

FK506이 T 림프구 사멸에서 활성산소 생성에 미치는 영향

전남대학교 의과대학 외과학교실

이호균 · 정상영 · 최수진나

The Effect of FK506 to Generate Reactive Oxygen Species on T Lymphocyte Death

Ho Kyun Lee, M.D., Sang Young Chung, M.D., Soo Jin Na Choi, M.D.

Department of Surgery, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Purpose: Tacrolimus (FK506) has been widely used as an immunosuppressant in organ transplanted recipients to suppress organ rejection phenomenon. We investigated the role of oxidative stress and heme oxygenase-1 by FK506 on human Jurkat T cells.

Methods: The cells viability was examined by DAPI stain, enzyme activity of caspase family proteins, and western blotting for Bax, PUMA, iNOS, HO-1. Cells were cultured in the absence or presence of CoPP or ZnPP and the fluorescence intensity was analyzed using a flow cytometry.

Results: Treatment with FK506 increased the generation of reactive oxygen species (ROS), including hydrogen peroxide and superoxide anion, and NO in Jurkat cells in a dose-dependent manner. Immunohistochemistry and Western blot analysis data revealed the hemoxygenase-1 (HO-1) was induced by the addition of FK506 in Jurkat cells. Induction of CoPP, HO-1 inducer, resulted in decreased intracellular H₂O₂ and NO concentrations. Instead ZnPP, an HO-1 competitive inhibitor did it reversely. In addition, ZnPP regulates iNOS protein synthesis by inhibition of HO-1.

Conclusion: Increase of HO-1 expression would induce to decrease the intracellular H₂O₂ and NO concentrations. Also, HO-1 would regulate iNOS protein synthesis. Consequently, we can expect the regulation of HO-1 expression with concomitants use of FK506 to suppress organ rejection phenomenon by enhancing apoptosis.

(J Korean Surg Soc 2009;77:310-319)

Key Words: FK506, Reactive oxygen species, Heme Oxygenase-1

중심 단어: FK506, 활성산소종, 헴 옥시게나아제-1

서 론

FK506은 토양 진균류인 *Streptomyces tsukubaensis*에서 얻어지는 macrolide계 항생물질로서 1990년대 간이식에 최초

임상을 실시하였다.(1) 특히, FK506의 효과는 간이식 환자에게 있어서 사이클로스포린을 능가하여 거의 유일한 약제로 자리매김되어 근래는 간이식환자 과반수가 FK506을 복용하고 있다.

세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사 과정을 통해서 생성된다.(2,3) 세포는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다. 대표적인 예인 헴 옥시게나아제(heme oxygenase, HO)는 헴을 빌리베르딘, 일산화탄소 및 유리철로 산화 분해하여 세포 내 헴을 조절하는데 중요한 역할을

책임저자: 최수진나, 광주시 동구 학1동 8번지
☎ 501-757, 전남대학교병원 외과
Tel: 062-220-6473, Fax: 062-227-7635
E-mail: choisjn@chonnam.ac.kr

접수일: 2009년 5월 6일, 게재승인일: 2009년 8월 21일
이 연구는 2008년도 전남대학교 병원 임상의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

수행하는 효소이고, 이후 빌리베르딘은 다시 세포질 내 빌리베르딘 환원효소에 의해 항산화제인 빌리루빈으로 전환된다.(4,5)

세포사멸의 과정은 크게 2가지로 대별되어 왔는데, 즉 사망수용체(death receptor, Fas/FasL, TNF-a 등)를 통한 수용체 매개성(외인성) 세포사멸 경로와 항산화화제, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등 다양한 인자들에 의해 유발되는 미토콘드리아 매개성(내인성) 세포사멸 경로가 있다.(6,7)

본 연구에서는 사람의 T 세포 실험대상으로 잘 알려져 있는 Jurkat 세포를 이용하여 FK506에 의한 세포사멸에서 세포 내 활성산소종 및 HO-1의 역할에 대해 연구 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

방 법

1) 재료

(1) 세포주: 사람 T 림프구 세포주인 Jurkat 세포는 한국 세포주 은행(KNCC, 서울대학교)으로부터 구입, 계대배양하면서 실험을 실시하였다.

(2) 시약 및 기기: 실험에 필요한 RPMI 1640, 항생제 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)제품을, 배양용기(24-well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), DAPI, bicinchoninic acid (BCA), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다.

2) 방법

(1) Jurkat 세포주 배양 및 시약처리: Jurkat 세포는 CO₂ 세포 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 FK506을 처리한 후 세포 고사현상과 이에 연관된 생화학 실험을 수행하였다. FK506은 10 μM 농도로 DMSO에 녹여 -70°C에 보관하였고, RPMI 1640 배지에 희석하여 사용하였다.

(2) DAPI에 의한 세포핵 염색: FK506으로 처리한 세포는 포집하여 냉 PBS로 세척한 후 cytospin (Shandon Southern Products Ltd., England)으로 600 rpm, 3분간 회전분사하여 슬라이드글라스에 부착시켰다. 슬라이드글라스에 부착된 세

포는 4% formaldehyde 용액으로 고정하고 PBS로 세척하여, 10 μM DAPI로 20분간 실온에서 반응한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 핵 형태를 관찰하였다.

