

패혈성 쇼크에서 간의 유황함유 아미노산 대사

강건욱 · 김상겸*#

조선대학교 약학대학, *충남대학교 약학대학, 충남대학교 형질전환 복제돼지 센터
(Received July 4, 2007; Revised July 31, 2007)

Hepatic Metabolism of Sulfur Amino Acids During Septic Shock

Keon Wook Kang and Sang Kyum Kim*#

College of Pharmacy Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

*College of Pharmacy and Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

Abstract — It has been reported that sulfur-containing intermediates or products in the transsulfuration pathway including S-adenosylmethionine, 5'-methylthioadenosine, glutathione and taurine can prevent liver injury mediated by inflammation response induced by lipopolysaccharide (LPS) treatment. The present study examines the modulation of hepatic metabolism of sulfur amino acid in a model of acute sepsis induced by LPS treatment (5 mg/kg, iv). Serum TNF-alpha and hepatotoxic parameters were significantly increased in rats treated with LPS, indicating that LPS results in sepsis at the doses used in this study. LPS also induced oxidative stress determined by increases in malondialdehyde levels and decreases in total oxy-radical scavenging capacities. Hepatic methionine and glutathione concentrations were decreased, but S-adenosylhomocysteine, cystathionine, cysteine, hypotaurine and taurine concentrations were increased. Hepatic protein expression of methionine adenosyltransferase, cystathionine beta-synthase and cysteine dioxygenase were induced, but gamma-glutamyl-cysteine ligase catalytic subunit levels were decreased. The results show that sepsis activates transsulfuration pathway from methionine to cysteine, suggesting an increased requirement for methionine during sepsis.

Keywords □ sepsis, lipopolysaccharide, sulfur amino acid, hepatic metabolism, transsulfuration

간은 패혈성 쇼크의 주요 표적 장기 중 하나로 병변은 그람 음성 박테리아의 외벽에 존재하는 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 촉발된다.¹⁾ LPS의 투여에 의해 간은 다양한 염증 매개성 cytokine, 활성산소종과 단백질 분해효소에 노출된다. 특히, 간에 정착한 macrophage인 Kupffer cell의 활성화는 이 과정에서 중추적인 역할을 수행한다.²⁾ TNF-alpha는 대표적인 염증매개성 cytokine으로 LPS의 노출에 의해 폭발적으로 증가하며 항체를 이용한 TNF-alpha의 중화는 LPS에 의한 간독성을 현격하게 억제한다.³⁾ 최근 S-adenosylmethionine(SAM), 5'-methylthioadenosine, taurine과 betaine과 같은 유황함유 아미노산의 대사체가 LPS나 TNF-alpha에 의한 간독성을 억제하는 것으로 보고되었다.⁴⁻⁶⁾ SAM은 methionine으로부터 methionine adenosyltransferase(MAT)에 의해, 5'-methylthioadenosine은 SAM으로부터 polyamine 합

성과정에서 생성된다. 그리고 taurine은 유황함유 아미노산 대사 과정의 최종 배설형이며 betaine은 choline의 산화성 대사체로서 homocysteine의 remethylation에 필요한 methyl 기의 공여체로 methionine의 재생 반응에 참여한다.⁷⁾ 이상의 결과들은 패혈성 쇼크에서 유황함유 아미노산의 대사체가 염증반응의 조절에 관여할 가능성을 보여준다.⁸⁾

패혈증에서 대사의 교란은 몸무게의 감소, acute-phase protein의 발현, 근육 단백질의 소모와 negative nitrogen 평형으로 특징된다. Negative nitrogen 평형은 단순한 음식섭취의 감소 이상으로 발생하여 특정 아미노산의 필요량이 증가할 가능성을 시사한다.⁹⁾ 특히 패혈증에서 유황함유 아미노산의 대사변화에 관한 연구가 염증반응의 조절과 관련하여 주목을 받고 있다. 랫트에 *Escherichia coli*를 정맥주사하여 발생시킨 패혈증에서 methionine의 황을 ³⁵S로 표시하여 투여하였을 경우 methionine으로부터 cysteine으로의 transsulfuration이 증가하는 것으로 관찰되었으나 간에서 cystathionine gamma-lyase의 활성은 오히려 감소하였다.¹⁰⁾ 또한 동일한 실험조건에서 cysteine의 황을 ³⁵S로 표시

