

마우스 단핵 탐식 세포에서 Nitric oxide 생성의 조절 기전에 관한 연구

최 병 기, 김 수 웅

동덕여자대학교 약학대학

Studies on the Regulation of Nitric Oxide Synthesis in Murine Mononuclear Phagocytes

Byung-Ki Choi and Soo-Woong Kim

College of Pharmacy, Dong-duk Womens University, Seoul, 136-714, Korea

ABSTRACT

ADP-ribosylation may be involved in the process of macrophage activation. Nitric oxide (NO) has emerged as an important intracellular and intercellular regulatory molecule with function as diverse as vasodilation, neural communication or host defense. NO is derived from the oxidation of the terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine by the NADPH-dependent enzyme, nitric oxide synthase (NOS) which is one of the three different isomers in mammalian tissues. Since NO can exert protective or regulatory functions in the cell at a low concentration while toxic effects at higher concentrations, its role may be tightly regulated in the cell. Therefore, this paper was focused on signal transduction pathway of NO synthesis, role of endogenous TGF- β in NO production, effect of NO on superoxide formation. Costimulation of murine peritoneal macrophages with interferon- γ (IFN- γ) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) increased both NO secretion and mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) when PMA abolished costimulation. Pretreatment of the cells with PMA abolished costimulation effects due to the depletion of protein kinase C (PKC) activities. The involvement of PKC in NO secretion could be further confirmed by PKC inhibitor, staurosporine, and phorbol ester derivative, phorbol 12, 13-didecanoate. Addition of actinomycin D in IFN- γ plus PMA stimulated cells inhibited both NO secretion and mRNA expression of iNOS indicating that PMA stabilizes mRNA of iNOS. Exogenous TGF- β reduced NO secretion in IFN- γ stimulated murine macrophages. However addition of antisense oligodeoxynucleotide (ODN) to TGF- β to this system recovered the ability of NO production and inhibited mRNA expression of TGF- β . ACAS interactive laser cytometry analysis showed that transportation of FITC-labeled antisense ODN complementary to TGF- β mRNA could be observed within 5 min and reached maximal intensity in 30 min in the murine macrophage cells. NO released by activated macrophages inhibits superoxide formation in the same cells. This inhibition may be related on NO-induced auto-adenosine diphosphate (ADP)-ribosylation. In addition, ADP-ribosylation may be involved in the process of macrophage activation.

Key words : iNOS, IFN- γ , PMA, PKC, TGF- β

서 론

NO는 혈관계에서 혈관 이완과 혈류를 조절하는 신호 전달자(signaling molecules)로써 작용하며,¹⁾ 면역계에서는 외부 침입한 미생물이나 내부 종양세포의 사멸에 영향을 주는 면역 방어 분자(immune defense molecules)로써 인식되고 있다.²⁾ 또한 1988년에 뇌조직에서 NO와 유사한 인자가 확인된 후 NO는 새로운 신경 전달물질로써 이 분야에 대한 연구가 급속히 진행되어왔다.³⁾ 면역계에서 생성된 NO는 세포 활성 물질(cytokines)이나 박테리아 세포벽 성분인 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도된 inducible NO synthase(iNOS)에 의해 생성되는데,⁴⁾ 이는 이미 세포 내에 발현되어 있는 상존성 NOS인 brain NOS(bNOS)나 endothelial NOS(eNOS)보다 약 100배 이상의 NO를 생성하는 것으로 보고되고 있다.⁵⁾

NO가 면역계에서 중요한 방어 분자로써 작용하고 있고 특히 T-cell에서 분비되는 세포 활성 물질인 IFN- γ 와 LPS에 의한 막을 통한 신호 전달 기전에 관한 연구는 생체에서 T-cell과 탐식 세포사이의 상호작용을 이해와 탐식 세포간의 self-regulation의 기전을 이해하는 중요한 자료가 되기 때문에 활발한 연구가 진행되고 있다.⁶⁻⁸⁾

지금까지 밝혀진 병인의 인식으로 분비되는 tumor necrosis factor(TNF)와 interleukin-1(IL-1) 등에 의해 자극된 내상피 세포나 탐식 세포가 iNOS를 유도하여 NO가 형성되고 NO에 의한 혈관 확장을 수반하여 혈압 강하를 초래하게 된다.⁹⁾ iNOS를 발현시켜 NO를 생성시키는 밝혀진 cytokines은 IFN- γ , IL-2 및 TNF로 대식 세포는 IFN- γ 가 먼저 작용하여 priming된 후 TNF가 작용하여 triggering되어야 NO를 형성한다. 그러나 현재 IFN- γ 의 신호 전달 체계에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않으며, 2차 신호 전달 중의 하나인 protein kinase C(PKC)와 관련이 있을 것으로 추정하고 있으나 직접적인 보고는 없다.¹⁰⁾

cytokine중 TGF- β 는 priming된 대식 세포나 혈소판 및 림프구에서 분비되어지는 cytokine으로 강력한 면역조절물질로 IL-2에 의존하여 T-cell 증식을 억제하고, IL-1에 의존하여 murine lymphocyte와 B-cell 증식과 면역 글로블린 분비를 억제하는 것으로 알려졌다.^{11),12)}

대식 세포에 의해 생성되는 NO는 비교적 장기간 동안 많은 양이 분비되어지므로 암세포나 미생물의 사멸뿐만 아니라 자가 조직에도 손상을 미친다. 특히 생성된 NO는 대식 세포에서 생성되어지는 또 다른 방어 분자인 반응 산소 중간 물질(reactive oxygen intermediate: ROI)의 생성 기능에도 영향을 미칠 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 대식 세포의 iNOS 발현 기전과 NO 생성에 관한 신호 전달 체계와 cytokines의 일종인 TGF- β 가 iNOS의 발현에 관여하는 조절 기전, 생성된 NO가 자가 방어 기구의 일종인 활성 신호 라디칼의 생성에 미치는 영향에 관하여 알아보았다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 시약

실험 동물은 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)에서 구입한 C57BL/6과 Balb/c 마우스를 사용하였고 recombinant mouse interferon gamma(IFN- γ : 1×10^6 units/mg), TNF- α 는 Genzyme(Cambridge, USA) 제품을 사용하였고 기타 시약은 Sigma chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. iNOS 효소 활성도 측정

복강 대식세포를 Griess 반응으로 nitrate 농도를 측정하였다.¹³⁾

3. 반응 질소 중간 물질(NO₂⁻, NO₃⁻, NO) 측정

배양액 속에 축적된 NO₂⁻을 발색시켜 ELISA reader로 측정한 후 NO₃⁻를 환원 효소로 처리한 후 Griess reagent를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁴⁾

4. RNA 분리 및 Northern blotting

RNA분리는 LiCl-urea 방법을 사용하여 분리 후¹⁵⁾ Northern blotting 하였다.

