

패혈증 동물 모델에서 Peroxiredoxin 및 Thioredoxin의 발현 변화[†]

연세대학교 의과대학 내과학교실, 전남대학교 자연과학대학 생물학과¹

김형중, 채호준¹, 안철민, 김성규, 이원영

= Abstract =

Altered Expression of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Septic Animal Model

Hyung Jung Kim, M.D., Ho Zoon Chae, Ph.D.¹, Chul Min Ahn, M.D.,
Sung Kyu Kim, M.D., Won Young Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul and
Department of Biology, College of Sciences, Chonnam National University, Kwangju, Korea.*

Background : In sepsis, excessive generation of reactive oxygen species plays key roles in the pathogenesis of acute lung injury. The serum antioxidants such as catalase and MnSOD are elevated in sepsis and considered as predictors of acute respiratory distress syndrome(ARDS) and prognostic factors of sepsis. Peroxiredoxin (Prx) has recently been known as an unique and major intracellular antioxidant. In this study, we evaluated the expression of Prx I and Prx II in mouse monocyte-macrophage cells(RAW 267.7) after treatment of oxidative stress and endotoxin and measured the amount of Prx I, Prx II and thioredoxin(Trx) in peritoneal and bronchoalveolar lavage fluid of septic animal model.

Methods : Using immunoblot analysis with specific antibodies against Prx I, Prx II and Trx, we evaluated the distribution of Prx I and Prx II in human neutrophil, alveolar macrophage and red blood cell. We evaluated the expression of Prx I and Prx II in mouse monocyte-macrophage cells after treatment of 5 μ M menadi-one and 1 μ g/ml lipopolysaccharide(LPS) and measured the amount of Prx I, Prx II and Trx in peritoneal lavage fluid of intraperitoneal septic animals(septic animal model induced with intraperitoneal 6 mg/Kg LPS

[†]이 논문은 1998년 연세대학교 의과대학 일반교수 연구비의 지원을 받아 이루어진 것임.

Address for correspondence :

Hyung Jung Kim, M.D.

Yongdong Severance Hospital, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine.
146-92, Dogok-Dong, Kangnam-Ku, Seoul, 135-270, Korea.

Phone : 02-3497-3316 Fax : 02-3463-3882 E-mail : hkim57@yumc.yonsei.ac.kr

injection) and those in bronchoalveolar lavage fluid of intraperitoneal septic animals and intravenous septic animals(septic animal model induced with intravenous 5 mg/Kg LPS injection) and compared with the severity of lung inflammation.

Results : The distribution of Prx I and Prx II were so different among human neutrophil, alveolar macrophage and red blood cell. The expression of Prx I in mouse monocyte-macrophage cells was increased after treatment of 5 μ M menadione and 1 μ g/ml lipopolysaccharide but that of Prx II was not increased. The amount of Prx I, Prx II and Trx were increased in peritoneal lavage fluid of intraperitoneal septic animals but were not increased in bronchoalveolar lavage fluid of intraperitoneal and intravenous septic animals regardless of the severity of lung inflammation.

Conclusion : As intracellular antioxidant, the expression of Prx I is increased in mouse monocyte-macrophage cells after treatment of oxidative stress and endotoxin. The amount of Prx I, Prx II and Trx are increased in local inflammatory site but not increased in injured lung of septic animal model. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 451-459)

Key words : Peroxiredoxin, Thioredoxin, Sepsis, Bronchoalveolar Lavage, Peritoneal Lavage.

