

## A77 1726 Inhibit NO-induced Apoptosis via PI-3K/AKT Signaling Pathway in Rabbit Articular Chondrocyte

In-Kyou Choi and Song-Ja Kim<sup>†</sup>

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Kongju National University, Korea

Leflunomide is an immunomodulatory agent used for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). Leflunomide known as a regulator of iNOS synthesis which largely decreases NO production in diverse cell type. However, the effect of leflunomide on chondrocyte is still poorly understood. In our previous studies, we have shown that direct production of Nitric oxide (NO) by treating chondrocytes with NO donor, sodium nitroprusside (SNP), causes apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase in association with elevation of p53 protein level, caspase-3 activation. In this study, we characterized the molecular mechanism by which A77 1726 inhibit apoptosis. We found that A77 1726 inhibit NO-induced apoptosis as determined by MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) assay and DNA fragmentation. The inhibition of apoptosis by A77 1726 was accompanied by increased PI-3 kinase and AKT activities. So, inhibition of phosphatidylinositol (PI)-3kinase with LY294002 rescued apoptosis. Triciribine, the specific inhibitor of AKT, also abolished anti-apoptotic effect. Our results indicate that A77 1726, the active metabolite of leflunomide, mediates NO-induced apoptosis in chondrocytes by modulating up-regulation of PI-3 kinase and AKT.

**Key Words:** A77 1726, Leflunomide, Chondrocyte, Apoptosis, PI3 kinase

### 서 론

Leflunomid는 구강에 투여하는 면역조절제로서, 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환에 효과적으로 작용한다. 또한 Leflunomide는 항 류마티스성 약물로 류마티스성 관절염 환자에게 투여된다 (Strand et al., 1999; Smolen et al., 1999; Emery et al., 2000; Breedveld et al., 2000). 생체 내에서 Leflunomide는 빠르게 대사가 이루어져 A77 1726이라는 대사산물로 변환된다 (Herrmann et al., 2000). 이러한 A77 1726은 미토콘드리아 효소인 Dihydro-orotate dehydrogenase (DHODH)를 억제시키며, 이러한 DHODH는 피리미딘을 합성하는 De novo 체계에 매우 중요한 효소이므로 피리미딘 합성과정에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Fox et al., 1999). 이러한 효과는 피리미딘에 매우 의존적인 T-세포, B-세포의 세포사멸을 유도하므로 A77 1726의 자가면역질환 조절의 메카니즘을

설명해 주고 있다. 뿐만 아니라, A77 1726은 정상세포에서 산화질소 생성 효소인 iNOS의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Miljkovic et al., 2001). 하지만 이러한 A77 1726의 항 류마티스성 효과에 대한 자세한 메커니즘은 잘 알려지지 않았다.

연골세포는 배아발생과정 중 중간엽 줄기세포로부터 분화하여 생성된다 (Sandell et al., 1999; DeLise et al., 2000). 분화된 연골세포의 표현형은 Type II collagen이나 Proteoglycan과 같은 연골세포 특이적 세포외부 기질의 합성, 침적 및 유지로 묘사할 수 있다. 이러한 연골세포의 세포외부 기질의 합성은 연골조직의 발생, 유지, 재생에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 연골세포는 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$  (Goldring et al., 1994), 산화질소 (Amin et al., 1998), Retinoic Acid (Cash et al., 1997; Weston et al., 2000), 계대배양 (Lefebvre et al., 1990) 등 여러 가지 원인에 의해 외부 기질 합성의 불균형을 야기시키며, 이는 연골세포의 탈분화 및 세포사멸을 일으킨다. 이러한 세포 수준의 손상으로 인해 조직이 파괴되며 이는 류마티스 관절염 혹은 골관절염의 발병원인이 된다. 산화질소는 산화질소 생성 효소에 의해 생성되며 이러한 산화질소는 연골세포에 작용하여 관절질환인 퇴행성 관절염과 류마티스성 관절염을 유발시킨다 (Yoon

