

제대정맥 내피세포에서 Amiloride 유도체에 의한 Apoptosis 반복

한양대학교 의과대학 소아과학교실, 연세대학교 원주의과대학 생리학교실*

박규창 · 박규상* · 문수지

Repetition of Apoptosis Induced by Amiloride Derivatives in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Kyu Chang Park, M.D., Kyu Sang Park, M.D.* and Soo Jee Moon, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Hanyang University, Seoul,
Department of Physiology*, Yonsei University, Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Purpose : Human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) play an important role in regulating blood flow by releasing vasoactive substances. It has been reported that endothelial impairment and dysfunction might be a primary cause of placental vascular disease, which is manifested clinically as preeclampsia in mother and intrauterine growth restriction in fetus. Furthermore, the frequency of apoptotic changes is increased in umbilical and placental tissues from growth-restricted pregnancies. However, the various mechanisms of umbilical endothelial cell apoptosis have not been broadly proposed. We investigate the effects of amiloride derivatives on apoptotic death of HUVECs and identify their ionic mechanism.

Methods : HUVECs were purchased from Clonetics, and cultured on endothelial cell growth medium. MTT assay and flow cytometry were used for assessing cytotoxic effect and confirming the apoptosis. Changes in intracellular ion concentrations were measured with specific fluorescent dyes and fluorescence imaging analysis system.

Results : Amiloride derivatives elicited cytotoxic effects on HUVECs with dose-dependent manners and the rank order of potency is HMA(IC₅₀ 11.2 μM), MIA>EIPA>>amiloride. HMA-induced cytotoxicity is dependent on extra- and intracellular pH, that is, increase extra- and intracellular pH augmented the cytotoxic effects of HMA. HMA dose-dependently reduced intracellular major ions, such as K⁺ and Cl⁻. Interestingly, the depletion of intracellular ions induced by HMA was also significantly enhanced at alkaline extracellular pH.

Conclusion : Amiloride derivatives induce apoptosis of HUVECs with dose and pH dependent manners. They reduce intracellular K⁺ and Cl⁻ concentration, which is also extracellular pH dependent. (J Korean Pediatr Soc 2003;46:56-66)

Key Words : Human umbilical vein endothelial cells, Apoptosis, HMA[5-(N,N-hexamethylene) amiloride], MIA[5-(N-methyl-N-isobutyl) amiloride], EIPA[5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride], Intracellular ion depletion

서 론

제대정맥은 자궁 내 태반으로 이동된 모체의 혈액을 태아로 운반하여 산소와 영양물질을 공급하는 유일한 통로이다. 정맥 내부를 덮고 있는 내피세포는 혈관을 이루는 구조물인 동시에 혈액의 응고, 면역학적 혹은 염증 반응을 조절하는데 중요한 역할을

을 담당하고 있으나¹⁾, 이보다 더 결정적인 역할은 혈관의 긴장도 및 혈류 조절이라 할 수 있다²⁾. 내피세포는 혈관 이완인자나 수축인자들을 유리함으로써 인체 평활근을 이완 혹은 수축시켜, 혈관내경의 크기 및 혈류량을 세밀히 조절하는 역할을 담당하고 있다³⁾. 제대 혈류의 장애가 자궁내 성장제한(intrauterine growth restriction)을 초래할 수 있다는 점은 이미 잘 알려져 있으며^{4,5)}, 최근에는 임신성 고혈압(preeclampsia)의 병인이 제대 및 태반의 내피세포 손상 혹은 기능장애에 의해서라고 보고되고 있다^{6,7)}. 하지만 아직까지 제대-태반 혈관의 내피세포 손상을 유발하는 다양한 원인 자극들 및 그 기전에 관해서는 구체적으로 연구되

접수 : 2002년 8월 21일, 승인 : 2002년 9월 18일
책임저자 : 문수지, 한양대학교 의과대학 소아과학교실
Tel : (02)2290-8384 Fax : (02)2297-2380
E-mail : moonsoojee@email.hanyang.ac.kr

지 못한 상태이다.

세포는 외부에서의 손상 자극에 대해 방어 기전을 활성화시키기도 하지만, 경우에 따라 스스로 사멸함으로써 손상된 세포를 제거하기도 하는데 이러한 세포사멸 기전을 apoptosis라고 한다⁸⁾. 또 다른 세포사멸 기전인 necrosis의 경우에는 일반적으로 세포 전체가 팽창하여 세포막이 용해(lysis)되고, 이로 인해 세포내 구성물질들이 유리되어 심한 염증반응을 일으키게 된다. 하지만, apoptosis인 경우에는 DNA의 절단과 함께 염색질이 농축되고 세포 크기가 위축되며, 세포막 파괴나 구성성분 유출이 없어 염증반응을 일으키지 않고 주변 탐식세포에게 제거되게 된다⁹⁾. 따라서 발생과정의 형태변화나 퇴화, 그리고 이상 세포의 제거에 생리적 기전으로 이용되어진다¹⁰⁾.

Apoptosis의 원인물질 및 그 기전들은 매우 다양하며, 각각에 관해서는 지금까지 비교적 폭넓게 연구되어 오고 있다. 최근에는 여러 원인들에 의한 apoptosis 과정 중에 K^+ 이나 Cl^- 와 같은 세포 내 주요 이온들의 농도 감소가 중요한 역할을 담당하고 있음이 보고 된 바 있다. 즉 이들 이온의 유출이 증가할 경우 삼투압 변화에 의한 물의 유출이 이어져 세포의 심각한 위축(shrinkage) 현상을 일으키게 된다는 것이다¹²⁾. 뿐만 아니라 세포 내 이온 농도가 apoptosis 관련 단백질들의 활성화와 밀접한 관계가 있으므로, 일정 이상의 이온농도가 유지되는 것이 apoptosis 발생을 억제하는 중요 기전중 하나라고 주장되어지고 있다¹³⁾.

한편 세포막 이온 운반체들의 작용을 억제한다고 알려진 amiloride 유도체들은 신장에서 Na^+ 및 물의 재흡수와 함께 K^+ 분비를 억제하여 K^+ -sparing 이뇨제로 사용되고 있다¹⁴⁾. Amiloride는 pyrazine ring에 acylguanidium 기와 두개의 amino 기가 붙어 있는 구조를 하고 있으며, pKa가 8.7 정도의 약염기 물질이다. 따라서 생리적 pH에서는 H^+ 이온이 붙으면서 (protonation) 양이온으로 작용하게 되는데, 이로 인해 Na^+ 등과 경쟁적 억제를 하게 된다¹⁵⁾. 알려진 바에 따르면 amiloride 유도체가 억제하는 운반체들은 세포 내 이온농도 및 pH를 일정하게 유지시켜 세포를 보호하는 기능을 가지고 있다. 그러므로 이들에 의해 세포 내 환경 평형이 깨어질 경우 세포에 심각한 손상이 가해질 수 있으나, 아직까지 이에 관해서는 보고가 많지 않은 상태이다. 일부에서는 세포 내 Na^+ 축적을 억제함으로써 심장이나 신경의 허혈-재관류 손상을 억제시키고 apoptosis 발생을 오히려 감소시킨다고 보고한 반면¹⁶⁻²⁰⁾, 다른 연구자들은 혈액 중앙세포에서 apoptosis를 촉진하여 중앙 증식을 억제한다고 보고하는 등^{21, 22)} 아직 그 작용에 대해 상반된 결과들을 보고하고 있다.

