

혈청이 마우스 간 세포주 BNL CL.2의 Nitric Oxide 생성에 미치는 영향

원광보건대학 임상병리과, 원광대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실*,
전주대학교 이공대학 생명과학부**

김유현[†] · 김신무 · 배현욱* · 유지창* · 정헌택* · 진효상**

국문초록: 마우스 간 세포주인 BNL CL.2의 시험관내 배양에서 혈청과 IFN- γ 가 세포주의 nitric oxide (NO) 생성과 세포 손상에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 하였다. 혈청이 공급된 배양에서 IFN- γ 에 의한 세포 생존율은 거의 변동이 없었으나, 혈청을 제거한 배양에서는 약 65%의 생존율이 유지되었으며, NO 생성 억제제인 N^G-monomethyl-L-arginine (NMA)의 첨가는 농도 의존적으로 세포의 생존율을 감소시켰다. 혈청이 제거된 BNL CL.2 세포주는 IFN- γ 단독 처리에서도 NO를 생성할 수 있었으며, IFN- γ 와 lipopolysaccharide (LPS)의 복합 처리는 세포주의 NO 생성을 상승적으로 증가시켰다. 또한 protein tyrosine kinase (PTK) inhibitor인 herbimycin A와 genistein에 의해서 NO 생성이 억제되어 PTK의 활성이 혈청이 고갈된 BNL CL.2 세포에서 NO의 생성에 중요한 역할을 담당하고 있기 때문에 판단된다. IFN- γ 의 독성은 혈청을 제거시킬 때 NO 생성 억제제에 상승적으로 간 세포를 손상시키며, 이때 NO가 IFN- γ 에 의해 유도된 손상을 어느 정도 억제시키는 것을 알 수 있었다.

서 론

Nitric oxide (NO)는 대부분의 포유류 동물의 세포 내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서, 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합 작용을^{5,7,18,26,32}, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적으로 중요한 역할을 하고^{16,27}, 표적 세포 및 숙주 세포에 여러 가지 생리학적이며 대사 적인 변화를 유도한다¹¹.

NO의 생리학적 역할은 혈관 반응에서 활발히 연구되었으며^{4,28}, 최근에는 NO가 신경계의 생리학적 전달자로서 뿐만 아니라⁷, 염증 반응^{2,6,20,24,30,35}, 면역계 및 세포 독성에도 중요한 조절 물질로 알려지고 있다¹².

최근에 NO가 세포 활성화 물질 및 reactive oxygen intermediates (ROI)에 의해 유발된 세포 독성을 최소화시키는 한 요인이 밝혀짐으로 이 분야에 대해서 활발히 연구되고 있다^{10,17,37}.

간염은 바이러스나 세균의 감염, 알코올 및 약제 자극과 같은 여러 가지 원인으로 유발되는 하나의 염증성 질환이다²⁹. 간 염증 발생시 간은 ROI 및 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) 등에 의하여 간 손상이 심화되고^{14,15}, 간의 혈관 내피 세포, hepatocyte (HC) 및 Kupffer cell (KC) 등이 괴사 및 고사되며³³, 이때 NO는 간 세포에 괴사 및 고사를 초래하는 TNF- α 및 ROI의 세포 독성을 억제시킨다³³.

IFN- γ 는 활성화된 림프구와 NK cell에 의하여 분비되는 다기능성 cytokine으로, IFN- γ 의 수용체는 감염된 간의 HC에 발현되지만 정상 간에는 발현되지 않는다. 또 IFN- γ 는 TNF- α 와 같이 HC에 세포 독성을 나타내는 cytokine으로 간 손상에 관련될 수 있을 것으로 보이며 간염의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 최근에 mitogenic factor인 hepatocyte growth factor (HGF), epithelial growth factor (EGF) 및 fetal bovine serum

* 논문 접수: 1999년 4월 29일

수정재접수: 1999년 6월 15일

[†] 별책 요청 저자: 김유현, 570-750, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광보건대학 임상병리과

* 이 연구는 1999년도 원광보건대학 학술연구비에 의하여 이루어 졌음.

(FBS)이 HC에서 IFN- γ 로 유발된 세포 손상을 감소시킨다^{3,22)}는 보고를 감안해 볼 때 HC에서 IFN- γ 에 의해서 유발된 세포 독성과 생성된 NO와는 상호 관련성이 있을 것으로 생각된다.

한편 Kim 등¹⁵⁾은 마우스 실험을 통하여 NO가 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 간 손상을 보호하고 간 세포에 독성을 나타내는 TNF- α 의 생성을 어느 정도 조절할 수 있음을 보고하였다.