(3) Western blot analysis: FK506을 처리한 Jurkat 세포는 포집하여, 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin)과 4°C에서 30분 반응하였다. 동량의 세포파쇄액(200 μg)과 2X sample buffer를 혼합하여 100°C에서 3분 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 electrotransfer system (Ellard Inc, Seattle, WA, USA)을 이용(0.8 mA/cm)하여 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응하였다. PERK, phospho-PERK, CHOP, Grp78, Grp94/BiP, Bcl-2, Bak 및 β-actin에 대한 항체는 0.05% (v/v)의 tween-20이 함유된 tris-buffered saline (TBS-T)에 1 : 1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응하였으며, 각 항체에 대한 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase (HRP)와 anti-mouse IgG conjugated HRP는 TBS-T로 희석(1 : 3,000)하여 상온에서 1시간 반응한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham, England)를 이용하여 현상하였다.

(4) Caspase계 cystein protease 활성도 측정: FK506처리 후 포집된 Jurkat 세포(1×10⁶)를 4°C에서 15분 lysis buffer (1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol [DTT], 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin)로 용해하고 13,000 rpm으로 15분 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액은 bicinchoninic acid (BCA, Sigma Co. MO, USA)법으로 단백질을 정량하고, 세포파쇄액을 분석 완충용액(100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% Chaps, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin)에 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 반응한 후 Fluorometer (Molecular Devices Co, USA)로 측정하였다. Caspase-3 protease의 효소 활성의 측정은 형광기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin (AMC) (Calbiochem Co. CA, USA) 50 μM을 이용하였으며, 이 형광기질의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380 nm)와 emission wavelength (460 nm)를 사용하였다. Caspase-8 pro-

tease 효소적 활성은 Ac-IETD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) (Calbiochem Co. Germany) 50 μ M를 기질로 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm (excitation wavelength)와 505 nm (emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다. Caspase-9 protease 효소적 활성은 Ac-LEHD-AFC (Calbiochem) 50 μ M을 기질로 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm (excitation wavelength)와 505 nm (emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다.

(5) 세포내 ROS 생성의 측정: FK506에 의한 세포내 활성산소종의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포 내 hydrogen peroxide와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. Jurkat 세포에 FK506을 처리한 후 세포를 수확하기 전에 5 μ M DCF-DA를 처리하여 37°C에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS (pH 7.4)로 세척하여 flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences)로 형광을 측정하고 CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

(6) 세포 내 NO 생성의 측정: FK506에 의한 세포 내 산화질소(Nitric Oxide, NO)의 생성을 측정하기 위하여 형광 probe 2', 7'-diaminofluorescein diacetate (DAF-DA; Sigma)를 이용하였다. 비형광물질인 DAF-DA는 세포 내 산화질소 존재 시 형광의 DAF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. Jurkat 세포에 FK506을 처리한 후 세포를 수확하기 전에 5 μ M DAF-DA를 처리하여 37°C에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS (pH 7.4)로 세척하여 Flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences)로 형광을 측정하고 CellQuest software (Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

(7) 미토콘드리아 막전위 측정: 미토콘드리아 막전위의 변화를 조사하기 위하여 JC-1 염색을 시행하였다. FK506을 처리한 세포는 포집하여 냉 PBS로 세척한 후 cytospin (Shandon Southern Products Ltd., England)으로 600 rpm, 3분간 회전 분사하여 슬라이드글라스에 부착시켰다. 슬라이드글라스에 부착된 세포는 PBS로 세척하여, 10 μ g/ml JC-1과 20분간 실온에서 반응한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 형광의 변화를 관찰하였다.

(8) 통계처리: 표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고, P-value가 최대치 0.05 ($P < 0.05$) 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) FK506이 T 림프구, Jurkat 세포의 세포사멸에 미치는 영향

세포사멸의 특징적인 현상을 초래하는 세포 내 신호전달기전에서 caspase의 중요성이 이미 잘 알려져 있다. FK506에 의한 Jurkat 세포의 고사 현상이 caspase 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 caspase-3 proteases의 효소적 활성을 이 효소의 형광기질(fluorogenic substrate)을 이용하여 12시간 간격으로 측정하였다. 그 결과 Caspase-6, -8, 및 -9 protease의 활성은 대조군에 비교하여 유의한 변화가 없었으나(미발표 성적), caspase-3 protease는 시간 의존적으로 증가하여 FK506 처리 72시간 후 대조군에 비하여 최대 4.2배의 증가된 활성을 보였다(Fig. 1A). 또한, FK506에 의한 세포 사멸에서 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 핵산의

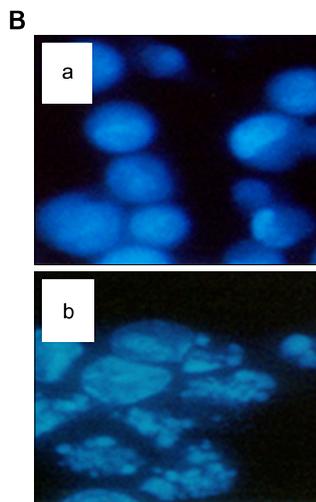
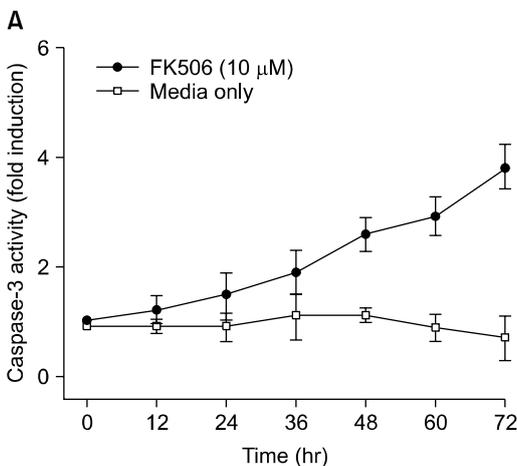


Fig. 1. FK506 induced cytotoxicity and nuclear fragment on Jurkat cells. (A) Cells were treated with 10 μ M FK506 for 12 to 72 hr and lysed to measure the activity of caspase proteases by using fluorogenic biosubstrates. Data represent the mean \pm standard deviation (S.D.) of quadruplicates. (B) Cells were treated with FK506 (10 μ M) for 72 hr. Then, cells were stained with DAPI and observed under fluorescence microscopy.

