

Effect of NADPH Oxidase Inhibition on Heme Oxygenase-1 Expression in Human Hepatoma Cell Line HepG2

Sang Kwon Lee¹, Kang Mi Kim², Kwang Hoon Park² and Young Chul Park^{2*}¹Cardiovascular Center, Pusan National University Yangsan Hospital, Yangsan, Gyeongnam 626-770, Korea²Department of Microbiology & Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan, Gyeongnam 626-870, Korea

Received October 24, 2011 / Revised November 9, 2011 / Accepted November 10, 2011

Heme oxygenase-1 (HO-1) is a stress-responsive protein that is known to regulate cellular functions such as cell proliferation, inflammation, and apoptosis. In this study, we investigated the role of NADPH oxidase on the expression of HO-1 in human liver hepatoma cell line HepG2. Diphenyleneiodonium (DPI), an NADPH oxidase inhibitor, markedly inhibited HO-1 expression and the nuclear translocation of transcription factor Nrf2 in cobalt protoporphyrin (CoPP) or hemin-treated HepG2 cells. Similarly, the knockdown of p47^{phox}, a cytosolic factor for NADPH oxidase activity, by siRNA inhibited the CoPP-induced expression of HO-1. In addition, GSHmee, an intracellular antioxidant, blocked the expression of HO-1 in CoPP-treated cells. Based on these results, we conclude that the blockage of NADPH oxidase with DPI or p47^{phox} siRNA inhibits CoPP-induced HO-1 expression in HepG2 cells, and also suggest that the expression of HO-1 in CoPP-induced HepG2 cells is associated with increase of intracellular ROS by NADPH oxidase activity.

Key words : Heme oxygenase-1 (HO-1), CoPP, diphenyleneiodonium (DPI), NADPH oxidase, HepG2 cells

서 론

Heme의 대사를 조절하는 효소인 heme oxygenase-1 (HO-1)은 ferrous iron, carbon monoxide 및 biliverdin을 대사 산물로 만들어내고[7], biliverdin은 biliverdin reductase에 의해 강력한 항산화 작용을 보이는 bilirubin으로 전환된다. HO-1과 그 대사산물은 항염증 및 항세포사멸에 관련된 유전자 발현과 효소의 활성에 영향을 주는 중요한 항산화 효소로 알려져 있다[8,26]. HO-1은 다양한 종류의 세포에서 염증성 cytokines [6], 저산소 상태[11], ultraviolet radiation [30], metal [24] 등에 의해 유도된다. HO-1의 발현은 전사조절인자 NF-E2-related factor-2 (Nrf2)에 의해 조절되며, mitogen-activated protein kinases (MAPKs)에 의해서도 조절되는 것으로 알려져 있다[20,29]. Nrf2는 redox status에 민감한 전사인자(redox-sensitive transcription factor)로써 다양한 항산화 효소의 유전자 발현에 관여한다. Nrf2는 세포질내에서 Keap1과 복합체를 이루어 불활성화 상태로 존재하고 있지만 [2], reactive oxygen species (ROS) 등의 자극에 의해 활성화되어 핵속으로 이동하여 antioxidant response element (ARE)에 결합함으로써 NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1), glutathione S-transferase (GCS), HO-1과 같은 여러 종류의 항산화 효소들의 유전자 발현을 증가시킨다[14,25,27].