5. 대식 세포의 활성 산소 중간 물질 생성능의 측정

1) 복강 대식세포 유도

Peritoneal exudates cell (PEC)를 분리 후 veronal buffered saline으로 5×10^6 cells/300 μ l이 되게 적정 후 chemiluminescence (CL)로 측정하였다.¹⁶⁾

2) lucigenin에 의해 유도된 CL 측정

PEC (5×10^6 cells/300 μ l)를 luminometer (LB 9509, Berthold)에서 37°C로 15~30분 동안 preincubation 후 10 mM lucigenin을 주입하고 5.3 μ M phorbol myristate acetate (PMA) 주입 후 37°C에서 60분 동안 CL을 측정하였다.

3) 복강 대식 세포에서 세포질 단백 분리

복강 대식 세포를 homogenize한 후 원심 분리 후 상층액을 취해 20분간 초고속 원심 분리 후 상층액을 세포질 분획으로 하였다.

4) [³²P]ADP-ribosylation

ADP-ribosylation는 Riberio-Neto 등의 방법¹⁷⁾을 따랐다.

6. Oligonucleotide 합성

antisense 25-mer phosphorothioate ODNs는 Gene Assembler Special (Pharmacia LKB biotechnology)로 합성하였다.

7. Antisense ODNs의 세포 내 유입 측정

5-end에 FITC로 표지한 다음 ACAS 570 Interactive Laser cytometer (Meridin, Co., U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

결 과

1. 대식 세포의 iNOS 발현 기전과 NO 생성에 관한 신호 전달 체계

1) 마우스 대식 세포에 있어서 NO 생성 유도에 대한 rIFN- γ 와 PMA의 효과

NO 생성에 있어서 rIFN- γ 와 PMA의 상호 작용 여부를 밝히기 위해 마우스의 복강에서 얻은 대식 세포를 배양액과 rIFN- γ 를 넣은 배양액에서 각각 48시간 동안 배양시키면서 PMA를 시간별로 처리하면서 Griess 방법으로 NO 발생을 측정하였다. PMA를 단독 처리하였을 때는 NO가 생성되지 않았으나 rIFN- γ 를 함께 처리하면 상호 협조에

Table 1. Synergistic cooperation between rIFN- γ and PMA to induce NO synthesis in murine macrophages

Stimulators		Final concentration (μ M) ^c	
rIFN- γ ^a	PMA ^b	NO ₂ ⁻	NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻
-	-	<5	<5
+	-	20 \pm 5	38 \pm 7
-	+(0 h)	<5	<5
+	+(0 h)	40 \pm 4	85 \pm 11
+	+(3 h)	65 \pm 6	145 \pm 12
+	+(6 h)	70 \pm 7	152 \pm 14
+	+(9 h)	60 \pm 6	133 \pm 10

^a TG-elicited macrophages were cultured either in the presence or absence of rIFN- γ (5 U/ml).

^b The cells were stimulated with PMA (200 nM) at various times after incubation.

^c The amount of NO₂⁻ or NO₂⁻ plus NO₃⁻ released by macrophages was measured after 48 hrs of incubation. Values are means \pm SD of four experiments

위하여 NO의 생성이 현저히 증가함을 볼 수 있었다. 또한 rIFN- γ 를 처리한 후 6시간 후 PMA를 처리하면 상승 작용이 최대임을 알 수 있었다 (Table 1).

효소 활성도 증가와 iNOS mRNA 간의 관계를 증명하기 위하여 iNOS mRNA를 Northern blot으로 측정하였다. rIFN- γ 를 처리한 경우 대식세포에서는 약간의 iNOS mRNA expression이 확인되었고 LPS나 PMA를 rIFN- γ 와 함께 처리한 경우 iNOS mRNA expression이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 또한 PMA를 단독 처리한 경우는 iNOS mRNA expression이 발현되지 않았으나 LPS와는 달리 PMA에 의한 rIFN- γ 를 처리한 대식세포의 nitrite 생성은 배양 초기에는 천천히 증가하다가 후기에는 급격히 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 1A). 또한 rIFN- γ 와 PMA 협조에 의한 NO의 형성은 PMA 농도 의존적임을 알 수 있었다 (Fig. 1B). 또한 PMA는 LPS로 유도된 NO의 양을 높이는 협조 상승 작용에 관여하지만 6시간 전에 PMA를 전처리한 후 rIFN- γ 로 자극하면 NO 형성에 협조 상승작용이 나타나지 않았는데 (Fig. 2), 이는 PMA가 PKC의 활성을 고갈시켰기 때문으로 생각된다.