DAPI염색을 수행하였다. Jurkat 세포에 FK506 (10 μM)을 72시간 처리한 후 DAPI 염색을 시행한 결과, 정상 대조군의 핵은 타원형의 온전한 형태의 균질한 형광 염색을 나타냈으나, FK506 72시간 처리군의 핵은 여러 조각으로 분절된 형광 절편이 증가되어 관찰되었다(Fig. 1B).

2) FK506에 의한 Jurkat 세포사멸에서 세포 내 활성산소 H₂O₂의 생성에 미치는 영향

FK506에 의한 세포 내 활성산소인 H₂O₂ 생성 변화를 관찰하기 위하여 DCF-DA로 염색하고 flow cytometry로 분석하였다. DCF-DA는 세포 내 H₂O₂와 반응시 형광을 띠는 DCF로 전환된다. 그 결과, FK506 농도 의존적인 증가를 보였다(Fig. 2). 이상의 결과는 FK506에 의한 세포 내 활성산소인 H₂O₂ 생성이 세포사멸을 유도할 가능성을 시사하였다.

3) FK506이 Jurkat 세포사멸에서 NO의 생성 및 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향

FK506에 의한 세포 내 활성산소종의 생성변화를 확인하

기 위하여 DAF-DA 염색을 통해 세포 내 NO의 생성변화를 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 FK506 처리 농도에 의존적으로 NO의 양이 증가하였다(Fig. 3A). 또한, 세포 내 NO 합성 효소인 NOS의 발현 변화를 Western blot 방법으로 조사한 결과 iNOS 단백질의 발현이 FK506 처리 12시간부터 증가하여 24시간에 최대의 발현량을 보였으며 48시간 이후부터 점차 감소하는 양상을 보였다(Fig. 3B). 따라서 FK506 처리에 의한 Jurkat 세포의 세포사멸은 iNOS 단백질의 발현 증가에 따른 NO의 생성 증가에 의해 초래됨을 시사하였다.

4) FK506에 의한 Jurkat 세포사멸에서 미토콘드리아 막 전위변화와 PUMA 단백질 발현에 미치는 영향

FK506에 의한 Jurkat 세포의 미토콘드리아의 막 전위 변화를 확인하기 위하여 JC-1 형광 염색을 시행하였다. 10 μM의 FK506을 Jurkat 세포주에 36시간 처리 후 JC-1으로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 Jurkat 세포는 FK506을 처리하지 않은 대조군 점상형(punctuated-pat-