\*논문 접수: 2009년 2월 20일

수정재접수: 2009년 2월 25일

<sup>†</sup>교신저자: 김송자, (우) 314-701 충남 공주시 신관동 182번지, 국립공주대학교 자연과학대학 생명과학과  
Tel: 041-850-8507, Fax: 041-850-0927  
e-mail: ksj85@kongju.ac.kr

et al., 2002). 산화질소에 의한 관절 파괴는 다양한 방식으로 진행된다. 특히 연골세포의 사멸은 관절 파괴에 매우 중요한 원인 중 하나라 생각된다 (Blanco et al., 1998; Hashimoto et al., 1998; Yatsugi et al., 2000).

이전 연구결과에서 우리는 산화질소의 공여체인 Sodium nitroprusside를 토끼연골세포에 처리하였을 때 MAPK 세포신호 전달체계인 ERK-1/2와 p38 신호전달계에 의해 세포사멸이 유도된다는 것을 보고한 바 있다. 위의 MAPK 신호전달체계는 p53단백질의 발현 양을 조절하여 결과적으로 Caspase-3의 활성을 유도한 다음 세포사멸을 유도하는 것으로 생각된다 (Pelletier et al., 2001; Kim et al., 2001, 2002). 또한, 산화질소에 의한 p38의 인산화는 PKC- $\zeta$ 의 Thr-560 부분의 자가 인산화를 억제시켜 세포사멸을 유도하는 것으로 생각된다 (Kim, 2005).

본 연구에서는 산화질소 공여체인 SNP에 의한 연골세포의 사멸이 항 염증치료제로 알려진 Leflunomide의 대사산물인 A77 1726에 의해 이루어지는 연골세포사멸 저해가 어떠한 분자적 조절을 통하여 이루어지는가에 대해 알아보하고자 하였다. 본 연구결과에 따르면 산화질소 유도에 의한 연골세포의 사멸은 A77 1726의 PI-3K/AKT 활성유도를 통해 연골세포의 사멸이 억제되어짐을 확인할 수 있었다.

## 재료 및 방법

### 1. Cell culture

토끼 무릎 연골세포의 추출은 2주된 New Zealand White종의 토끼로부터 추출하였다. 추출방법은 치사량의 Diethyl ether로 토끼를 치사 시킨 후 뒷다리 관절부분을 포함한 요골과 장골을 적출한다. 적출한 관절로부터 연골을 절편하여 0.2% collagen 분해효소 (381 U/mg, Sigma)가 함유된 PBS 완충용액에 넣고 37°C에서 6시간 동안 반응시켜 세포를 조직에서 분리시킨다. 세포는 원심분리를 이용하여 수집한다. 수집된 세포는 10%의 FBS, 50  $\mu$ g/ml의 Streptomycin, 50 units/ml의 Penicillin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)에서  $5 \times 10^4$ 의 밀도로 배양한다. 배양액은 이틀에 한 번씩 교체하여 주었으며, 배양접시의 세포밀도가 거의 80%가 되었을 때 시약을 처리하였다.

### 2. Immunoblot analysis

단백질의 정량분석을 위하여 세포를 50 mM Tris-HCl,

pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% Sodium dodecylsulfate가 함유된 Lysis buffer에 단백질 분해효소 억제제 [10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride]와 인산 분해효소 억제제 (1 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )를 첨가하여 세포 단백질을 추출하여 사용하였다. 분리된 단백질은 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. pAKT, pro-caspase-3, p53 그리고 actin 항체는 Santa cruz biotechnology사에서 구입하여 사용하였다 (Santa Cruz, CA).

