

# 폐동맥내피 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포자사

김 범 식\* · 정 주 호\*\*

=Abstract=

## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induces Apoptosis in Calf Pulmonary Artery Endothelial Cells

Bum Shik Kim, M.D.\*, Joo-Ho Chung, M.D.\*\*

**Background:** Although the pathophysiology of pulmonary vascular injury has been reported, exact its mechanism has not yet been elucidated. Recent studies have reported that reactive oxygen species, including hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and superoxide, formed in association with a variety of oxidative stress-related diseases, may play an important role in cell injury and apoptosis. In this study, we investigated whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces apoptosis, a possible mechanism of pulmonary vascular injury. **Material and Method:** The calf pulmonary artery endothelial cell line(CPAE) was used in the experiment. For the measurement of cytotoxicity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay was performed. To find out whether H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> affects cell morphology, cells were examined by phase-contrast microscopy. To confirm the induction of apoptosis, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells were analyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling(TUNEL) assay, 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) staining and flow cytometric analysis. **Result:** Compared to the untreated control(100%), viabilities of cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of concentrations of 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M and 500  $\mu$ M for 3 hours were about 70%, 33%, 26% and 28%, respectively. Morphologically, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells(50  $\mu$ M) showed retraction of processes, cell shrinkage, cytoplasm condensation and irregularity of shape. Both TUNEL assay and DAPI staining also showed typical apoptotic features of nuclear condensation and nuclear fragmentation in some nuclei of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells. Through flow cytometric analysis, it was determined that there was an increased number of cells in the sub-G<sub>1</sub> phase and a decreased number of cells in the G<sub>1</sub> phase among the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells, compared to those of the control. **Conclusion:** Through morphological and biochemical analyses, it was first demonstrated that cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in CPAE showed classic apoptotic features. These results suggest the possibility that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis may, in part, be involved in the molecular mechanism of pulmonary vascular injury.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2000;33:935-40)

---

**Key word :** 1. Endothelial cell  
2. Oxygen  
3. Apoptosis  
4. Pulmonary artery

---

\*경희대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Kyung Hee University

\*\*경희대학교 의과대학 약리학교실

Department of Pharmacology, College of Medicine, Kyung Hee University

논문접수일 : 2000년 9월 14일 심사통과일 : 2000년 10월 30일

책임저자 : 김범식(130-702) 서울특별시 등대문구 회기동1, 경희의료원 흉부외과학교실. (Tel) 02-958-8414, (Fax) 02-958-8410

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

## 서 론

폐손상이나 폐질환 시의 폐기능 장애에서 나타나는 여러 임상 증상 중 일부는 폐혈관 손상과 연관되어 있는 것으로 추측되고 있다. 이러한 폐혈관 손상의 주요한 기전으로 산화성 스트레스에 의한 손상이 설득력 있게 받아들여지고 있다<sup>1,2</sup>. 즉, 세포 내에서 생성된 자유라디칼(free radical)이 세포에 손상을 유발한다는 것이다<sup>3-5</sup>. 최근에는 이러한 산화성 질환의 기전으로 세포자사(apoptosis)가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다<sup>6</sup>. 또한 혈관내피 세포는 혈압과 국소 혈류량의 조절에 관계하고 있으며<sup>7</sup>, 이러한 내피세포는 물리적인 자극 및 혈관 평활근 수축에 영향을 미치는 화학적 신호전달에 반응한다고 알려져 있다<sup>8</sup>. 이에 본 연구에서는 배양한 소의 폐동맥내피 세포에 산화성 스트레스를 유발한다고 알려진 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 투여하여, 폐혈관세포의 손상 기전의 하나로 생각되는 세포자사를 유발하는지를 연구하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 시약

세포 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS) 등은 GibcoBRL(USA)에서 구입하였으며, propidium iodide(PI)와 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)는 Sigma(USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) kit는 Roche(Germany)에서, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling(TUNEL) assay는 Intergen(USA) 회사의 ApopTag<sup>®</sup> in situ apoptosis detection kit를 사용하였으며, 일반 시약은 Sigma 제품을 이용하였다.

