

폐상피세포에서 Nitric Oxide (NO)에 의한 세포사에 관한 연구

단국대학교 의과대학 내과학교실

용화심, 김윤섭, 박재석, 지영구, 이계영

=Abstract=

Characterization of Nitric Oxide (NO)-Induced Cell Death in Lung Epithelial Cells

Wha Shim Yong, M.S., Youn Seup Kim, M.D., Jae Seuk Park, M.D.,
Young Koo Jee, M.D. and Kye Young Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

Background : Nitric Oxide (NO) is a multi-faceted molecule with dichotomous regulatory roles in many areas of biology. NO can promote apoptosis in some cells, whereas it inhibits apoptosis in other cell types. This study was performed to characterize NO-induced cell death in lung epithelial cells and to investigate the roles of cell death regulators including iron, bcl-2 and p53.

Methods : A549 cells were used for lung epithelial cells. SNP (sodium nitroprusside) and SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) were used for NO donor. Cytotoxicity assay was done by MTT assay and crystal violet assay. Apoptotic assay was done by fluorescent microscopy after double staining with propidium iodide and hoechst 33342. Iron inhibition study was done with RBCs and FeSO₄. For bcl-2 study, bcl-2 overexpressing cells (A549-bcl-2) were used and for p53 study, Western blot analysis and p53 functionally knock-out cells (A549-E6) were used.

Results : SNP and SNAP induced dose-dependent cell death in A549 cells and fluorescent microscopy revealed that SNAP induced apoptosis in low doses but necrosis in high doses while SNP induced exclusively necrotic cell death. Iron inhibition study using RBCs and FeSO₄ significantly blocked SNAP-induced cell death. And also SNAP-induced cell death was blocked by bcl-2 overexpression.

* 본 논문은 2003년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 이루어졌습니다.

Address for correspondence :

Kye Young Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Dankook University College of Medicine

16-5 Anseo-dong, Cheonan, 330-714, Korea

Phone : 82-41-550-3916 Fax : 82-41-556-3256 E-mail : kyleemd@dankook.ac.kr

Finally, we found that SNAP activate p53 by Western blot analysis and that SNAP-induced cell death was decreased in the absence of p53.

Conclusion : In lung epithelial cells, NO can induce cell death, more precisely apoptosis in low doses and necrosis in high doses. And iron, bcl-2, and p53 play important roles in NO-induced cell death. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2004, 56:***-***)

Key words : Nitric oxide (No), Apoptosis, Lung epithelial cells.

서 론

Nitric Oxide (NO)는 매우 다양한 생물학적 조절 기능을 수행하는 분자로서 심혈관계, 신경계, 면역 기능 등에 관여함은 물론 최근 세포사에도 직접적으로 영향을 미치고 있음이 알려져 있다. NO의 이렇게 복잡한 생물학적 기능 수행은 reactive oxygen species(ROS), metal ions 및 단백질 등과 복잡한 상호작용에 의한 것이며 NO가 나타내는 생물학적 효과는 용량-의존적이며, 세포-특이적이라고 밝혀져 있다¹⁻³. NO가 세포사에 미치는 영향도 세포 종류에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려져 있는데 간세포나 혈관내피세포에서는 아포프토시스를 억제하지만 종양세포 및 신경세포 등에서는 아포프토시스를 유도하는 것으로 보고되고 있다⁴⁻⁷. NO는 여러 호흡기질환의 병태 생리에도 관여하는 것으로 알려져 있는 바 천식과 같은 염증성 기도 질환에서 호기 NO가 증가되어 있는 반면 흡연자나 일차성 폐고혈압 환자에서는 감소되어 있다고 보고되고 있는데, NO가 면역 및 염증 관련성 역할 이외에 폐상피세포의 세포사에도 관여할 것으로 추측되고 있다^{8,9}.

NO가 세포사 조절에 미치는 영향이 상반되는 효과를 나타내는 것은 NO가 iron (철), thiol, proteinem 등의 생물학적 분자들과 어떠한 상호작용을 하는가에 따라 결정된다고 알려져 있다^{10,11}. 이 중에서 철은 NO-유도성 세포사에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 철은 caspases

활성을 저해함으로써 NO-유도성 세포사를 억제하는 것으로 보고되고 있다. 또한 NO가 아포프토시스를 유도하는 경로 중에서 미토콘드리아의 활성화와 p53이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO는 미토콘드리아 막에서 cytochrome c를 유리시키며^{12,13}, NO는 DNA 손상에 이은 p53 활성을 유도하여 아포프토시스를 유도하는 것으로 알려져 있다^{7,13}. 이에 저자들은 폐상피세포에서 NO가 세포사에 미치는 영향을 분석하고 그 신호전달 경로에 중요한 역할을 한다고 알려진 철, bcl-2, p53 등의 역할을 규명하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포주 및 시약

폐상피세포주로서 A549 (Type II pneumocyte) 세포주를 사용하였으며 ATCC사로부터 구입하였다. 세포배양은 RPMI 1640 (GIBCO BRL) 배지에 10% Fetal bovine serum과 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin 등을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 시행하였다.