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로.
(전화) 042-821-5930 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) sangkim@cnu.ac.kr

하여 투여하고 동위원소의 분포를 이온교환 크로마토그래피로 분리하고 방사능을 측정하는 연구에서 간의 taurine 합성이 증가하고 반면 inorganic sulfate의 생성이 감소하는 것으로 관찰되었다.⁹⁾ 이상의 결과는 폐혈증에서 유험함유 아미노산의 대사가 변동됨을 시사한다. 그러나 현재까지 유험함유 아미노산의 전체적인 대사체 분석이나 관련 효소의 발현 변화를 평가한 논문은 전무하다.

본 연구에서는 LPS에 의해 유도된 폐혈증에서 간의 유험함유 아미노산 대사를 평가하기 위해 methionine, SAM, S-adenosylhomocysteine(SAH), cystathionine, cysteine, GSH, hypotaurine 및 taurine의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 또한 유험함유 아미노산 대사를 매개하는 MAT, cystathionine beta-synthase (C β S), cysteine dioxygenase(CDO) 및 gamma-glutamylcysteine ligase catalytic subunit(GCLC)의 단백질 발현 변화를 평가하였다.

실험 방법

실험동물 및 투여방법

대한 실험동물에서 구입한 몸무게가 230~280 g의 웅성 Sprague-Dawley 랫트에 LPS(*Escherichia coli*, serotype 0128 : B12)을 5 mg/kg 용량으로 pyrogen-free saline에 녹여 꼬리에 정맥주사하였다. 대조군은 동일한 부피의 pyrogen-free saline을 투여하였다.

시약

LPS, SAM, SAH, cystathionine, hypotaurine, amino acid 표준품, taurine, NADPH, glutathione(GSH), 2-mercaptoethanol, ninhydrin과 O-phthalaldehyde는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 외에 분석에 필요한 모든 시약은 reagent grade 또는 그 이상의 품질이었다.

Assays

유험함유 아미노산 및 대사체 측정을 위하여 LPS를 투여하고 10시간 후에 랫트를 ether로 마취를 시키고 복대동맥에서 전혈을 취하고 간을 절취하였다. 간을 ice-cold 1 M perchloric acid 또는 1.15% KCl 용액에서 분쇄하였다. SAM, SAH, GSH와 cysteine은 perchloric acid를 처리하고 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였으며 기타 아미노산은 1.15% KCl 조직분쇄액을 methanol로 재단백하고 원심분리하여 얻은 상등액을 시료로 사용하였다. 자세한 분석 방법은 이전 보고를 따랐다.^{11,12)}

Cysteine의 함량을 측정하기 위해 시료를 10분간 100°C에서 100 μ l의 산성 ninhydrin 용액, 100 μ l의 acetic acid와 100 μ l의 시료를 반응시킨 후 즉시 얼음물로 식혔다. 95%의 ethanol 0.67 ml를 가하여 안정화시키고 20~30분 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

GSH의 함량은 GSH reductase를 이용한 enzyme recycling 방법을 사용하였다. Eppendorf tubes에 0.3 mM NADPH 용액 0.7 ml, 6 mM DTNB(5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) 용액 0.1 ml, 검체 또는 GSH 표준액 0.2 ml를 가하여 잘 섞은 후 상온에서 4분간 방치하였다. 반응액에 12 units/ml 농도의 GSH reductase를 가하고 잘 섞은 후 412 nm에서 약 2분간 흡광도의 변화를 측정하여 linear한 1분간의 기울기 변화를 구하고 검량선으로부터 GSH의 농도를 계산하였다.

SAM과 SAH은 1-heptanesulfonic acid sodium salt를 사용하여 ion pairing시키고 역상 column(3.5 μ m Symmetry C18 column; Waters, Milford, MA, USA)과 UV 검출기(UV-975 UV/VIS detector, Jasco Co., Tokyo, Japan)를 장착한 HPLC system에서 분리 및 정량하였다. 이동상은 18% methanol을 함유한 40 mM NH₄H₂PO₄와 8 mM 1-heptanesulfonic acid sodium salt의 용액을 사용하였으며 column oven을 이용하여 35°C에서 분석하였다.