본 실험에서는 잘 알려진 amiloride 유도체들인 5-(N, N-hexamethylene) amiloride(HMA), 5-(N-methyl-N-isobutyl) amiloride(MIA), 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride(EIPA) 등을 중심으로 이들에 의한 인간 제대정맥 내피세포의 세포 독성효과를 확인하고자 하였으며, 또 그 과정이 apoptosis에 의한 것인지 확인하고 이와 관련된 세포 내 이온 농도의 변화를 관찰

하였다. 이러한 실험들을 통해 아직 전혀 알려진 바 없는 내피 세포에 미치는 amiloride 유도체들의 작용을 밝히고, 지금까지 명확히 밝혀지지 못한 세포 내 이온농도 변화와 apoptosis 간의 관계를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포 배양 및 실험

인간 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cells; HUVECs)는 일차 배양한 첫번째 passage의 것을 Clonetics(CC-2517, BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, USA)로부터 구입하였으며, 내피세포 성장에 필요한 여러 성장인자가 포함된 배지(EGM-2 Bulekit, BioWhittaker Inc.)로 37°C 습식 배양기(humidified incubator; 95% air - 5% CO_2)에서 배양하였다. 실험에 사용된 amiloride 및 amiloride 유도체들과 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), propidium iodide 등은 모두 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터, FITC-labeled Annexin-V 염색 kit는 Bender Medsystem(Vienna, Austria)으로부터 구입하였다. 형광염료인 SBFI, PBF1, N-(Ethoxycarbonyl-methyl)-6-methoxyquinolinium bromide(MQAE)는 모두 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다.

2. 세포 생존성 실험

세포의 생존 정도는 MTT 방법을 이용하여 측정하였는데, 이는 살아있는 세포 미토콘드리아 내 존재하는 succinate dehydrogenase에 의한 formazan 반응 생성물의 양으로 생존하는 세포의 수를 분석하는 방법이다²³⁾. HUVECs를 96-well plate에 10^4 cells/well의 농도로 접종하여 24시간 배양한 다음, amiloride 및 amiloride 유도체들을 여러 농도로 처리하였다. 약물 처리한지 24시간이 지난 후 각 well당 0.5 mg/mL의 농도가 되도록 MTT를 가한 다음 37°C 습식 배양기에서 4시간 더 배양하였다. 이어 배지를 모두 버리고 200 μ L의 solubilization 용액(10% sodium dodesyl sulfate(SDS), 50% dimethyl formamide, pH 4.7)을 넣고 2시간 이상 shaking함으로써 살아있는 세포에서 만들어진 formazan 반응 침전물을 용해시켰다. ELISA 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm와 630 nm에서 흡광도를 측정한 뒤, 이를 subtraction ($A_{570} - A_{630}$)하여 세포의 생존 정도를 분석하였다.

3. Flow cytometry analysis

배양용기에서 적정 세포수($2-5 \times 10^5$ cells/mL)로 자라고 있는 HUVECs에 amiloride 유도체를 24시간 처리한 다음 trypsin으로 바닥에서 떼어내어 원심분리(300×g, 5 분)로 세포를 모았다. 여기에 70% ethanol을 넣은 후 4°C에서 2시간 이상 보관하였다. 다시 원심분리 하여 phosphate buffered saline(PBS)으로

2회 세척한 후 1 mL의 PBS에 부유시켰다. 이어 5 μg propidium iodide, 50 μg ribonuclease A 및 0.1% triton X-100을 가하여 염색한 후 빛을 차단한 상태로 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 분석하였다. 전체 세포 중 각 세포주기 상 비율을 구하였으며, 이중 hypodiploid (sub G_0/G_1 phase)한 세포들의 비율을 통해 apoptosis의 정도를 비교하였다²⁴⁾. 세포사멸 기전으로 apoptosis와 necrosis를 구별하기 위하여 FITC-labeled annexin-V와 propidium iodide 이중염색을 실시한 뒤 flow cytometer 분석을 하였다. 먼저 위와 같은 방법으로 배양된 세포에 약물을 처리한 다음, trypsin 처리 후 원심분리로 세포들을 모았다. 분리된 세포들을 PBS로 3회 세척한 후 1 mg/mL의 FITC labeled annexin-V가 포함된 binding buffer를 넣고 빛을 차단한 상태에서 10분간 배양하였다. 이어 1 mg/mL의 propidium iodide을 첨가한 다음 flow cytometer(Becton Dickinson)로 측정하여 FITC-labeled annexin-V에 의한 녹색 형광과 propidium iodide에 의한 적색 형광을 각각 X, Y축으로 나타내었다²⁵⁾. Annexin-V는 정상세포의 세포막 안쪽에만 위치하는 phosphatidylserine에 선택적으로 결합하는 물질이지만, apoptosis 초기 phosphatidylserine이 바깥 쪽으로 이동(translocation)하는 특징적 현상으로 인해 세포막 외측에서도 결합할 수 있게 된다. 함께 염색하는 propidium iodide는 세포막의 손상이 있어야만 세포내로 들어가 핵을 염색하게 되므로, apoptosis 진행세포는 우하방 사분면에, 세포막의 손상이 심한 necrosis 진행세포는 우상방 사분면에 위치하므로 둘을 구분할 수 있다^{26, 27)}.

4. 형광 현미경을 이용한 세포내 이온농도 및 pH 측정

세포 내 이온농도 변화를 측정하기 위해서는 각각의 목적에 적합한 형광염료들을 세포 내에 부하(loading)시켜 놓은 뒤, 형광 현미경(Carl Zeiss, Swiss)과 연결된 영상분석장치(Ultra-View Live Cell Imager; Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, MA, USA)를 이용하여 관찰하였다. 먼저 22 mm diameter의 round coverslip에 HUVECs을 2일간 배양하여 바닥에 잘 붙어 자라는 것을 확인한 후 형광염료를 부하시켰다. 예를 들어 세포내 K^+ 농도 측정인 경우 PBFI를 5 μM 되도록 가하여 실온에서 1시간 부하시킨 다음 HEPES-buffered physiologic solution(HBPS; 142 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.25 mM CaCl_2 , 5.5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4)으로 2회 세척하여 coverslip을 현미경 위의 perfusion chamber(Perkin Elmer Life Sciences Inc.)에 장착하였다. 이어 complete perfusion system(Warner Instrument Co., Hamden, CT, USA)과 연결된 도관을 micromanipulator(Narishige scientific instrument, Tokyo, Japan)로 세포 인접부위(200 μm 내외)에 위치시킨 뒤, amiloride 유도체가 포함된 HBPS를 관류시키면서 나타나는 형광 세기의 변화를 기록 및 분석하였다. 이 경우 340 nm와 380 nm의 빛으로 번갈아 가

며 여기(excitation)시켰을 때 510 nm로 방출(emission)되는 형광 강도의 비율($\Delta F_{340}/F_{380}$)이 세포 내 K^+ 농도를 반영하게 된다²⁸⁾. 한편 Cl^- 농도는 MQAE를 부하(5 μM)시킨 다음 360 nm 단일과장으로 여기시켜 510 nm로 방출되는 형광광도를 측정하였으며, 이때 세포내 Cl^- 농도는 형광광도의 크기에 반비례하게 된다. 측정된 결과는 UltraView software(Temporal module; Perkin Elmer Life Sciences Inc.)를 이용하여 분석 및 저장하였다.

5. 통계처리

모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었고, 통계적인 의의는 Student의 t-검정(paired 혹은 unpaired)을 통해 확인하였다. 모든 경우에 P값이 0.05 이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 세포독성 실험에서는 대조군의 50% 세포 사멸을 나타내는 약물의 농도(EC_{50})를 기준으로 비교하였다. 농도-반응 곡선(dose-response curve)과 EC_{50} 값은 최소자승 비선형 회귀분석(least-square non-linear regression analysis)으로 구하였으며, 이를 위해 Prism software(Version 3.0, GraphPad Prism, San Diego, CA, USA)를 이용하였다.