2. Plasmid DNA 및 유전자주입

pcDNA3-bcl-2 expression vector를 연세대학교 오영준 교수로부터 제공받았고, HPV-E6 expression vector는 스탠포드 대학 Dr. Rosen으로부터

공여 받았다. 유전자주입 실험은 lipofectamine-plus (Gibco-BRL)를 이용하여 제품설명서에 따라 시행하였는데, 간단히 설명하자면 세포주를 24-well 세포배양접시에 70~80%의 confluency가 되게 37°C, 5% CO₂ incubator에서 overnight으로 배양한 후 다음날 세포를 washing 한 후 정해진 DNA의 양을 무혈청 배지에서 lipofectamine으로 각각의 세포에 주입하고 3시간 후에 성장 배지가 되도록 혈청을 첨가하여 주었다. 그 후에 G418을 400~600 µg/ml로 넣어준 뒤 그 중에서 저항성이 있는 것을 선택 배양해서 내성 clone을 pooling 함으로써 A549-bcl-2 세포 주와 A549-E6 세포 주를 획득하였다.

3. MTT assay

Nitric Oxide (NO)에 의한 Cell viability를 측정하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 간단히 요약하면, 96-well 세포배양접시에 A549 세포 주를 10,000개씩 분주한 후 NO donor인 SNP와 SNAP을 각각 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM로 각각 처리하여 48시간 후에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 5mg/ml 용액 20µl를 첨가하고 2시간동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 incubation한 후 0.1N acidified CH₃ Cl-HCl를 첨가하여 세포들이 용해되면 이를 ELISA plate reader 590nm에서 흡광도를 측정하여 Cell viability를 결정하였다.

4. Crystal Violet Assay

NO에 대한 inhibitor study와 cell viability를 보기 위해 crystal violet assay 를 시행하였다. Crystal violet (Sigma) staining solution은 30% ethanol 과 3% formaldehyde 용액을 첨가해 0.5% crystal violet이 되도록 만들어 실온에 보관하였다. 24-

well 세포배양 접시에 A549 세포주를 분주해 배양한 후 NO의 억제 물질인 철을 함유한 RBC (4mM)와 FeSO₄ (80µM)를 이용하여 실험을 시행하였다. RBC는 4mM로 사용하여 SNAP을 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM로 처리하여 48시간 후 배양액을 제거하고 준비해 놓은 crystal violet staining 용액을 500µl씩 넣은 후 실온에서 15분 정도 incubation시키고 crystal violet staining 용액을 제거하고 3차 증류수로 3회~4회 정도 washing 작업을 한 후 상온에서 plate를 15~30min 정도 dry시켰다. 10% SDS로 elution 한 후 96-well 세포배양접시에 100µl씩 분주해서 ELISA plate reader 590nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 결정하였다. FeSO₄는 12시간 전 처리한 후 RBC와 마찬가지로 SNAP을 각각 0mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM로 처리하여 같은 방법으로 실험하였다.

5. Apoptotic Assay

형태학적 감별에 의한 아포프토시스 assay를 시행하기 위하여 세포사를 유도한 세포주를 형광색소인 Hoechst 33342와 propidium iodide (PI)를 동시에 처리하는 이중염색으로 형광 현미경을 사용하여 관찰하였다. A549 세포주를 6-well 세포배양접시에 배양하여 키운 후 NO의 donor인 SNP와 SNAP을 각각 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM로 각각 처리한 후 세포를 수확해서 PBS로 세척한 후 원심분리하여 상층액은 버리고 pellet은 PBS로 resuspension 시킨 후 형광색소인 bisbenzimidazole Hoechst 33342(50µg/ml)를 취해 15분 동안 상온(어두운 곳)에서 incubation시키고 다시 원심분리를 해서 상층액은 버리고 다시 pellet을 PBS로 resuspension시킨 후 propidium iodide (PI ; 1mg/ml)를 첨가한 후 암실에서 형광 현미경으로 관찰하였다.

6. Western Blot

p53의 활성화를 확인하기 위해 Western blotting을 시행하였다. 각 세포주를 6개의 60π세포배양접시에서 80~90%의 confluency가 되도록 배양한 후 SNAP을 1mM의 농도로 처리한 후 각각 0시간, 2시간, 6시간, 10시간 후에 Trypsin/EDTA로 cell을 harvest 하여 lysis 용액(1%SDS, 1mM sodium vanadate, 10mM Tris-HCl pH7.4)으로 whole lysate를 획득한 후 5분간 4°C 14,000 rpm에서 원심 분리 하여 단백 추출물을 얻었다. Bradford solution을 사용해 단백 농도를 spectrophotometer로 측정하고 5분간 가열하여 denaturation시킨 후 SDS-PAGE로 전기 영동하여 nitrocellulose에 transfer하였다. Transfer한 membrane을 Blocking Solution(4% milk, 1% BSA, 10mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 30분~1시간 정도 흔들면서 incubation 시킨 후 1차 항체를 4% milk, 1% BSA, 10mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20등을 포함한 4% milk 용액에 1:1000 비율로 희석해서 1시간~2시간 실온에서 incubation하고 10분씩 3회 동안 세척한 후 horseradish peroxidase conjugated 된 2차 항체 반응을 1시간동안 한 후 같은 방법으로 다시 세척하여 ECL (Amersham, Arlington Heights, IL) solution

으로 현상하여 결과를 확인했다.