### 2. 세포배양

실험에 사용한 세포주는 소의 폐혈관내피 세포(CPAE; calf pulmonary arterial endothelial cells)로 폐동맥의 수축, 이완기전, 약물 반응 등의 연구에 널리 사용되는 세포주이며, 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였다. 세포의 배양은 20% FBS가 포함된 DMEM 용액에 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였고, 배양액은 2일마다 교환하였다<sup>9</sup>.

### 3. 세포 독성

CPAE 세포의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 의한 세포독성을 측정하기 위하여, 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 원리를 이용한 Roche(Germany) 회사의 MTT assay kit를 사용하였다. 세포

독성은 ELISA reader로 595 nm과 690 nm에서 측정된 후, 다음의 산출식에 의해 세포 생존율로 나타내었다. 세포생존율(%) = {실험군의 흡광도(595 nm)-실험군의 흡광도(690 nm)/대조군의 흡광도(595 nm)-대조군의 흡광도(690 nm)} × 100. 실험 방법은 CPAE 세포를 96 well plate에 well 당 2×10<sup>4</sup> 세포를 분주하고 배양액 100 μl를 가하여 배양하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 최종 농도가 10 μM, 50 μM, 100 μM, 500 μM이 되도록 처리하였다. 처리 후 1시간, 3시간, 5시간 배양하고 MTT labeling 용액을 10 μl씩 각 well에 가하였다(최종농도 0.5 mg/ml). 세포를 빛에 노출되지 않게 알루미늄 호일로 덮은 후 4시간 동안 배양한 다음 solubilization solution 100 μl를 각 well에 첨가하고, 세포 배양기에서 하룻밤 방치한 후 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 595 nm와 690 nm에서 측정하였다.

### 4. 형태학적 관찰

CPAE 세포를 chamber slide(Nalge Nunc International, USA)에 well당 5×10<sup>4</sup>의 세포수가 되도록 분주하고 배양액 500 μl를 첨가한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 최종 농도가 50 μM이 되도록 처리하였고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 3시간 동안 배양하였다. 4% paraformaldehyde(PFA)를 첨가하여 세포를 고정시킨 후, 75% ethanol에서 5분, 90% ethanol에서 5분, 95% ethanol에서 5분, 100% ethanol에서 5분간(2회) 탈수시키고, xylene으로 처리 후 coverglass로 봉입한 다음 광학 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 또는 CPAE 세포를 60 mm 배양접시에 배양한 후 도립현미경(Nikon, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

### 5. TUNEL staining

Chamber slide에 CPAE 세포와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 형태학적 관찰과 같은 방법으로 처리한 후, Intergen(USA) 회사의 ApopTag<sup>®</sup> in situ apoptosis detection kit를 사용하여 제조회사의 실험방법대로 시행하였다. 먼저 배양액을 제거하고 phosphate-buffered saline(PBS)로 3회 세척 후 4% PFA로 실온에서 10분간 세포들을 고정하였다. PBS로 5분간 2회 세척 후 ethanol:acetic acid(2:1)로 -20°C에서 5분간 후고정 하고 PBS로 5분간 2회 세척을 한 후 proteinase K(20 μg/ml)를 점적하고 37°C에서 10분간 배양하였다. 멸균 된 물로 2회 세척 후 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS를 실온에서 5분간 반응시키고 PBS로 2회 세척 후 equilibration buffer 75 μl를 점적하고 10초 반응시킨 후 제거하였다. Working strength TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase) 효소를 55 μl/5 cm<sup>2</sup> 점적 후 37°C에서 습도를 유지하면서 1시간 동안 반응시키고, working strength stop/wash buffer를 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다. PBS로 3회 세척 후 anti-digoxigenin peroxidase 65 μl/5 cm<sup>2</sup>를 점적 후 습도를

유지하면서 실온에서 30분간 반응시키고, PBS로 4회 세척하였다. 발색제로는 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)과 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 혼합된 용액을 사용하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 6. DAPI staining

Chamber slide의 well에 CPAE 세포를 5×10<sup>4</sup>개 분주하고 배양액 500 μl 첨가하여 배양한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 최종 농도가 50 μM이 되도록 투여한 다음 3시간 동안 배양하였다. 각 well의 배양액을 제거하고 methanol을 사용하여 세척한 후, DAPI(1 μg/ml) 용액에서 30분간 염색하였다. 세포는 372 nm에서 형광현미경(Zeiss, Germany)으로 관찰하였다<sup>10)</sup>.