본 연구는 혈청이 간 세포의 NO 생성과 IFN- γ 에 의한 세포 독성에 어떠한 영향을 미치는가를 시험관내에서 조사하였다. 시험관내 실험을 위해서 본 연구는 비교적 연구가 잘 되어 있는 마우스 간 세포주인 BNL CL.2를 사용하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

실험에 사용한 methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), LPS (phenol extracted *Salmonella enteritidis*), phosphate-conjugated goat anti-rabbit IgG, staurosporine, H-7, herbimycin A, genistein, p-nitrophenyl 및 sodium dodecylsulfate (SDS)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서, murine recombinant interferon (IFN- γ)과 N^G-monomethyl-L-arginine (NMA)은 Genzyme (Cambridge, MA)에서 구입하였으며, anti-murine iNOS polyclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하여 사용하였다.

BNL CL.2 세포주를 배양하기 위한 Dulbecos modified Eagle medium (DMEM)과 trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)는 GIBCO Laboratories (Grand Island, NY)에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone Laboratories (Logan, UT)에서, ninety-six well tissue culture plates 및 tissue culture dish는 Nunc, Inc (North Aurora Road, IL)에서 각각 구입하였다.

그 외의 세포 배양에 필요한 기구는 Life Technologies (Gaithersburg, MD)에서 구입하고, 모든 시약 및 배양액의 LPS의 오염 여부는 colorimetric *Limulus* amoebocyte lysate assay법에 의해서 확인되었다.

2. 세포주 배양 및 처리

시험 세포주 BNL CL.2는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였으며,

이 세포주는 DMEM (4.5 g/l glucose)에 10% FBS를 첨가하여 배양하였다. 부착성 세포인 BNL CL.2는 trypsin-EDTA로 부유시키고 이것을 원심 분리하여 세포의 밀도가 2×10^5 cells/dish 되도록 3~4일 동안 배양하였다.

DMEM + 10% FBS에서 배양된 BNL CL.2 세포는 혈청을 고갈시키기 위해서 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지로 전환하였다. 6시간 후 혈청 고갈 세포를 각 실험 목적에 따라 적정 농도로 부유 처리하여 사용하였다.

3. 세포 독성 검증

BNL CL.2 세포를 2×10^5 cell/ml이 되도록 하여 1 ml씩 24-well plate에 분주하고 IFN- γ 와 NMA를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교환하여 4시간 동안 배양한 다음 PBS에 용해한 MTT (1 mg/ml)용액 50 μ l/ml를 각 well에 넣고 3시간 배양하였다.

배양 후 배양액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 200 μ l/well씩 넣어 MTT-formazan을 용해한 다음 ELISA analyzer (ETY-96, Toyo Instruments, Inc., Japan)로 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. IFN- γ 에 의한 BNL CL.2 세포주의 생존율은 IFN- γ 를 처리하지 않은 대조군을 100%로 하여 환산하였다.

4. Nitric Oxide (NO)의 측정

배양액에 녹아 있는 NO₂⁻ 량의 측정은 Green 등⁹⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

BNL CL.2 세포를 24-well plate에 2×10^5 cell/well씩 넣어 준 다음 IFN- γ 나 LPS, 또는 다른 시약을 각각의 농도에 따라 배양 세포에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 배양한 다음 각 well로부터 100 μ l씩의 배양액을 취하여 ELISA Titer Tek plate에 옮기고 동량의 Griess Reagent (N-1-naphthylethylene diamine 0.1% in H₂O, sulfanilamide 1% in 5% H₃PO₄)를 첨가하고 10분간 실온에 두었다.

전체 NO₂⁻ 생성 정도는 TiterTek Multiscan MC/340 (Flow Lab)으로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 NO₂⁻ 농도에 대한 표준 곡선은 NaNO₂를 serial dilution하여 작성하였다.

5. Western Blot Analysis

IFN- γ 의 자극에 의한 NO 합성효소 (iNOS) 발현

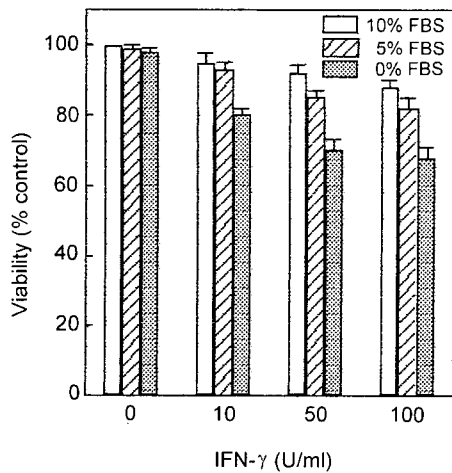


Fig. 1. Effect of FBS on IFN- γ -induced cell injury. BNL CL.2 cells were cultured in the presence or absence of FBS and stimulated with IFN- γ at indicated concentrations for 3 days. Then viability was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Results are mean \pm standard error of five separate experiments.