결 과

1. Amiloride 유도체에 의한 세포 독성효과

실험에 사용된 HUVEC은 일차 배양한 첫번째 passage의 것을 구입한 것으로, 장기간 계대 배양 시 나타날 수 있는 세포 특성의 변형을 방지하기 위하여 6-7번째 passage 이하의 것만을 사용하였다. 그리고 사용 기간 동안에는 형태적 변화나 약물에 대한 반응에 큰 차이를 관찰할 수 없었다. 일정 농도의 amiloride 및 amiloride 유도체들을 24시간 투여한 경우 우선 세포질 위축이 가장 현저하게 나타나며(Fig. 1C), 이어 핵의 농축과 세포질의 일부가 떨어져 나가는 모습들을 관찰할 수 있었다. 약물의 농도가 높아질수록 이러한 변화가 더욱 현저하여 대부분의 세포들이 사멸한 것으로 관찰되었다(Fig. 1D). Amiloride 및 amiloride 유도체들을 여러 농도로 처리한 다음 24시간 후의 생존 정도를 비교한 결과, 모든 약물들은 투여한 농도에 비례하여 세포독성을 나타내었으며, amiloride를 제외한 나머지 유도체들 모두 100 μM 미만의 농도에서 거의 100%에 가까운 세포 사멸을 보였다(Fig. 2). 50% 세포사멸 효과를 나타내는 농도(EC_{50})를 비교한 결과 HMA가 가장 낮은 농도(11.2 μM)에서 효과를 나타내었으며, MIA(13.6 μM)는 이와 유사하였고 EIPA(30.8 μM)는 이보다 효력이 낮았다. 한편 amiloride는 HMA에 비해 10배 가량 높은 농도(106 μM)에서 효과를 나타내었다.

2. Amiloride 유도체에 의한 세포 주기상 변화

먼저 amiloride 유도체들에 의한 세포 주기상 변화를 관찰하고자 세포막을 투과가능 및 고정시킨 다음 propidium iodide로

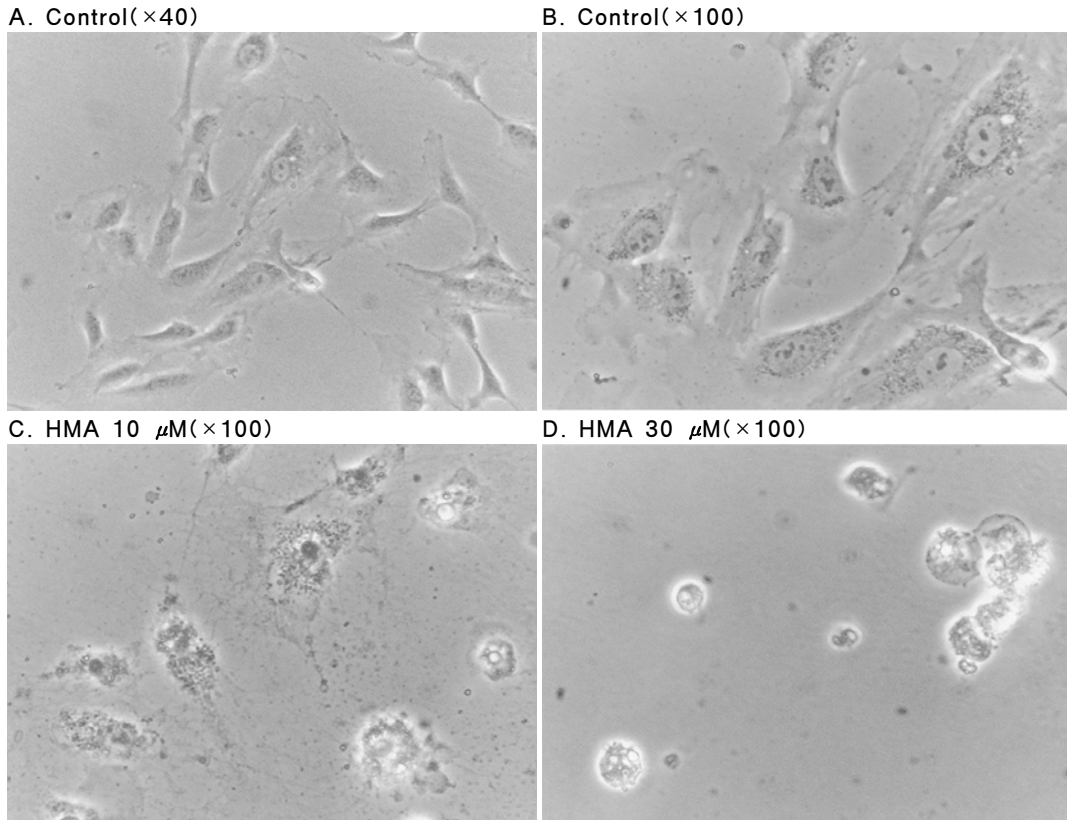


Fig. 1. Effect of amiloride derivative on morphological changes of HUVECs. Low-power (A) or high-power (B) micrographs of control cells were shown. Note the prominent cell shrinkage induced by 10 μ M HMA, an analogue of amiloride (C). At high concentration of HMA, almost all of HUVECs were observed to be dead (D).

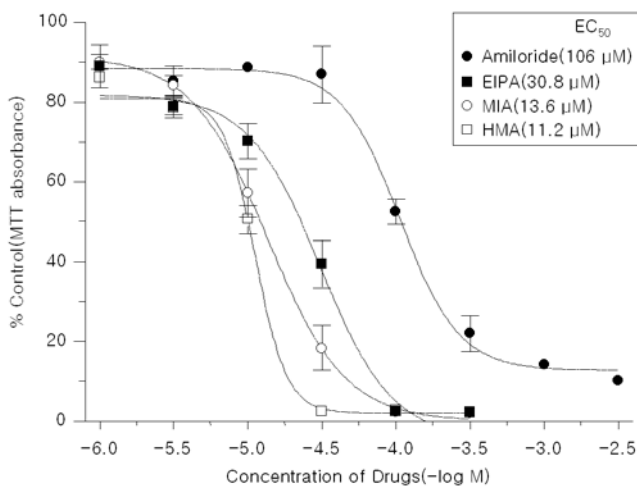


Fig. 2. Cytotoxic effects induced by amiloride and amiloride derivatives on HUVECs. Dose-response curve for cytotoxicity induced by 24 hours exposure of HMA, and amiloride were obtained using MTT assay. Results are average values of at least 6 experiments \pm S.E. Parentheses represent the EC_{50} values for cytotoxic effects. The rank order of potency was HMA, MIA>EIPA>>amiloride.

DNA를 염색하여 flow cytometry로 분석하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 대조군에서는 G_0/G_1 기가 46.6%를, G_2/M 기가 21.2%를 차지하였으나(Fig. 3A), 10 μ M HMA를 투여한 경우 G_2/M 기가 11.4%로 감소한 반면, G_0/G_1 기가 56.5%로 증가되었다(Fig. 3B). 특히 대조군에서 4.5%에 불과하던 sub- G_0/G_1 기의 비율이 16.3%로 증가하였다. 전체 세포 중 sub- G_0/G_1 기의 비율은 주로 단절된 DNA에 의한 것이므로 apoptosis로 진행된 세포의 정도와 비례한다²⁹⁾. 보다 높은 농도의 HMA(30 μ M)를 투여할 경우 sub- G_0/G_1 기의 비율은 현저히 증가하여 전체세포의 43.2%를 차지하였으며, 상대적으로 다른 세포들의 비율은 줄어들었다(Fig. 3C). 이는 대부분의 세포들이 apoptosis로 사멸되었거나 그 과정 중에 있음을 의미한다고 할 수 있다. 대부분의 apoptosis 과정을 매개하는 단백질로 알려진 caspase의 여러 아형들을 비선택적으로 억제하는 z-VAD-fmk(100 μ M)를 HMA와 같이 처치한 경우에는 sub- G_0/G_1 기의 비율이 크게 줄어들었으며(13.7%), 상대적으로 G_0/G_1 및 G_2/M 기의 비율은 증가하였다(Fig. 3D). 이는 HMA에 의한 DNA 단절효과 및 apoptosis 과정에 caspase가 관여하고 있음을 의미한다. 지금까지 apoptosis을 초래하는 물질로 잘 알려진 protein kinase C 억제제 staurosporine(0.5 μ g/mL) 역시 sub- G_0/G_1 기의 비