#### 7. Flow cytometry 분석

CPAE 세포를 5×10<sup>6</sup>개의 세포수가 되도록 분주한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 형태학적 관찰과 같은 방법으로 처리하였다. 3시간 배양 후 세포를 배양액과 모은 후 200×g에서 10분간 원심분리를 하였다. 침전된 세포를 75% ethanol 2 ml을 첨가하여 4℃에서 60분 동안 고정하고, 다시 원심분리를 한 후 PBS로 세척하였다. 세척된 세포에 PI(20 μg/ml) 용액 1 ml을 넣어 부유시키고 100 μg/ml의 RNase를 첨가하였다. 빛을 차단한 상태로 37℃에서 30분 동안 방치한 다음 flow cytometry(Becton Dickinson, USA)로 분석하였다<sup>11)</sup>.

#### 8. 통계학적 분석

모든 실험값은 평균값±표준오차로 하였고, 통계학적 분석은 SAS(Statistic Analysis System) program을 이용하였다. MTT cytotoxicity assay의 결과는 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 이용하였고, 통계적인 유의성은 p<0.05로 하였다.

## 결 과

### 1. MTT 분석에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포독성

CPAE 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 세포독성을 일으킬 수 있는 농도를 알아보고자, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 최종 농도가 10 μM, 50 μM, 100 μM, 500 μM 처리한 각각의 CPAE 세포를 1시간, 3시간 및 5시간 배양하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 하여 MTT 분석을 시행하였다. 각 시간 및 농도별 세포독성은 실험방법에 기재한 세포생존율로 산출하였으며, 대조군의 세포생존율을 100%로 하여 상대 비교하였다. 실험 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 10 μM, 50 μM, 100 μM, 500 μM 농도로 1시간 동안 처리한 세포의 생존율은 각각 약 81.5±4.7, 35.1±6.6, 24.5±2.9, 25.7±2.9이었고, 3시간에서는 각각 70.3±6.1, 33.1

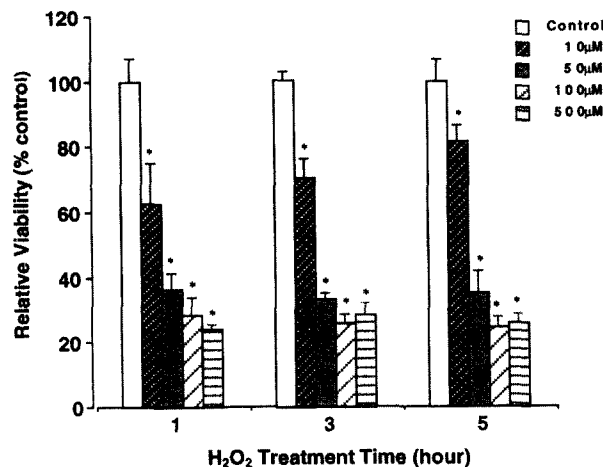


Fig. 1. Dose-dependent effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability. Cellular viability was determined by an MTT assay. Relative viability(% control) is shown as the percentage absorbance of the sample with respect to that of the control(without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Data are represented as mean±SEM(bars). \*: P<0.01 compared with the control.

±1.8, 25.9±2.6, 28.3±3.5로 나타났으며, 5시간에서는 각각 62.6±12.3, 36.3±4.9, 28.5±5.1, 24.3±1.3이었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 실험군에서 시간별, 농도별 모두 대조군에 비해 유의하게 세포독성을 나타내었고 세포독성은 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과를 토대로 추후 실험들에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 50 μM의 농도로 3시간을 처리하였다.

### 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포독성시 세포자사의 확인

형태학적 변화는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시 세포의 수축과 세포질이 응축이 나타났으며, 배양접시의 바닥으로부터 분리되어 각각의 세포가 둥근 형태로 크기가 작아진 조건을 보여주었으며(Fig. 2), 이러한 형태학적 변화들은 세포자사의 특징적인 형태학적 소견들과 일치하였다.