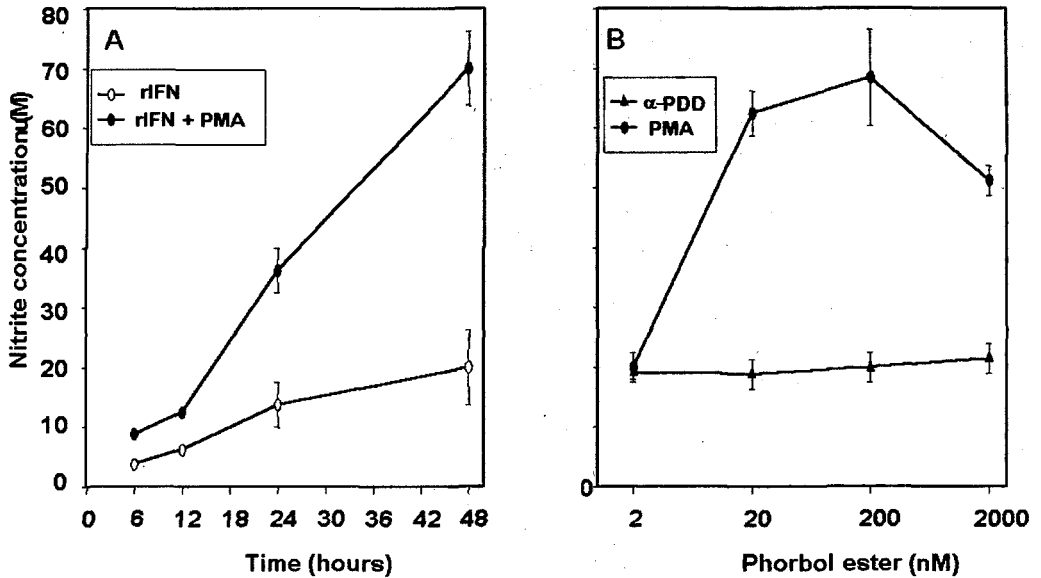


Fig. 1. NO release by murine peritoneal macrophages stimulated with rIFN- γ or rIFN- γ plus PMA. TG-elicited macrophages (2×10^5) were cultured for 6 hrs in medium containing rIFN- γ (5 U/ml). The cells were then stimulated with either medium or derivatives of phorbol ester for 48 hrs, and released-NO was measured by the methods of Griess. (A) Time dependent effects of PMA (200 nM) on the rIFN- γ treated macrophages. : rIFN- γ treated, \bullet : rIFN- γ plus PMA treated. (B) Dose dependent effects of α -PDD (\blacktriangle) or PMA (\bullet) for NO release on the rIFN- γ treated macrophages. Results are presented as the means \pm SD of 5 independent cell preparations.

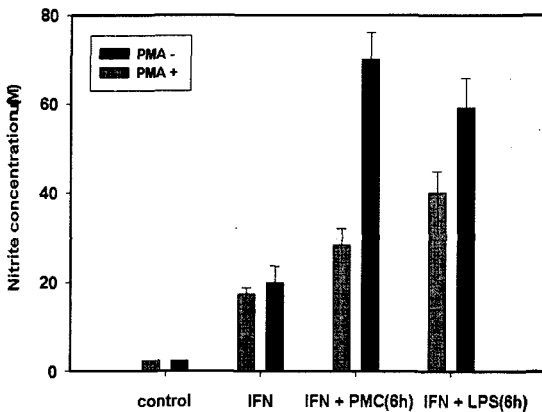


Fig. 2. pretreatment of PMA before the stimulation with rIFN- γ abolished the synergistic cooperation among rIFN- γ , PMA and LPS. TG-elicited macrophages (2×10^6) were cultured for 6 hrs in the absence or presence of 200 nM PMA and stimulated with either 5 U/ml rIFN- γ , 5 U/ml rIFN- γ plus 200 nM PMA or 5 U/ml rIFN- γ plus 10 ng/ml LPS. NO release was measured by the methods of Griess. Values are the means \pm SD of three experiments.

2) BCG를 주사한 마우스의 대식세포에서 NO 생성에 대한 PMA 효과

BCG를 주사한 마우스의 복강 대식세포에서 PMA의 NO생성에 관여 여부를 알아보았다. PMA를 단독으로 처리하여도 NO가 생성되었고 PMA와 rIFN- γ 를 동시에 처리하면 NO의 생성에 있어서 협조 상승 작용이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 3).

3) rIFN- γ 와 PMA를 처리한 대식세포의 NO 형성에 있어서 STSN과 polymyxin B의 효과

rIFN- γ 나 PMA의 자극으로 인한 대식 세포에서 발생된 NO생성의 증가 기전을 더 자세히 알아보기 위하여 두 가지 경쟁적인 PKC활성 억제제를 사용하였다. rIFN- γ 와 PMA를 처리한 후 여기에 PKC 저해제인 STSN 혹은 LPS 저해제인 polymyxin B를 처리하면 PMA의 협조 증가 작용이 억제하여 NO 형성량이 50%와 36%로 감소하였다(Table 2). 그러나 rIFN- γ 만 단독으로 처리한 경우는 NO의 형성에 영향을 받지 않았다.

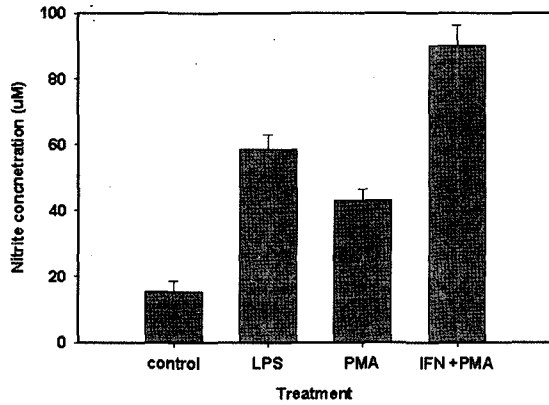


Fig. 3. The effect of PMA on the production of NO by macrophages from BCG-injected (i.p. 2 ml of 1×10^8 BCG/ml) mice. Macrophages from BCG-injected mice were cultured for 48 hrs in the presence of either PMA alone or PMA plus rIFN- γ . NO release was measured by the methods of Griess. Values are the means \pm SD of three experiments.

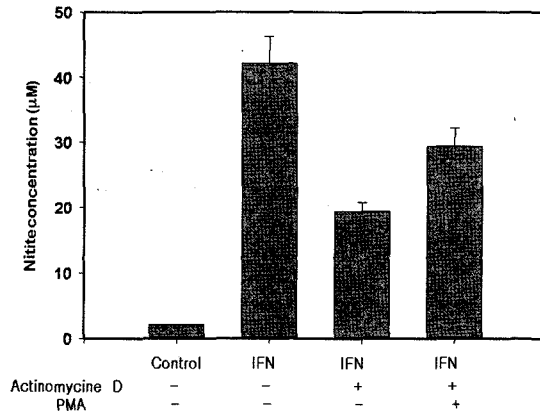


Fig. 4. Effect of PMA on the actinomycin D-induced inhibition of NO secretion by rIFN- γ -stimulated macrophages. TG-elicited macrophages (2×10^5) were cultured for 6 hrs either in medium alone or in medium containing rIFN- γ (100 U/ml). The cells were then treated with either actinomycin D (1 μ g/ml) plus PMA (200 nM) as indicated, cultured for 48 hrs, and NO release was measured by the method of Griess. Values are the means \pm SD of three experiments.

Table 2. Effects of STSN or polymyxin B on the production of NO by IFN- γ or IFN- γ plus PMA-stimulated macrophages

Stimulators ^a		Substance ^b		NO ₂ ⁻ secretion (µM) ^c	Inhibition rate (%)
IFN- γ	PMA	STSN	polymyxin B		
-	-	-	-	5 >	
+	-	-	-	20 \pm 4	
+	-	+	-	17 \pm 3	
+	-	-	+	19 \pm 5	
+	+	-	-	70 \pm 7	0
+	+	+	-	35 \pm 4	50
+	+	-	+	25 \pm 5	64

^a TG-elicited macrophages were cultured for 6 hrs with either in medium alone or in medium containing rIFN- γ (5 U/ml).