서 론

패혈증에서 염증성 매개 물질로 알려진 cytokines, endothelins, platelet activating factor 및 보체등은 호중구를 활성화시키며 활성화된 호중구는 단백분해 효소(protease)와 함께 활성산소종(reactive oxygen species)을 분비하고^{1,2} 이들은 nitric oxide을 포함한 다른 유리기(free radical)와 밀접한 관계를 가지며 세포독성에 관여한다^{2,3}. 한편 adhesion molecules, cytokines 및 chemokines등은 호중구의 조직 내 격리(sequestration), 내피 세포를 통한 이동(transendothelial migration) 및 실질세포에 부착(adherence to parenchymal cells) 과정을 거쳐 실질 세포 손상에 관여한다¹. 패혈증에서 활성 산소종의 생성이 증가하고 과도한 활성산소종의 생성이 급성호흡곤란증후군을 포함한 다장기기능부전증을 유발하는 것으로 알려져 있다³. 아울러 패혈증 환자중 급성호흡곤란증후군 환자에서 xanthine oxidase 기질인 hypoxanthine 및 xanthine이 증가되어 있으며 사망 환자에서 hypoxanthine 양이 많이 증가되어 있는 것으로 알려져 있고 이들과 단백질의 thiol의 손상과는 역

비례 관계를 보이는 것으로 알려져 있다⁴. 한편 패혈증에서 항산화 물질이 증가하는 것으로 알려져 있으며 다장기 기능부전증⁵ 및 예후에도 관련이 있는 것으로 알려져 있고^{5,6} 혈청의 catalase⁵⁻⁷ 및 MnSOD^{5,6} 활성도가 급성호흡곤란증후군을 동반한 패혈증 환자에서 증가하는 것으로 알려져 있다.

Peroxiredoxin(Prx)은 생화학적으로 thioredoxin system(NADPH, thioredoxin reductase, thioredoxin)⁸ 혹은 다른 물질로부터 전자를 받아 H₂O₂을 H₂O로 환원하는 작용을 가지며^{9,10} 세포내에서 growth factors 및 TNF- α 에 반응하여 생성되는 H₂O₂를 제거 한다¹¹. 인간 세포에는 2개의 cysteine(cys47, cys140)을 가지며 생화학적으로 thioredoxin peroxidase(TPx)의 작용을 가진 Prx으로 proliferation associated gene(PAG)¹², thiol-specific antioxidant(TSA)^{10,11} natural killer cell enhancing factor A, B(NKEF-A, B)¹³, murine erythroleukemia preferentially expressed protein(MER5)¹⁴, Antioxidant enzyme 372(AOE372)¹⁵ 등이 알려져 있다. 이들의 생물학적 작용은 세포의 증식 및 분화¹², 자연 살해세포의 작용 항진¹³, 산화 스트

레스에 대한 반응^{10,11}, NF- κ B와 같은 전사 인자의 조절¹⁵ 및 apoptosis의 억제¹⁶ 등과 밀접히 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Prx는 아미노산 서열의 유사성에 의해 I, II, III, IV의 동종 단백질로 구별하며 Prx I, II, IV는 세포질에 존재하고 Prx III는 미토콘드리아에 존재하는 것으로 알려져 있다^{10,11,15}. Prx I에는 PAG 및 NKEF-A, Prx II에는 TSA 및 NKEF-B, Prx III에는 MER5^{10,11} Prx IV에는 AOE372¹⁵ 등이 속한다. Catalase 및 glutathione peroxidase와 비교하여 볼 때 Prx는 세포내 많은 양이 존재하며 H₂O₂에 대한 친화도(affinity, K_m)가 높은 것으로 알려져 있다¹⁰. 이에 Prx I 및 II에 대한 특이 항체를 이용하여 호중구 및 폐포대식세포 등의 염증 세포에 Prx의 분포를 관찰하고 대식세포에서 산화 스트레스 및 내독소 처리후 Prx I 및 Prx II의 발현을 관찰하고 패혈증 동물 모델에서 복강세척액내 Prx I, Prx II 및 Trx를 측정하였고 기관지폐포세척액내에서 Prx I, Prx II 및 Trx의 양을 측정하여 폐 손상 정도와 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

정상인에서 적혈구, 호중구 및 폐포대식세포를 확보하였고 250-300 gm의 백서(Sprague-Dawley)를 준비하였다. Mouse monocyte-macrophage cell (RAW 264.7)은 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Menadione(2-methyl-1, 4-naphthoquinone sodium bisulfite)과 lipopolysaccharide(from E. coli Serotype 055 : B5)는 Sigma로부터 구입하였고 Peroxiredoxin(Prx) I, II에 대한 항체 및 Thioredoxin(Trx)에 대한 항체는 이들 단백질에 대한 다클론 항체를 이용하였다.