NADPH oxidase는 다량체로 구성된 단백질 복합체로써 자극에 의해 세포 내 ROS를 생성시키는 효소이다[21,23]. 이는 막부착 단백질인 p91^{phox}, p22^{phox}와 세포질 인자인 GTPase Rac1, p67^{phox}, p47^{phox}로 구성되어 있으며, 세포 내 신호전달이나 방어에서 중요한 역할을 담당한다. Diphenyleneiodonium (DPI)는 NADPH oxidase, nitric oxide synthase, xanthine oxidase 및 NADPH cytochrome P450 oxidoreductase와 같은 flavoenzymes의 활성을 억제하는 물질로 널리 사용되고 있다[4,19,22]. 이들 flavoenzyme의 flavin 잔기를 이용한 전자 전달은 diphenyleneiodonyl radical 형태로 DPI를 환원시키고, 결과적으로 단백질의 heme 그룹이나 flavin과 covalent phenylation을 이루어 억제 작용을 나타내게 된다[5,15]. 이러한 비특이적인 작용에도 불구하고, DPI는 다양한 종류의 세포에서 flavoenzymes 특히, NADPH oxidase에 의해서 생성되는 ROS를 억제시키는 약물로 빈번하게 사용되고 있다 [4,12,16].

본 연구에서는 인간 간암세포주인 HepG2에서 DPI 또는 p47^{phox}에 대한 small interfering RNA (siRNA)를 사용하여 세포 내 NADPH oxidase의 활성 억제가 CoPP 등에 의해 유도되는 HO-1의 증가에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 CoPP에 의한 HO-1 유전자 발현 과정에는 NADPH oxidase에 의한 세포 내 ROS의 생성이 요구된다는 것을 보여준다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8093, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ycpark@pusan.ac.kr

재료 및 방법

시약

CoPP, DPI, protease inhibitor cocktail, hemin, L-glutathione monoethyl ester (GSHmee)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. HO-1, Nrf2, β -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 구입하였다. Bach1과 p47^{phox}에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting kit는 Amersham Pharmacia Biotech. (Piscataway, NJ, USA) 제품을 사용하였다.

세포배양

실험에서 사용된 인간 간암세포주 HepG2는 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포배양에 필요한 minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (FBS), 항생제, trypsin-EDTA는 HyClone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, HepG2 세포는 10% FBS, 100 μ g/ml streptomycin/100 U/ml penicillin이 함유된 MEM 배양액에서 5% CO₂ 조건에서 37°C incubator에서 배양하였다.

Western blot analysis

약물을 처리한 HepG2 세포를 PBS로 세척한 후, protease inhibitor cocktail를 포함한 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40)를 첨가하여 세포의 전체 단백질을 추출하였다. Bicinchoninic acid를 이용하여 정량하고, 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후, electroblotting apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 단백질을 nitrocellulose membrane에 이동시켰다. Membrane은 항체의 비특이적인 부착을 막기 위하여 5% skim milk에 1시간 동안 두었고, 그 후 필요한 일차 항체 및 horse radish peroxidase (HRP)가 부착되어 있는 2차 rabbit 항체를 반응시켰다. 부착된 면역복합체는 ECL kit를 사용하여 Fujifilm Las3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) 기기에서 단백질 발현을 분석하였다.

세포질 및 핵 단백질 분리

약물을 처리한 세포를 PBS로 세척한 후, Fermetas (Waltham, MA, USA) 제품인 ProteoJETTM Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit를 이용하여 제조사가 추천하는 protocol에 의거하여 세포질과 핵 단백질을 분리하였다. 분리된 각각의 단백질은 bicinchoninic acid를 이용하여 단백질을 정량하였다. 그리고 Western blot analysis를 이용하여 분석하였고, 세포질 및 핵 단백질 오염을 측정하기 위하여 histone과 β -actin에 대한 항체를 각각 사용하였다.

Immunofluorescence assay

멸균된 fat-free glass slide가 깔려있는 plate에 세포를 분주한 뒤 약물을 처리하였다. PBS를 사용하여 세척한 후, 세포를 고정시키기 위해서 4% paraformaldehyde를 상온에서 5분 반응시킨 후, PBS로 세척하였다. 그 다음 세포 permeability를 높이기 위해 0.2% Triton X-100/5% FBS를 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 고정된 세포에 Nrf2 항체를 1시간 동안 반응시킨 후 FITC가 부착되어 있는 2차 rabbit 항체를 반응시켰다. 세포내 fluorescent image는 confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 관찰하였다.