7. RBC 추출 (Hemoglobin; Hb)

NO에 대한 억제제로서 RBC에서 Hemoglobin을 추출하여 사용하였다. 전혈을 2,500rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액은 버리고 pellet을 PBS로 세척한 후 4°C modified Drabkin 희석액 (potassium ferricyanide and potassium cyanide solution)으로 RBC를 lysis 시킨 후 spectrophotometer로 파장 540 nm에서 흡광도를 측정해서 hemoglobin 농도를 측정하였다.

III. 결 과

1. 폐 상피 세포에서 NO-유도성 세포사

A549 폐상피세포를 대상으로 NO에 의한 세포독성 검사를 시행하였다. 96-well 세포배양접시에 한 well당 1×10^4 개의 세포를 분주하고 NO donor인 SNP와 SNAP을 각각 0mM, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM의 농도로 처리한 후 48시간 후에 MTT assay로 Cell viability를 측정한다. 결과 A549 세포 주에서 SNP에 의해 농도에 비례하여 유의하게 증가되는 세포독성 결과를 확인할

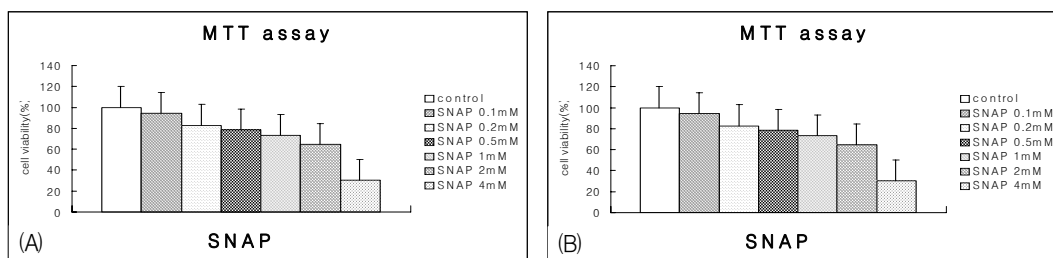


Fig. 1. Dose-dependent NO-induced cytotoxicity in A549 cells.

A549 cells were incubated with increasing doses of SNP or SNAP for 48 hr. Cytotoxicity was measured by MTT assay. (A) SNP data. (B) SNAP data. Values are mean of three experiments±S.D.

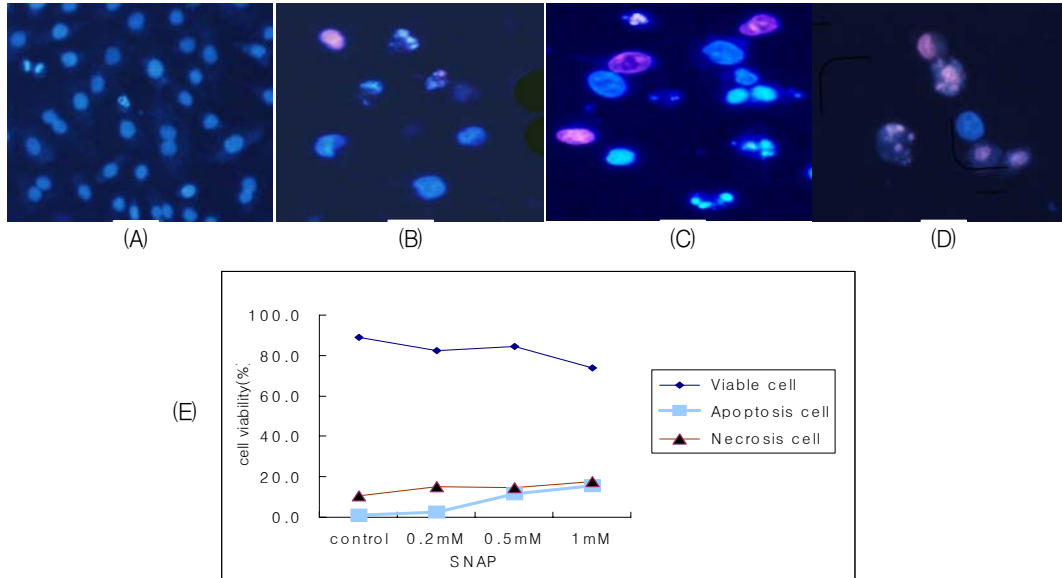


Fig. 2. Fluorescent microscopic findings after double staining with PI (propidium iodide) and Hoechst 33342 in SNAP-treated A549 cells. (A) control, (B) SNAP 0.5 mM, (C) SNAP 1 mM, (D) SNAP 2 mM (E) calculated apoptosis vs. necrosis. Blue cells with intact nuclei are viable cells; blue cells with fragmented nuclei are early apoptotic cells; pinkish cells with fragmented nuclei are late apoptotic cells; pinkish cells with intact nuclei are necrotic cells.