2. 방 법

1) 적혈구, 호중구 및 폐포대식세포에 Prx I 및

Prx II의 분포 : 정상인의 혈액을 헤파린 처리한 주사기로 채취하여 Percoll(Pharmacia Biotech, Inc)에 조심스럽게 넣은후 20,000×g으로 20분간 원심분리하여 적혈구 및 호중구를 분리하였고 정상인을 우측 중엽기관지에서 120 ml의 생리식염수로 기관지폐포 세척술을 시행 하여 3000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세포들을 얻어 10% bovine serum albumin을 함유한 RPMI에 배양하여 부착한 세포를 확인하여 폐포대식세포를 분리하였다. 부착된 세포에 trypsin 처리하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 cell pellet을 차거운 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척후 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 μ g/ml aprotinin 및 1 μ g/ml leupeptin을 함유한 20 mM Hepes-NaOH(pH 7.0)에서 초음파 처리후 10,000 rpm으로 30 분간 원심분리하여 상층액을 취하여 BCA reagent(Pierce, Inc)으로 단백질 농도를 측정하였다.

2) Mouse monocyte-macrophage(RAW 264.7) 세포에서 산화 스트레스 및 내독소 처리에 의한 Prx I 및 Prx II의 발현 : Mouse monocyte-macrophage(RAW 264.7) 세포를 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicillin 및 50 μ g/ml streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle' medium(DMEM)에 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. Mouse monocyte-macrophage 세포를 140-mm dish에 1.0×10⁵/ml으로 4시간 배양 후에 부유 세포를 제거한 후 serum-free DMEM으로 2시간 배양하였다. 5 μ M menadione 및 1 μ g/ml lipopolysaccharide을 함유한 DMEM에 배양하여 0, 3, 6, 12, 24 및 48 hr에 세포를 수확하여 3000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세포를 차거운 PBS으로 세척한후 lysis buffer(20 mM Hepes-NaOH(pH 7.2), 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinin 및 2 μ g/ml leupeptin)에 노출시킨 후 분해액(lysate)을 10,000으로 원심 분리하여 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 Bio-Rad detergent-compatible assay kit(Bio-Rad, Inc)으로 단백을 정량하였다.

3) 패혈증 실험 동물에서 복강세척액 및 기관지폐포 세척액내의 Prx I, Prx II 및 Trx 양의 측정과 폐 손상 정도의 평가: 250-300 gm의 백서에 대조군은 0.5 ml 생리 식염수를 실험군은 6 mg/Kg LPS를 녹여 복강내로 투여하여 48 시간까지 생존한 백서(복강내 패혈증)와 5 mg/Kg LPS를 녹여 정맥내 투여하여 12시간까지 생존한 백서(정맥내 패혈증)에서 10 ml의 생리식염수로 복강내세척술을 시행하였으며 우측 중엽기관지에서 5 ml의 생리식염수로 기관지폐포세척술을 시행하였다. 기관지폐포세척액내 세포 수를 hemocytometer로 측정하고 cytocentrifuge후 슬라이드를 건조시켜 Wright-Giemsa 용액으로 염색하여 세포를 감별하여 폐장 손상의 정도를 평가하였고 세척액의 단백 농도를 BCA reagent(Pierce, Inc)으로 측정하였으며 복강세척액 및 기관지폐포세척액의 Prx I, Prx II 및 Trx 양의 측정하였다.