TUNEL assay에서는 세포자사를 일으킨 세포에 특이적으로 존재하는 단편화된 DNA의 유리 3'-OH 말단을 terminal deoxynucleotidyl transferase를 사용하여 digoxigenin-dUTP로 표식한 후, peroxidase를 결합한 anti-digoxigenin 항체로 표식하고 발색기질로 DAB을 사용하였다. 따라서 TUNEL(+) 세포들은 흑갈색으로 염색되어 광학 현미경으로 관찰할 수 있으며, 50 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리한 CPAE 세포에서 핵염색질이 응축되고 DNA 절편이 생성되는 흑갈색으로 염색된 TUNEL(+) 세포들이 관찰되었다(Fig. 3). DAPI staining에서는 세포핵에 특이적으로 염색되는 DAPI 처리 후 형광현미경으로 관찰하였으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시 핵응축, DNA 절편과 핵주변에 작은 세포자사

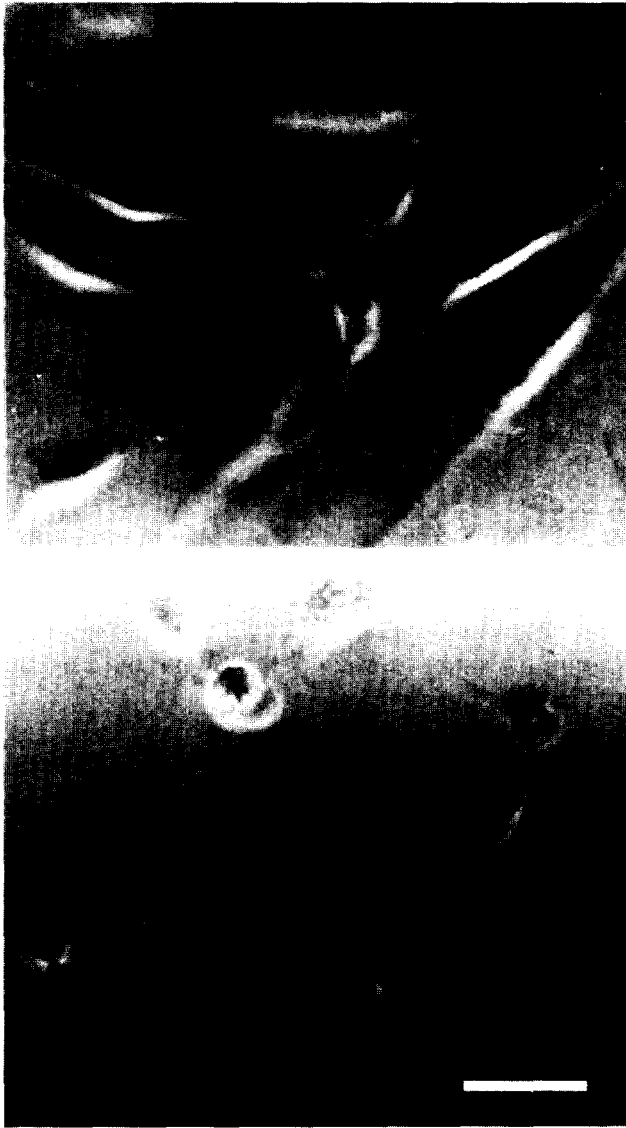


Fig. 2. Effect of  $H_2O_2$  on morphology of calf pulmonary artery endothelial cells. Cells were incubated in control medium or  $H_2O_2$ -treated medium ( $50 \mu M$ ), for 3 hours in each case. Top: control medium. Below:  $H_2O_2$ -treated medium. Scale bar represents  $100 \mu m$ .

소체(apoptotic body)가 형성되었다(Fig. 3). Flow cytometry 분석시  $50 \mu M$ 로 처리한 실험군에서 대조군에 비해 세포주기 중 sub- $G_1$ 이 증가하였으며,  $G_1$  peak가 감소하였다(Fig. 3). 이상의 형태학적 소견과 생화학적 소견들은 세포자사에서 일어나는 특징적인 소견들이며, 따라서  $H_2O_2$   $50 \mu M$  투여시 CPAE 세포에서 세포자사가 일어나는 것을 확인 할 수 있었다.