Transfection of small interfering RNA (siRNA)

p47^{phox} 유전자를 silencing 하기 위하여, 21-nucleotide duplex siRNA를 Dharmacon 사(Lafayette, CO, USA)에 주문하여 사용하였다. HepG2 세포를 1 \times 10⁵ cells/ml의 농도로 60-mm dish에 분주한 뒤 12시간 배양한 후, 준비한 p47^{phox} siRNA를 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 제품인 Lipofectamin 2000 reagent를 이용하여 제조사가 추천하는 protocol에 의거하여 transfection 하였다.

결과 및 고찰

간암세포주 HepG2에서 DPI에 의한 HO-1 발현의 억제

HO-1과 그 대사산물은 항염증 및 항세포사멸에 관련된 유전자 발현과 효소의 활성화에 영향을 주는 세포 내 항산화계의 중요한 인자들이다. 다양한 세포에서 HO-1의 과발현을 유도하면 산화적 스트레스(oxidative stress) 등에 의한 세포 및 조직의 손상에 대한 보호작용을 나타내고, 결과적으로 염증 및 세포사멸의 완화에 기여한다고 보고되고 있다[13,18]. HO-1의 활성을 유도시키는 강력한 유도제들이 많이 알려져 있는데, 특히 porphyrin 계열의 CoPP와 hemin 등이 많이 사용된다. 본 연구에서 사용한 NADPH oxidase의 활성을 저해하기 위하여 DPI를 사용하였다[17]. 배양 중인 HepG2 세포에 다양한 농도(10, 50, 100 μ M)의 CoPP를 24시간 동안 처리하여, CoPP에 의한 HO-1의 발현이 농도 의존적으로 증가함을 Western blot analysis를 이용하여 확인하였다(Fig. 1A). DPI를 농도별(1, 10, 50 μ M)로 1시간 전처리 된 HepG2 세포에 CoPP를 처리한 경우에는 HO-1의 단백질 양이 현저하게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 이는 DPI에 의한 NADPH oxidase의 활성 억제제가 CoPP에 의한 HO-1의 유전자 발현을 감소시킨다는 것을 나타내는 것이라 할 수 있다. 다른 HO-1 유도제로 사용되는 hemin을 처리하였을 때도 CoPP를 처리한 경우처럼 DPI에 의해 HO-1의 발현이 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B).

HO-1 발현의 전사인자 Nrf2에 대한 DPI의 효과

다음으로 CoPP 자극에 의한 HO-1 유전자 발현의 DPI에

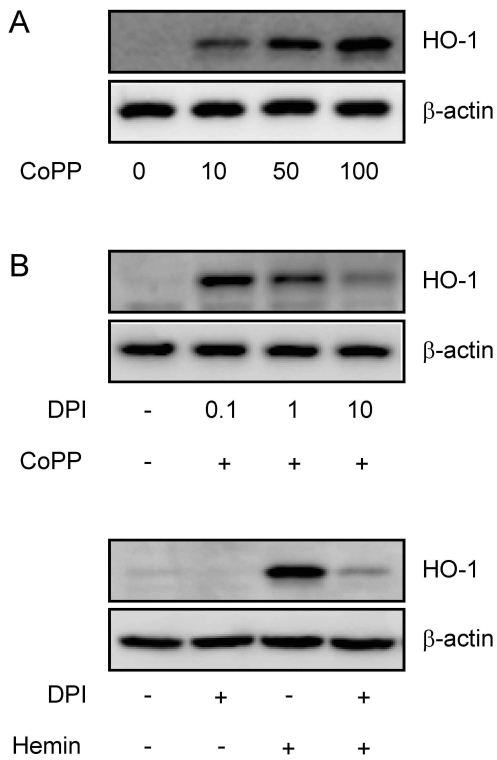


Fig. 1. Effect of DPI on the CoPP-induced HO-1 expression in HepG2 cells. (A) Cells were stimulated with various concentrations of CoPP for 24 hr. (B) Cells were pretreated for 1 hr in the absence or the presence of DPI (1, 10, 50 μ M), and then incubated for an additional 24 hr with 100 μ M CoPP or 50 μ M hemin. Whole cell extracts were analyzed by Western blot analysis using an appropriate antibodies. β -Actin was used as an internal control for equal protein loading.