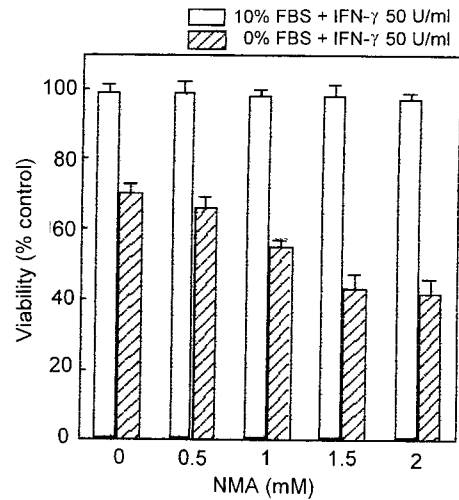


Fig. 2. Effect of NMA on IFN- γ -induced cell injury. Cells were cultured with 50 U/ml IFN- γ plus NMA at indicated concentrations in the presence or absence of 10% FBS for 3 days. Then viability was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Results are mean \pm standard error of five separate experiments.

을 확인하기 위하여 실험의 목적에 맞도록 배양된 세포를 PBS로 3회 세척하고 원칩하였다.

원칩된 세포에 cell lysis buffer를 가하고 잘 혼합하여 원심분리한 후 상청액은 E-tube로 옮기고 침전물은 버린다. 상청액의 일부를 단백질 정량에 사용하고 나머지는 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 따라 단백질을 분리시킨 다음, Electrobolt system을 사용하여 transfer 완충 용액에서 nitrocellulose filter에 옮겼다. PBS 완충액으로 씻고 blocking 용액에 1시간 정도 방치한 후 항혈청을 blocking 용액에 1:1,000으로 희석하여 처리하고 상온에서 90분 동안 흔들어서 다음 PBS 완충 용액으로 5분간 3회 씻고 암실에서 developing solution (ECL kit) A와 B를 1:1로 혼합한 용액을 처리한 즉시 hyper film (Fuji film)을 덮어 5분간 노출시킨 다음 현상하였다.

결 과

마우스 간 세포주인 BNL CL.2 세포에서 혈청의 존재 여부에 따라 IFN- γ 가 NO 생성과 세포 독성에 어떠한 영향을 미치는가를 시험한 결과는 Fig. 1과 같다.

혈청을 완전히 제거시킨 DMEM 배지에서

BNL CL.2 세포주를 배양한 5일 동안의 세포는 95% 이상의 생존율을 유지하여 큰 변화가 없었다. 그러나 IFN- γ 를 처리한 3일 후의 세포 생존율은 10 U/ml에서 약 80%, 50 U/ml에서는 약 65%로 떨어졌으며, 5% 또는 10%의 혈청을 첨가했을 때의 IFN- γ 에 의한 세포 생존율은 혈청이 제거된 경우보다 높게 나타나 배지 내의 혈청이 IFN- γ 에 의한 독성을 감소시킨 결과를 보였다.

10% FBS를 공급하고 50 U/ml의 IFN- γ 와 NO 생성 억제제인 NMA를 처리하여 배양한 3일 후 세포주의 생존율에는 거의 변화가 없었으나, FBS가 제거된 상태에서 IFN- γ 와 NMA를 동시에 처리하면 NMA의 농도 증가에 따라 세포 생존율은 감소하는 경향을 보였으며 (Fig. 2), 이러한 감소 현상은 처리 후 72시간부터 관찰되었다 (Fig. 3).

혈청 제거시 IFN- γ 에 의한 NO 생성을 알아보기 위하여 시험한 결과는 Fig. 4와 같다. 혈청을 완전히 제거한 세포주는 IFN- γ 를 단독 처리해도 NO가 생성되었으며, IFN- γ 의 농도가 증가할수록 NO의 양은 농도 의존적으로 증가하였고, IFN- γ 량이 50 U/ml일 때 최대의 NO 생성을 나타냈다.