아미노산, taurine, hypotaurine 및 cystathionine의 정량을 위해 O-phthalaldehyde를 이용하여 유도체화하고 역상 column (3.5 μ m Symmetry C18 column; Waters, Milford, MA, USA)과 fluorometric 검출기(RF-10A fluorescence detector, Shimadze, Tokyo, Japan)를 장착한 HPLC를 사용하였다. 0.1 M sodium acetic acid(pH=7.2)와 3%(v/v)의 tetrahydrofuran을 함유한 methanol을 이동상으로 사용하였으며 농도구배를 주기위해 2개의 pump(model LC-10AT, Shimadze, Tokyo, Japan)를 이용하였다.

혈청에서 간독성 지표를 측정하기 위해 LPS를 처리하고 6시간 후 혈액을 얻고 원심분리하여 혈청을 분리하였다. Alanine aminotransferase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST) 활성을 측정하기 위해 시험관에 ALT 또는 AST 기질액(α -ketoglutarate 2 mmole/l and aspartate 200 mmole/l, α -ketoglutarate 2 mmole/l and alanine 200 mmole/l) 0.5 ml, serum 0.1 ml를 가하고 37°C에서 ALT는 30분, AST는 1시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 즉시 발색액(2,4-dinitrophenyl hydrazine, 1 mmole/l)을 0.5 ml씩 가하고 실온에서 20분간 방치한 후 0.4 N NaOH 5 ml를 가하여 증류수를 대조액으로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Pyruvate를 동일한 방법으로 발색시킨 표준검량선으로부터 활성을 구하였다. 혈액 중 total bilirubin 함량은 bilirubin이 diazo 시약과 결합하여 생성되는 azobilirubin의 흡광도를 구하여 정량하였다. Bilirubin 발색액에 diazo 시약을 가하고 혈청 0.2 ml를 첨가하여 20분간 실온에서 방치시킨 후 535 nm에서 흡광도를 구한다. Diazo 시약을 가하지 않은 시료를 맹점으로 사용하였다.

TNF-alpha를 측정하기 위해 LPS를 처리하고 1.5시간 후에 혈액을 취하고 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청에서 TNF-alpha

농도는 ELISA kit(Endogen Inc., Woburn, MA, USA)를 사용하였다.

지질과산화물을 평가하기 위해 LPS를 처리하고 10시간 후 동물을 diethyl ether로 마취시키고 복강을 절개하여 적출된 간에 3배 용량의 1.15% KCl을 가하여 분쇄한 후 분쇄액으로부터 lipid peroxidation 의 최종생성물인 malondialdehyde의 함량을 측정하였다. Thiobarbituric acid와 malondialdehyde 를 100°C에서 40분간 반응시켜 유도체를 만든 후 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 상등액을 역상 column(3.5 µm Symmetry C18 column; Waters, Milford, MA, USA)과 fluorometric 검출기(RF-10A fluorescence detector, Shimadze, Tokyo, Japan)가 장착된 HPLC에서 분리 정량하였다.¹³⁾

간 시료에서 전체적인 oxy-radical에 대한 포획능을 평가하기 위해 total oxyradical scavenging capacity(TOSC) assay를 수행하였다. LPS를 처리하고 10시간 후 복대동맥에서 전혈을 취하고 간을 절취하였다. 간의 cytosol fraction과 혈청을 200배로 희석시킨 후 시료로 사용하였다. Peroxy radical은 2,2'-azobisamidinopropane(ABAP)을 35°C에서 thermal homolysis시켜 발생시켰다. Hydroxy radical은 Fe와 ascorbate를 이용한 Fenton reaction으로, peroxy nitrite는 SIN-1의 자발적 붕괴를 통해 발생시켰다. 발생한 각각의 reactive oxygen species는 alpha-keto-gamma-methiolbutyric acid(KMBA)와 반응하여 ethylene을 발생하며 이때의 TOSC 값은 일정범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고된 바 있다. 반응은 최종 volume 1 ml의 반응액을 rubber septum으로 밀폐된 10 ml 용기에 넣어 진행시켰다. Ethylene 생성의 측정은 반응용기의 head space 공기 0.2 ml를 취하여 gas chromatography로 분석하였다. Flame ionization detector(FID)와 30 m의 capillary SPB-1 컬럼(Supelco)를 장착한 Hewlett-Packard(Series II 5890) gas chromatograph를 사용하였으며 이 때 oven과 injector, FID의 온도는 각각 60°C, 180°C, 180°C로 설정하고 이동상인 helium gas는 30 ml/min의 속도를 유지하였다. 실험결과는 실험측정치로부터 구한 그래프를 적분하여 area under the kinetic curve(AUC)를 얻고 TOSC는 아래의 식으로부터 산출할 수 있다.