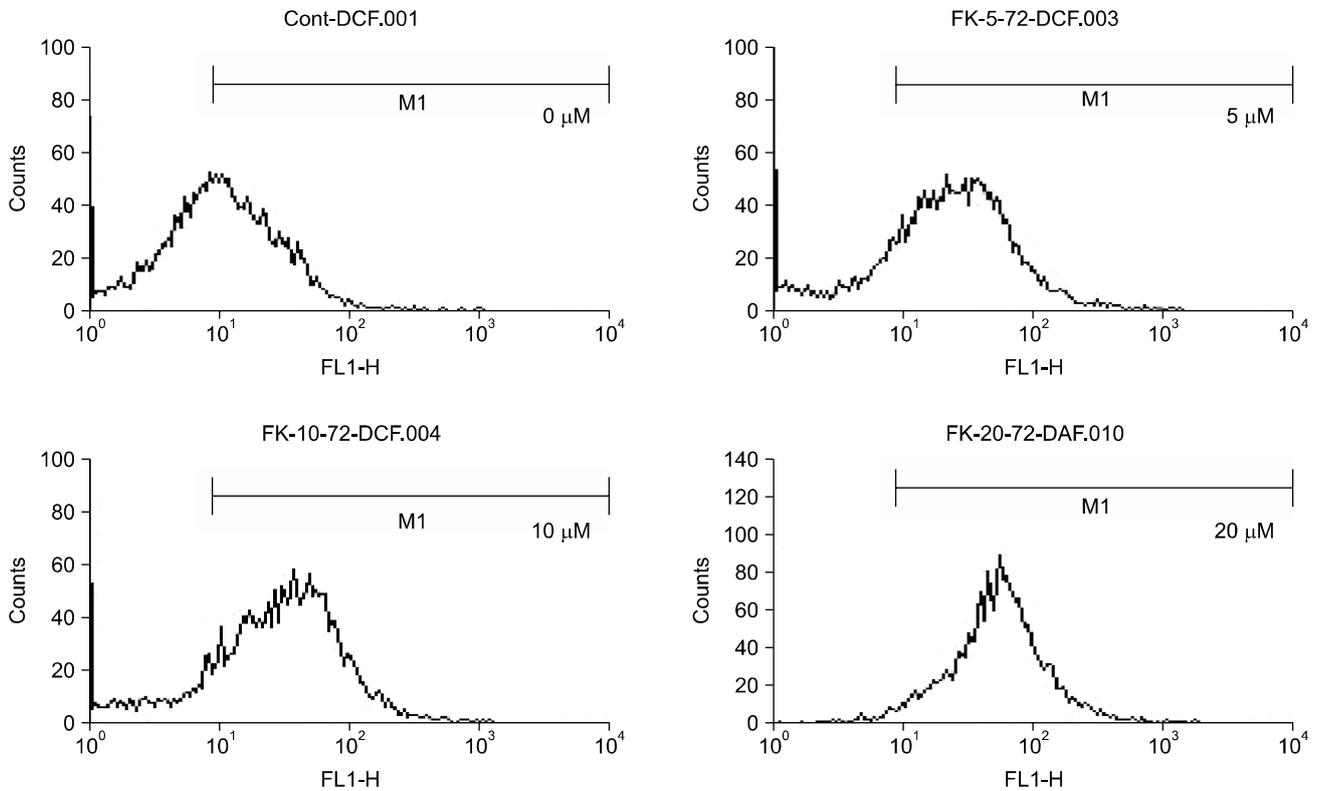


Fig. 2. Production of H₂O₂ in FK506 treated Jurkat cells. Cells were treated with indicated dose of FK506 for 72 hrs. Then, cells were incubated with the dye 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (5 μM) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry.

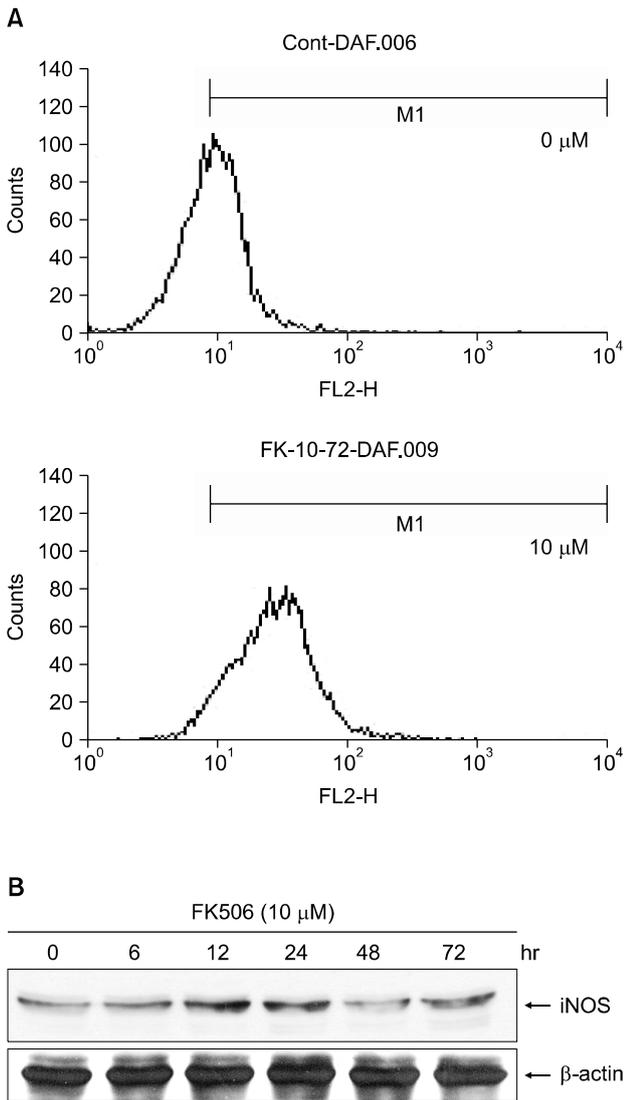


Fig. 3. Effects of NO production and iNOS protein expression in Jurkat cells. (A) Cells were treated with indicated dose of FK506 for 72 hrs. Then, cells were incubated with the dye DAF-DA (5 μ M) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry. (B) Histogram status of A Cells were treated with 10 μ M FK506 for various periods. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-iNOS and anti- β -actin antibodies.

tem)의 오렌지 형광(Fig. 4A, a)이 녹색 형광으로 시간 의존적으로 변화하면서 미만형(diffused-pattern)으로 세포질 전체에 균질하게 분포하였다(Fig. 4). 또한 이때 Bcl-2 family 단백질 중 Bak과 PUMA 단백질의 발현 변화를 조사하기 위하여 Jurkat 세포에 10 μ M의 FK506을 처리한 후 Western blot을 실시하였다. 그 결과, 6시간 이후부터 pro-apoptotic 기능을 갖는 Bak 단백질의 발현을 증가를 보이다 점차 감소하는 양상을 보였고 72시간 이후 대조군 수준으로 감소하였고, anti-apoptotic 기능을 갖는 PUMA 단백질은 FK506 처리 시간에 의존적으로 감소되는 발현 양상을 보였다(Fig. 4B). 이때 단백질량은 β -actin을 통하여 동일한 양임을 확인하였다. 이상의 결과는 FK506 처리가 Bak의 발현증가와 PUMA의 발현 감소에 따른 Jurkat 세포의 미토콘드리아 막

전위차 감소를 초래하였음을 시사하였다.