혈청이 제거된 배양에서 NO 생성 효소인 iNOS의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. iNOS 발현이 IFN- γ 를 처리한 농도에 따라서 NO

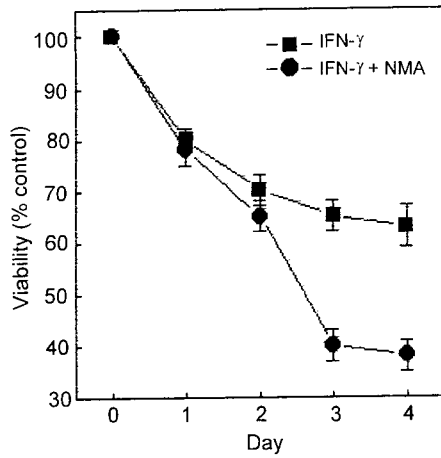


Fig. 3. Effect of the treatment time of NMA on IFN- γ -induced cell injury. Cells were cultured in the absence of FBS and stimulated with 50 U/ml IFN- γ plus 2 mM NMA for indicated times. Then viability was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Results are mean \pm standard error of five separate experiments.

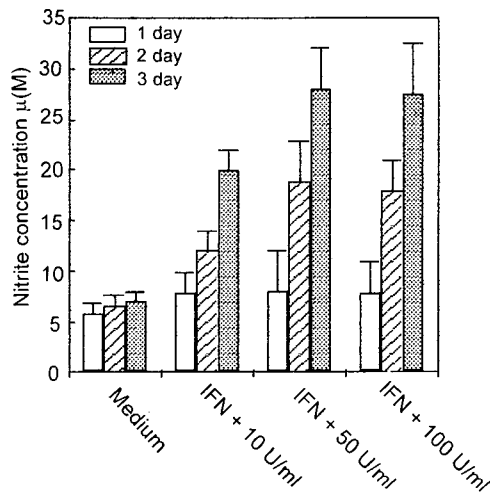


Fig. 4. Enhancing effect of serum-starved on IFN- γ -induced NO production in BNL CL.2 cells. Cells were incubated with IFN- γ at indicated concentrations for 3 days, and then nitrite concentration was determined by Griess reagent as described in Materials and Methods. Results are mean \pm standard error of five separate experiments.

생성과 함께 증가된 결과를 얻었다 (Fig. 5).

NO 생성을 억제하는 NMA를 IFN- γ 로 처리한 세포군에 첨가하여 혈청이 제거된 상태에서 배양하면 NO의 생성은 대조군의 NO 생성 수준으로

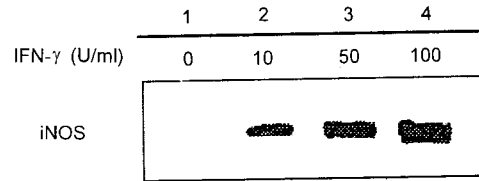


Fig. 5. Expression of IFN- γ -induced iNOS in serum-starved BNL CL.2 cells. Total protein was collected from treated or untreated cells and assayed for iNOS protein by Western blotting with a specific anti-iNOS antibody as described in Materials and Methods. Similar findings were observed in three separate experiments.

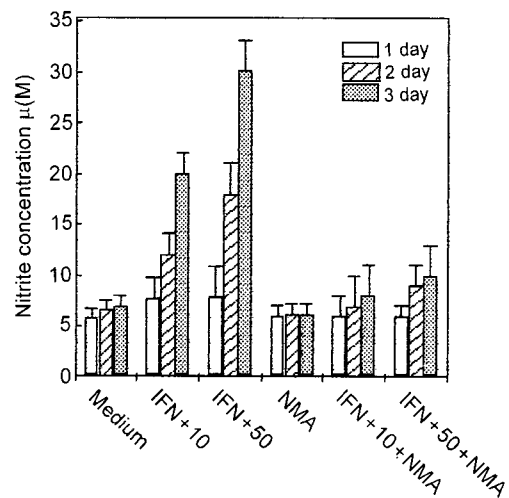


Fig. 6. Effect of NMA on NO production by serum-starved BNL CL.2 cells. Cells were incubated with IFN- γ in the presence or absence of NMA (2 mM) for 3 days, and then nitrite concentration was determined by Griess reagent as described in Materials and Methods. Results are mean \pm standard error of five separate experiments.

감소되었다 (Fig. 6).

혈청을 제거시킨 BNL CL.2 세포주에서 IFN- γ 와 LPS를 동시 처리했을 경우에 상승적으로 NO가 생성되는지를 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 즉 10 U/ml와 50 U/ml의 IFN- γ 에 농도별로 LPS를 처리했을 경우 LPS 단독 처리시 NO는 생성되지 않았으나, 10 U/ml의 IFN- γ 를 처리한 군에서는 LPS에 의해서 NO가 상승적으로 증가되는 결과를 얻었다.