수 있었고, (Fig. 1-A) SNAP 역시 농도에 비례하는 유의한 세포독성을 유도함을 확인할 수 있었다. (Fig. 1-B)

2. 형광 현미경 소견

SNP와 SNAP에 의한 A549 세포주의 세포사가 아포프토시스인지 괴사인지의 세포사를 감별하기 위하여 형광색소인 Hoechst 33342와 propidium iodide (PI)로 염색한 후 관찰되는 형태학적 변화를 관찰하였다. 핵이 유지되어 있는 푸른색 세포는 정상세포이며, 핵이 분절된 푸른 세포는 초기 아포프토시스 세포이고, 핵이 분절되었으며 붉은 세포는 후기 아포프토시스 세포이며, 핵은 유지되어 있으나 붉은 세포는 괴사된 세포이다.

이러한 감별점에 기준하여 SNP와 SNAP을 각각 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM로 처리한 후 형광현

미경으로 관찰한 결과 SNAP는 저농도에서는 아포프토시스를 유도하지만 농도가 증가함에 따라 아포프토시스 세포와 괴사된 세포를 동시에 관찰할 수 있었다. (Fig. 2) 반면 SNP는 저농도에서부터 괴사 세포를 관찰할 수 있어서 SNP에 의한 세포사는 주로 괴사를 유도함을 확인할 수 있었다. (Fig. 3.) 이는 SNP가 순수한 NO donor가 아니라 cyanide 성분에 의한 세포독성의 결과라고 생각되며, 고농도에서 SNAP에 의한 괴사 유도는 peroxynitrite 생성에 의한 결과라고 생각된다.

3. 철에 의한 NO-유도성 세포사 억제 효과

폐상피세포를 손상으로부터 보호한다고 알려져 있는 철의 NO 유도성 세포사에 미치는 영향을 확인하기 위하여 철을 함유하는 FeSO₄와 RBC를 사용하였다. RBC는 Hb 4mM의 농도로, FeSO₄는 80μM의 농도

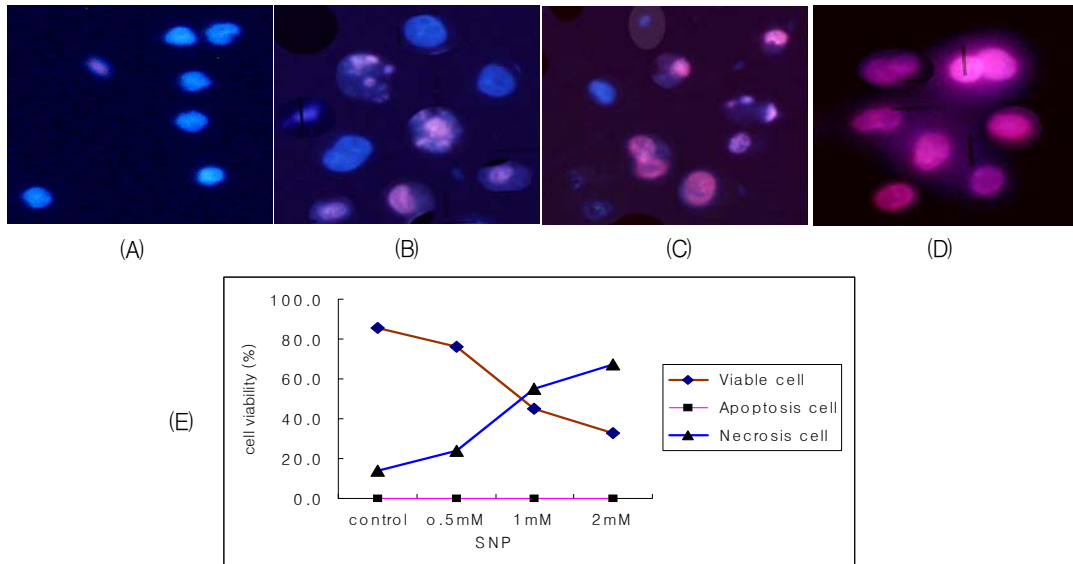


Fig. 3. Fluorescent microscopic findings after double staining with PI (propidium iodide) and Hoechst 33342 in SNP-treated A549 cells. (A) control, (B) SNP 0.5 mM, (C) SNP 1 mM, (D) SNP 2 mM (E) calculated apoptosis vs. necrosis. Blue cells with intact nuclei are viable cells; blue cells with fragmented nuclei are early apoptotic cells; pinkish cells with fragmented nuclei are late apoptotic cells; pinkish cells with intact nuclei are necrotic cells.