$$TOSC = 100 - (\int SA / \int CA \times 100)$$

where $\int SA$ =integrated area from the curve of the sample reaction

$\int CA$ =integrated area from the curve of the control reaction

따라서 oxyradical scavenging capacity를 전혀 갖지 못하는 샘플의 경우에는 $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며 TOSC=0의 값을 갖는다. 반대로 $\int SA \rightarrow 0$ 일 때는 TOSC 값은 100에 접근한다. 이 값은

대조동물에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로는 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

Immunoblot 분석을 15 µg의 단백질을 loading buffer에 희석시킨 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane(Bio-Rad, Inc., Hercules, CA)로 이동시켰다. 단백질이 결합된 nitrocellulose membrane을 2시간 동안 5% non-fat milk powder를 함유하는 phosphate-buffered saline(pH 7.4)에서 반응시키고 각각의 일차 항체를 가한 후 상온에서 16시간 동안 반응시켰다. 일차 항체가 결합된 nitrocellulose membrane을 3시간 동안 horseradish peroxidase 포함되어 있는 이차 항체와 반응시키고 enhanced chemiluminescence 시약과 Kodak X-OMAT film(Sigma-Aldrich)을 이용하여 단백질을 검출하였다. 검출된 단백질을 정량하기 Molecular Dynamics scanning laser densitometer와 ImageQuant analysis program(Amersham Biosciences, Inc.)을 사용하였다.

통계처리

실험군 사이의 통계적 차이는 Student's *t*-test로 검사하였다. 모든 실험결과는 평균±표준오차로 표시하였다.

실험결과 및 고찰

실험에 사용한 LPS의 간독성을 평가하기 위해 LPS(5 mg/kg, iv)을 처리하고 6시간 후에 혈청에서 간독성 지표인 ALT와 AST의 활성 및 total bilirubin함량을 측정하였다(Table I). LPS의 처리는 ALT의 활성을 정상대조군에 비하여 약 17배, AST의 활성을 약 6배 그리고 total bilirubin의 함량을 약 11배 증가시켰다. 이 결과는 본 실험에 사용한 LPS가 매우 신속하고 강력한 간독성을 유발함을 보인다. 혈청에서 염증반응의 대표적인 매개체인 TNF-alpha의 농도는 LPS 처리 후 1.5시간에 현격히 증가하였으며 정상 동물에서는 검출감도이하로 측정되었다. 따라서 이 결과는 LPS가 염증을 매개로한 강력한 간독성 물질임을 시사한다.

염증반응에 의한 조직 손상은 다양한 인자의 복합적인 결과이다. 특히 산화적 손상이 세포독성의 중요한 매개자로 보고되고

Table I – LPS-induced hepatotoxicity in rats

	Control	LPS
ALT (units/serum ml)	37.7±1.9	659.2±163.9***
AST (units/serum ml)	83.6±2.5	485.4±57.2**
Total bilirubin (mg/serum dl)	0.18±0.01	1.93±0.15***
TNF-alpha (ng/serum ml)	0.01±0.01	20.9±0.66***

Blood was sampled 1.5 or 6 h after LPS treatment (5 mg/kg, iv) for determination of serum TNF-alpha or hepatotoxicity parameters (ALT, AST and total bilirubin), respectively. Each value represents the mean±S.E.M. for 8 rats.

***Significantly different from control (Student's *t*-test, P< 0.01 or 0.001, respectively).

Table II - Oxidative stress in septic rats

	Hepatic cytosol		Serum	
	Control	LPS	Control	LPS
Malondialdehyde (nmol/g liver or ml serum)	5.2±0.3	15.0±1.5***	0.2±0.1	0.5±0.1**
TOSC against hydroxyl radical (TOSC/mg protein)	925±51	732±46*	131±5	100±8**
TOSC against peroxy radical (TOSC/mg protein)	691±25	443±31***	202±7	127±5***
TOSC against peroxynitrite (TOSC/mg protein)	829±41	598±52**	153±6	67±3***

Rats were sacrificed 10 h after LPS treatment (5 mg/kg, iv). Each value represents the mean±S.E.M. for more than 4 rats.