혈청을 제거시킬 경우 BNL CL.2 세포주의 NO 생성 기전이 protein kinase (PK)와 관련이 있는지

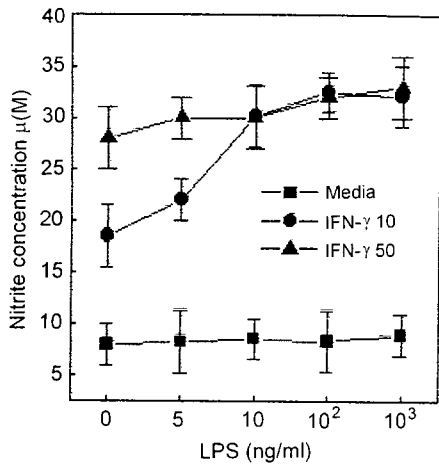


Fig. 7. Synergistic effects of IFN- γ and LPS on NO production. BNL CL.2 cells were incubated with LPS in the presence or absence of IFN- γ for 3 days, and then nitrite concentration was determined by Griess reagent as described in Materials and Methods. Results are mean \pm standard error of five separate experiments.

알아보기 위해서 여러 종류의 protein kinase inhibitor, 즉 PKA의 억제제인 H-89와 KT5720을, PKC의 억제제로는 staurosporine과 H-7, 그리고 protein tyrosine kinase (PTK) 억제제로 genistein과 herbimycin A 등을 각각 활성화된 세포에 처리하여 NO 생성 정도를 조사한 것은 Fig. 8과 같다. 즉 protein kinase inhibitor에 의한 NO 생성 정도를 나타낸 것으로 오직 PTK inhibitor에 의해서만 NO 생성이 억제되는 것을 볼 수 있었다.

고찰

간 세포에서 NO 생성 조절에 관한 연구를 살펴보면, Billiar 등¹⁾은 간 세포와 간 대식 세포를 혼합 배양하고 LPS로 자극하면 NO 생성이 증가되며 여기에 cytokine을 혼합 처리하면 NO 생성이 상승적으로 증가된다고 보고하였다. Redmond 등³³⁾은 dimethyl sulfoxide에 의한 간 세포의 경미한 손상에서도 NO 생성이 증가되었다고 하였으며, Kuo 등¹⁹⁾은 간 세포에 ethanol를 첨가하면 TNF- α + LPS의 자극에 의한 NO 생성이 증가한다고 보고하면서, 또한 이들은 ROI에 의해서도 간 세포의 NO의 생성이 증가할 수 있다고 하였다.

Mizumoto 등²⁵⁾은 사염화탄소에 의한 간 경화 발생시 NO 생성이 급격히 증가한다고 하였고,

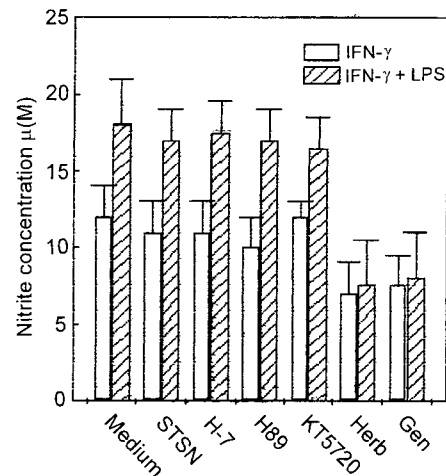


Fig. 8. Effect of signal blockers on NO production by serum-starved BNL CL.2 cells. Cells were preincubated with PKC inhibitors [25 nM staurosporine (STSN), 5 μ M H-7], PKA inhibitors [20 μ M H-89, 20 μ M KT5720], and PTK inhibitors [5 μ M herbimycin A (Herb), 5 μ g/ml genistein (Gen)], and then stimulated with IFN- γ (10 U/ml) plus LPS (10 ng/ml) for 48 hr. Griess reagent as described in Materials and Methods determined nitrite concentration. Results are mean \pm standard error of five separate experiments.

Nussler 등³¹⁾은 간 세포의 밀도에 따라서 NO 생성이 다르게 나타난다고 하였다.