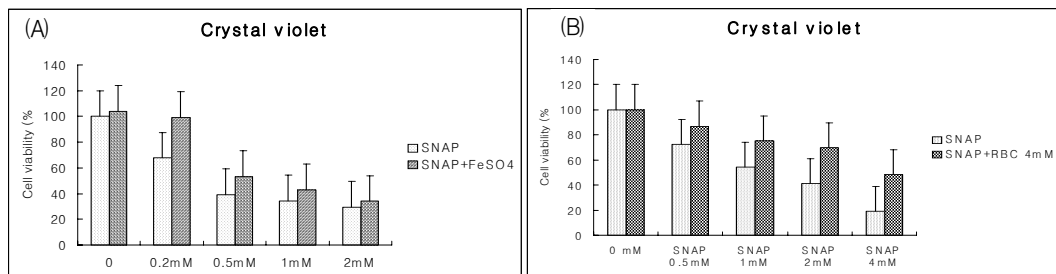


Fig. 4. Inhibition of NO-induced cell death in A549 cells by iron. (A) Red blood cells (RBC). (B) FeSO4. A549 cells were incubated with SNAP (0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM) in presence or absence of RBC (4mM) or FeSO4 (80 μ M) for 48 hr and cell viability was measured by crystal violet assay. Values are mean of three experiments \pm S.D.

로 SNAP 처치 12시간 전에 전처리하여 48시간 후에 crystal violet assay로 세포 독성을 확인하였는데 Fig. 4.에서와 같이 SNAP 단독에 비해 RBC와 FeSO4 모두 30-40%의 세포생존율의 증가를 보여 철에 의한 NO 유도성 세포사의 억제효과를 확인할 수 있었다.

4. 아포프토시스 억제 단백질 Bcl-2의 효과

NO에 의한 세포사멸에는 이 NO 자체가 oxidant이기 때문에 oxidant가 관여할 것이라고 쉽게 알 수 있으며 oxidant에 의한 아포프토시스는 미토콘드리아 경로가 중요하다고 알려져 있기에 미토콘

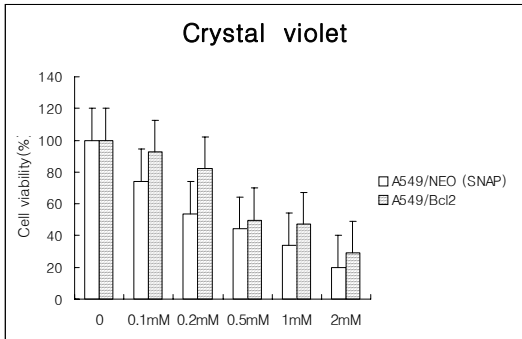


Fig. 5. Inhibition of NO-induced cell death in A549 cells by Bcl-2 overexpression. A549-bcl-2 cells (stably transfected A549 cells with bcl-2 overexpression vector) and its control A549-neo cells were compared for cytotoxicity in various concentrations of SNAP and cell viability was measured by crystal violet assay. Values are mean of three experiments±S.D.

드리아에 위치하는 아포프토시스를 억제하는 단백질인 Bcl-2의 역할을 확인하기 위하여 Bcl-2 발현 vector인 pcDNA3-bcl-2 construct와 대조 vector인 pcDNA3-neo construct를 유전자 주입하여 bcl-2를 과 발현하는 안정적인 A549-bcl-2 세포주를 선택 배양하여 대조세포주인 A549-neo 세포주와 crystal violet assay로 SNAP 0mM, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 2mM로 처리하여 NO에 대한 세포독성을 비교한 결과 A549-bcl-2 세포주에서 SNAP에 의한 세포사를 각각 20% 정도 억제함을 확인할 수 있었다. (Fig. 5.) 이상의 결과에서 bcl-2가 NO-유도성 세포사멸에서 유의한 억제 효과가 있음을 확인하였다.

5. NO-유도성 세포사멸에서 p53이 미치는 영향

NO-유도성 세포사멸의 신호전달체계에 있어서 p53의 중요성을 확인하기 위하여 p53 western blot 분석 실험과 HPV-E6 과발현에 의한 p53의 기능

적 knock-out 실험을 시행하였다. Fig. 6-A.에서와 같이 SNAP 처리 후 p53이 유의하게 활성화됨을 확인할 수 있었으며, 이러한 p53의 활성화의 기능적 유의성을 검증하기 위해 p53이 기능적으로 knock-out된 A549-E6세포와 대조세포주 A549-neo 세포주에서 SNAP에 의한 세포독성을 비교한 바 A549-E6 세포주의 세포 생존율이 A549-neo 세포의 생존율보다 30~40% 높은 세포사 억제 효과를 보여 NO 유도성 세포사에 p53이 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다.