### 3. DNA fragmentation

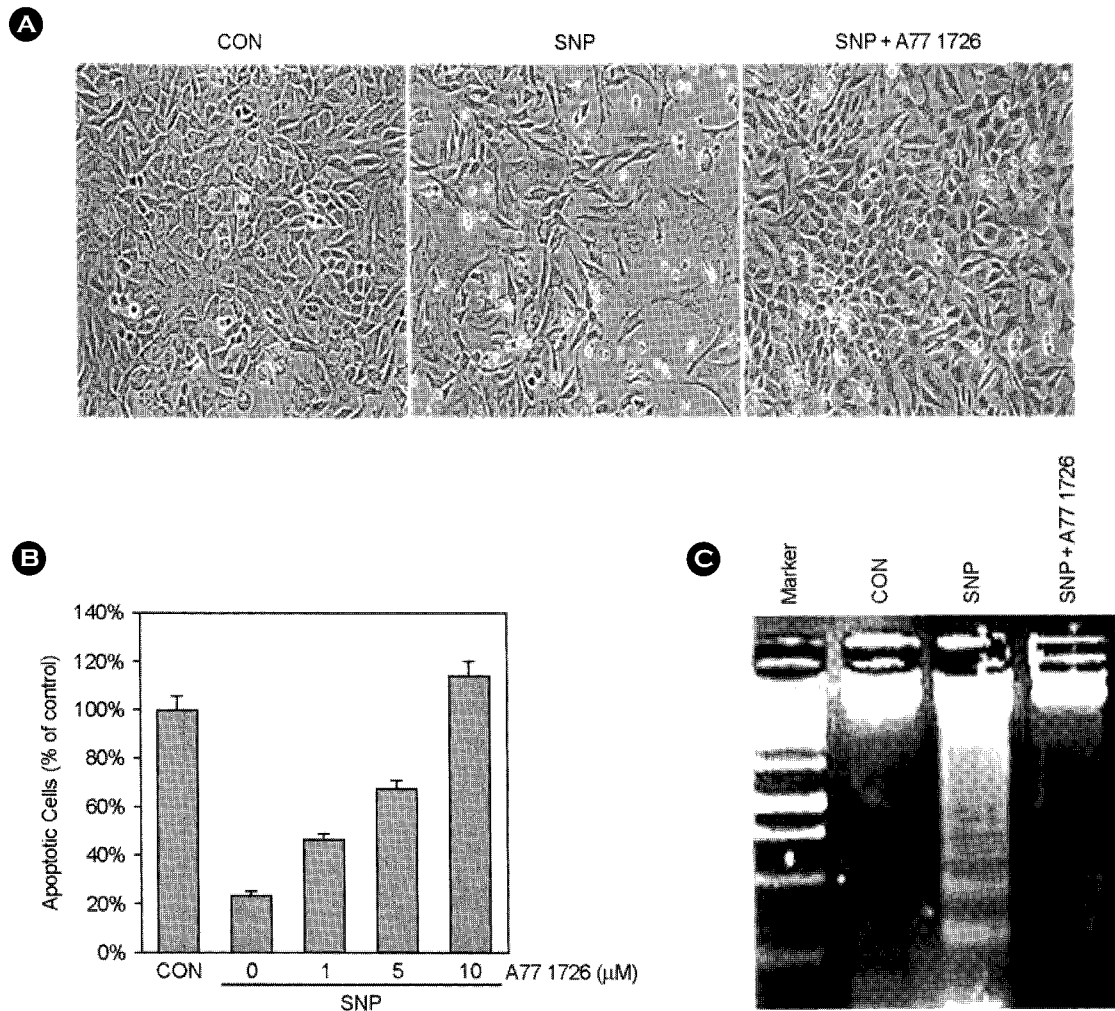
세포는 PBS로 2회 세척 후 Lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl)를 사용하여 세포를 용해 해주었다. 용해한 용액은 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 수집하였으며, 수집한 상등액에 20  $\mu$ g RNase A를 37°C에서 2시간 동안 반응하였으며, 이 후 0.01 mg의 Proteinase K를 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 용액에 PCI (Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol 25:24:1)를 사용하여 DNA를 정제하였으며, 3 M Sodium acetate와 에탄올을 사용하여 DNA를 침전하였다. 침전된 DNA는 70% 에탄올로 세척하였다. 세척한 DNA는 상온에서 건조한 후, 멸균된 2차 증류수를 사용하여 DNA를 녹였다. 용해된 DNA는 2% agarose gel에 전기영동하여 DNA 절편을 분리하였다.