5) FK506이 Jurkat 세포사멸에서 CoPP 및 ZnPP가 H₂O₂의 생성 및 HO-1 단백질의 발현에 미치는 영향

FK506에 의한 세포내 활성산소종 생성에 대한 HO-1의 역할을 조사하기 위하여 HO-1 유도제인 CoPP와 HO-1 효소 활성 저해제인 ZnPP를 각각 30분 전처리한 후 10 μ M FK506을 처리 48시간 후에 H₂O₂의 생성 변화 및 HO-1 단백질의 발현을 조사하였다. 먼저 세포 내 H₂O₂의 생성변화는 DCF-DA 염색을 통해 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 10 μ M 농도의 FK506 처리 48시간 후에 대조군에 비하여 증가하였던 H₂O₂의 양이 CoPP 전처리에 의해 현저히 감소하였으며, 이때 CoPP 자체 영향은 없었다. 그러나 ZnPP 전

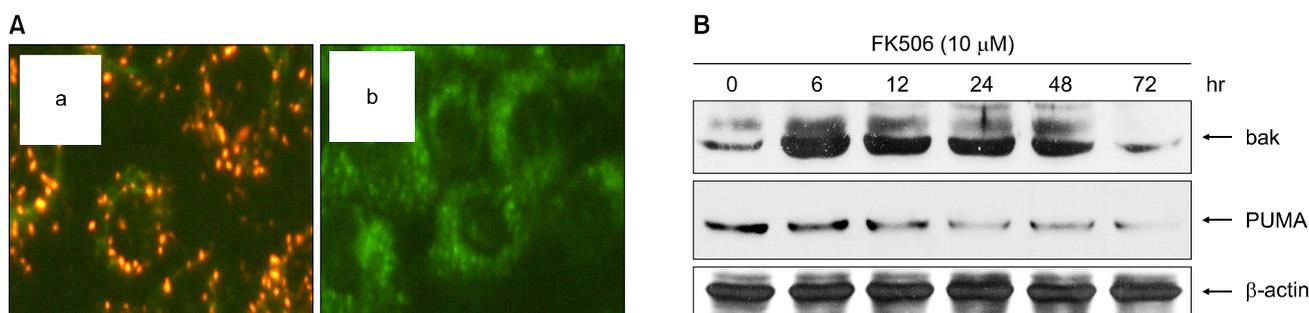


Fig. 4. Change of mitochondrial membrane potential transition and differential expression of Bak and PUMA in FK506 treated Jurkat cells. (A) Cells were treated with 10 μ M FK506 for 36 hr. FK506 treated cells were stained with 10 μ g/ml of JC-1 visualized under a fluorescent microscope. (a) Control cells, and (b) FK506 treated cells for 36 hrs. (B) Cells were treated with 10 μ M FK506 for various periods. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with PUMA, anti-Bak and anti- β -actin antibodies.

처리시 FK506에 의해 생성 증가된 H₂O₂의 양은 감소하지 않았으며 특히 ZnPP 단독처리군에서 증가된 양상을 보였다(Fig. 5A, B). 이때 CoPP 처리에 의하여 Jurkat 세포의 HO-1 단백질의 발현은 증가되었으며, ZnPP 처리시 HO-1의 발현은 감소되는 양상을 보였다(Fig. 5C). 이상의 결과는 HO-1의 inducer 및 inhibitor 처리를 통해 HO-1의 발현에 따른 세포내 H₂O₂생성의 연관관계를 확인하였다.

6) FK506이 Jurkat 세포사멸에서 CoPP 및 ZnPP가 NO의 생성 및 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향

FK506에 의한 세포 내 NO 생성에 대한 HO-1의 역할을 조사하기 위하여 HO-1 유도제인 CoPP와 HO-1 효소 활성 저해제인 ZnPP를 각각 30분 전처리한 후 10 μ M FK506을 처리 48시간 후에 NO의 생성 변화 및 iNOS 단백질의 발현을 조사하였다. 먼저 세포 내 NO의 생성변화는 DAF-DA 염색을 통해 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 10 μ M 농도의 FK506 처리 48시간 후에 대조군에 비하여 증가하였던 NO의 양이 CoPP 전처리에 의해 현저히 감소하였으며, 이때 CoPP 자체 영향은 없었다. 그러나 ZnPP 전처리시 FK506에 의해 생성 증가된 NO의 양은 증가하는 양상을 보였으며 특히 ZnPP 단독처리군에서 현저히 증가하였다(Fig. 6A, B). 이때 CoPP 처리에 의하여 Jurkat 세포의 iNOS 단백질의 발현은 FK506 단독처리군에 비하여 감소되었으며, ZnPP 처리시 iNOS의 발현은 뚜렷한 증가를 보였다(Fig. 6C). 이상의 결과는 HO-1의 inducer 및 inhibitor 처리를 통해 HO-1의 발현에 따라 세포내 NO 생성 및 iNOS의 발현의 조절의 연관관계를 확인하였다.

고찰

FK506은 실험적 장기이식술에서 강력한 면역억제제로 작용하며 독성이 훨씬 적고 스테로이드 사용을 줄인다. 특히 1980년대부터 임상에 사용된 사이클로스포린 A (cyclosporine A)는 각종 장기 이식의 성공률을 향상시켜 이식 분야 발전에 지대한 공헌을 한 것으로 평가받고 있는데, 1990년대에 새로 개발된 강력한 면역억제제인 FK506은 급성 거부반응의 예방뿐만 아니라 난치성 거부반응의 구조 요법으로 효과적이며, 각종 장기이식에 사용되어 사이클로스포린 A를 대신할 수 있는 우수한 면역억제제로 보고되었다.(7) 그러나, 사이클로스포린 A에 비교하여 FK506에 의한 T 림프구의 증식 억제 및 세포사멸에 대한 신호전달 과정 및 그 작용기전에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 FK506에 의한 사람 T 림프구 Jurkat 세포사멸에서 활성 산소에 의한 스트레스와 관련된 신호전달 기전을 조사하였다. 그 결과 FK506은 농도의존적으로 Jurkat 세포의 생존율의 감소를 초래하였으며, 세포사멸의 형태학적 특징인 핵의 분절현상과 caspase-3 protease의 활성을 유도하였다. FK506은 세포 내 활성산소종인 H₂O₂와 NO의 생성을 증가시켰으며, 이는 세포 내 산화질소 합성 효소인 iNOS의 발현 증가에 기인하였다. 또한 FK506은 사람 T 림프구세포에서 Bak 단백질의 발현 증가, PUMA 단백질의 감소 등 미토콘드리아 기능 이상을 통한 세포사멸의 신호전달기전을 활성화시켰다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산