4) Immunoblot 분석을 이용한 단백질의 비교: Peroxiredoxin 및 Thioredoxin의 양을 비교하기 위하여 immunoblot 분석을 이용하였다. 간단히 기술하면 각각의 sample로부터 얻어진 20 µg의 단백을 Prx I 및 Prx II의 경우 12%, Trx의 경우 16% reducing SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 이동 시킨다. Prx I, Prx II 및 Trx 항체로 밤새 처리한 후 alkaline phosphatase conjugate with goat anti-rabbit IgG antibody(KPL, Inc)으로 확인하였다.

결 과

1) 적혈구, 호중구 및 폐포대식세포에 Prx I 및 Prx II의 분포: 호중구에는 Prx I 및 Prx II가 존재하지 않았고 폐포대식세포에는 Prx I 및 Prx II가 많은 양이 존재 하였으며 적혈구에는 Prx I은 존재하지 않았으나 Prx II는 많이 존재하였다(Fig. 1).

2) Mouse monocyte-macrophage(RAW 264.7)

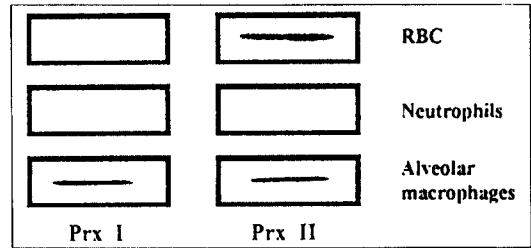


Fig. 1. The distribution of Prx I and Prx II in the human neutrophils, alveolar macrophages and red blood cells. Immunoblot analysis of 20 g crude extract from the human neutrophils, alveolar macrophages and red blood cells was performed, the neutrophils have no Prx I and Prx II, the alveolar macrophages have abundant Prx I and Prx II and red blood cells have large amount of Prx II but no Prx I.

세포에서 산화 스트레스 및 내독소 처치에 의한 Prx I 및 Prx II의 발현: 용량 의존적 연구 시행후 mouse monocyte-macrophage 세포에 5 µM menadione 및 1 µg/ml lipopolysaccharide을 처치 하였을때 Prx I의 발현은 6시간에 증가하여 12시간에 최고점에 도달하였으나 Prx II의 발현은 증가하지 않았다(Fig. 2).

3) 패혈증 실험 동물에서 복강세척액 및 기관지폐포 세척액내의 Prx I, Prx II 및 Trx 양의 측정과 폐 손상 정도의 비교: 5마리의 대조군과 10마리의 백서에 6 mg/Kg LPS를 복강내로 투여 하였을 때 10마리 모두 48시간까지 생존 하였으며(복강내 패혈증) 5마리의 대조군과 10마리의 백서에 5 mg/Kg LPS를 정맥내로 투여하였을 때 4마리가 12시간까지 생존 하였다(정맥내 패혈증). 기관지폐포세척액내 세포수 ($\times 10^4/\text{ml}$)는 대조군($n=5$) 10.4 ± 4.7 , 복강내 패혈증($n=10$) 40.9 ± 21.3 이었으며 대조군($n=5$) 11.5 ± 5.4 , 정맥내 패혈증($n=4$) 70.5 ± 42.1 으로 복강내 및 정맥내 패혈증에서 증가하였으며 호중구의 분획은 대조군 14.5 ± 9.7 , 복강내 패혈증 43.1 ± 15.3 이

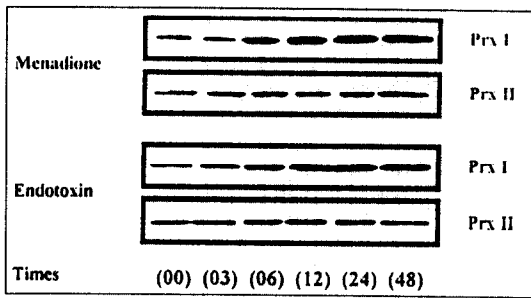


Fig. 2. The expression of Prx I and Prx II in mouse monocyte-macrophage (RAW 264.7) cells after treatment of menadione and endotoxin. After dose dependent study, we treated RAW 264.7 cells with 5 μ M menadione and 1 μ g/ml endotoxin. The expression of Prx I was increased and peaked at 12 hrs. but the expression of Prx II remained unchanged. Menadione: 2-methyl-1, 4-naphthoquinone sodium bisulfite, Endotoxin: lipopolysaccharide Serotype 055 : B5.