의한 억제에 HO-1의 전사인자 Nrf2에 미치는 영향을 조사하였다. 자극에 의한 HO-1의 유전자 발현의 개시는 전사인자 Nrf2의 핵으로의 이동과 더불어 세포 내 양적 증가도 수반되는 것으로 알려져 있다. 세포에 자극이 오면 Keap1에 부착되어 불활성 형태로 존재하던 Nrf2는 활성화된 형태로 핵으로 이동하게 된다[10]. 핵으로 이동한 Nrf2은 Maf와 결합하여 전사억제 인자로 알려져 있는 Bach1을 밀어내고 HO-1 유전자의 ARE 부착 부위에 결합하여 유전자 발현을 개시하는 것으로 보고되고 있다[9]. 본 연구에서 HepG2 세포에 CoPP를 처리하였을 때 역시 비슷한 결과를 볼 수 있었는데, Nrf2의 핵으로의 이동과 Bach1의 세포질에서의 증가와 함께 HO-1의 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 그러나, DPI의 전처리는 CoPP에 의해 유도되는 Bach1의 세포질로의 이동과 Nrf2의 핵으로의 이동을 완전히 억제시켰다. 이는 세포질 및 핵 단백질을 분리한 후 수행한 Western blot analysis과 immunofluorescence 분석을 이용하여 확인할 수 있었다.