### 4. MTT assay

세포를 96 Well plate에  $2 \times 10^4$ 의 농도로 배양한다. 세포밀도가 80% 이상 되었을 때 시약을 처리하였으며, 처리시간에 따라 배양세포에 MTT reagent I [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]를 최종 농도 10%로 첨가하였다. 4시간 반응 후 formazan 결정이 생겼음을 확인한 후, MTT reagent II (10% SDS in 0.01 M HCl, DMSO)를 최종 부피의 2배 첨가하여 formazan 결정을 12시간 동안 용해한 후 흡광 광도계를 사용하여 600 nm의 흡광도로 측정하였다.

### 5. 결과 분석 및 평균화

본 실험의 결과는 3~4차례의 실험의 평균치를 결과로 사용하였다.



**Fig. 1.** A77 1726 inhibit NO-induced apoptosis. **A.** Chondrocytes were untreated (CON) or treated with 1 mM SNP for 24 h that was pretreated for 1 h with vehicle alone or 10  $\mu$ M A77 1726. Photographs were taken using phase contrast microscope ( $\times$  400). **B** and **C.** Chondrocytes were treated with or without the indicated concentrations of A77 1726 for 1h prior to 1 mM SNP. Cell viability was determined using MTT assay kit (**B**) DNA fragmentation was determined by using DNA electrophoresis (**B**). The data in **A** and **C** represent the results of a typical experiment conducted three times, and **B** represent the average values with standard deviation ( $n=4$ ).

## 결 과

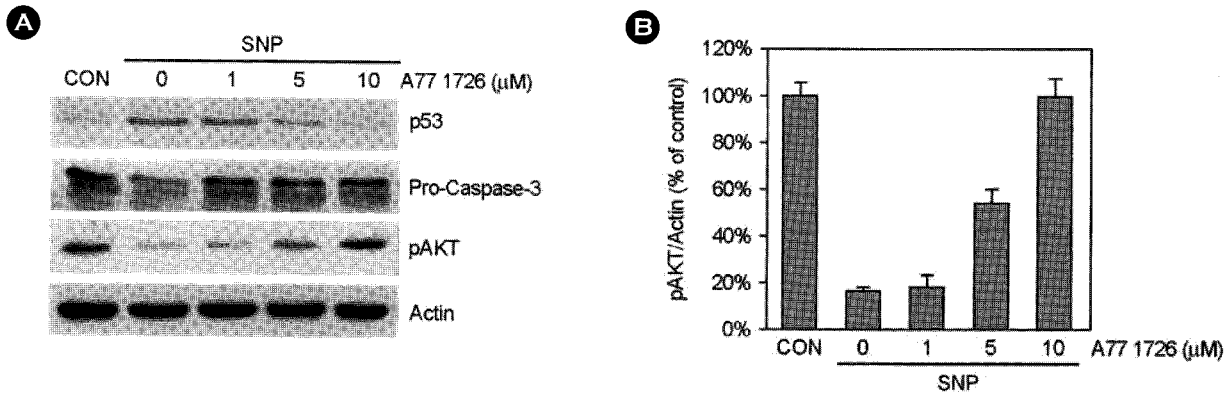
1. A77 1726은 산화질소에 의해 유도된 세포사멸을 저해한다

A77 1726은 Leflunomide의 대사산물로서 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환의 치료제로 현재 사용되고 있으며, iNOS 발현을 저해하는 것으로도 알려지고 있다. 이러한 A77 1726에 의한 세포사멸 억제 조절기전을 알아보기 위하여 연골세포에 A77 1726을 농도 별로 1시간 전 처리한 후 산화질소 공여체인 SNP를 24시간 동안 처리하였다. 세포사멸의 정도를 위상차 현미경을 사용하여 확인한 결과 SNP를 단독 처리한 세포군 보다 A77 1726을 전 처리한 세포군에서 현저히 세포사멸이 저해되어짐