염증 상태에 있는 간은 ROI 및 TNF- α 등에 의해서 괴사되거나 고사되어 산소 및 세포의 항상성 유지에 필요한 여러 가지 영양 물질들이 고갈될 수 있으며^{3,9,13,34)}, 손상된 간은 NO 생성을 유도하고 생성된 NO는 ROI나 TNF- α 에 의한 손상을 최소화시켜 간을 보호할 수 있음을 보고하였다^{15,33)}. 최근 Liang과 Akaike^{21,22)}는 혈청 내에 들어 있는 mitogenic factor (HGF, EGF, TGF)들이 세포 활성 물질에 의한 간 세포의 NO의 생성을 억제시킨다고 하였고, 또한 세포 활성 물질인 IFN- γ 에 의하여 간 세포들이 손상되고 이때 혈청이 세포 손상을 억제한다고 하였다.

이상의 연구들은 여러 가지의 요소들의 간 세포의 NO 생성과 손상에 큰 영향을 미치고 있음을 시사하고 있으나 간 세포의 NO 생성 및 손상과의 상호 관련성에 대해서는 연구가 불분명한 실정이다.

본 연구는 마우스 간 세포주인 BNL CL.2의 시험관내 배양을 통하여 혈청이 제거된 경우 IFN- γ

는 세포주에 독성을 나타내고 NO 생성을 유도하며, 혈청은 IFN- γ 에 의한 독성을 억제하고 유도된 NO는 간 세포를 보호할 수 있음을 알았으며, 또한 NO의 생성은 PTK 활성화와 관련이 있음을 확인하였다.

혈청을 제거시킨 DMEM 배지에서 BNL CL.2 세포주를 배양한 5일 동안의 세포 생존율은 큰 변화가 없었으나, IFN- γ 를 처리할 경우 3일 후부터 세포 생존율이 낮아진 반면, 혈청을 첨가했을 때의 IFN- γ 에 의한 세포 생존율은 혈청이 제거된 경우보다 높게 나타나 배지내의 혈청이 IFN- γ 에 의한 세포의 독성을 감소시킴을 알 수 있었으며, 이는 HC에서 IFN- γ 에 의한 세포 손상을 혈청이 억제한다는 Liang과 Akaike²²⁾의 결과와 유사하였다.

FBS를 공급하고 IFN- γ 와 NO 생성 억제제인 NMA를 처리하여 배양한 3일 후 세포주의 생존율에는 거의 변동이 없어 FBS가 IFN- γ 에 의한 세포 손상을 억제하여 NO가 생성되지 않음을 알 수 있었고, FBS가 제거된 상태에서 IFN- γ 와 NMA를 동시에 처리하면 NMA의 농도 증가에 따라 세포 생존율은 감소하는 경향을 보였으며, 이러한 현상은 처리 후 72시간부터 관찰되었다. 이는 IFN- γ 에 의한 세포 독성은 혈청에 의하여 억제될 뿐만 아니라 NO에 의해서도 세포가 보호될 수 있음을 시사한다.

Lee 등²³⁾은 10% 혈청 조건에서 IFN- γ + LPS를 복합 처리할 경우에 BNL CL.2 세포주가 NO를 생성할 수 있다고 하였으나, 본 연구 결과에 의하면 혈청이 제거된 BNL CL.2 세포주는 배양 3일 후부터 IFN- γ 단독 처리에서도 NO를 생성할 수 있었으며, IFN- γ 의 농도 증가에 따라 NO 생성량도 증가하였다. 이는 혈청 고갈에 따른 세포주의 손상은 3일 후부터 나타나고 손상의 결과 NO의 생성을 유도하였다고 해석된다.

간 세포에서 NO의 생성은 NO 합성 효소인 iNOS의 발현과 직접적으로 연관되어 있다. 따라서 본 실험에서는 iNOS의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. 혈청의 고갈에 의한 iNOS 발현이 IFN- γ 를 처리한 농도에 따라서 증가되어 NO 생성량이 증가됨을 확인할 수 있었다.

LPS는 그람 음성 세균의 세포벽 물질로서 세포 활성 물질에 의해서 활성화된 간 세포 및 면역 세포 등을 자극하여 NO의 생성을 상승적으로 증가시킨다고 하였다.³⁶⁾ 혈청을 제거시킨 BNL CL.2

세포주에 LPS를 단독 처리하면 NO는 생성되지 않았으나, IFN- γ 와 LPS를 동시에 처리할 경우 NO 생성은 LPS의 농도 증가에 따라 상승적으로 증가되는 것을 알 수가 있었다.