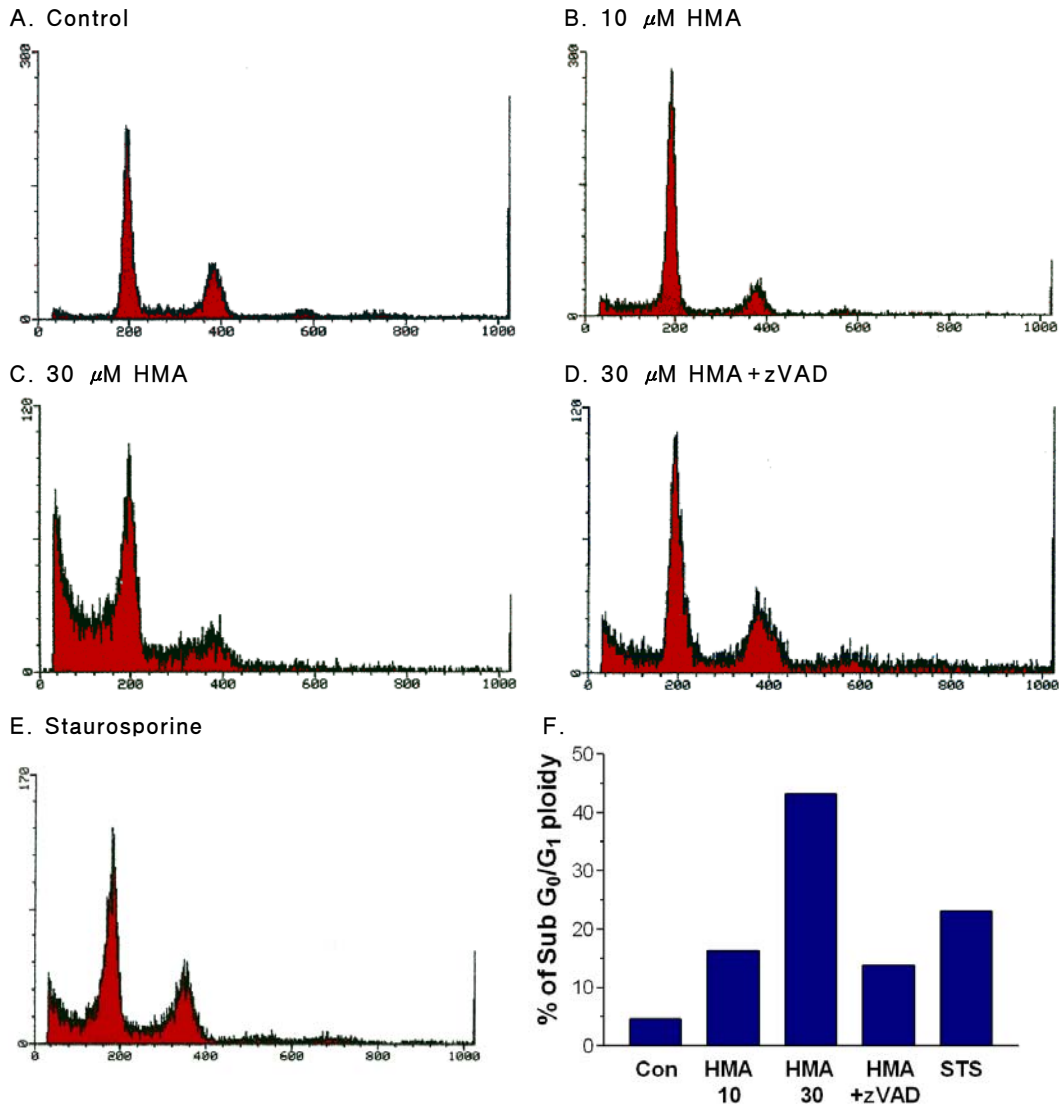


Fig. 3. Effects of HMA on the cell cycle distribution of HUVECs. A representative data of HMA-induced cell cycle changes stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Note the increase in sub-G₀/G₁ ploidy by HMA treatment (C), which was blocked by caspase inhibitor, z-VAD-fmk (D). zVAD : z-VAD-fmk, STS : staurosporine.

율을 23.0%로 증가시켰으나(Fig. 3E), 그 증가 정도가 30 μM HMA에 비해서는 작았다.

3. Annexin-V 염색을 통한 apoptosis 확인

세포사멸 효과가 apoptosis에 의한 것임을 확인하기 위하여 FITC-labeled annexin-V와 propidium iodide 이중염색을 실시하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 대조군에서는 대부분의 세포들이 두 가지 모두에 염색이 되지 않은 좌하방(Fig. 4A; 80.1%)에 위치한 반면, HMA 처리시 주로 우하방으로(Fig. 4B; 72.9%), 일부는 우상방(22.1%)으로 이동되었다. 앞에서 언급한 바와 같이 우하방에 위치하는 세포는 apoptosis, 우상방의 것은 necrosis 과정임을 나타낸다. 따라서 HMA에 의해 necrosis 과정

으로 진행되는 세포들도 일부 있으나, 대부분의 경우 apoptosis 기전을 통해 사멸되었음을 알 수 있다.

4. 세포외액 및 세포내액의 pH 변화에 따른 apoptosis 효과 차이

기존의 보고에 따르면 amiloride 및 amiloride 유도체들은 세포 내 pH 조절과 관련된 여러 운반체들을 억제한다고 알려져 있으므로, 이와 관련지어 세포 내·외액의 pH 변화가 HMA에 의한 apoptosis 과정에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 먼저 세포외액의 pH를 달리 하였을 때 나타나는 세포독성을 비교한 결과, pH 8.0과 8.8에서는 큰 변화가 없었으나 pH 6.8 및 6.0에서는 산성화 정도와 비례하여 세포 사멸이 증가하였