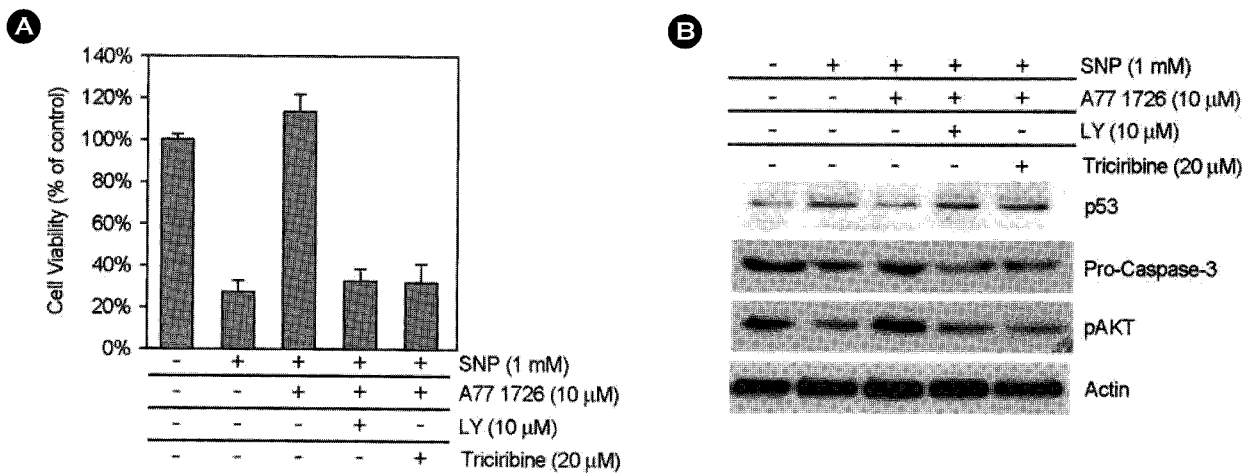
을 확인할 수 있었으며 (Fig. 1A), 이를 MTT assay로 측정 한 결과 A77 1726의 처리농도 의존적으로 세포사멸이 억제되어짐을 나타내었다 (Fig. 1B). 이러한 세포사멸 저해가 핵 수준에서도 일어나는지를 확인하기 위해 DNA fragmentation 실험을 행한 결과, SNP 처리 군에서 보이는 DNA ladder가 A77 1726을 함께 처리한 군에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 1C). 이러한 결과를 종합해 볼 때, 산화질소에 의해 유도된 세포사멸은 A77 1726에 의해 현저히 저해되어짐을 확인할 수 있었다.

2. A77 1726에 의한 세포사멸 저해는 PI-3K/AKT 활성을 통하여 일어난다

A77 1726에 의한 세포사멸 저해와 관련하여 세포사멸



**Fig. 2.** A77 1726 increases pAKT activity. A and B. Chondrocytes were untreated (CON) or treated with 1 mM SNP in the presence of the indicated concentrations of A77 1726. Expression of p53, pro-caspase-3, pAKT and actin was detected using Western blot analysis. Actin was used as loading controls (A). Amount of pAKT were determined by Image J (B). The data in A represent the results of a typical experiment conducted three times.



**Fig. 3.** A77 1726 suppress NO-induced apoptosis via PI-3K/AKT signaling pathway. A and B. Cells were treated with or without 10 μM A77 1726 for 1 h prior to 1 mM SNP in the absence or presence of 10 μM LY294002 (PI-3K inhibitor) and 20 μM triciribine pAkt inhibitor). Cell viability was determined using MTT assay kit (A). Expression of p53, pro-caspase-3, pAKT and actin was detected using Western blot analysis. Actin was used as loading control (B). The data in A and B represent the results of a typical experiment conducted three times.