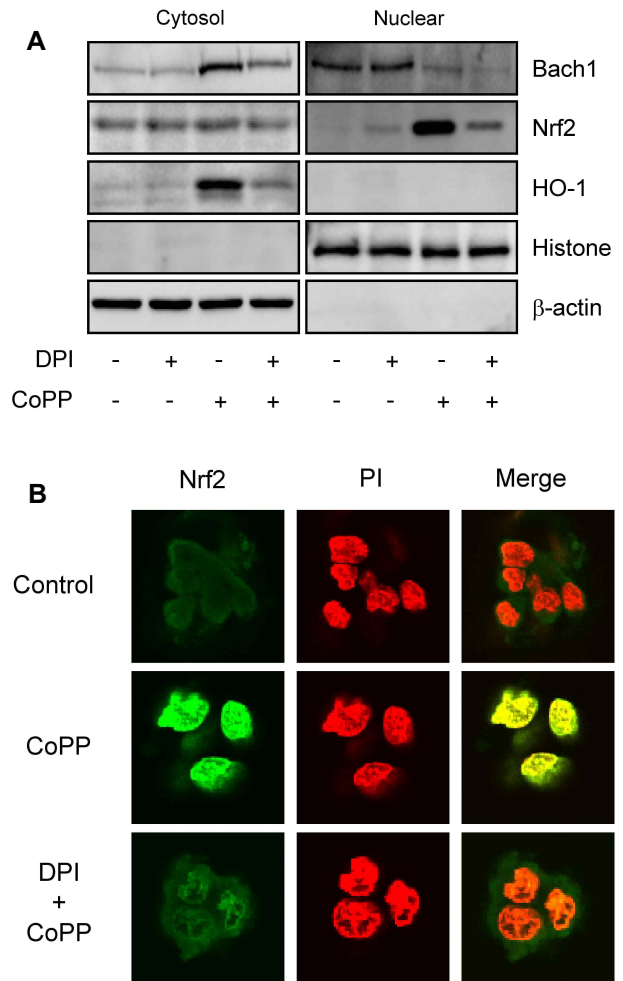


Fig. 2. Effects of DPI on Bach1, Nrf2, and HO-1 expression in CoPP-treated HepG2 cells. Cells were pretreated for 1 hr in the absence or the presence of DPI (10 μ M), and then incubated with 100 μ M CoPP for an additional 24 hr. (A) Nuclear and cytoplasmic proteins were isolated and used for Western blot analysis. Antibodies against β -actin and histone were used for contamination of the nuclear and cytoplasmic proteins, respectively. (B) Cells were fixed, then reacted with Nrf2 antibody for immunofluorescence staining by confocal microscopy. The right panels show superposition of Nrf2 antibody and PI immunoreactivity (orange).

HO-1 발현에서 p47^{phox} silencing의 효과

HO-1 발현 과정에 NADPH oxidase의 관련성을 확증하기 위하여 siRNA를 이용하였다. NADPH oxidase는 막부착 단백질인 p91^{phox}, p22^{phox}와 세포질 인자인 GTPase Rac1, p67^{phox}, p47^{phox}로 구성되어 있으며[21], p47^{phox}의 발현을 knockdown 시켜서 NADPH oxidase의 활성을 억제시킬 수 있다[3]. 본 연구에서 p47^{phox}의 발현을 억제하기 위하여 p47^{phox} mRNA와 간섭하는 oligonucleotides 즉, siRNA를 사용하여 NADPH

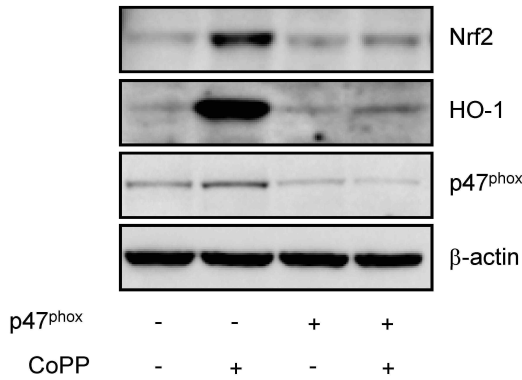


Fig. 3. Effects of p47^{phox} siRNA on Nrf2 and HO-1 expression in CoPP-treated HepG2 cells. HepG2 cells were transfected with siRNA for the silencing of the p47^{phox} gene. Then, cells were stimulated with 100 μM CoPP for 24 hr. The cell lysates were used for Western blot analysis.

oxidase의 활성을 억제시켰다. p47^{phox}에 대한 siRNA는 효과적으로 p47^{phox} 유전자 발현을 막아 세포 내 p47^{phox}의 양을 완전히 감소시켰다. 그 결과, p47^{phox} silencing한 세포에 CoPP를 처리한 경우는 control siRNA를 처리한 세포와 비교할 때 전사인자 Nrf2 및 HO-1 발현을 현저히 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 3).

HO-1 발현에서 GSHmee의 효과

DPI 혹은 p47^{phox} silencing에 의한 NADPH oxidase 활성의 억제는 적당한 자극에 의해 NADPH oxidase에 의한 세포내 ROS의 생성을 저해시키게 된다. 본 연구에서 사용한 이들 NADPH oxidase의 억제 효과는 CoPP의 자극에 의한 HO-1의 발현을 억제시켰고, 이는 CoPP에 의한 HO-1 발현의 신호전달

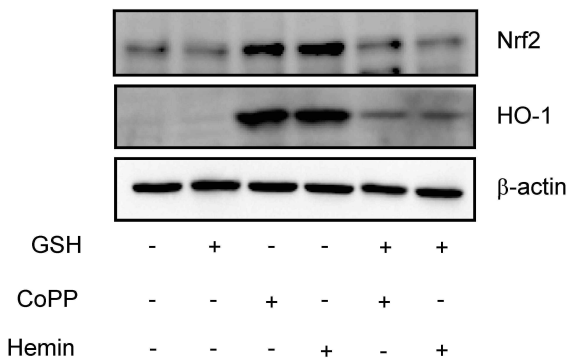


Fig. 4. Effects of GSHmee on Nrf2 and HO-1 expression in CoPP-treated HepG2 cells. HepG2 cells were pretreated with 1 hr for 50 μM GSHmee, and then incubated with 100 μM CoPP or 50 μM hemin for 24 hr. Whole cell extracts were analyzed by Western blot analysis using anti-Nrf2, anti-HO-1 antibodies. β-Actin was used as an internal control for equal protein loading.