었으며 대조군 17.5 ± 9.7 , 정맥내 패혈증 50.5 ± 17.3 으로 복강내 및 정맥내 패혈증에서 증가하였다 (Table 1). 복강내 패혈증에서 복강세척액내의 Prx I 은 10예중 5예에서 Prx II 은 10예중 8예에서 Trx은 10예중 4예에서 대조군에 비해 뚜렷이 양이 증가하였다(Fig. 3). 그러나 기관지폐포세척액내의 Prx I, Prx II 및 Trx의 양은 대조군에 비해 복강내 패혈증(Fig. 4) 및 정맥내 패혈증(Fig. 5)에서 증가하지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 우선 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 호중구, 대식세포 및 적혈구에서 Peroxiredoxin (Prx)의 분포를 평가하였다. 호중구에는 Prx I 및 Prx II 이 존재하지 않았고 폐포대식세포에는 Prx I 및 Prx II 가 존재하였으며 적혈구에는 많은 양의 Prx II 만이 존재하였다. HL60(promyelocytic leukemia) 세포에는 Prx I 만이 존재하고 U937 (chronic myelogenous leukemia) 세포에는 Prx I 및 Prx II 가 존재하며 K-562 (histiocytic lymphoma) 세포에는 Prx I 및 Prx II 가 많은 양이 존재한다는 사실¹⁷을 고려할 때 이들 세포는 분화 과정을 통하여 Prx 양이 변화하고 호중구의 경우 효율적인 호흡 폭발(respiratory burst)을 위해 이들 단백질의 소실을 생각하여 볼 수 있으며 적혈구는 헤모글로빈과 함께 산소를 운반하는 특성상 많은 항산화 단백질이 필요하며 항산화 단백질로서 Prx II 는 이런 역할을 할 것으로 기대된다.

패혈증에서 염증 매개물질은 호중구 및 대식세포를 활성화하여 활성산소종 및 단백분해효소를 분비하여 세포 손상에 관여한다¹. 한편 패혈증에서 catalase 및 superoxide dismutase등의 항산화 물질이 혈청내 증가하고 이들은 다장기기능부전증의 발생 및 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁷. 이에 본 연구에서 대식 세포에 염증 매개물질인 내독소 및 산화 스트레스를 처리한 후 Prx의 발현 양상을 평가하였으며

Table 1. The bronchoalveolar lavage data in the animal model of control vs intraperitoneal(IP) sepsis and control vs intravenous(IV) sepsis.

	Control	IP Sepsis	Control	IV Sepsis
Cell counts ($\times 10^4$ /ml)	10.4 ± 4.7	40.9 ± 21.3	11.5 ± 5.4	70.5 ± 42.1
% Neutrophils	14.5 ± 9.7	43.1 ± 15.3	17.5 ± 9.7	50.5 ± 17.3
% Lymphocytes	14.2 ± 8.2	5.4 ± 3.2	16.2 ± 5.6	6.2 ± 8.9
% Macrophages	65.2 ± 17.6	41.2 ± 11.6	64.2 ± 13.6	39.3 ± 21.3

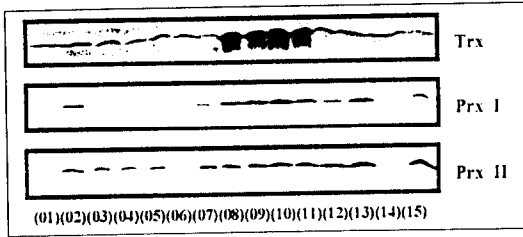


Fig. 3. The amount of Prx I, Prx II and Trx in peritoneal lavage fluid of intraperitoneal septic animals. Immunoblot analysis of 30 μ l peritoneal lavage fluid of controls (lane 1-5) and intraperitoneal septic (lane 6-15) animals was performed, the amount of Prx I in 5 cases, Prx II in 8 cases and Trx in 4 animals out of 10 intraperitoneal septic animals were larger than those in controls.