단백질의 발현양상을 조사하였다. SNP와 A77 1726을 함께 처리한 세포군에서는 A77 1726 농도의존적으로 p53 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, Pro-caspase-3의 발현양상도 A77 1726 농도의존적으로 Caspase-3로의 분해가 일어나지 않는 것을 알 수 있었다. 이에 산화질소와 관련한 본 연구자의 연구결과를 (Kim et al., 2001, 2002, 2005) 기초로 하여 MAP kinase와 PI-3 kinase 신호전달 단백질의 발현량 및 활성도를 측정하여 보았다. 그 결과 MAP kinase의 발현량 및 활성도에는 아무런 변화가 없음을 확인할 수 있었으나 (data not shown), PI-3 kinase의 하위신호전달 단백질인 pAKT의 발현량이 농도의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A). 이 결과를 loading control로서 사용되어진 actin 단백

질과 pAKT의 발현량을 densitometry로 측정하여 pAKT의 발현량을 정량화 하여 나타내었다 (Fig. 2B). 위의 결과를 토대로, PI-3kinase의 저해제인 LY294002와 pAKT의 저해제인 triciribine을 SNP와 A77 1726 처리한 세포군에 각각 처리하였을 경우 기대한 것처럼, 세포의 사멸이 현저히 증가함을 확인할 수 있었으며, (Fig. 3A) pAKT의 활성이 각각의 저해제에 의해 억제되었음을 확인하였다 (Fig. 3B). p53 단백질의 발현 역시 세포사멸과 같은 양상으로 증가하는 것을 확인하였으며, pro-caspase-3의 분해가 촉진되었음을 Western blot으로 확인하였다 (Fig. 3B). 위의 결과들을 종합해 볼 때 산화질소에 의해 유도된 연골세포의 세포사멸은 A77 1726에 의해 저해되며, 이는 PI-3K/AKT 신호전달계를 경유하여 p53과 caspase-3 단백

질의 발현을 조정함으로써 이루어지는 것으로 생각된다.

## 고 찰

류마티스성 관절염은 자가면역질환으로서 그 병리학적 과정은 관절 표면의 염증반응과 세포의 탈분화 및 사멸에 의해 질환이 시작된다. 산화질소는 이러한 병리학적 과정의 시작을 유도하는 중요한 분자로서 염증성 Cytokine인 IL-1에 의해 산화질소 생성 효소의 발현이 유도되어 내생적으로 생성되거나 다른 환경적 요인에 의해 체내에 축적된다. 이전 실험결과에서 우리는 위와 같이 유도되는 산화질소를 그 공여체인 SNP를 처리함으로써 산화질소가 연골세포의 탈분화와 염증반응, 세포사멸을 유도한다는 것을 밝힌 바 있다. 특히 세포사멸의 주된 조절기전으로서 p53에 의한 Caspase-3의 활성화는 매우 중요하다. 이러한 p53 단백질의 발현은 MAPK 중 한 가지인 p38 신호전달계에 의해 유도되며, p38은 PKC- $\zeta$ 의 자가 인산화를 방해하여 PKC- $\zeta$ 의 활성저해를 통해 세포사멸의 억제를 방해하는 것으로 생각된다. 이렇게 유도된 p53은 Pro-caspase-3의 활성을 자극하고 활성화된 Caspase-3는 핵을 분해하는 세포사멸 과정을 진행하게 된다.