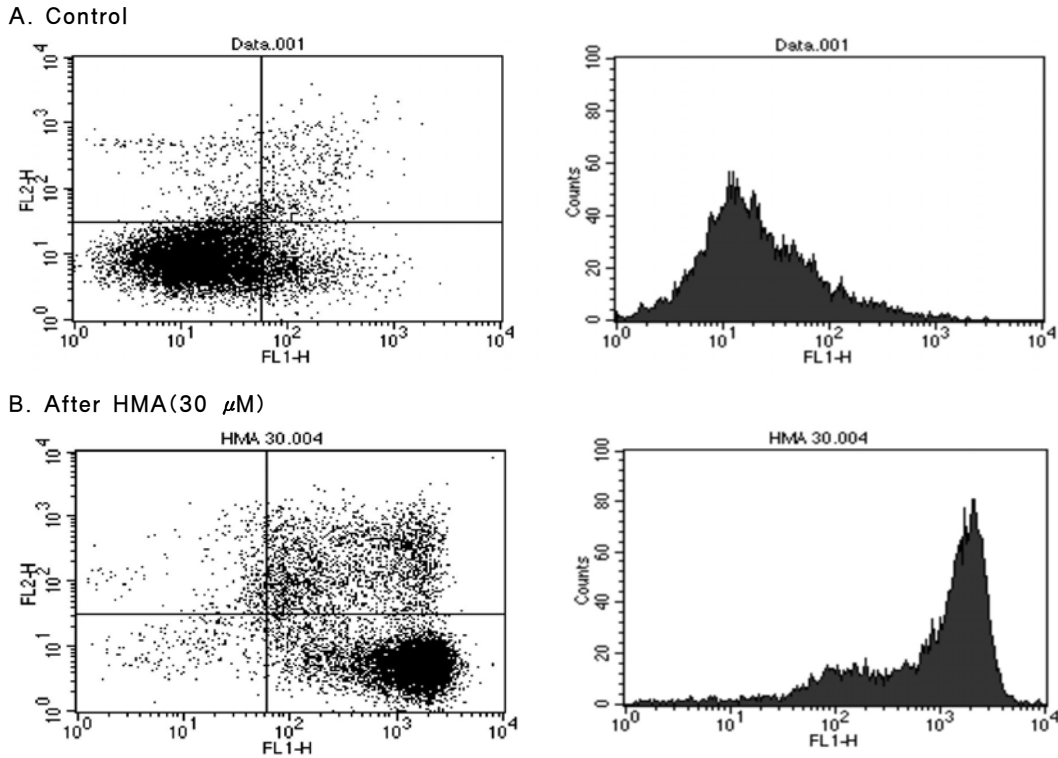


Fig. 4. Staining with Annexin-V and propidium iodide induced by HMA treatment in HUVECs. Cells were labeled with FITC-labeled Annexin-V and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Apoptotic cells, located at lower right quadrant, were increased by the exposure of HMA(30 μ M) for 24 hours(B; 73.0%) compared to those of control group(A; 11.3%).

다(Fig. 5A). 하지만 산성 배지에서는 pH 변화에 의한 세포 독성에도 불구하고 HMA 투여로 인해 추가의 독성이 초래되지 않은 반면, 염기성 배지는 배지 자체의 효과는 없지만 HMA에 의한 세포독성은 오히려 현저히 증가시켰다. 그리고 이러한 효과는 pH 8.0에서 보다 8.8에서 더 크게 나타났다(Fig. 5B). 이번에는 세포 안으로 들어가 수소이온을 내어놓거나(sodium acetate), 혹은 수소이온과 결합하는 물질(ammonium chloride)을 이용하여 세포 내액의 pH를 변화시키는 방법을 사용하였다. 이때 투여하는 sodium acetate나 ammonium chloride의 농도를 증가시킬 경우 그에 따른 세포 내 pH 변화 역시 비례하여 커지게 된다. Fig. 5C와 5D에 나타난 바와 같이 ammonium chloride 투여로 세포 내를 염기화시켰을 때 HMA에 의한 세포 독성이 항진되는 결과를 나타내었는데, 이는 세포 내액이나 외액의 염기화 모두 HMA의 작용기전에 개별적 혹은 이차적으로 관여하여 세포독성 효과를 증가시켰음을 의미한다.

5. 5-(N, N-hexamethylene) amiloride(HMA)에 의한 세포내 이온농도의 변화

세포내 삼투압 형성에 가장 중요한 역할을 담당하는 양이온인 K^+ 은 부족시 세포위축과 함께 apoptosis가 초래된다고 알려져 있다. 따라서 PBFI라는 선택적으로 K^+ 농도를 측정할 수 있는 형광염료를 이용하여 amiloride에 의한 apoptosis 과정에 세포

내 K^+ 농도의 변화가 관여하는지 관찰하였다. HMA는 가한 농도에 비례하여 세포내 K^+ 농도를 감소 시켰으며(Fig. 6A, 6B), 특히 염기성 pH(8.8)의 세포외액으로 관류한 경우 pH 7.4에서의 효과에 비해 K^+ 감소 효과가 크게 항진되었다(Fig. 6C, 6D). 뿐만 아니라 HMA를 제거한 뒤에도 감소한 K^+ 농도가 쉽게 회복되지 않았다. K^+ 과 함께 삼투압조절에 관여하는 세포내 Cl^- 농도 역시 세포의 용적을 결정하는 중요한 인자로 작용하며, 감소시 세포위축 및 apoptosis을 초래한다고 알려져 있다. 세포내 Cl^- 농도 측정을 위해 MQAE라는 Cl^- 선택적 형광염료를 사용하였는데, 이 물질에 의한 형광 세기는 세포내 Cl^- 농도와 반비례 관계를 나타낸다. Fig. 7에서 나타난 것과 같이 HMA는 가한 농도에 비례하여 Cl^- 농도를 감소시켰다. 그리고 K^+ 농도변화에서와 마찬가지로 세포외액의 pH와 밀접한 연관이 있어, 염기성 세포외액(pH 8.8)에서 효과가 항진되어 나타난 반면 산성 세포외액(pH 6.0)에서는 거의 효과를 나타내지 않았다. 이와 같이 세포외액 pH에 대한 의존성이 apoptosis 효과나 이온농도 변화에서 일관성 있게 나타난다는 점은 HMA에 의한 이온농도 변화가 apoptosis 기전에 관여하고 있을 가능성을 시사한다고 할 수 있다.

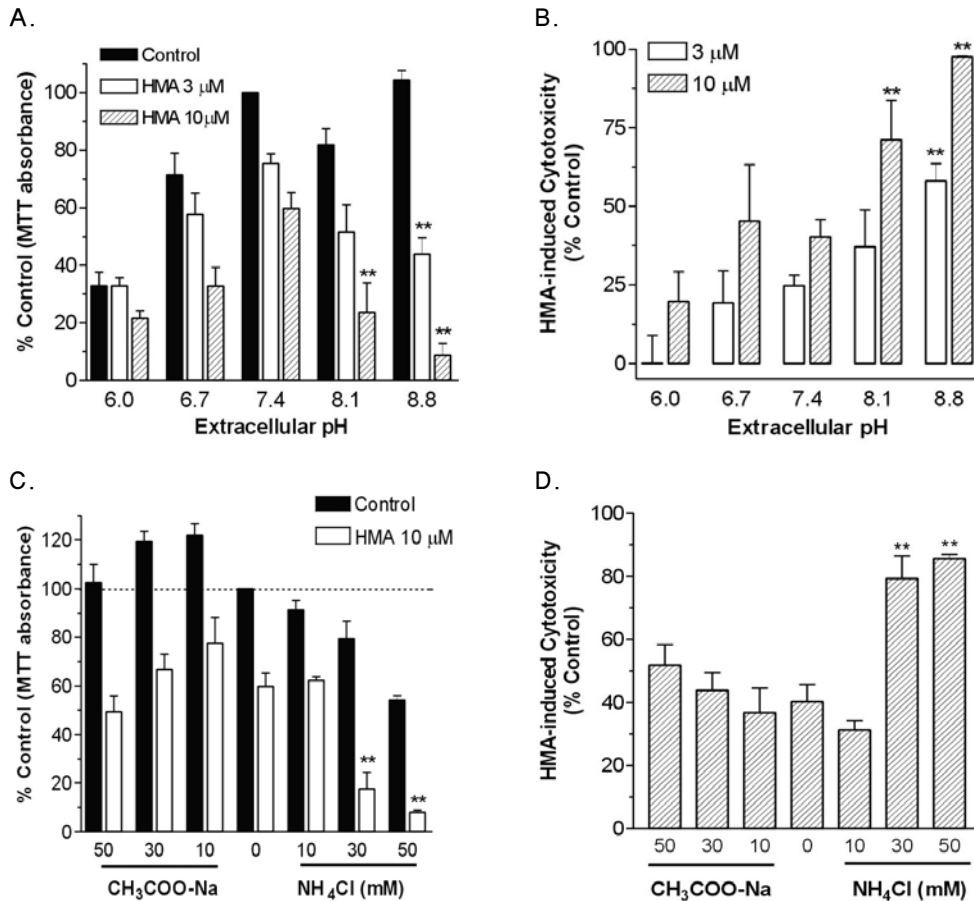


Fig. 5. Extracellular and intracellular pH-dependent cytotoxicity of HMA in HUVECs. (A) Effects of acidic or alkaline extracellular pH (black bar) and those with HMA treatment (empty or hatched bar) on cell survival. (B) HMA-induced cytotoxicity was normalized to their control at different extracellular pH and showed prominent augmentation at alkaline medium. (C) Intracellular acidification, induced by the application with sodium acetate, or alkalinization, with ammonium chloride, affect the cell survival by itself (black bar) or alter the effect of HMA (hatched bar). (D) HMA-induced cytotoxicity was significantly enhanced by intracellular alkalinization. Results represent the mean \pm S.E. from at least 6 experiments. ** $P < 0.01$.