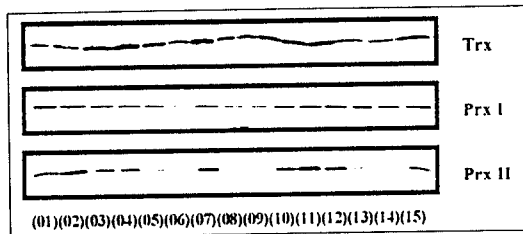


Fig. 4. The amount of Prx I, Prx II and Trx in bronchoalveolar lavage fluid of intraperitoneal septic animals. Immunoblot analysis of 60 μ l bronchoalveolar lavage fluid of controls (lane 1-5) and intraperitoneal septic (lane 6-15) animals was performed, the amount of Prx I, Prx II and Trx in intraperitoneal septic animals were similar to those in controls.

Prx I 은 이전 보고¹⁸와 같이 발현이 증가되었으며 내독소에 의해 역시 발현이 증가되었다. 그러나 Prx II 는 발현이 증가되지 않았다. Prosperi¹⁸ 등은 Prx I 인 PAG는 산화 스트레스의 종류 및 세포 종류에 따라 발현 정도가 다른 것으로 평가하였으며 본 연구에서 이용한 대식세포에서는 상피세포(HBL-100, human)보다 menadione은 강한 산화 물질로 H_2O_2

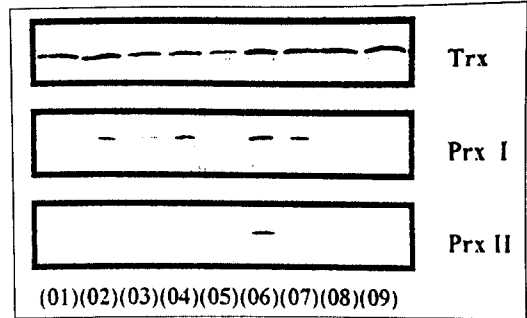


Fig. 5. The amount of Prx I, Prx II and Trx in bronchoalveolar lavage fluid of intravenous septic animals. Immunoblot analysis of 60 μ l bronchoalveolar lavage fluid of controls (lane 1-5) and intravenous septic (lane 6-15) animals was performed, the amount of Prx I, Prx II and Trx in intravenous septic animals were similar to those in controls.

보다 PAG의 발현이 더욱 현저한 것으로 알려져 있다¹⁸. 한편 Prx에 전자를 제공하는 thioredoxin (Trx)은 림프구에서 산화 스트레스 및 내독소에 의해 발현이 증가하며 세포외로 분비되는 것으로 알려져 있다¹⁹.

패혈증에서 혈청의 catalase 활성도 증가는 내피세포 손상에 의한 것으로 알려져 있다⁵. 이에 본 연구에서 패혈증 동물의 혈청에서 catalase, Prx I, Prx II 및 Trx의 양을 측정하여 보았으나 이들의 존재를 확인할 수 없었다. 따라서 패혈증에서 혈청내에 존재하는 catalase 및 Prx의 양이 극히 소량일 것으로 생각 된다.