본 연구결과에서는 Leflunomide의 대사산물인 A77 1726은 산화질소에 의해 유도된 세포사멸을 PI-3K/AKT 신호전달계의 활성저해를 통해 억제한다는 것을 밝혔다. 이와 같은 결과는 연골세포에서 산화질소에 의해 일어나는 세포사멸이 MAPK와 PI-3K/AKT 두 신호전달계를 경유하여 일어난다는 기존의 보고와 다른 결과로서 매우 흥미로운 결과이다. 즉, A77 1726은 MAPK 신호전달계와는 무관하게 산화질소 유도 세포사멸을 억제하는 것으로 생각된다. 이는 산화질소 유도 세포사멸에서 보고한 MAPK의 하위 신호전달체인 PKC- $\alpha$ 와  $\zeta$ 를 경유하는 신호전달계와 본 연구결과에서 밝힌 PI-3K/AKT 신호경로와의 crosstalk에 의한 세포사멸 저해 조절경로를 생각해 볼 수 있으며, 혹은 이와 무관한 세포사멸 저해 신호전달 경로를 생각해 볼 수 있다. 그러므로, 본 연구결과를 기초로 하여 추가적으로 A77 1726에 의한 세포사멸 저해 신호전달 조절기전을 규명해야 할 것이며, 밝혀진 연구결과를 토대로 연골세포 관련 질환인 류마티스 관절염 및 골관절염의 치료제로서 응용될 수 있는 새로운 유전자 타겟 신호단백질을 발굴하는 데 목적이 있다.

## REFERENCES

- Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1998. 10: 263-268.
- Blanco FJ, Guitian R. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998. 41: 284-289.
- Breedveld FC, Dayer JM. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000. 59: 841-849.
- Cash DE, Bock CB. Retinoic acid receptor alpha function in vertebrate limb skeletogenesis: a modulator of chondrogenesis. *J Cell Biol.* 1997. 136: 445-457.
- DeLise AM, Fischer L. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000. 8: 309-334.
- Emery P, Breedveld FC. A comparison of the efficacy and safety of leflunomide and methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2000. 39: 655-665.
- Fox RI, Herrmann ML. How does leflunomide modulate the immune response in rheumatoid arthritis? *Bio Drugs* 1999. 12: 301-315.
- Goldring MB, Birkhead JR. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest.* 1994. 94: 2307-2316.
- Hashimoto SR, Ochs L. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998. 41: 1632-1638.
- Herrmann ML, Schleyerbach R. Leflunomide: an immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Immunopharmacology* 2000. 47: 273-289.
- Kim JS, Park ZY. p38 kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes through the inhibition of protein kinase C zeta by blocking autophosphorylation. *Cell Death Differ.* 2005. 12: 201-212.
- Kim SJ, Hwang SG. p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2002. 277: 33501-33508.
- Kim SJ, Ju JW. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J Biol Chem.* 2002.

- 277: 1332-1339.
- Lefebvre V, Peeters-Joris C. Production of collagens, collagenase and collagenase inhibitor during the dedifferentiation of articular chondrocytes by serial subcultures. *Biochim Biophys Acta*. 1990. 1051: 266-275.
- Miljkovic D, Samardzic T. Leflunomide inhibits activation of inducible nitric oxide synthase in rat astrocytes. 2001. *Brain Res*. 889: 331-338.
- Pelletier JP, Fernandes JC. Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol*. 2001. 28: 2509-2519.
- Sandell LJ, Adle PR. Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci*. 1999. 4: D731-742.
- Smolen JS, Kalden JR. Efficacy and safety of leflunomide compared with placebo and sulphasalazine in active rheumatoid arthritis: a double-blind, randomised, multicentre trial. *European Leflunomide Study Group. Lancet* 1999. 353: 259-266.
- Strand VS, Cohen. Treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide compared with placebo and methotrexate. Leflunomide Rheumatoid Arthritis Investigators Group. *Arch Intern Med*. 1999. 159: 2542-2550.
- Weston AD, Rosen V. Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways. *J Cell Biol*. 2000. 148: 679-690.
- Yatsugi N, Tsukazaki T. Apoptosis of articular chondrocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: correlation of apoptosis with degree of cartilage destruction and expression of apoptosis-related proteins of p53 and c-myc. *J Orthop Sci*. 2000. 5: 150-156.
- Yoon YM, Kim SJ. Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. *J Biol Chem*. 2002. 277: 8412-8420.
-