고찰

세포사멸 기전 가운데 apoptosis는 인근세포에 피해를 끼치거나 염증반응을 나타내지 않고 개별 세포를 제거할 수 있는 생리적인 기전이다¹³⁾. Apoptosis의 가장 특징적인 형태 변화는 세포 용적 감소 및 위축현상이며, 이와 더불어 염색체 농축과 DNA 절단 등을 초래한다⁹⁾. 대부분의 apoptosis 과정을 매개하는 세포내 단백질은 cysteine기를 다량 함유한 caspase라는 단백질 분해효소 집단(family)인데, 이들은 표적 단백질들의 펩타이드 결합을 잘라 이를 활성화 혹은 비활성화 시킨다. 특히 세포내 DNA 분해효소를 활성화 시켜 histone에 의해 보호되지 않는 부위들을 절단(200 bp fragments)하게 하며, 핵 내 lamin을 절단하여 염색질을 농축시키거나 세포 구조단백질을 분해하여 형태 변화를 초래한다³⁰⁾. Caspase가 apoptosis 과정에서 중심적인

역할을 한다는 것은 크게 이견이 없는 반면, 이들의 단계적 활성화를 개시(trigger)시키는 기전에 관해서는 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 지금까지 알려진 가장 대표적인 기전으로는 미토콘드리아 막전압의 탈분극 및 그로부터 유리되는 cytochrome c가 세포내 다른 단백질(apoptotic protease-activating factor, Apaf)과 결합하여 caspase를 활성화시킨다는 것이다^{30, 31)}. 이 과정에 미토콘드리아 막에 존재하는 bcl 집단 단백질들이 관여하는데, 이들은 서로 결합하여 미토콘드리아 막전압 변화 및 cytochrome c 유리를 조절한다고 하였다^{31, 32)}. 이때 세포질과 미토콘드리아 내의 pH 변화를 동반한다고 보고된 바 있으나³³⁾, 아직 pH 변화의 역할에 관해서는 잘 알려져 있지 않다.

본 실험에서는 이온 환경평형을 유지하는데 필수적인 운반체들을 억제한다고 알려진 amiloride 유도체들을 투여하여, 그에 의한 세포 사멸의 기전을 살펴보고자 하였다. 결과적으로 amiloride 유도체들에 의한 세포사멸효과는 몇 가지 증거들에 의해

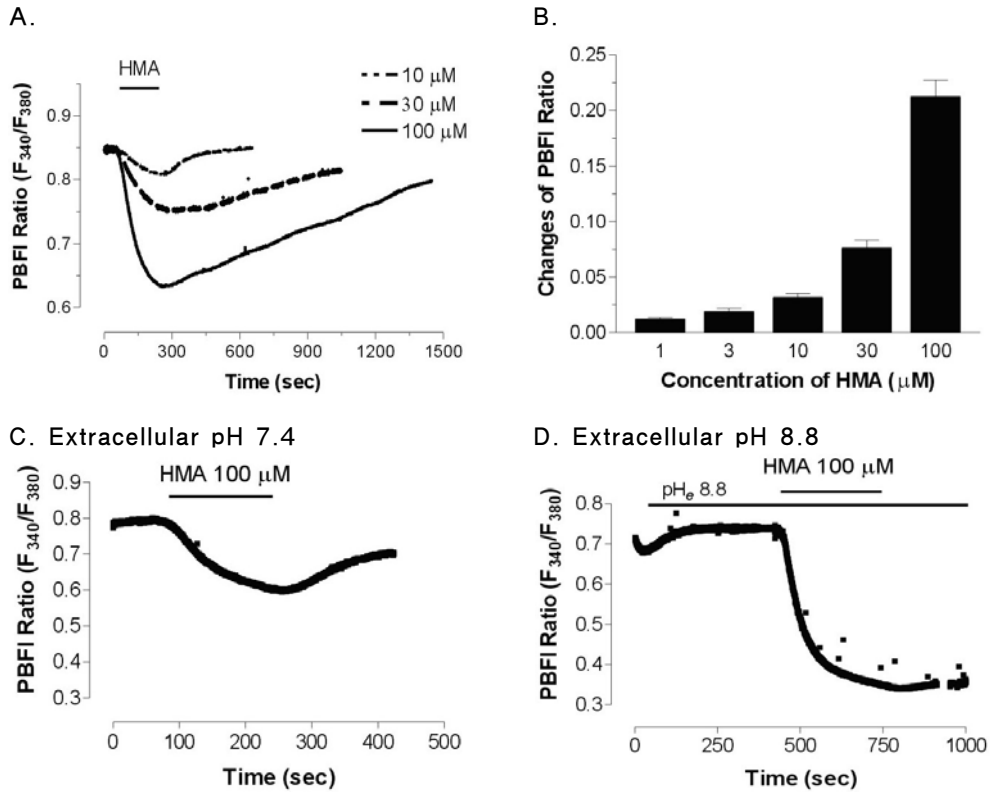


Fig. 6. Depletion of intracellular K⁺ by HMA with dose and pH-dependent manner. Intracellular K⁺ concentration(F₃₄₀/F₃₈₀), measured using K⁺ selective fluorescence dye(PBFI/AM) was reduced by HMA treatment (A). HMA-induced K⁺ decrease was also dose dependent (B). HMA-induced changes was prominently increased and not easily recovered to the resting level at extracellular pH 8.8 (C, D). Data are expressed as mean ± S.E.

apoptosis임이 확인되었다. 첫번째로는 형태적인 변화로서, 세포질 위축이 현저해 세포가 작고 납작해지다가 사멸시 구형으로 변화된 점이다. 그와 함께 염색질이 작고 짙어지는 것도 관찰되었는데 이는 앞에서 언급한 바와 같이 apoptosis의 특징적 조건들이다. 두번째로는 세포주기 분석상 단절된 DNA에 의해 나타나는 sub-G₀/G₁ ploidy peak가 투여한 농도에 비례해서 증가했다는 점이며, 특히 그 증가 정도가 apoptosis을 유발하는 대표적 약물인 staurosporine에 의한 것에 비해 월등히 컸다. 세번째로는 caspase 억제제에 의해 이러한 변화가 감소했다는 점이다. Caspase는 여러 아형(subtype)들이 존재하고 각각에 보다 선택적인 억제물질들이 개발되었으나, 본 실험에서는 대부분의 caspase 아형들을 비선택적으로 억제하는 z-VAD-fmk을 사용하였다. 이는 세포내로 들어가 경쟁적으로 caspase 활성을 억제한다. 본 실험 결과는 amiloride 유도체들이 apoptosis 기전 중에서도 caspase 의존적인 방식을 이용한다는 것을 의미한다³⁴. 네번째로 가장 결정적인 증거는 annexin-V와 propidium iodide 이중 염색결과 apoptosis로 진행된 세포가 현저히 증가했다는 점이며, 일부는 세포괴사로 진행되었으나 전체에서 차지하는 비중이 작았다.