^b Either rIFN- γ or rIFN- γ plus PMA-stimulated cells were treated with STSN (200 nM) or polymyxin B (100 U/ml) at 6 hrs after incubation.

^c The amount of NO₂⁻ released by macrophages was measured after 48 hrs of incubations. Values are means \pm SD of four experiments.

^d TG-elicited macrophages were cultured for 6 hrs with rIFN- γ , and then the cells were stimulated with PMA (200 nM).

4) 대식 세포에서 NO 형성을 위한 actinomycin D 저해 작용에 있어서 PMA의 효과
rIFN- γ 를 처리한 6시간 후 actinomycin D와 actinomycin D+PMA를 처리하였을 때 actino-

mycin D+PMA를 처리한 군은 actinomycin D만을 단독 처리한 군에 비해 상대적으로 NO의 형성이 증가되었고, iNOS mRNA의 발현도 증가하였다 (Fig. 4). 이는 PMA 단독으로는 iNOS mRNA의 발현에 영향을 줄 수 없으나 rIFN- γ 에 의해 이미 발현된 iNOS mRNA의 안정화에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

5) PKC 저해제가 TNF에 의해 유도되어지는 NO 생성에 미치는 영향

TNF의 세포내 신호 전달 기전이 PKC와 관련성이 있는지를 조사하기 위하여 IFN와 TNF를 처리한 세포에 STSN과 polymyxin B를 처리한 결과 TNF에 의해 유도되어지는 NO 생성은 억제되지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 5). 이는 TNF의 신호 전달 기전이 PKC와 관련성이 없이 독립적으로 전달됨을 알 수 있다.

2. TGF- β 에 대한 antisense oligodeoxynucleotide (ODNs)가 IFN- γ 에 의해 유도되어지는 NO이 생성에 미치는 영향

1) Antisense ODNs의 세포 내 유입
대식 세포를 5-end FITC-labeled phosphoroth-

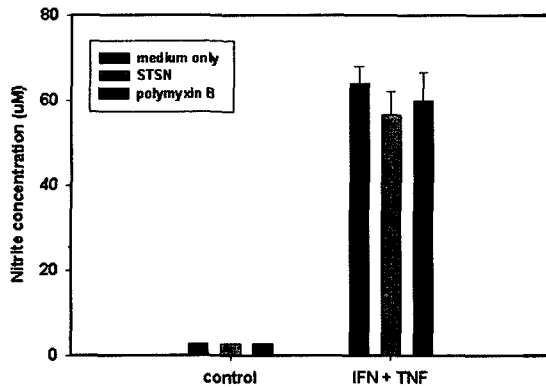


Fig. 5. Effects of STSN or polymyxin B on the induction of NO synthesis induced by rIFN- γ - or rIFN- γ plus TNF- α -stimulated murine peritoneal macrophages. TG-elicited macrophages were cultured for 6 hrs with rIFN- γ (5 U/ml) in the presence of STSN (20 nM) or polymyxin B (100 U/ml) and then the cells were treated with or without TNF- α (1,000 U/ml). The amount of NO₂⁻ released was measured after 48 hrs of incubation. Values are the means \pm SD of three experiments.

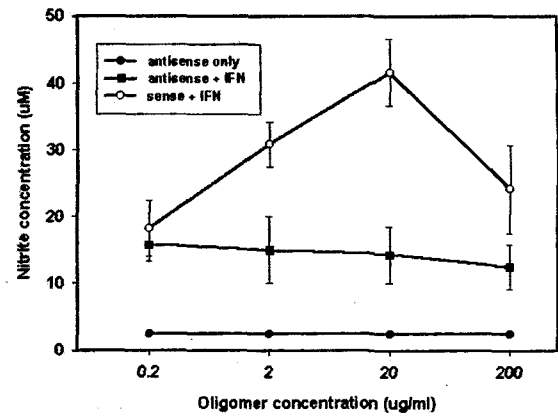


Fig. 6. Dose dependent effects of antisense ODNs complementary to TGF- β mRNA on NO production on murine peritoneal macrophages. TG-elicited macrophages (2×10^5) were cultured with various concentration of antisense or sense ODNs complementary to TGF- β mRNA in the presence or absence of rIFN- γ (5 U/ml). After 48 hrs incubation, NO release was measured by the methods of Griess. Results are expressed as the means \pm SD of 3 independent cell preparations.

ioate antisens ODN으로 처리한 다음 형광 강도를 측정하였다. Antisense ODNs는 배양 후 약 5분 안에 세포 내로 이동하기 시작하였으며 약 30분내에 최대 농도로 세포 내에 유입되었다. 유입된 형광은 약 12시간 정도 세포 내에서 지속되는 것으로 보아 antisense ODNs는 비교적 세포 안에서 안정한 것으로 사료된다.

2) 활성화된 대식세포에서 antisense ODNs에 의한 TGF- β 유전자의 발현 억제

Antisense ODNs이 TGF- β 와 특이적인 반응을 하는지를 알아보기 위하여 phorbol ester로 활성화시킨 대식세포에 antisense TGF- β ODNs를 처리한 다음 Northern blot을 이용하여 TGF- β mRNA 발현을 조사하였다. 그 결과 antisense ODNs를 처리한 군이 특이적으로 TGF- β 발현이 억제되었다. Antisense ODNs를 전처리한 대식세포에 IFN- γ 를 처리하면 antisense ODNs 농도 의존적으로 NO 생성이 증가하고 농도가 20 μ g/ml에서 가장 효과적으로 NO 생성이 증가하였다 (Fig. 6). 이러한 결과는 antisense ODNs가 특이적으로 TGF- β 발현을 억제함으로써 NO 형성을 증가시킬 뿐만 아니라

세포 활성화 과정동안 TGF- β 와 같은 cytokine을 분비함으로써 NO 생성을 자체적으로 억제하고 있음을 시사한다.