*, **, ***Significantly different from control (Student's *t*-test, $P < 0.05$, $P < 0.01$ or 0.001 , respectively).

있다.¹⁴⁾ LPS에 의한 산화적 스트레스를 평가하기 위하여 간과 혈청에서 지질과산화에 의한 생성물인 malondialdehyde의 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였다(Table II). LPS의 처리는 간에서 malondialdehyde의 농도를 5.2±0.3 nmol/g liver에서 15.0±1.5 nmol/g liver로 현격히 증가시켰다. 본 실험결과는 LPS의 처리가 간에서 산화적 스트레스에 의한 지질과산화를 증가시킴을 시사한다. LPS에 의한 과도 염증반응에서 조직의 총 항산화 활성을 평가하기 위해 TOSC assay를 수행하였다(Table II). LPS의 처리는 간의 cytosol에서 hydroxyl radical, peroxy radical 및 peroxynitrite에 대한 TOSC 값을 각각 정상대조군의 79, 64 및 72%로 감소시켜 간에서 이들 oxy-radical에 대한 항산화 활성이 LPS에 의해 감소되었음을 확인하였다. 혈청에서도 hydroxyl radical, peroxy radical 및 peroxynitrite에 대한 TOSC 값은 정상대조군의 76, 63 및 44%로 감소하였다. LPS는 간에 비하여 혈청에서 peroxynitrite에 대한 TOSC 값을 현격하게 감소시켰다.

LPS를 처리하고 10시간 후에 간에서 유허합유 아미노산 및 대사체의 함량을 측정하였다(Table III). LPS의 처리는 몸무게에 대한 상대적인 간무게를 3.66±0.07%에서 2.99±0.06%로 감소시켰다 (Student's *t*-test, $P < 0.001$). LPS의 처리는 SAM을 제외한 측정된 모든 지표에 유의적인 변화를 유발하였다. Methionine의 함량은 유의적으로 감소하였으나 반면 SAH, cystathionine, cysteine, hypotaurine과 taurine의 함량은 증가하였다. 특히

Table III - Changes in hepatic levels of major sulfur amino acid metabolites in LPS-treated rats

	Control	LPS
Methionine (nmole/g)	60.8±3.1	45.2±1.5***
S-Adenosylmethionine (nmole/g)	99.4±2.0	109.3±4.8
S-Adenosylhomocysteine (nmole/g)	22.5±0.4	36.9±2.1***
SAM/SAH (%)	4.32±0.16	3.00±0.15***
Cystathionine (nmole/g)	6.0±0.2	11.8±1.1***
Cysteine (nmole/g)	97.1±2.2	118.9±5.5**
GSH (μmole/g)	7.23±0.10	4.80±0.09***
Hypotaurine (nmole/g)	125.5±12.4	942.9±136.8***
Taurine (μmole/g)	2.18±0.27	6.05±0.22***

Rats were sacrificed 10 h after LPS treatment (5 mg/kg, iv). Each value represents the mean±S.E.M. for 8 rats.

*, **, ***Significantly different from control (Student's *t*-test, $P < 0.01$ or 0.001 , respectively).

hypotaurine과 taurine의 증가가 가장 현격하였다. 결과적으로 세포에서 methylation 반응 능력의 지표인 SAM/SAH의 비율을 유의적으로 감소하였다. 체내의 대표적인 항산화 물질인 GSH의 함량은 LPS의 처리에 의하여 감소하였다. 이 결과는 methionine으로부터 cysteine으로의 전환이 LPS 처리에 의해 활성화될 가능성을 시사한다. 첨가적으로 간에서 proline을 제외한 나머지 단백질 구성 아미노산의 함량을 측정하였다(Table IV). 측정된 아미노산 중에서 aspartate, glutamate, glycine 그리고 arginine의 함량은 증가하였으며 나머지 아미노산의 함량에는 유의적인 변화가 없었다. 이 결과는 폐혈증에서 GSH의 감소가 GSH를 구성하는 cysteine, glutamate 및 glycine의 감소와는 무관함을 시사한다.