### 고 찰

폐질환이나 손상시에 나타나는 여러 가지 증상들의 원인

## Control

## $H_2O_2$

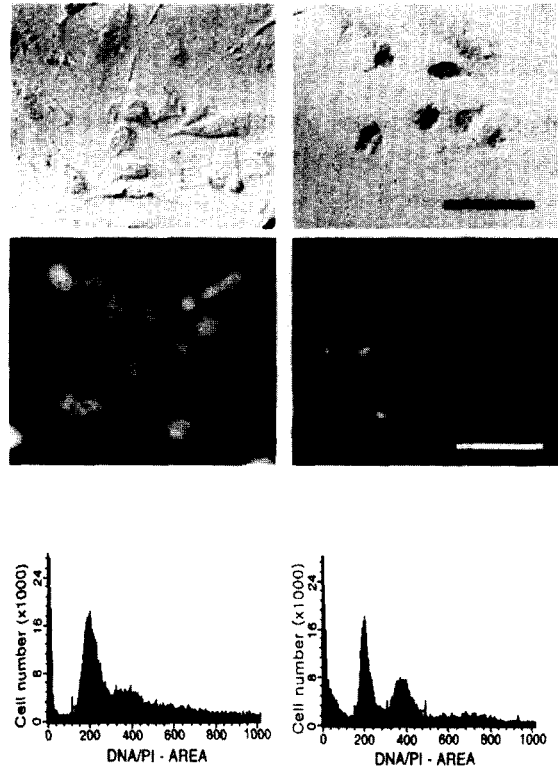


Fig. 3. Characterization of  $H_2O_2$ -induced cell death in calf pulmonary artery endothelial cells. Cells were cultured without  $H_2O_2$ (Control) or with  $50 \mu M$   $H_2O_2$ ( $H_2O_2$ ), for 3 hours in each case. Upper: TUNEL assay,  $H_2O_2$ -treated cells show labeling condensed and marginal chromatin. Middle: DAPI staining,  $H_2O_2$ -treated cells show condensed nuclei. Lower: Flow cytometric data. Note the increased number of cells in the sub- $G_1$  phase after treatment with  $H_2O_2$ . Scale bars represent  $120 \mu m$ .

중에 일부분은 폐혈관 손상과 관련되어 있으며, 폐혈관 손상 기전의 하나로 산화성 스트레스가 폐혈관 손상에 관련되어 있을 것으로 추측하고 있다<sup>1-5</sup>.  $H_2O_2$ 는 내인성으로 생성되는 활성 산소군(reactive oxygen species)의 하나로 여러 산화성 스트레스와 관련된 질환에서 세포의 손상과 세포자사에 관련되는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>. 본 실험은 이러한 폐혈관 손상에 대한 산화성 스트레스와의 관련 정도를 알아보기 위하여, 배양한 CPAE 세포에 산화성 스트레스를 일으키는  $H_2O_2$ 를 투여한 후,  $H_2O_2$ 에 의한 세포독성을 관찰하고, 폐혈관 손상 기전의 하나로 생각되고 있는 세포자사가 유발되는 지를 연구하였다.

세포 사멸은 적어도 2가지 기전, 세포자사와 괴사(necrosis)

에 의해 발생된다고 한다. 세포자사는 생리적이고 능동적인 세포의 사망기전으로서, 괴사와는 다른 형태학적인 특징을 갖으며, 세포 수축, 핵막의 파괴, 세포막의 수포 형성(bleb), 핵염색질의 응축, 핵분절(nuclear fragmentation) 등의 형태학적 특징을 가지며, 최종적으로 세포자사 소체가 형성된 후 대식세포나 인접세포에 의해 제거되며 염증반응을 일으키지 않는다고 하였다. 광학 현미경 관찰 시에는 세포가 수축되며 미세융기 같은 표면 구조물이 상실되어 인접된 세포들로부터 각각 분리되어 세포들의 형태가 작고 농축된 상태로 관찰된다고 하였다<sup>12-14</sup>. 본 연구에서도 CPAE 세포에 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처치 시 이러한 형태학적 특징이 관찰되었다. 또한 MTT를 이용한 세포독성 실험 결과에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M 농도로 투여한 1시간, 3시간 및 5시간 실험군에서 모두 유의한 세포독성을 나타내었고, 농도 의존적이었다.