3) Anti-TGF- β antibody가 대식 세포의 NO 형성에 미치는 영향

Antisense ODNs의 NO 생성에 대한 효과가 TGF- β 의 발현 억제에 의해 일어나는 데 대한 TGF- β 에 대한 Anti-TGF- β antibody가 antisense ODNs의 효과를 모방할 수 있는지를 검증하였다. Anti-TGF- β antibody는 농도 의존적으로 NO의 생성을 증가시켰고 (Fig. 7), 증가된 NO는 bioactive TGF- β 에 의해 모두 감소되었다 (Figs. 7, 8). 이러한 결과는 세포 외부에서 TGF- β 를 첨가시키거나 세포 내에서 TGF- β mRNA를 억제시키거나 모두 동일하게 NO를 억제한다는 것을 보여준다.

3. NO의 형성이 대식세포의 ROI 생성에 미치는 영향

1) 대식 세포의 활성화에 따른 반응 산소 및 질소 중간 물질들의 생성

Balb/c 마우스의 복강으로부터 분리한 대식 세

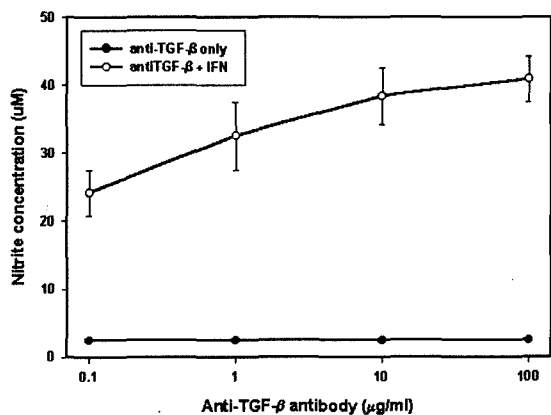


Fig. 7. Dose dependent effects of anti-TGF-β antibodies on NO production in murine peritoneal macrophages. TG-elicited macrophages (2×10^5) were cultured with various concentration of anti-TGF-β antibodies in the presence or absence of rIFN-γ (5 U/ml). After 48 hrs incubation, NO release was measured by the method of Griess. Results are presented as the means \pm SD of 3 independent cell preparations.

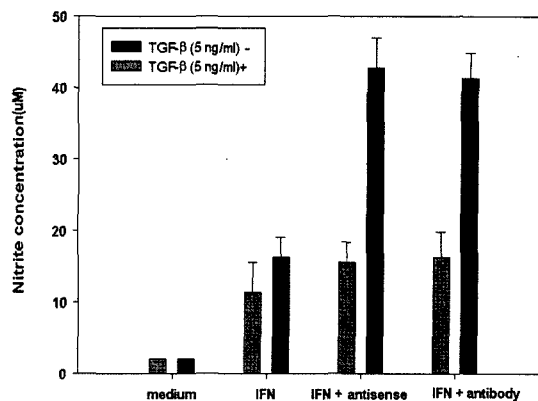


Fig. 8. Effects of exogenous TGF-β on antisense ODNs- or anti-TGF-β antibodies-induced NO production in IFN-γ-treated murine peritoneal macrophages. TG-elicited macrophages (2×10^5) were cultured with rIFN-γ (5 U/ml), antisense ODNs (20 mg/ml) plus IFN-γ, or exogenous TGF-β (5 ng/ml). After 48 hrs incubation, NO release was measured by the method of Griess. Results are presents as the means \pm SD of 2 independent cell preparations.

포를 IFN-γ 혹은 LPS를 단독으로 혹은 동시에 6, 12, 24, 48시간 간격으로 처리한 후 형성되는 ni-

trite의 양을 Griess 법으로 측정하였다. Superoxide anion과 nitrite의 양을 비교 분석한 결과는 Fig. 9

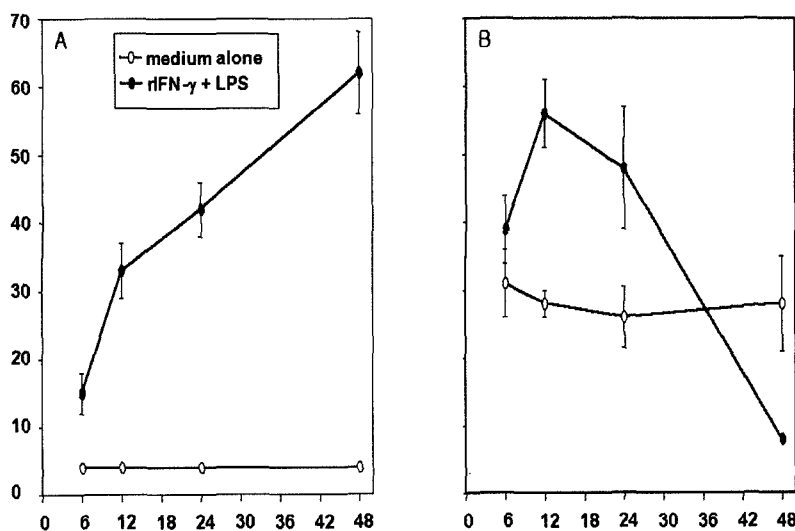


Fig. 9. Time course of NO and superoxide productions by murine peritoneal macrophages during activation. The cells (2×10^6 cells/dish) were incubated either in medium alone or in medium containing 5 U/ml rIFN-γ and 10 ng/ml LPS at 37°C for 6, 12, 24 and 48 hrs. The supernatants were collected for determination of nitrite content (A). The cells were then washed and harvested for determination of PMA-induced superoxide formation (B). The results are means \pm SE for triplicates. Where error bars are not shown, they are fall within the symbol. (A) Time course of NO generation. (B) Time course of superoxide formation.

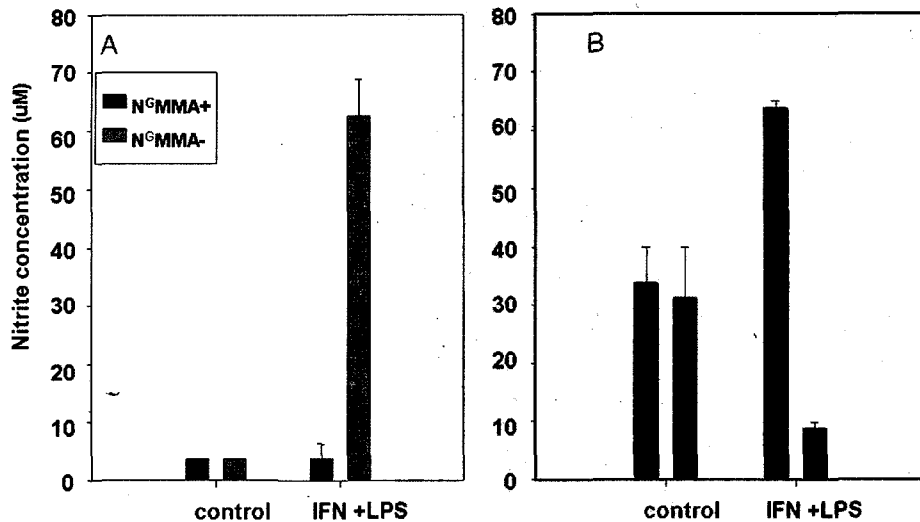


Fig. 10. Effects of N^GMMA on the production of NO and superoxide. TG-elicited peritoneal macrophages (2×10^6 cells/dish) were incubated with 5 U/ml rIFN- γ plus 10 ng/ml LPS in the presence or absence of 1 mM N^GMMA at 37°C for 48 hrs. NO was measured by method by Griess (A) and superoxide formation was determined by Chemiluminescence assay (B). The results are the means \pm SE for triplicates. Where error bars are not shown, they are fall within the symbol.