유허합유 아미노산의 대사에 관여하는 핵심 효소인 MAT, CBS, CDO 및 GCLC의 단백질 발현 변화를 각각의 항체를 이용하여 평가하였다(Fig. 1). 유허합유 아미노산 대사의 첫 단계를 매개하여 methionine과 ATP로부터 SAM을 합성하는 MAT의 발현은 폐혈증에서 약 2.5배 증가하였다. 이 결과는 methionine의 감소

Table IV - Effect of LPS on levels of various amino acids in liver

	Control	LPS
Aspartate (nmole/g liver)	847±34	1438±74***
Glutamate (nmole/g liver)	1239±86	2467±158***
Asparagine (nmole/g liver)	119±9	109±2
Serine (nmole/g liver)	651±44	590±36
Glutamine (nmole/g liver)	4929±480	4988±522
Histidine (nmole/g liver)	996±66	1029±76
Glycine (nmole/g liver)	1590±119	2695±208**
Arginine (nmole/g liver)	17±1	30±2***
Threonine (nmole/g liver)	222±3	260±18
Alanine (nmole/g liver)	3088±206	2663±124
Tyrosine (nmole/g liver)	96±13	88±7
Tryptophan (nmole/g liver)	32±4	29±1
Valine (nmole/g liver)	194±17	176±14
Phenylalanine (nmole/g liver)	84±10	82±2
Isoleucine (nmole/g liver)	144±12	112±10
Leucine (nmole/g liver)	211±21	178±13
Lysine (nmole/g liver)	544±55	781±83

Rats were sacrificed 10 h after LPS treatment (5 mg/kg, iv). Each value represents the mean±S.E.M. for more than 4 rats.

*, **, ***Significantly different from control (Student's *t*-test, $P < 0.05$, $P < 0.01$ or 0.001 , respectively).

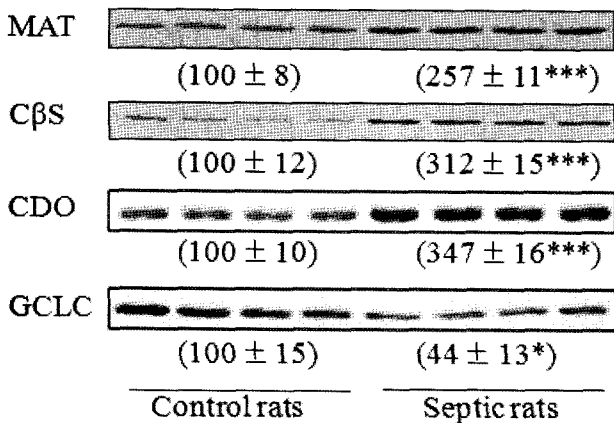


Fig. 1 – Immunoblot analysis of hepatic MAT, CβS, CDO and GCLC protein levels in rats treated with LPS. Rats were sacrificed 10 h after LPS treatment (5 mg/kg, iv). Values given in parentheses are shown as a percentage of each protein levels monitored in control rats (100%). Each value represents the mean ± S.E.M. for 4 rats. ***Significantly different from control (Student's *t*-test, *P* < 0.05, or 0.001, respectively).

가 MAT의 활성화 증가에 의해 매개됨을 시사한다. 그러나 반응 생성물인 SAM의 함량은 MAT의 증가에도 불구하고 유의적인 차이가 관찰되지 않았으므로 SAM의 소모반응이 증가하였을 것으로 판단된다. SAM의 소모 반응은 크게 methylation 반응과 polyamine의 합성으로 구분된다. 본 연구결과에서 methylation 능력의 지표인 SAM/SAH의 비율이 감소하였으므로 methylation 반응이 증가할 가능성은 낮은 것으로 판단된다. 반면 polyamine의 함량이 LPS가 처리된 마우스의 간에서 증가하였으며 polyamine의 합성을 매개하는 ornithine decarboxylase와 spermidine/spermine N¹-acetyltransferase의 활성이 증가하는 것으로 보고되었다.¹⁵⁾ 이상의 결과는 LPS에 의한 MAT의 발현 증가는 SAM을 통한 polyamine의 합성과 관련이 있을 가능성을 시사한다.