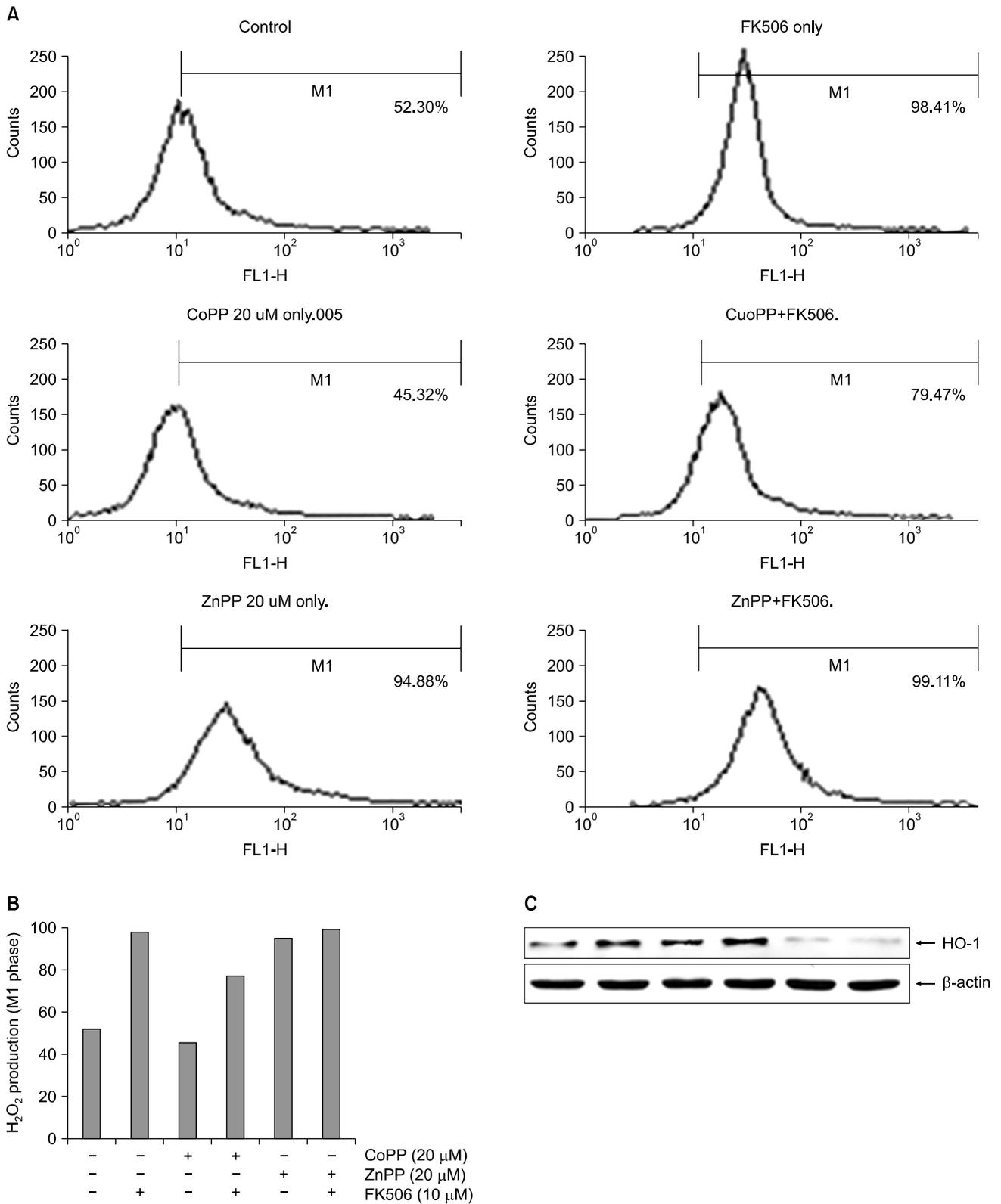


Fig. 5. Effects of H₂O₂ production and HO-1 protein expression in Jurkat cells by CoPP or ZnPP. (A) Cells were cultured in the absence or presence of CoPP or ZnPP for 48 hrs. Cells were treated with 10 μM FK506 for various periods. Then, cells were incubated with the dye DCF-DA (5 μM) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry. (B) Histogram status of A. (C) The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-HO-1 and anti-β-actin antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL detection kit.