과 같다. 배양 6시간 후 nitrite 양의 변화는 없었지만 superoxide의 양은 대조군에 비해 약간의 증가를 보였고 12시간이 경과한 후에는 NO와 superoxide가 모두 증가하였다. 12시간이 지난 후에는 NO는 계속 증가한 반면 superoxide는 신속히 감소하였다(Fig. 9). 이러한 현상은 NO에 의하여 superoxide의 생성이 억제된 것으로 보인다.

따라서 48시간 후 superoxide의 생성 억제가 NO에 의한 효과인지를 알아보기 위하여 IFN- γ 혹은 LPS를 처리한 세포에 NOS 억제제인 N^GMMA를 첨가하여 세포는 활성화시키고 NO 생성을 억제한 조건을 만들어 준 결과 48시간 후에도 superoxide는 증가함을 보였다(Fig. 10). 이 결과는 배양 초기와는 달리 배양 48시간대에는 과량으로 생성된 NO에 의하여 대식세포의 ROI 생성능이 억제 받고 있음을 보여준다.

2) nitric oxide가 마우스 대식세포의 superoxide 생성에 미치는 영향

대식 세포의 활성화에 따른 superoxide의 형성 억제가 NO 단일 인자에 의한 것인지를 알아보기 위하여 *in vitro*에서 NO 형성 물질인 sodium nitroprusside(SNP)를 농도별로 처리한 결과 농도 의존

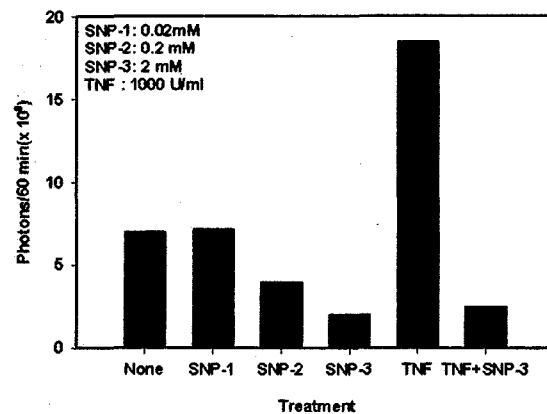


Fig. 11. Effect of SNP on the superoxide formation by murine peritoneal macrophages. TG-elicited peritoneal macrophages (1×10^6 cells/dish) were incubated with the various concentrations of SNP and or TNF- α at 37°C for 6 hrs. The cells were then collected and incubated in luminometer for determination of PMA-induced superoxide formation. Representative results of at least three similar experiments are shown.

적으로 superoxide가 억제(Fig. 11)된 것으로 보여 대식 세포의 priming agent인 TNF- α 에 의하여 증

가된 superoxide도 SNP에 의해 감소됨을 확인하였다.

3) Nitric oxide가 대식 세포내 cytosolic protein의 ADP-ribosylation에 미치는 영향

마우스 대식 세포 내에서 형성된 NO가 세포 단백질을 ADP-ribosylation 시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 NO 생성 촉진 물질인 SNP를 0.2 mM로 반응 후 전기 영동하였다. 약 37 KD protein이 ADP-ribosylation 정도가 대조군에 비해 강하게 나타났다.

4) TG로 처리된 마우스 복강 대식 세포의 superoxide 형성에 3-aminobenzamide (3-ABA)가 미치는 영향

NO의 각종 기능 중 어떠한 작용이 ROI 생성을 억제하는지에 대한 기전을 알아보았다. 배양 세포에 ADP-ribosyltransferase inhibitor인 3-amino benzamide (3-ABA)와 SNP를 하고 PMA로 자극하여 형성되는 superoxide를 측정 한 결과 2.5 mM 3-ABA에서 superoxide가 증가되었고 NO에 의하여 억제된 superoxide의 형성도 부분적으로 회복되었다 (Table 3).

5) 3-aminobenzamide (3-ABA)가 BCG로 접종된 마우스 복강 대식 세포의 superoxide 생성에 미치는 영향

BCG에 의해 활성화되어 NO를 형성하고 있는

상태인 세포에 3-ABA의 효과를 측정하기 위해 대식 세포를 6시간 동안 배양하면서 3-ABA를 처리했을 때 resting 상태보다 높은 superoxide 생성을 보였다 (Table 3).

결론

숙주의 면역 반응에 중요한 역할을 하는 대식 세포는 IFN 또는 LPS와 같은 물질에 의해 활성화되어 nitric oxide (NO)를 형성한다. 이는 숙주 방어의 증진, 신경 전달, 혈관 확장 등에 관여하며, 세포 내에서 낮은 농도로써 숙주 세포의 보호 및 조절 기능을 갖기 때문에 정교하게 조절되어야 한다. 본 연구에서는 nitric oxide (NO)의 합성 시 1) 신호 경로, 2) TGF-β의 역할 3) superoxide생성 시 NO의 효과를 알아보았다.