세포자사를 규명할 수 있는 중요한 생화학적 특징으로, 칼슘 의존성 핵산분해효소가 활성화되어 DNA 분절이 동반된다고 한다<sup>15</sup>. 이러한 DNA 분절은 초기에는 DNA가 300 kb 또는 50 kb 크기로 절단된 후, 핵산분해효소의 계속적 활성화에 의해 oligonucleosome 크기의 DNA 분절을 만들고, 결국 180-200 bp의 DNA 분절들을 나타낸다고 하였다<sup>16</sup>. 본 연구에서는 이러한 DNA 분절을 확인하기 위하여 세포자사를 일으킨 세포에 특이적으로 존재하는 단편화된 DNA의 유리 3'-OH 말단을 terminal deoxynucleotidyl transferase를 사용하여 염색하는 TUNEL assay를 사용하였으며, 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처치한 실험군에서 TUNEL(+) 세포들이 관찰되어 세포자사가 일어났음을 확인 할 수가 있었다.

또한 세포자사의 발생 시 가장 뚜렷한 내부구조의 변화가 핵에서 발생하며, 핵 염색질이 응축되면서 핵막의 내표면으로 경계를 이루어 결절을 형성하고 핵내 단백질이 분해되어 결국 핵들이 여러 개의 세포막으로 둘러싸인 핵분절을 형성한다<sup>17</sup>. 본 연구에서는 이러한 핵들의 변화를 관찰하기 위해 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색액인 DAPI를 사용하여 핵을 염색하고 형광현미경으로 관찰하였으며, 정상 대조군에 비해 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처치한 CPAE 세포에서 핵분절 등의 전형적인 세포자사 형태를 나타내었다.

그리고 본 연구에서는 비교적 정확하게 초기단계의 세포자사를 판별하고 세포자사와 괴사를 식별할 수 있는 flow cytometry를 이용하여 세포자사를 확인하고자 하였다. 세포자사가 발생하면 flow cytometry 상에서 정상 세포주기에 있는 세포 수가 감소하고 세포자사가 일어난 세포에서 작은 분자량의 DNA 단편들이 세포막의 변화로 이동하여 sub-G<sub>1</sub> peak를 보인다고 하였다<sup>11</sup>. 본 연구결과에서도 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처치한 CPAE 세포에서 세포주기 중 sub-G<sub>1</sub>이 증가하고 G<sub>1</sub>이

감소된 세포자사에 나타나는 소견을 보였다.

최근 세포자사와 괴사와의 구분이 모호해지고 세포 사멸 시 두 기전이 공존하여 나타나는 경우도 있고, 세포자사를 규명하는 실험방법들이 전적으로 특이적이지 않다는 점을 감안하여, 본 연구에서는 세포자사의 다양한 형태학적 특징이나 생화학적 특징 등을 이용한 여러 가지 방법을 사용하였으며, CPAE 세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포독성 시 세포자사가 일어나는지를 확인하였고, 모든 실험결과에서 일관되게 세포자사의 특징적인 소견을 나타내었다.