Amiloride 유도체들의 효력을 비교한 결과, HMA, MIA 및 EIPA가 amiloride에 비해 10배가량 강력하였으며, 이는 Na⁺ 운

반체들에 대한 억제효과의 효력순서와 일부 유사하였다. Amiloride에 의해 억제되는 Na⁺ 운반체들 중 가장 잘 알려진 것은 Na⁺/H⁺ exchanger이지만, 본 실험에서 나타난 세포 독성효과가 이 운반체를 억제한 결과라고 보기는 어렵다. 그 이유로 첫번째는 효과를 나타내는 농도의 차이로서, Na⁺/H⁺ exchanger의 아형들마다 일부 차이는 있으나, HMA나 EIPA의 경우 대략 30-50 nM이면 이온 이동의 50%를 억제할 수 있다고 보고된 바 있으나¹⁶, 본 실험의 세포독성 효과는 이보다 거의 1,000배 가까이 높은 농도에서 나타난다는 점이다. 또 다른 이유로는 세포외액 및 내액의 pH 변화에 따른 독성효과의 차이를 들 수 있다. 만일 그 기전이 Na⁺/H⁺ exchanger의 억제일 경우 염기성보다는 오히려 산성의 세포외액에서 독성이 증가해야 하는데, 그 이유는 Na⁺/H⁺ exchanger가 Na⁺의 유입과 H⁺의 유출이 동반되는 antiport이므로 세포내의 산성화를 방지하게끔 작용하기 때문이다^{15, 22}. 따라서 Na⁺/H⁺ exchanger가 아닌 다른 운반체 억제효과로 인해서 일 것으로 추정되나 정확히 어떤 운반체인지는 아직까지 확인하지 못하였다.

Apoptosis가 초래되는 다른 기전으로 최근에 알려진 것이 바로 세포내 주요 이온들, 특히 K⁺의 농도 감소로 인한 세포의 위축현상이다^{12, 13}. 예를 들어 혈장제거(serum deprivation)나

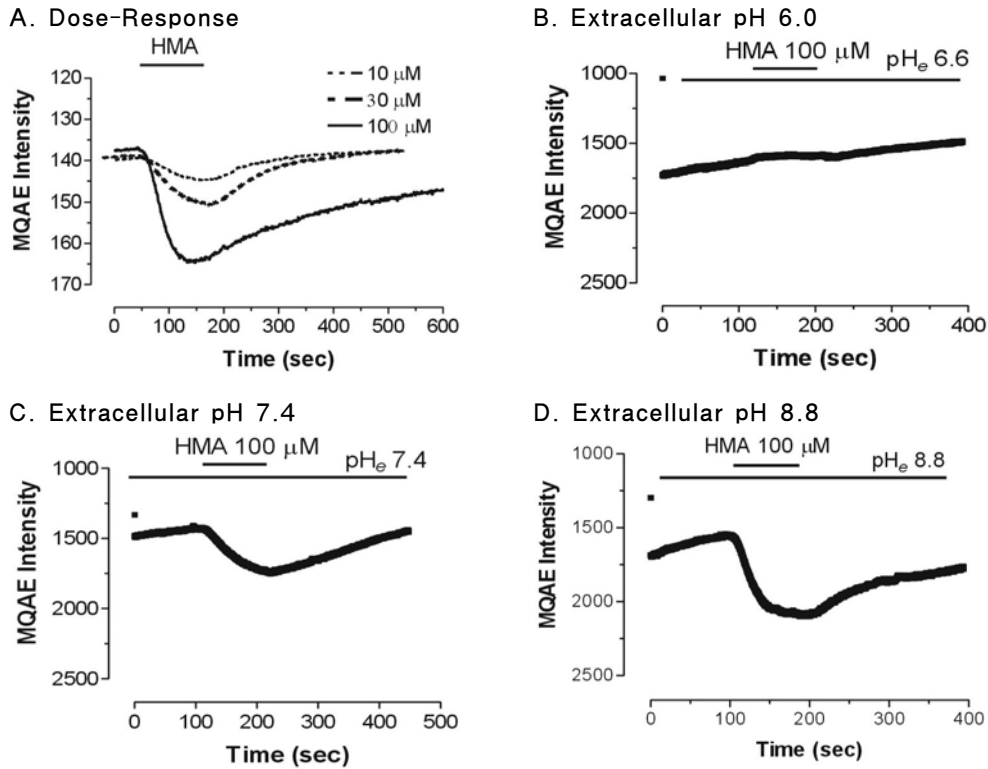


Fig. 7. HMA-induced reduction of intracellular Cl^- concentration. Intracellular Cl^- concentration, measured using Cl^- selective fluorescence dye MQAE, was reduced by HMA treatment with dose-dependent manner (A). HMA-induced changes was prominently increased at extracellular pH 8.8 (D) and decreased at pH 6.0 (B) than at normal extracellular pH, 7.4 (C).

여러 apoptosis 유발물질들의 작용들에 세포내 주요 이온의 유출이 관여한다고 보고되고 있으며^{35, 36)}, 이러한 변화는 세포외액의 K^+ 농도를 높이거나, K^+ 이 세포외로 유출되는 통로를 차단함으로써 농도감소를 줄일 경우 방지될 수 있다고 하였다^{37, 38)}. 뿐만 아니라 Cl^- 농도 감소 역시 apoptosis와 관련이 있어, 세포외액의 Cl^- 농도를 높이거나 Cl^- 통로 차단제를 투여할 경우에도 apoptosis을 방지할 수 있다고 보고되었다^{39, 40)}. 특히 세포내 K^+ 과 Cl^- 농도는 서로 밀접한 관련이 있으므로, 이들의 농도 감소는 세포내 삼투압을 현저히 저하시키게 되고, 결국 물의 유출로 인해 세포의 심각한 위축을 나타내게 한다¹²⁾. 이와 더불어 세포내 이온 농도 감소는 caspase 활성화에도 영향을 미친다고 보고되어 있다. 그 기전에 관해서는 명확히 알려져 있지 않으나, 세포내 K^+ 농도가 유지될 경우 그 자체로서 caspase 활성을 억제하며, 따라서 apoptosis로의 진행을 막을 수 있다고 하였다^{37, 41)}. 결국 정상적인 세포내 이온농도가 apoptosis을 방지하고 세포생존을 유지하는데 필수적이며, 이러한 이온 환경 평형이 깨어졌을 때 세포는 apoptosis을 통해 제거되게 된다¹³⁾.

본 실험에서 amiloride 유도체들은 세포 내 삼투압을 형성하는 주요 이온인 K^+ 과 Cl^- 를 고갈시켰으며, 결과에 나타나지 않았으나 이들은 세포 내 Na^+ 농도 역시 감소시켰다. Amiloride 유도체들은 이미 알려진 Na^+ 유입 억제기전을 통해 세포내 Na^+

농도를 감소시켰을 것으로 추측되나, K^+ 과 Cl^- 농도 감소의 기전은 아직 분명치 않다. 흥미로운 결과는 Na^+ , K^+ 및 Cl^- 농도의 감소가 앞의 세포독성에서와 동일하게 염기성 세포 외액에서 더욱 현저해지는 반면, 산성 세포외액에서는 감소 정도가 줄어들거나 거의 변화가 없다는 점이다. 이는 이들 이온의 농도감소가 amiloride 유도체들에 의한 apoptosis 과정에서 중요한 부분을 차지하고 있음을 의미한다. 문헌조사 결과, 아직까지 amiloride 유도체들이 세포내 주요 이온 농도에 영향을 미친다는 보고는 없으며, 이들에 의한 세포독성 및 이온농도 변화가 세포외액의 pH에 의존적이라는 것도 처음으로 관찰된 내용이다.