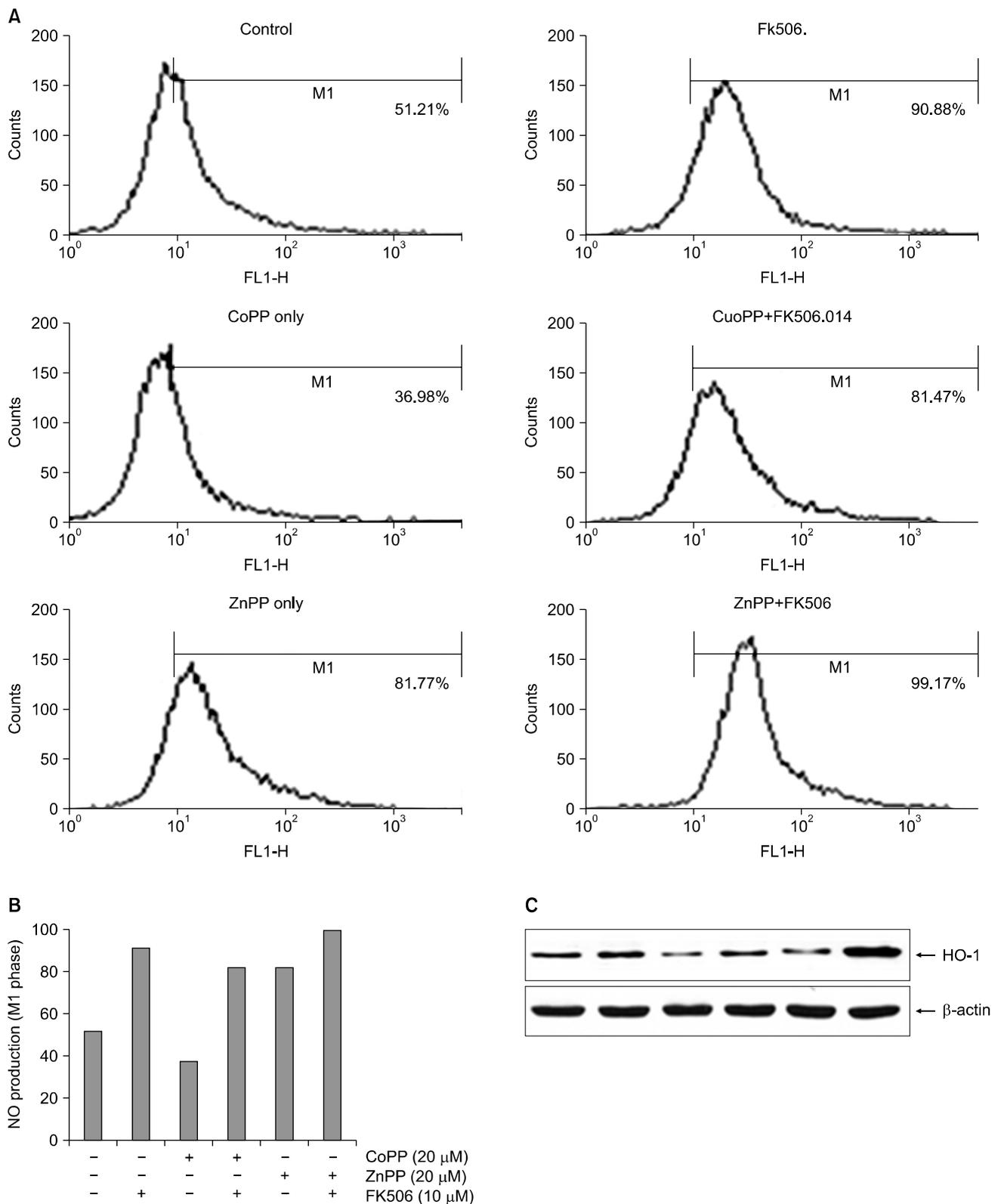


Fig. 6. Effects of NO production and iNOS protein expression in Jurkat cells by CoPP or ZnPP. (A) Cells were cultured in the absence or presence of CoPP or ZnPP for 48 hrs. Cells were treated with 10 μ M FK506 for various periods. Then, cells were incubated with the dye DAF-DA (5 μ M) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry. (B) Histogram status of A. (C) The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 10% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-iNOS and anti- β -actin antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL detection kit.

대사 과정을 통해서 생성된다.(8) 비록 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 효소 등이 세포 내에서 생성된 활성산소종을 제거하기 위한 생리적 방어기전으로 작용하지만, 과도한 활성산소종은 이들 방어체계를 초과하여 세포손상을 초래한다.(9) FK506 처리시 세포 내 유의한 H_2O_2 생성증가가 관찰되었다. 이러한 세포 내 활성 산소는 미토콘드리아 기능 이상에 의해 초래되거나, 반대로 미토콘드리아 기능 이상을 초래한다고 알려져 있다.(9) 본 연구 결과에서는 FK506에 의한 미토콘드리아의 막전위차 변화를 JC-1 형광 염색으로 확인하였으며, Bak 단백질의 발현 증가와 PUMA 단백질의 발현 감소를 통해 다시 한 번 확인하였다.