## 결 론

폐혈관 손상 기전의 하나로 추측되고 있는 산화성 스트레스에 의한 세포자사를 연구하고자, 소에서 유래한 폐동맥혈관내피 세포에 산화성 스트레스를 유발하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 투여하였다. 실험결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 폐동맥혈관내피 세포에서 세포독성을 유발하였다. 또한 TUNEL assay, DAPI staining 및 flow cytometry 분석 등을 통하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 폐동맥혈관내피 세포의 손상은, 형태학적 소견 및 생화학적인 소견에서 세포자사의 특징적인 소견을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. Guice KS, Oldham KT, Caty MG, Johnson KJ, Ward PA. Neutrophil-dependent, oxygen radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis. *Ann Surg* 1989;210:740-7.
2. Spragg RG. DNA strand break formation following exposure of bovine pulmonary artery and aortic endothelial cells to reactive oxygen products. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4:4-10.
3. 김원곤, 신윤철, 서정욱. 양에서 막형 산화기를 사용하여 심폐바이패스할 경우 백혈구격리 및 자유라디칼로 중재되는 폐손상. *대홍외지* 1999;32:978-83.
4. Varani J, Ginsburg I, Gibbs DF, et al. Hydrogen peroxide-induced cell and tissue injury: protective effects of Mn<sup>2+</sup>. *Inflammation* 1991;15:291-301.
5. Thom SR, Ischiropoulos H. Mechanism of oxidative stress from low level of carbon monoxide. *Res Rep Health Eff Inst* 1997;80:1-19.
6. DiPietrantonio AM, Hsieh T, Wu JM. Activation of caspase 3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:477-82.
7. Ryan US, Avdonin P, Hyaes B, Broschat KO. Signal transduction in endothelial cells. In: Ryan US, Rubanyi GM. *Endothelial regulation of vascular tone*. New York: Mrcel Dekker. 1992;73-90.
8. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989;3:2007-18.

9. Droogmans G, Maertens C, Prenen J, Nilius B. *Sulphonic acid derivatives as probes of pore properties of volume-regulated anion channels in endothelial cells*. Br J Pharmacol 1999;128:35-40.
10. Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS. *Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway*. J Biol Chem 1998;273:3756-64.
11. Ormerod MG. *Flow cytometry of apoptotic cells*. In: Celis JR. *Cell biology: a laboratory handbook*. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 1998;351-6.
12. Gorman AM, Orrenius S, Ceccatelli S. *Apoptosis in neuronal cells: role of caspases*. Neuroreport 1998;9:R49-55.
13. Steller H. *Mechanism and genes of cellular suicide*. Science 1995;267:1445-9.
14. Wyllie AH. *Apoptosis*. Br J Cancer 1993;67: 205-8.
15. Wyllie AH. *Glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. Nature 1980;284:555-6.
16. Oberhammer F, Wilson JW, Diva C, et al. *Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation*. EMBO J 1993;12:3679-84.
17. Woodle ES, Kulkarni S. *Programmed cell death*. Transplantation 1998;66:681-91.

**=국문초록=**

**배경:** 폐혈관 손상에 관한 기전은 여러 보고에도 불구하고 자세히 밝혀지지 않는 상태이다. 최근 산화성 스트레스 질환에 관여하는 과산화 수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등의 활성 산소종(reactive oxygen species)은 세포손상과 세포자사(apoptosis)에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 유발된 산화성 스트레스가, 폐혈관 손상 기전의 하나로 추측되고 있는 세포자사를 야기하는지를 연구하였다. **대상 및 방법:** 소의 폐동맥에서 유래된 calf pulmonary artery endothelial cell line(CPAE)를 이용하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 독성을 측정하기 위하여, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 시행하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포의 형태학적 변화는 도립 현미경으로 분석하였다. 세포자사를 확인하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling(TUNEL) assay와 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) staining 방법 및 flow cytometry 분석을 시행하였다. **결과:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 생존율은, 대조군(100%)과 비교하여 3시간 실험군에서 10 μM에서 약 70%, 50 μM에서 약 33%, 100 μM에서 약 26%, 500 μM에서 약 28%이었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 투여시 세포돌기 감소, 세포 축소, 세포질 응축과 불규칙한 형태 등의 세포자사에 나타나는 형태학적 변화를 나타내었다. TUNEL assay와 DAPI staining에서도 세포자사에 특징적으로 나타나는 핵응축과 핵분절 등의 소견을 나타내었다. Flow cytometry 분석 시에도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 투여시 sub G<sub>1</sub> 분절의 증가와 G<sub>1</sub> 분절의 감소 등의 세포자사 양상이 확인되었다. **결론:** 형태학적 분석과 생화학적 분석을 통하여, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 CPAE에서 세포자사를 야기함을 확인하였다. 이러한 결과는 폐혈관 손상의 기전에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포자사가 부분적으로 관여할 가능성을 제시한다.

- 중심 단어:** 1. 폐혈관 손상  
2. 산화성 스트레스  
3. 세포자사