PTK, PKA 및 PKC 등은 여러 종류의 세포에서 NO의 생성과 직접 또는 간접적으로 관련되어 있는 것으로 알려져 있다^{19,23)}. 따라서 본 실험에서는 혈청을 제거시킬 경우에 BNL CL.2 세포주의 NO 생성이 protein kinase와 관련이 있는지를 알아보기 위해서 PKA, PKC 및 PTK inhibitor들을 활성화된 세포에 처리하고 NO 생성 정도를 조사한 바 오직 PTK inhibitor에 의해서만 NO 생성이 억제되는 것을 알 수가 있었으며, 이와 같은 결과는 PTK의 활성이 혈청이 고갈된 BNL CL.2 세포에서 NO의 생성에 중요한 역할을 담당하고 있기 때문으로 판단되며 이에 따른 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, West MA, Bentz BG and Simmons RL (1989): An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis *in vitro*. *J Exp Med*, **169**: 1467-1470.
- 2) Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BR and Moncada S (1993): Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis. *Lancet*, **342**: 338-340.
- 3) Burr AW, Hillan KJ, McLanughlin KE, Ferrier R, Charman C, Mathew J and Burt AD (1996): Hepatocyte growth factor levels in liver and serum increase during chemical hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, **24**: 1282-1287.
- 4) Busse R and Mulsch A (1990): Introduction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, **265**: 133-136.
- 5) Feldman PL, Griffith OW and Stuehr DL (1993): The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News*, **20**: 26-38.
- 6) Flynn JL, Scanga CA, Tanaka KE and Chan J (1998): Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J Immunol*, **160**(4): 1796-1803.
- 7) Gally JA, Montague PR, Reeke GN and Edelman GM (1990): The NO hypothesis: Possible

- effects of short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **87**: 3547-3551.
- 8) Green LC, Wagner DA, Glogowski JS, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR (1982): Analysis of nitrate, nitrite and [15-N]nitrite in biological fluids. *Anal Biochem*, **126**: 131-136.
 - 9) Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards III CK, Schuchman EH, Fuks Z and Kolesnick R (1997): Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med*, **186(11)**: 1831-1841.
 - 10) Hibbs JJr, Taintor RR and Vavrin Z (1990): Macrophages cytotoxicity: a role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, **235**: 1599-1607.
 - 11) Hibbs JJr, Vavrin Z and Taintor RR (1987): L-arginine is required for expression of the activated macrophages effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol*, **138**: 550-565.
 - 12) Ioannidis I and de Groot H (1993): Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochem J*, **296**: 341-345.
 - 13) Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A and Jones DA (1998): Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol*, **160**: 3480-3486.
 - 14) Kim YM, Talanian RV and Billiar TR (1998): Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, **372(49)**: 31138-31148.
 - 15) Kim YH, Pae HO, Yoo JC, Kim SM, Jun CD, Park RK, Chung HT and Jin HS (1998): Roles of nitric oxide and tumor necrosis factor in liver inflammation induced by *C. parvum* and LPS. *Korean J Immunol*, **20(2)**: 237-243.
 - 16) Kobzik I, Reid BM, Bredt DS and Stamler JS (1994): Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, **372**: 546-548.
 - 17) Kröncke KD, Fehsel K and Kolb-Bachofen V (1997): Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection - How, why, when, and where? *Nitric Oxide*, **1(2)**: 107-120.
 - 18) Kubes P, Suzuki M and Granger DN (1991): Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **88**: 4651-4655.
 - 19) Kuo PC, Abe KY and Schroeder RA (1997): Oxidative stress increases hepatocyte iNOS gene transcription and promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **234**: 289-292.
 - 20) Lalenti A, Moncada S and Di Rosa M (1993): Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol*, **110**: 701-706.
 - 21) Liang JF and Akaike T (1997): Role of metabolic intermediates in lipopolysaccharide/cytokine-mediated production of nitric oxide in isolated mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**: 379-382.
 - 22) Liang JF and Akaike T (1998): Mitogenic-factor-dependent regulation of lipopolysaccharide and cytokine mixture-mediated hepatocyte nitric oxide synthesis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, **243**: 833-837.
 - 23) Lee BS, Kang HS, Pyun KH and Choi I (1997): Roles of tyrosine kinases in the regulation of nitric oxide synthesis in murine liver cells: Modulation of NF- κ B activity by tyrosine kinases. *Hepatology*, **25**: 913-919.
 - 24) Middleton SJ, Shorthouse M and Hunter JD (1993): Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet*, **341**: 456-466.
 - 25) Mizumoto M, Arai S, Furutani M, Nakamura T, Ishigami S, Monden K, Ishiguro S, Fujita S and Imamura M (1997): NO as an indicator of portal hemodynamics and the role of iNOS in increased NO production in CCl₄-induced liver cirrhosis. *J Surg Res*, **70**: 124-133.
 - 26) Moncada S, Palmer RM and Higgs EA (1989): The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem Soc Trans*,