IV. 고찰

Nitric Oxide (NO)는 세포독성이나 성장억제 활성을 나타내는 자유유리기 (free radical)로서 세포 종류에 따라 세포사를 억제하거나 촉진할 수 있다고 알려져 있는데 간세포 및 혈관내피세포에서는 세포사를 억제하지만 종양세포 및 신경 세포 등에서는 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있다.¹⁻³ 아포프토시스 유도 효과는 NO 자체에 의한 신호전달 작용뿐 아니라 iNOS에 의해 생산되는 고농도의 NO가 peroxynitrite를 생성함으로써 이에 의해 DNA 손상에 의한 p53의 축적을 유도함으로써 caspase의 활성화, cytochrome C의 방출, Bax/Bcl-xl의 비율 증가 등에 의해 아포프토시스를 유도하거나 p21 유도발현에 의한 세포주기의 정지도 관여할 것으로 알려져 있다.^{14,15} NO의 아포프토시스 억제 효과는 caspase의 활성화, ceramide generation, 미토콘드리아의 cytochrome C의 방출들이 억제되게 하는 cGMP의 생산과 연관되어 있다고 한다.¹⁻³

NO에 의한 폐상피세포의 세포사는 여러 호흡기 질환의 병태 생리에도 관여하는 것으로 알려져 있는데, 천식과 같은 염증성 기도 질환에서 호기시 NO가 증가되어 있는 반면 흡연자나 일차성 폐 고혈압(Primary Pulmonary Hypertension : PPH) 환자에서는 감소되어 있다고 보고되어 있는 바 이는

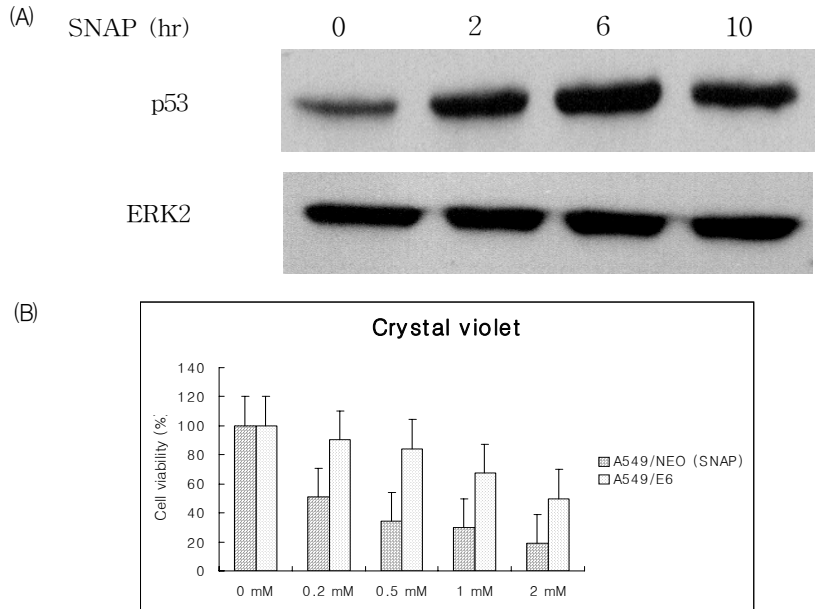


Fig. 6. Activation of p53 by SNAP in A549 cells and inhibition of NO-induced cell death by functional block of p53. **(A)** Western blot analysis for p53 activation in SNAP (1 mM)-treated A549 cells. Cells were harvested at 0, 2, 6, and 10 hr after SNAP treatment and Western blot was done with a monoclonal p53 antibody. **(B)** A549-E6 cells(stably transfected A549 cells with functionally p53 blocking HPV-E6 protein overexpression vector) and its control A549- neo cells were compared for cytotoxicity in various concentrations of SNAP and cell viability was measured by crystal violet assay. Values are mean of three experiments±S.D.

흡연에 의해 NO 생성 세포에 독성이 가해지거나, 흡연 시 담배연기 안의 고농도의 NO를 흡입함으로써 endogenous NO를 생산하는 것을 저해하기 때문이라는 설명도 있다.⁸ 하지만 호기시 NO 가 갖는 병태생리학적 의의와 NO 유도성 세포사 갖는 연관성에 대해서도 좀 더 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다. NO 유도성 세포사의 조절인자와 신호전달 물질을 규명하기 위하여 RBC와 FeSO₄를 사용하여 철에 의한 억제 실험을 하였는데 NO는 철이나 질소를 함유하는 성분에 의해 lipid peroxidation을 저해한다고 알려져 있다.^{16,17} 아포프토시스를 유도하는 NO는 철이 불충분한 세포 내에서 발생하게 되는데 예를 들어 Raw 264.7 대식세포와 MCF-7 유방암 세포에서의 NO는 철