1) 대식 세포의 iNOS 발현 기전과 NO 생성에 관한 신호 전달 체계

지금까지의 보고에 의하면 rat 복강 대식 세포, hepatocyte 및 Raw 264.7 등의 세포에서는 PMA 단독으로 PKC를 활성화 시킴으로써 iNOS를 유도할 수 있다고 보고되었다. 그러나 이러한 세포들은 공통적인 특성은 NO를 형성하기 위하여 IFN-γ나 LPS 단독으로 완전히 자극될 수 있다는 것이다. 대식 세포의 활성화는 세포 자체의 특성에 의존할 수 있다. 마우스의 복강 대식 세포와 J774는 LPS단독 자극은 반응성이 매우 낮으며, LPS에 IFN-γ의 자극이 더해져야 비로소 완전한 활성화가 일어나기 때문에 LPS에 IFN-γ에 의한 iNOS 발현의 분자적 기전을 밝히기가 더욱 용이하다. 본 연구에서 NOS를 발현하는 세포들 사이의 차이를 밝히며 iNOS 발현 기전을 이해하기 위하여 C57BL/6에서 얻은 복강 대식 세포를 사용하였으며 여러 가지 세포 내 신호 전달 물질을 자극할 수 있는 물질을 이용하여 NOS를 유도시키는데 요구되는 조건들에 관하여 연구를 수행하였다.

첫째, PMA는 단독으로 NO 합성에 관여하지는 않지만 rIFN-γ은 단독으로 NO 생성에 관여한다. 또한 PMA와 rIFN-γ의 협조 작용에 의한 NO 발생 정도와 iNOS mRNA의 양과는 상호 연관 관계를 가지고 있으며 NO 생성에 가장 효과적일 시간은 rIFN-γ 처리 6시간 후 PMA를 처리하였을 때

Table 3. Effect of 3-ABA on the production of superoxide by murine peritoneal macrophages

Cells	Photons/60 min (× 10 ⁶)	
	3-ABA (-)	3-ABA (+)
TG-elicited Macrophages	0.72±0.08	0.87±0.10
TG-elicited Macrophages + SNP (2 mM)	0.24±0.05	0.35±0.06
BCG-injected Macrophages	2.50±0.23	4.42±0.20
BCG-injected Macrophage + SNP (2 mM)	1.01±0.10	2.10±0.31

TG-elicited or BCG-injected peritoneal macrophages (1 × 10⁶ cells/dish) were incubated with 2 mM SNP in the presence or absence of 2.5 mM.

3-ABA at 37°C for 6 hrs. The cells were then collected and incubated in luminometer for determination of PMA-induced superoxide formation.

The results are means ± SE of four triplicates.

였으며 NO 생성을 유도할 수 있는 PMA의 농도는 PKC 활성화에 적합한 농도임을 알 수 있었다.

둘째, PMA를 전 처리하여 배양하는 경우에는 장시간 PMA를 처리하는 경우 오히려 세포의 PKC를 고갈시키기 때문에 rIFN- γ 와 PMA와 협조 상승 작용이 일어나지 않았다. 만일 PKC가 rIFN- γ 의 자극에 의해 대식 세포에서 만들어지는 NOS의 유도에 직접 관계한다면 PKC 활성화의 억제 는 rIFN- γ 에 의한 NO 생성량에 영향을 주어야 하지만 PMA를 전 처리한 세포는 rIFN- γ 의 단독 처리에 의하여 유도된 NO 생성에는 영향을 주지 않고 단지 rIFN- γ 와 PMA의 협조 상승작용에만 영향을 준다.

셋째, BCG를 주사한 마우스의 대식세포에서 PMA 단독으로도 NO가 생성됨을 알 수 있었다. 대식 세포는 불활성 상태에서 활성 상태로의 다단계 과정을 거쳐 활성화되고, 완전하게 활성화된 상태의 대식 세포는 다양한 병원균이나 암세포를 죽일 수 있다. BCG를 주사한 마우스의 대식세포는 감염 과정에서 활성화되어 NO 생성의 협조 상승 작용 유도를 가능하게 한다.

넷째, STSN 이나 polymyxin B는 rIFN- γ 자극에 의해 유도되는 NO 생성을 억제하지 못하지만, 이는 rIFN- γ 와 PMA로 자극하여 유도되는 NO 생성량 증가에 있어서는 PMA의 활성을 감소시켰다. rIFN- γ 와 PMA협조 상승에 의한 NO 생성 증가는 LPS와 비슷한 양상을 띠지만 LPS와는 달리 PMA는 배양 초기에는 NO 생성 유도가 느리고, 후기에는 NO 생성 유도가 빠르게 일어났다. 따라서 LPS와 PMA간의 분자적 기전은 차이점이 있는 것으로 사료된다.

PKC의 활성화는 primary astrocytes나 Raw cell에서 TNF, IFN- α , IFN- β , IL-2 등을 암호화하는 mRNA의 안정도와 관련이 있음이 보고되어지고 있기 때문에,^{18), 19)} 본 연구에서 세포를 rIFN- γ 로 자극 후 mRNA 합성 억제제인 actinomycin D를 단독으로 처리하거나 PMA와 함께 처리한 세포에서 더 많은 NO가 생성됨을 보아 PKC 활성화에 의해 유도된 신호는 rIFN- γ 를 처리하여 이미 발현된 NOS mRNA의 안정도를 높이는 것으로 생각된다.

결론적으로, PMA는 rIFN- γ 에 의해 유도된 대식 세포 활성화의 modulator로써 작용함을 알 수 있

었으며, iNOS mRNA의 유도나 안정화의 관계는 대식 세포 활성화 유도에 매우 중요한 것으로 사료된다.

2) TGF- β 에 대한 antisense ODNs가 IFN- γ 에 의해 유도되는 NO 생성에 미치는 영향

Antisense ODNs의 조절로 인하여 유도되는 iNOS mRNA에 상보적인 antisense를 부착시킴으로써 발현체를 억제하는 것은 특이적인 유전자 발현 과정이 차단되므로 본 연구에서는 대식 세포의 활성화 기간동안 TGF- β 유전자 발현의 자가 조절 기작을 밝히는데 antisense DNA 기술을 사용하였다. 그 결과 첫째, 복강 대식 세포에서 TGF- β mRNA에 상보적인 antisense ODN은 TGF- β 의 발현을 억제하고 IFN- γ 로 유도되는 NO 생성을 현저하게 증가시켰다. 둘째, 대식 세포는 반응성이 크고 잠정적으로 독성을 갖는 라디칼인 NO의 생성시 자가 조절 기작을 갖고 있다. 셋째, antisense ODNs는 빠른 시간 내에 세포내에 유입되고 phosphorothiolation 할 때 상대적인 안정성을 유지하고 있으므로 생체 내에서 치료적 대상으로서 antisense 치료법의 적용 가능성을 시사하고 있다.