- 17(4):** 642- 644.
- 27) Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U and Murad F (1993): Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett*, **316**: 175-180.
 - 28) Nakayama DK, Geller DA and Lowenstein CJ (1992): Cytokines and lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **7**: 471-476.
 - 29) Nanji AA, Greenberg SS, Tahan SR, Fogt F, Loscalzo J, Sadrzadeh SMH, Xie J and Stamler JS (1995): Nitric oxide production in experimental alcoholic liver disease in the rat: Role in protection from injury. *Gastroenterol*, **109**: 899-907.
 - 30) Nozaki Y, Hasegawa Y, Takeuchi A, Fan ZH, Isobe KI, Nakashima I and Shimokata K (1997): Nitric oxide as an inflammatory mediator of radiation pneumonitis in rats. *Am J Physiol*, **272** (Lung Cell Mol Physiol 16): L651-L658.
 - 31) Nussler DA, Liu ZZ, Silvio MD, Sweetland MA, Geller DA, Lancaster JR, Billiar TR, Freeswick PD, Lowenstein CL and Simmons RL (1994): Hepatocyte inducible nitric oxide synthesis is influenced in vitro by cell density. *Am J Physiol*, **266**(Cell Physiol. 35): C394-C401.
 - 32) Ou J, Carlos TM, Watkins SC, Saavedra JE, Keefer LK, Kim YM, Harbrecht BG and Billiar TR (1997): Differential effects of nonselective nitric oxide synthase (NOS) and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia. *Nitric Oxide*, **1(5)**: 404-416.
 - 33) Redmond HP, Wang JH and Bouchier-Hayes D (1996): Taurine attenuates nitric oxide- and reactive oxygen intermediate- dependent hepatocyte injury. *Arch Surg*, **131**: 1280-1288.
 - 34) Roth RA, Harkema JR, Pertka JP and Ganey PE (1997): Is Exposure to bacterial endotoxin a determinant of susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? *Toxicol Appl Pharmacol*, **147**: 300-311.
 - 35) Sasaki S, Miura T, Nishikawa S, Yamada K, Hirasue M and Nakane A (1998): Protective role of nitric oxide in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect Immun*, **66(3)**: 1017-1022.
 - 36) Spitzer JA (1994): Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats. *Hepatology*, **19**: 217-228.
 - 37) Wink DA, Cook JA, Pacelli R, DeGraff W, Gamson J, Liebman J, Krishna MC and Mitchell JB (1996): The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: A direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys*, **331(2)**: 241-248.

=Abstracts=

**Effects of Serum on Nitric Oxide Production in Embryonic
Mouse Liver Cell Line BNL CL.2**

**Yoo-Hyun Kim[†], Shin-Moo Kim, Hyun-Ok Pae*, Ji-Chang Yoo*,
Hun-Taeg Chung* and Hyo-Sang Jin****

*Department of Clinical Pathology, Wonkwang Health Science College,
Iksan, Jeonbuk, 570-750, Korea, Department of Microbiology and Immunology,
Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Korea*,
School of Life Science, Jeonju University, Jeonju, Jeonbuk, 560-759, Korea***

Nitric oxide (NO) plays an important role in immunologic defense, and influences upon the functioning of secretory tissues and cells. It also exhibits cytotoxic/cytostatic activity as one of major operating effectors of the cellular immunity system. We investigated the effects of serum on the cell damages and NO production in the mouse liver cell line BNL CL.2 to establish the role of NO. We observed that, when BNL CL.2 cells were cultured in serum-free medium, they were induced to cell damage by the stimulation of IFN- γ alone or IFN- γ plus LPS. Serum-starved cells showed large amount of nitrite accumulation and NO synthase (NOS) expression in response to INF- γ alone in dose- and time- dependent manners, but serum-supplied cells did not. The production of NO was blocked by protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors, genistein and herbimycin. These results suggest that the deprivation of serum in the BNL CL.2 cell culture medium might primed with the cells to produce NO when the cells are triggered by IFN- γ and the involvement of PTK signal transduction pathway in the expression of NOS gene in murine hepatocytes.

Key Words: Nitric oxide, NOS, BNL CL.2, IFN- γ , Protein tyrosine kinase

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 5(1): 85-93, June, 1999]

[†] Corresponding author