이 불충분하기 때문에 caspase 활성화에 의해 아포프토시스가 유도되지만 철을 전치시켰을 때의 NO는 반대로 작용하여 세포들은 아포프토시스로부터 보호되게 된다.^{17,18} 즉 세포내에 철의 양에 따라 NO가 아포프토시스를 유도하는지 아닌지가 결정되며 NO의 아포프토시스의 효과는 세포내에서 철이 동원됨에 달려있다고 할 수 있겠다. 이러한 철의 아포프토시스 억제 효과는 철이 caspase 활성을 저해함으로써 발생하는 것으로 알려져 있는데 세포내에서 heme을 가지지 않은 철의 증가는 NO에 노출됨으로써 nitrosothiol이 형성되는 것을 증가시키는 것과 같이 더 큰 iron-nitrosyl 복합체 형성과 연관되어 있다. 또한 철은 세포질 내의 dinitrosyl-iron complex (DNIC)의 형성과 연관

있어서,¹⁷ DNIC 역시 caspase의 활성을 억제하게 됨으로써 아포프토시스를 억제하게 되며, deferoximine으로 철을 chelation하면 철에 의한 NO 유도성 아포프토시스 억제효과 상쇄된다고 한다. NO가 아포프토시스를 유도함에 있어 철이 중요한 작용을 한다는 위와 같은 사실을 확인하고자 철의 성분이 있는 RBC와 FeSO₄를 처리하여 실험한 결과 폐상피세포에서도 철은 NO 유도성 세포사에서 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다.

NO 세포사 경로에 있어서 미토콘드리아는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO는 미토콘드리아 막을 통하여 cytochrome C를 직접적으로 방출할 수 있게 유도는데 NO는 전자가 체인으로 이동하는 미토콘드리아 안에서 cytochrome C 산화효소와 결합된다.^{1,13,14} 방출된 cytochrome c는 apoptotic protease activity factor (Apaf-1)와 상호작용을 하게 되어 caspase 9를 활성화시키고 활성화된 caspase 9가 다시 effector caspase인 caspase 3를 활성화시킴으로써 아포프토시스를 유발하게 되는데 결국에는 핵의 분절화 (fragmentation)를 일으키게 된다. 아포프토시스 억제 단백질로서 미토콘드리아에 존재하는 Bcl-2와 Bcl-X_L은 cytochrome c가 방출되는 것을 차단하고 caspase의 활성화를 방해함으로써 아포프토시스가 일어나지 않도록 하게 하는 작용을 하는데 본 연구에서 이러한 bcl-2가 NO 유도성 폐상피세포의 세포사에 미치는 역할을 확인한 결과 bcl-2 과발현 세포주에서 NO-유도성 세포사의 차단효과가 증명할 수 있어서 NO-유도성 폐상피세포의 세포사가 미토콘드리아 경로를 통해 일어남을 확인할 수 있었다.

NO 유도성 세포사의 또 다른 중요한 경로로 p53 경로를 들 수 있는데 NO에 의한 아포프토시스의 유도는 직접적인 DNA에 손상에 의해 발생하게 된다는 설명이다.¹⁻³ 본 연구에서도 폐상피세포에서 NO에 의해 p53이 활성화되는 것을 확인하였

고 p53의 기능적 중요성을 검증하기 위하여 A549-E6 세포주를 이용한 세포독성 비교실험을 통하여 NO 유도성 세포사에서 p53역시 중요한 역할을 담당하고 있음을 확인할 수 있었다.

결론적으로 NO는 폐상피세포에서 세포사를 유도하며 낮은 농도로 존재하게 되면 아포프토시스를 유발하게 되지만 NO가 높은 농도로 존재하게 되면 세포피사를 유발하게 됨을 확인하였으며, NO-유도성 세포사에는 철이 중요한 조절 인자로 작용하고 있음을 알 수 있었고 그 신호전달 과정에서 bcl-2와 p53이 중요한 역할을 할 것이라 생각된다.

요 약

연구배경 :

Nitric Oxide(NO)는 매우 다양한 생물학적 조절기능을 수행하는 분자로서 심혈관계, 신경계, 면역기능 등에 관여함은 물론 최근 세포 사에도 직·간접적으로 영향을 미치고 있음이 알려져 있다. NO의 이렇게 복잡한 생물학적 기능 수행은 reactive oxygen species(ROS), metal ions 및 단백질 등과 복잡한 상호작용에 의한 것이며 NO가 나타내는 생물학적 효과는 용량-의존적이며, 세포-특이적이라고 밝혀져 있다. NO는 간세포 및 현관내피세포에서는 아포프토시스를 억제하지만 종양세포 및 신경세포 등에서는 아포프토시스를 유도하는 것으로 보고되고 있다. NO는 여러 호흡기질환의 병태생리에도 관여하는 것으로 알려져 있는바 천식과 같은 염증성 기도 질환에서 호기 NO가 증가되어 있는 반면 흡연자나 일차성 폐 고혈압 환자에서는 감소되어 있다고 보고되고 있다. 이러한 배경에서 NO가 폐 상피 세포의 세포 사에 미치는 영향과 신호전달 경로를 밝히기 위하여 본 연구를 시행하였다.