폐혈증 랫트의 간에서 homocysteine으로부터 비가역적으로 cystathionine을 합성하는 CβS의 단백질함량은 정상 대조군에 비하여 약 3배 증가하였다. 이 결과는 대사 생성물인 cystathionine 및 하위 단계인 cysteine의 증가와 일치한다. 또한 CβS의 활성화는 산화적 손상에서 증가하는 것으로 보고되어¹⁶⁾ LPS에 의한 산화적 손상 역시 CβS를 통한 cystathionine의 합성 증가에 기여한 것으로 판단된다.

CDO는 cysteine으로부터 비가역적으로 cysteine sulfinic acid의 합성을 매개하는 효소로 taurine 합성의 첫 단계를 매개한다. CDO의 단백질 발현은 LPS의 처리에 의해 측정된 단백질 중에서 가장 크게 증가하였다. 이 결과는 간에서 측정된 taurine 및 hypotaurine의 증가와도 잘 일치한다. 이전 실험에서 식수를 통한 taurine의 공급은 급성적인 LPS 처리에 의한 간독성의 발현 및 TNF-alpha와 nitric oxide의 생성을 억제하는 것으로 보고되

었다.⁶⁾ Taurine은 hypochlorous acid와 포합체를 형성하거나 neutrophine의 기능을 조절하여 과도한 염증반응을 억제하는 것으로 보고되었다.¹⁷⁾ 이 결과는 폐혈증에서 CDO의 유도를 통한 taurine의 합성 증가가 염증반응의 조절과 관련이 있음을 시사한다.

GSH 합성에서 속도결정 단계를 촉매하는 gamma-glutamyl-cysteine ligase는 heterodimer 단백질로 catalytic subunit과 regulatory subunit으로 구성된다. GSH의 함량은 주로 catalytic subunit의 변화와 관련이 있다.¹⁸⁾ 본 연구에서 GCLC의 단백질 발현은 LPS에 의해 감소하였으며 이 결과는 LPS 처리에 의한 GCLC의 mRNA의 감소를 보고한 Buetler의 결과와 일치한다.¹⁹⁾ GSH의 항상성은 GSH의 신생합성 외에 소모 반응에 의해서도 조절된다는 점을 고려할 때 LPS에 의한 GSH의 감소는 합성 감소와 산화적 손상에 의한 소모 반응의 감소 모두 관련한 것으로 판단된다.

본 연구 결과 LPS에 의한 폐혈증에서 methionine으로부터 cysteine으로의 전환을 매개하는 transsulfuration pathway에 관여하는 MAT와 CβS의 단백질 발현이 증가하였으며 SAM을 제외한 SAH, cystathionine 그리고 cysteine의 함량이 증가하였다. 이 결과는 LPS 처리에 의해 methionine으로부터 cysteine으로의 전환이 촉진되었음을 시사한다. Transsulfuration pathway의 중간 대사체인 SAM과 polyamine 합성 과정에서 생성되는 5-methylthioadenosine은 모두 염증 반응을 조절하는 것으로 보고되었다.^{4,5)} 이상의 결과들은 LPS 처리에 의한 transsulfuration 반응의 증가가 염증반응의 조절과 관련이 있을 가능성을 시사한다. 추가적으로 CDO의 발현증가에 따른 hypotaurine 및 taurine의 합성 증가 역시 면역 및 염증 반응의 조절에 기여할 것으로 판단된다. 본 연구결과는 폐혈증에서 cysteine으로부터 taurine의 합성이 증가하며 이를 보충하기 위해 methionine으로부터 cysteine으로의 transsulfuration 반응이 활성화됨을 보인다. 결과적으로 폐혈증에서 관찰되는 negative nitrogen 평형은 필수아미노산인 methionine의 고갈과 관련이 있으며 폐혈증에서는 methionine의 공급이 추가적으로 필요함을 시사한다.