본 연구에서 백서에 복강내 내독소를 주입하여 복강 세척액 및 기관지폐포세척액을 immunoblot 분석으로 Prx I, Prx II 및 Trx의 양을 측정하여 대조군의 양과 비교하였다. 복강내 패혈증에서는 복강내 세척액에서 Prx I, Prx II 및 Trx의 양이 뚜렷이 증가하였으나 기관지폐포세척액에서는 염증 세포 및 호중구 분획의 증가에도 불구하고 Prx I, Prx II 및 Trx의 양은 증가하지 않았다. 이에 중증의 패혈증을

요 약

유발하기 위하여 백서에 정맥내 내독소를 주입하여 기관지폐포세척액을 immunoblot 분석으로 Prx I, Prx II 및 Trx의 양을 측정하여 대조군의 양과 비교하였다. 정맥내 패혈증에서는 염증 세포 및 호중구 분획의 증가에도 불구하고 Prx I, Prx II 및 Trx의 양은 증가하지 않았다. 결론적으로 국소 염증 부위에서 Prx I, Prx II 및 Trx의 양이 증가하나 패혈증에서 폐장의 손상 정도와 관계없이 기관지폐포세척액내 Prx I, Prx II 및 Trx의 양은 증가하지 않았다. 복강세척액내 이들 단백질의 증가는 염증 반응에 의해 침윤된 대식세포 및 상피세포에서 Prx 및 Trx의 발현 증가 및 손상에 기인한 것으로 생각되며 Prx I 보다 Prx II 양의 증가는 Prx II를 많이 가진 적혈구의 침윤에 기인한 것으로 생각된다. 복강내 패혈증 및 정맥내 패혈증에서 기관지폐포세척액 소견상 폐장의 염증 정도와 관계없이 기관지폐포세척액내 Prx I, Prx II 및 Trx의 양은 증가하지 않았는데 이는 Prx의 발현은 상피세포에서는 대식세포에 비해 뚜렷하지 않으며 세척액내에 증가하는 호중구에는 Prx I 및 Prx II이 존재하지 않으며 산화 스트레스 및 내독소에 의해 Prx의 발현이 증가하는 폐포대식세포는 기관지폐포세척액내 분획이 감소함에 따라 총 세포 수는 그리 많이 증가하지 않음에 기인한 것으로 사료된다. 최근 Prx와 아미노산 서열이 유사하고 NF- κ B 및 c-Jun N-terminal kinase을 활성화 하는 단백질 (TRANK: thioredoxin peroxidase-related activator of NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase)는 secretory signal polypeptide를 가지고 있으며 세포의 분비가 알려져 있어²⁰ 정상인의 혈청내 존재 및 패혈증 환자의 혈청내 증가를 평가하여 볼수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 대식세포에서 Prx I은 산화 스트레스 및 내독소에 의해 발현이 증가하고 패혈증에서 Prx I, Prx II 및 Trx는 국소 염증 부위에서 증가하나 폐장 손상 정도와 관계없이 기관지폐포세척액에서는 증가하지 않는다.

배 경 :

패혈증에서 과도한 활성산소종의 생성은 급성 폐손상의 병리 기전에 중요한 역할을 한다. Catalase 및 MnSOD 등의 항산화 단백질은 패혈증 환자의 혈청내 증가하며 급성호흡곤란증후군의 발생 예측 인자 및 패혈증의 예후 인자로 알려져 있다. Peroxiredoxin (Prx)는 최근 독특하고 중요한 세포내 항산화 단백질로 알려져 있다. 본 연구는 대식세포인 mouse monocyte-macrophages(RAW 264.7) 세포에 산화 스트레스 및 내독소 처리후 Prx I 및 Prx II의 발현을 평가하고 패혈증 동물 모델에서 복강세척액 및 기관지폐포세척액내 Prx I, Prx II 및 Trx의 양을 측정하였다.

방 법 :

Prx I, Prx II 및 Trx에 대한 특이 항체를 이용하여 immunoblot 분석으로 호중구, 대식세포 및 적혈구에 이들의 분포를 평가하였다. Mouse monocyte-macrophages 세포에 5 μ M menadione 및 1 mg/ml lipopolysaccharide(LPS)을 처리하여 Prx I 및 Prx II의 발현을 평가하였으며 6 mg/Kg LPS를 복강내 투여하여 유발한 복강내 패혈증 동물의 복강세척액내 Prx I, Prx II 및 Trx의 양을 측정하였으며 복강내 패혈증 동물 및 5 mg/Kg LPS를 정맥내 투여하여 유발한 정맥내 패혈증 동물에서 기관지폐포세척액내 Prx I, Prx II 및 Trx을 측정하였으며 폐장의 염증 정도와 비교하였다.