방 법 :

폐 상피 세포로는 A549 세포 주를, NO donor로서는

SNAP (S-nitroso-N-acetyl-penicillamine)과 SNP (sodium nitroprusside)를 사용하였다. 세포 독성 검사는 crystal violet assay를 이용하였고 아포프토시스 assay는 Hoechst 33342와 propidium iodide(PI) 이중 염색 후 형광현미경을 이용하여 핵의 형태학적 변화를 관찰함으로써 괴사(necrosis)와 감별하였다. 철에 의한 NO 유도성 세포 사 억제 효과를 관찰하기 위하여 RBC와 FeSO₄를 이용하였다. NO 유도성 세포사의 신호전달 경로에 bcl-2와 p53이 미치는 영향을 평가하기 위하여 bcl-2 과 발현 세포 주 (A549-bcl-2)와 p53 knock out 세포 주 (A549-E6)를 대상으로 세포독성을 비교하였고 p53 활성화는 Western blot을 이용하여 확인하였다.

결 과 :

A549 세포 주에서 SNAP과 SNP 모두 농도-의존적 세포독성을 관찰할 수 있었다. 아포프토시스 assay에서 SNAP은 저 농도에서는 아포프토시스를, 고농도에서는 괴사를 유도함을 관찰하였고 SNP는 농도에 상관없이 세포사가 괴사의 형태를 나타냄을 확인하였다. 이는 SNP가 단순한 NO donor가 아니라 cyanide에 의한 세포독성의 결과라고 생각되며 고농도의 SNAP에 의한 괴사 유도는 peroxynitrite 생성에 의한 결과임을 시사한다. SNAP에 의한 세포 사는 RBC와 FeSO₄등 철에 의해 억제됨을 확인하였고 bcl-2에 의해서 억제되었으며 p53을 활성화시키고 p53 knock out에 의해 차단되었다.

결 론 :

폐상피세포에서 NO는 저 농도에서는 아포프토시스를 고농도에서는 괴사에 의한 세포 사를 유도하며 철이 중요한 억제제이며 bcl-2 및 p53이 신호전달 경로에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric Oxide as a Bioregulator of Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282:1075-1079
2. Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric Oxide and Apoptosis: Another Paradigm for the Double-Edged Role of Nitric Oxide. *Nitric Oxide* 1997;1(4):275-281
3. Kim YM, Bombeck CA, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res*. 1999;84:253-256
4. Wang Y, Vodovotz Y, Kim PK, Zamora R, Billiar TR. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;962: 415-22.
5. Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2001;276:10627-33.
6. Ceneviva GD, Tzeng E, Hoyt DG, Yee E, Gallagher A, Engelhardt JF, Kim YM, Billiar TR, Watkins SA, Pitt BR. Nitric oxide inhibits lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;275:L717-28
7. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* 2001;2:149-56
8. Thomassen MJ, Kavuru MS. human alveolar macrophage and monocytes as a source and

- target for nitric oxide. *International Immunopharmacology* 2001;1:1479-1490
9. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled Markers of Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1693-1722
 10. Chen HW, Jiang WS, Tzeng CR. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril* 2001;75:1163-1171
 11. Feger F, Ferry-Dumazet H, Mamani Matsuda M, Bordenave J, Dupouy M, Nussler AK, Arock M, Devevey L, Nafziger J, Guillosson JJ, Reiffers J, Mossalayi MD. Role of iron in tumor cell protection from the pro-apoptotic effect of nitric oxide. *Cancer Res* 2001;61:5289-94
 12. Umansky V, Ratter F, Lampel S, Bucer M, Schirmacher V, Ushmorov A. Inhibition of Nitric-Oxide-Mediated Apoptosis in Jurket Leukemia Cells despite Cytochrome *c* Release. *Exp cell Res* 2001;265:274-282
 13. Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR. Nitric Oxide Suppression of Apoptosis Occurs in Association with an Inhibition of Bcl-2 Cleavage and Cytochrome *c* Release. *J Biol Chem* 1998;273:31437-31441
 14. Holan V, Krulova M, Zajicova A, Pindjakova J. Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in the immun system. *Mol Immunol* 2002;38:989-995
 15. Yoon SJ, Choi KH, Lee KA. Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 induction and Bax suppression. *Mol Reprod Dev* 2002;61:504-10
 16. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric Oxide : Cytotoxicity versus Cytoprotection-How, When, and Where? *Nitric Oxide. Biology and Chemistry* 1997;1:107-120
 17. Kim YM, Chung HT, Simmons RL, Billiar TR. Cellular Non-heme Iron Content Is a Determinant of Nitric Oxide-mediated Apoptosis, Necrosis, and Caspase Inhibition. *J Biol Chem* 2000; 275:10954-10961
 18. Green DR and Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312