결론

본 연구에서 LPS의 처리는 혈청 생화학적 지표로 평가된 간 독성을 유발하였으며 대표적인 염증 매개 cytokine인 TNF-alpha의 농도가 혈청에서 현격하게 증가하여 폐혈증을 발생시켰다. 본 실험조건에서 간의 SAH, cystathionine, cysteine, hypotaurine 및 taurine의 함량이 증가하였으며 반면 methionine 및 GSH의 함량은 감소하였다. 유허함유 아미노산의 대사를 매개하는 MAT, CβS와 CDO의 단백질 발현은 증가하였으며 GCLC의 발현은 감소하였다. 본 결과는 LPS에 의해 유발된 폐혈증에서 methionine으로부터 cysteine으로의 transsulfuration이 활성화되어 필수아

미노산인 methionine이 고갈되고 negative nitrogen 평형이 유발되며 따라서 폐혈증에서 methionine의 필요량이 증가함을 시사한다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 형질전환복제되지 ERC 프로그램(grant R11-2002-100-00000-0)의 지원을 받았다.

문헌

- 1) Wagner, J. G. and Roth, R. A. : Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* **52**, 349 (2000).
- 2) Seki, S., Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T. and Hiraide, H. : The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol. Rev.* **174**, 35 (2000).
- 3) Hewett, J. A., Jean, P. A., Kunkel, S. L. and Roth, R. A. : Relationship between tumor necrosis factor-alpha and neutrophils in endotoxin-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* **265**, G1011 (1993).
- 4) Garcia-Alvarez, F., Navarro-Zorraquino, M., Larrad, L., Salinas, J. C., Sousa, R., Pastor, C. and Lozano, R. : S-adenosyl-methionine immunomodulator treatment in sepsis. *Int. J. Surg. Investig.* **2**, 9 (2000).
- 5) Hevia, H., Varela-Rey, M., Corrales, F. J., Berasain, C., Martinez-Chantar, M. L., Latasa, M. U., Lu, S. C., Mato, J. M., Garcia-Trevijano, E. R. and Avila, M. A. : 5'-methylthio-adenosine modulates the inflammatory response to endotoxin in mice and in rat hepatocytes. *Hepatology* **39**, 1088 (2004).
- 6) Kim, S. K. and Kim, Y. C. : Attenuation of bacterial lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity by betaine or taurine in rats. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 545 (2002).
- 7) Stipanuk, M. H. : Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 539 (2004).
- 8) Craig, S. A. : Betaine in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 539 (2004).
- 9) Malmezat, T., Breuille, D., Pouyet, C., Mirand, P. P. and Obled, C. : Metabolism of cysteine is modified during the acute phase of sepsis in rats. *J. Nutr.* **128**, 97 (1998).
- 10) Malmezat, T., Breuille, D., Pouyet, C., Buffiere, C., Denis, P., Mirand, P. P. and Obled, C. : Methionine transsulfuration is increased during sepsis in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**, E1391 (2000).
- 11) Kim, S. K., Choi, K. H. and Kim, Y. C. : Effect of acute betaine administration on hepatic metabolism of S-amino acids in rats and mice. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1565 (2003).
- 12) Kim, S. K. and Kim, Y. C. : Effects of betaine supplementation on hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids in mice. *J. Hepatol.* **42**, 907 (2005).
- 13) Kim, S. K., Woodcroft, K. J., Oh, S. J., Abdelmegeed, M. A. and Novak, R. F. : Role of mechanical and redox stress in activation of mitogen-activated protein kinases in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1785 (2005).
- 14) Victor, V. M., Rocha, M., Esplugues, J. V. and De la Fuente, M. : Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 3141 (2005).
- 15) Matsuzaki, Y., Sugimoto, H., Hamana, K., Nagamine, T., Matsuzaki, S. and Mori, M. : Effects of eicosanoids on lipopolysaccharide-induced ornithine decarboxylase activity and polyamine metabolism in the mouse liver. *J. Hepatol.* **27**, 193 (1997).
- 16) Hultberg, M. and Hultberg, B. : Oxidative stress decreases extracellular homocysteine concentration in human hepatoma (HepG2) cell cultures. *Chem. Biol. Interact.* **65**, 54 (2007).
- 17) Schuller-Levis, G. B. and Park, E. : Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 195 (2003).
- 18) Lu, S. C. : Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* **13**, 1169 (1999).
- 19) Buetler, T. M. : Identification of glutathione S-transferase isozymes and gamma-glutamylcysteine synthetase as negative acute-phase proteins in rat liver. *Hepatology* **28**, 1551 (1998).