Heme Oxygenase는 1968년 Tenhunen 등(10)에 의해 처음 발견되었으며 지금까지 HO-1, HO-2, HO-3 세 가지 종류의 이형이 알려져 있다. 이 중 HO-1은 세포가 다양한 종류의 산화적 스트레스에 노출되면 유도되어 헤몰리틴을 빌리베르딘 일산화탄소 유리철로 분해하는 효소이다. Stocker 등(11)은 과거에는 단순한 생물학적 대사과정의 노폐물로만 여겼던 빌리루빈과 빌리베르딘이 강력한 항산화작용이 있다는 것을 규명하였고 Verma 등(12)도 헤몰리틴 분해 후 생성되는 일산화탄소가 혈관확장이나 신경전달 등의 생리적 기능을 중재하는 역할에 관여함을 보고함으로써 HO-1의 헤몰리틴 분해가 불필요한 헤몰리틴을 제거하는 과정일 뿐 아니라 빌리루빈이나 일산화탄소 등 생체에 이로운 기능을 할 수 있는 물질을 새로 생성해내는 동화과정임을 밝혔다. 저산소증 산화질소 등 다양한 물질에 의해 유도될 수 있는데 Applegate 등은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 반응, 즉 세포 내 환원제의 양이 감소하거나 혹은 활성산소종이 증가하는 상태에서는 원인에 상관없이 공통적인 과정으로서 이 유도될 수 있고 이러한 결과를 근거로 HO-1이 세포를 보호하는 역할을 수행할 가능성이 있다고 언급하였다. 최근에는 Tanaka 등(13)이 실험적 종양모델에서 HO 억제제인 Zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX)을 투여 시 광범위한 세포사멸이 초래됨을 보고하였다. 본 연구에서도 FK506 처리시 세포 내 H_2O_2 와 NO의 양이 증가하였으며, HO-1의 발현은 FK506 초기에 증가하다가 감소하는 양상을 보였다. 그러나 CoPP 처리에 의해 HO-1의 발현이 증가하면 세포 내 활성산소가 감소하였으며, ZnPP를 처리시 세포내 H_2O_2 및 NO의 양이 증가하여 세포사멸을 촉진하는 결과를 보였다.

과량의 산화질소 생성은 폐혈성 쇼크, 자가면역질환, 뇌경색과 당뇨병 같은 질환들과 연관되어 있으며, 이들 질환

에서는 산화질소 매개 세포사멸이 자주 관찰된다.(14) 산화질소는 단백질과 핵산반응을 포함한 몇 가지 세포독성을 가지며, DNA 손상을 유도하고 p53 유도와 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 활성화를 통하여 세포사멸을 유발한다.(15) 산화질소는 iNOS로부터 생성된다. iNOS는 주로 심각한 감염을 포함한 염증질환에서 유도된다.(16) eNOS에 의해 생성된 작은 양의 산화질소는 동맥경화증, 허혈성질환, 고혈압을 방지한다. 그러나 iNOS에 의해 생산되는 과량의 산화질소는 동맥경화증, 허혈/재관류, 심부전을 포함한 다양한 혈관질환의 병리기전에도 관련이 있으며,(16,17) ER stress 경로는 심혈관 질환의 발병과 관련이 있다.(18) 이러한 질환 병변에 있는 염증세포와 내피세포에서 iNOS가 유도되는 것이 확인되었다. Zhou 등(19)은 CHOP 발현을 포함한 ER stress 경로가 동맥경화증에서 혈관벽을 침범하는 대식세포에서 활성화되어 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 FK506 처리시 iNOS 단백질의 발현이 처리 12 시간 후부터 시간 의존적으로 증가하였으며, 세포 내 NO의 생성도 증가하였다. 그러나 HO-1의 발현 증가 시 NO 생성이 감소하였으며, HO-1의 활성 억제 시 iNOS의 발현 증가에 따른 NO의 생성이 증가되는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하면, FK506은 사람 T 림프구인 Jurkat 세포에 세포사멸을 유도하였고, 또한 iNOS의 발현증가를 유도하여 NO의 생성을 증가시켰고, Bak 단백질의 발현 증가에 따른 미토콘드리아의 기능 이상과 세포 내 활성산소인 H_2O_2 의 생성 증가를 초래하였다. 따라서, HO-1의 발현 조절에 대한 추가적인 분자생물학적 연구가 요구되며 면역억제제의 작용기전에 대한 임상적용의 과학적 기반을 제공할 수 있으리라 사료되며, HO-1의 조절을 통해 FK506과 병용처리 시 세포사멸 항진효과에 따른 용량 조절과 거부반응 억제효과가 기대된다.

REFERENCES

- 1) Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1997;63: 977-83.
- 2) Margreiter R; European Tacrolimus vs Cyclosporin Microemulsion Renal Transplantation Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study.

- Lancet 2002;359:741-6.
- 3) Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000;403:29-30.
 - 4) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403:98-103.
 - 5) Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002;277:34287-94.
 - 6) Jordan ML, Naraghi R, Shapiro R, Smith D, Vivas CA, Scantlebury VP, et al. Tacrolimus rescue therapy for renal allograft rejection--five-year experience. *Transplantation* 1997; 63:223-8.
 - 7) Schleibner S, Krauss M, Wagner K, Erhard J, Christiaans M, van Hooff J, et al. FK 506 versus cyclosporin in the prevention of renal allograft rejection--European pilot study: six-week results. *Transpl Int* 1995;8:86-90.
 - 8) Gao Z, Huang K, Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacol Res* 2001;43:173-8.
 - 9) Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989. p.86-9.
 - 10) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;61:748-55.
 - 11) Stocker R, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol* 1990;186:301-9.
 - 12) Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 1993;259:381-4.
 - 13) Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, et al. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 2003; 88:902-9.
 - 14) Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1997;1:107-20.
 - 15) Messmer UK, Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J* 1996;319(Pt 1):299-305.
 - 16) Gotoh T, Mori M. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1439-46.
 - 17) Liu YH, Carretero OA, Cingolani OH, Liao TD, Sun Y, Xu J, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H2616-23.
 - 18) Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005;115:2656-64.
 - 19) Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2005;111:1814-21.