최근 들어 임신성 고혈압의 발병원인으로 태반 및 제대 혈관 조직의 apoptosis이 제시되고 있으며^{6, 7, 42)}, 태아의 자궁 내 성장 지연이 있는 경우 제대정맥 및 태반의 apoptosis 빈도가 크게 증가함이 보고되고 있다⁵⁾. Wang 등에 의하면 제대-태반 혈관 질환(umbilical placental vascular disease)을 가진 임신에서의 태아혈장을 제대정맥 내피세포에 투여할 경우 apoptosis이 초래된다고도 하였다⁴²⁾. 하지만 아직까지 내피세포의 손상 및 apoptosis을 초래하는 원인 및 그 과정에 관해서는 구체적으로 밝혀진 바 없다. 본 실험의 결과들은 HUVECs에서 amiloride 유도체들에 의한 apoptosis 과정에 세포내 주요 이온 농도의 감소가 중요한 기전으로 작용하고 있음을 뒷받침 해준다. 또한 다른

여러 apoptosis 초래 물질들의 작용에도 공통적으로 세포내 이온농도 감소가 apoptosis을 유발하는 과정에 대한 직접적인 증거를 확보하고, 다른 apoptosis 유발 자극에서도 이온 농도의 변화가 선행됨을 관찰할 수 있다면 apoptosis 과정에 대한 이해의 폭을 넓히고 apoptosis을 방지할 수 있는 기전 이해에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

목적 : 제대정맥은 모체의 혈액을 태아로 운반하여 산소와 영양물질을 공급하는 유일한 통로이다. 이러한 제대 혈류의 장애가 있을 시 자궁내 성장제한, 임신성 고혈압 등을 초래할 수 있다. 제대-태반 혈관의 내피세포 손상을 유발하는 원인 중 amiloride 유도체들을 중심으로 내피세포에 미치는 amiloride 유도체들의 작용을 밝히고, 세포 내 이온농도 변화와 apoptosis 간의 관계를 규명하고자 하였다.

방법 : 인간 제대정맥 내피세포는 Clonetics로부터 구입하였으며, 내피세포 성장에 필요한 여러 성장인자가 포함된 배지에서 배양하였다. MTT 방법과 flow cytometry 방법을 이용하여 세포독성 효과 및 apoptosis를 확인하였다. 세포 내 이온농도 변화를 측정하기 위해서는 각각의 목적에 적합한 형광염료들을 세포내에 부하시켜 놓은 뒤, 형광 현미경과 연결된 영상분석장치를 이용하여 관찰하였다.

결과 :

1) Amiloride 유도체들은 농도 의존적으로 HUVEC의 사멸을 나타내었으며, 각각의 정도는 HMA(IC₅₀: 11.2 μM), MIA(13.6 μM) > EIPA(30.8 μM) >> amiloride(106 μM) 순이었다.

2) 세포주기 분석결과 apoptosis의 특징적인 sub G₀/G₁ ploidy peak를 나타냈으며, 이러한 작용은 caspase 억제제에 의해 감소되었다.

3) Annexin-V와 propidium iodide 이중 염색 결과 apoptosis로 진행된 세포의 비율(73.0%)을 대조군(11.3%)에 비해 현저히 증가시켰다.

4) HMA에 의한 apoptosis 효과는 세포외액의 pH를 높이거나, NH₄Cl을 투여하여 세포내액의 pH를 높일 경우 크게 증가하였다.

5) HMA는 농도 의존적으로 세포내 주요 이온인 K⁺ 및 Cl⁻의 세포내 농도를 감소시켰으며, 이러한 효과 역시 세포외액의 pH를 높일수록 현저하게 증가하였다.

결론 : 이상의 결과들로 미루어 볼 때, HUVEC에서 amiloride 유도체들에 의한 apoptosis 과정에 세포내 주요 이온 농도 감소가 일부 관여하고 있을 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 2001;81:1415-59.
- 2) Nilius B, Viana F, Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol* 1997;59:145-70.
- 3) Inagami T, Naruse M, Hoover R. Endothelium: As an endocrine organ. *Annu Rev Physiol* 1995;57:171-89.
- 4) Galbraith RS, Karchmar EJ, Piercy WN, Low JA. The clinical prediction of intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1979;133:281-6.
- 5) Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1395-401.
- 6) Davidge ST, Signorella AP, Lykins DL, Gilmour CH, Roberts JM. Evidence of endothelial activation and endothelial activators in cord blood of infants of preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1301-6.
- 7) Hayman R, Brockelsby J, Kenny L, Baker P. Preeclampsia: the endothelium, circulating factor(s) and vascular endothelial growth factor. *J Soc Gynecol Investing* 1999;6:3-10.
- 8) Kerr JR, Wylie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- 9) Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996;236:1-26.
- 10) Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000;407:796-801.
- 11) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.
- 12) Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:405-11.
- 13) Bortner CD, Cidlowski JA. Cellular mechanism for the repression of apoptosis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:259-81.
- 14) Horisberger JD, Giebisch G. Potassium sparing diuretics. *Ren Physiol* 1987;10:198-220.
- 15) Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev* 1997;77:51-74.
- 16) Cobo JM, Garcia-Canero R, Valdez JG, Barrasso AM, Sailer BL, Crissman HA. Attenuation of apoptotic DNA fragmentation by amiloride. *J Cell Physiol* 1998;175:59-67.
- 17) Tanonaka K, Takasaki A, Kajiwara H, Takeo S. Contribution of sodium channel and sodium/hydrogen exchanger to sodium accumulation in the ischemic myocardium. *Gen Pharmacol* 2000;34:167-74.
- 18) Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Bellomo G, Albano E. Alteration of Na⁺ homeostasis in hepatocyte reoxygenation injury. *Biochim Biophys Acta* 2000;1500:297-305.
- 19) Karmazyn M. Mechanisms of protection of the ischemic and reperfused myocardium by sodium-hydrogen exchange inhibition. *J Thromb Thrombolysis* 1999;8:33-8.
- 20) Karmazyn M. The role of the myocardial sodium-hydrogen exchanger in mediating ischemic and reperfusion injury.

- From amiloride to cariporide. *Ann NY Acad Sci* 1999;874: 326-34.
- 21) Luo J, Tannock IF. Inhibition of the regulation of intracellular pH: potential of 5-(N,N-hexamethylene) amiloride in tumour-selective therapy. *Br J Cancer* 1994;70:617-24.
 - 22) Rich IN, Worthington-White D, Garden OA, Musk P. Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na^+/H^+ exchanger. *Blood* 2000;95:1427-34.
 - 23) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
 - 24) Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997;89: 2429-42.
 - 25) Subbegowda R, Frommel TO. Aspirin toxicity for human colonic tumor cells results from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest. *Cancer Res* 1998;58:2772-6.
 - 26) Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-20.
 - 27) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
 - 28) Babiero G, Duranti F, Bonelli G, Amenta JS, Baccino FM. Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. *Exp Cell Res* 1995; 217:410-8.
 - 29) Ormerod MG, Collins MK, Rodriguez-Tarduchy G, Robertson D. Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *J Immunol Methods* 1992;153:57-65.
 - 30) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
 - 31) Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407:802-9.
 - 32) Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
 - 33) Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000;2:318-25.
 - 34) Bortner CD, Cidlowski JA. Caspase independent/dependent regulation of K^+ , Cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:21953-62.
 - 35) Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, et al. Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 1997; 278:114-7.
 - 36) Yu SP, Yeh CH, Strasser U, Tian M, Choi DW. NMDA receptor mediated K^+ efflux and neuronal apoptosis. *Science* 1999;284:336-9.
 - 37) Bortner CD, Hughes FM Jr, Cidlowski JA. A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:32436-42.
 - 38) McCarthy JV, Cotter TG. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death Differ* 1997;4:756-70.
 - 39) Szabo I, Lepple-Wienhues A, Kaba KN, Zoratti M, Gulbins E, Lang F. Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6169-74.
 - 40) Rasola A, Farahi Far D, Hofman P, Rossi B. Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl^- efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis. *FASEB J* 1999; 13:1711-23.
 - 41) Hughes FM Jr, Bortner CD, Purdy GD, Cidlowski JA. Intracellular K^+ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem* 1997;272:30567-76.
 - 42) Wang X, Yi S, Athayde N, Trudinger B. Endothelial cell apoptosis is induced by fetal plasma from pregnancy with umbilical placental vascular disease. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:557-63.