Owens MW, Grisham MB. Nitric oxide synthesis by rat pleural mesothelial cells : Induction by cytokines and lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 1993;265(Lung Cell Mol Physiol 9):L110-6.
7. Heiss LN, Lancaster JR, Crobett JA, Goldman WE. Epithelial autotoxicity of nitric oxide : role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:267-70.
8. Jain B, Rubinstein I, Robbins RA, Sisson JH. TNF- α and IL-1 upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;191:83-8.
9. Borm PJA, Henderson PT. Symposium on health effects of occupational exposure to inorganic dusts. *Exp Lung Res* 1990;16:1-3.
10. Blough NV, Zafirio OC. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg Chem* 1985;24:3502-4.
11. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BD. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620-4.
12. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:446-51.
13. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268(Lung Cell Mol Physiol 12):L699-722.
14. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1992;266(Endocrinol Metab 29):E829-39.
15. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992;256:225-8.
16. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Synder SH, Russell SW. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. *J Biol Chem* 1993;268:1908-13.
17. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 1994;74: 139-62.
18. Cantin A, Dubois F, Begin R. Lung exposure to mineral dusts enhances the capacity of lung inflammatory cells to release superoxide. *J Leucocyte Biol* 1988;43:299-306.
19. Petruska JM, Marsh J, Bergeron M, Mossman BT. Brief inhalation of asbestos compromises superoxide production in cells from bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990;2:129-36.
20. Robbins RA, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Battered LDK, Wilson AJ, et al. Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;198:835-43.
21. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannerbaum SR. Analysis of nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
22. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
23. Milligan SA, Owens MW, Henderson RJ, Grimes SR. Characterization of proteoglycans produced

- by rat pleural mesothelial cells in vitro. *Exp. Lung. Res.* 1995;21:559-75.
24. Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
25. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:523-6.
26. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 9265-9.
27. Epstein FH. Mechanisms of disease: Nitric Oxide. *N Eng J Med* 1993;329(27):2002-11.
28. Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:538-51.
29. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-52.
30. Janssen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993;69:261-74.
31. Churg A, Keeling B, Gilks B, Porter S, Olive P. Rat mesothelial and tracheal epithelial cells show equal DNA sensitivity to hydrogen peroxide-induced oxidant injury. *Am J Physiol* 1995;268: L832-8.
32. Kinnula VL, Everitt JI, Mangum JB, Chang LT, Carpo JD. Antioxidant defense mechanism in cultured pleural mesothelial cells. *Am. J. Respir. Cell mol. Biol.* 1992;7:95-103.
33. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droe W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J Exp Med* 1992;175:1181-94.
34. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promotor of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp med* 1993;177:1779-84.
35. Rubanyi GM, Vonhoute PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1986; 250:H815-21.