결 과 :

Prx I 및 Prx II의 분포는 호중구, 폐포대식세포 및 적혈구에서 서로 다른 양상을 보였다. Mouse monocyte-macrophages 세포에 5 μ M menadione 및 1 μ g/ml lipopolysaccharide을 처리하였을 때 Prx I 발현은 증가하였으나 Prx II 발현은 변화하지 않았다. 복강내 패혈증 동물에서 복강세척액내 Prx I, Prx II 및 Trx의 양은 증가하였으나 복강

내 패혈증 및 정맥내 패혈증 동물에서 기관지폐포세척액내 폐장 염증 정도와 관계없이 Prx I, Prx II 및 Trx의 양은 증가하지 않았다.

결 론 :

세포내 항산화 단백질로서 mouse monocyte-macrophages 세포에서 Prx I의 발현은 산화 스트레스 및 내독소 처리후 증가한다. Prx I, Prx II 및 Trx양은 패혈증 동물 모델에서 국소 염증 부위에서 증가하나 손상된 폐장에서는 증가하지 않는다.

참 고 문 헌

1. Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 1994;120:771-83
2. Novelli GP. Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol* 1997;48:517-27
3. Gonzalez PK, Zhuang J, Doctrow SR, Malfroy B, Benson PF, Menconi MJ, Fink MP. Role of oxidative stress in the adult respiratory distress syndrome: evaluation of a novel antioxidant strategy in a porcine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock* 1996;6:S23-26
4. Quinlan GJ, Lamb NJ, Tilley R, Evans TW, Gutteridge JM. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:479-84
5. Leff JA, Parsons PE, Day CE, Taniguchi N, Jochum M, Fritz H, et al. Serum antioxidants as predictors of adult respiratory distress syndrome in patients with sepsis. *Lancet*. 1993;341:777-80
6. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C. Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clin Chem* 1995;41:867-71
7. Leff JA, Parsons PE, Day CE, Moore EE, Moore FA, Oppegard MA, Repine JE. Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:985-89
8. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989;264:13963-66
9. Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from Yeast. *J Biol Chem* 1994;269:27670-78
10. Chae HZ, Kang SW, Rhee SG. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 1999;300:219-26
11. Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 1998;273:6297-302
12. Prosperi M-T, Ferbus D, Karczinski I, Goubin G. A Human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J Biol Chem* 1993;268:11050-56.
13. Shau H, Kim A. Identification of natural killer enhancing factor as a major antioxidant in human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:83-8
14. Yamamoto T, Matsui Y, Natori S, Obinata M. Cloning of a housekeeping-type gene (*MER5*) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells. *Gene* 1989;80:337-43
15. Jin D-Y, Chae HZ, Rhee SG, Jeang K-T. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF- κ B activation. *J Biol Chem* 1997;272:30952-61.

16. Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. J Biol Chem 1997;272:30615-18
17. 김형중, 황성철, 노동영, 김성규, 이원영, 채호준 등. Thioredoxin peroxidases의 조직내 분포 및 인체 종양 질환에서 발현에 관한 연구. 대한내과학회지 1997;51:165-173
18. Prosperi M-T, Ferbus D, Rouillard D, Goubin G. The *pag* gene product, a physiological inhibitor of *c-abl* tyrosine kinase, is overexpressed in cells entering S phase and by contact with agents inducing oxidative stress. FEBS Lett. 1998;423:39-44
19. Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. J Biol Chem 1992;267:24161-64
20. Haridas V, Ni J, Meager A, Su J, Yu G-L, Zhai Y, et al. Cutting edge : TRANK, a novel cytokine that activates NF- κ B and c-Jun N-Terminal Kinase. J. Immunol. 1998;161:1-6