TGF- β 해독 개시 부위가 표적이 되는 TGF- β antisense ODN이 대식 세포에서 TGF- β mRNA 단계를 상당히 감소시키는 것을 보여준 반면, sense ODN은 IFN- γ 에 의해 유도된 NO 생성에 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 대식 세포는 활성화 과정 중 TNF- α 나 TGF- β 와 같은 사이토카인을 분비하여 NO 생성을 조절함으로써 스스로 NO에 의한 손상에 대하여 보호하고 있음을 시사할 수 있다.

또한 IFN- γ 단독으로도 대식 세포를 활성화시킬 수 있었다. 이는 IFN- γ 에 의하여 생성되어지는 TGF- β 의 발현 및 분비 때문에 NO의 생성이 억제되고 있으므로 antisense를 이용하여 iNOS 유전자를 불활성화 시키는 TGF- β 유전자의 하향 조절에 의해 대식세포에서 IFN- γ 에 의해 유도되는 NO 생성을 현저하게 증가시킬 수 있음을 뜻한다. 이 결과는 antisense ODN이 iNOS와 같은 특별한 유전자 산물에 대한 길항제로써 사용될 수 있으며 특별한 유전자 발현에 대한 길항 물질로서의 역할을 할 수 있는 특징을 지니고 있음을 시사한다.

3) NO의 생성이 대식 세포 및 사람의 호중구의 ROI 생성에 미치는 영향

동일한 세포에서 NO에 의해 유도되는 superoxide생성의 저해는 다음과 같은 실험을 통해 뒷받침될 수 있다. 첫째, PBS로 세포를 세척하여 NO를 완전히 제거하고 superoxide를 측정하였다. 둘째, 배양 초기에 NO의 합성이 증가시에도 superoxide의 생성이 일시적으로는 증가라는 양상을 보였다. 셋째, superoxide를 측정시 NGMMA를 넣어 주어도 IFN- γ 와 LPS로 자극된 세포가 만들어 내는 superoxide의 양의 차이는 없었다. 이것은 생성되어지는 superoxide가 본 실험의 조건에서는 peroxynitrite를 만들지 않고 있음을 알 수 있다.

이상의 결과에서 대식 세포가 적당히 자극을 받았을 때 superoxide와 NO를 모두 생성하지만, NO의 생성은 동일한 세포에서 superoxide 생성을 저해하고 있음을 보여준다.

또 최근 NO는 사람의 혈소판과 rat의 중성구에서 37 KD의 세포질 단백질을 비가역적으로 ADP-ribosylation시키고 있음이 보고되어져 있지만 이 현상의 생리적 중요성을 알려져 있지 않다.^{20), 21)} 본 연구에서는 ADP-ribosylation의 저해제인 3-ABA는 휴지 상태의 대식 세포와 흥분 상태의 대식 세포에 NO를 처리하여 저해된 superoxide의 형성을 부분적으로 회복시켰다. 3-ABA는 NO를 처리한 대식 세포 뿐만 아니라 중성구에서도 superoxide의 생성을 증가시키고 있음을 보였다. 따라서 NO는 혈관을 확장시키는 것 이외에도 superoxide의 형성을 억제하기 때문에 조직 손상을 줄이는데 이용할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Furchgott, RF., and Vanhoutte, PM. 1989. Endothelium derived relaxing and contractor factors. *FASEB* 3: 2007
2. Nathan CF. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB* 6: 3051
3. Lowenstein CJ., Dinerman, JL., Snyder, SH. 1994. Nitric oxide, a physiologic messenger. *Ann Intern. Med.* 120: 227.
4. Narumi, S., Finke, JH., and Hamilton, TA. 1990. Interferon- γ and IL-2 synergize to induce selective monokine expression in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 265: 7036.
5. Ignarro, LJ. 1989. Endothelium-derived nitric oxide pathway: actions and properties. *FASEB* 3: 31.
6. Severn, A., Wakelam, MJO., and Liew, FR. 1992. The role of protein kinase C in the induction of nitric oxide synthesis by murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 997.
7. Hoterano, S., Genaro, AM., and Bosca, L. 1993. Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophage. *FEBS Lett.* 320: 135
8. Hoterano, S., Genaro, AM., and Bosca, L. 1992. Phorbol esters induce nitric oxide synthase activity in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 24937.
9. Tiao G, Rafferty J, Ogle C, Fisher JE, and Hasselgern PO. 1994. Differential effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumors necrosis factor and interleukin-6. *Surgery* 116: 332.
10. Derynck, R., Jarret, JA., Chen, EA. 1985. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701.
11. Assolan RK., Komority, A., Meyers, CA., Miller, DM., and Sporn, MB. 1983. Transforming growth factor- β in human platelets: identification of a major storage site, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 258: 7155.
12. Kejrl JH/, Wakefield, LM., Roberts, AB. 1986. Production of transforming growth factors- β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163: 1037.
13. Xie, QW., Cho, HJ., Calayycay, J., Mumford, RA., Swiderek, KM., Lee, TD., Ding, A., Troso, T., and Nahan, CF. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:
14. Lyons, RC., Orlogg, GL., and Cunningham, JM. 1992. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Bio. Chem.* 267: 6370.
15. Chirgwin, JM., Prtzbyla, RJ., MacDonald, RJ., and Rutter, WH. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18: 5294.
16. Potter, CD., Parkar, MH., Collins, MKL., Levinsky, RJ., and Kinnon, C. 1992. Superoxide production by normal and chronic granulatous disease (CGD) patient-derived EBV-transformed B-cell lines measures by chemilu-

- minescence-based assays. *J. Immunol. Methods*. 155: 151.
17. Ribeiro-Meto, FAP., Mattera, A., Hildebrandt, JD., Codina, J., Field, J B., Birnbaumer, L., and Sekura, R D. 1985. ADP-ribosylation of membrane components by pertussis and cholera toxin. *Methods Enzymol.* 109: 566.
18. Lieberman, AP., Pitha, PM., and Shin, ML. 1990. Protein kinase regulate TNF mRNA stability in virus-stimulated astrocytes. *J. Exp.Med.* 172: 989.
19. Lieberman, AP., Pitha, PM., and Shin, ML. 1991. Poly (A) removal is the kinase-regulated step in TNF mRNA decay. *J. Biol. Chem.* 267: 2123.
20. Brune, B., and Lapetina, EG. 1989. Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J. Biol. Chem.* 264: 8455.
21. Vedia, LM., McDonald, B., Brune B., Silvio, MD., Billiar, JR., Lapetina, EG. 1992. Nitric oxide-induced S-nitrosylation of gluceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzyme activity and increase endogenous ADP-ribosylation, *J. Biol. Chem.* 267: 4929.