과정에서 NADPH oxidase 및 그 효소에 의해 생성되는 ROS가 필요하다는 것을 시사한다. 그래서, 세포 내 ROS를 감소시키는 것으로 알려진 항산화 인자 GSH의 효과를 알아보았다[28]. GSH는 세포 내로 들어갈 수 없기 때문에 본 실험을 위해서 세포막을 투과할 수 있는 GSH의 ester form인 GSHmee를 사용하였다. GSHmee는 세포 내 esterase에 의해 분해되어 세포내 GSH의 양을 증가시키는 것으로 사용될 수 있다[1]. 흥미롭게도, GSHmee가 처리된 세포에서는 CoPP나 hemin이 Nrf2의 활성을 증가시키지 못하였고, 그 결과 HO-1의 발현을 유도하지 못하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 이 결과는 세포내 ROS가 CoPP나 hemin에 의한 HO-1 유전자 발현 과정에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년, 2011~2013)에 의하여 연구되었음.

References

- Anderson, M. F., M. Nilsson, and N. R. Slims. 2004. Glutathione monoethylester prevents mitochondrial glutathione depletion during focal cerebral ischemia. *Neurochem Int.* **22**, 153-159.
- Chan, K., X. D. Han, and Y. W. Kan. 2001. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4611-4616.
- Chose, O., P. Sansilverstri-Morel, C. Badier-Commander, F. Bernhardt, J. N. Fabiani, A. Rupin, and T. J. Verbeuren. 2008. Distinct role of nox1, nox2, and p47 phox in unstimulated versus angiotensin II-induced NADPH oxidase activity in human venous smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **51**, 131-139.
- Cross, A. R. and O. T. Jones. 1986. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem. J.* **237**, 111-116.
- Doussiere, J., J. Gaillard, and P. V. Vignais. 1999. The heme component of the neutrophil NADPH oxidase complex is a target for arylidonium compounds. *Biochemistry* **38**, 3694-3703.
- Durante, W., M. H. Kroll, N. Christodoulides, K. J. Peyton, and A. I. Schafer. 1997. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **80**, 557-564.
- Elbirt, K. K. and H. L. Bonkovsky. 1999. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **111**, 438 - 447.
- Gozzelino, R., V. Jeney, and M. P. Soares. 2010. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu. Rev.*

- Pharmacol. Toxicol.* **50**, 323-354.
9. Huang, H. C., T. Nguyen, and C. B. Pickett. 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12475-12480.
 10. Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, and M. Yamamoto. 1999. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76-86.
 11. Lee, P. J., B. H. Jiang, B. Y. Chin, N. V. Iyer, J. Alam, G. L. Semenza, and A. M. Choi. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 5375-5381.
 12. Li, Y. and M. A. Trush. 1998. Diphenyleiiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 295-299.
 13. Mandal, P., M. T. Pritchard, and L. E. Nagy. 2010. Anti-inflammatory pathways and alcoholic liver disease: role of adiponectin/interleukin-19/heme oxygenase-1 pathway. *World J. Gastroenterol.* **16**, 1330-1336.
 14. Mizuno, K., T. Kume, C. Muto, Y. Takada-Takatori, Y. Izumi, H. Sugimoto, and A. Akaike. 2011. Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. *J. Pharmacol. Sci.* **115**, 320-328.
 15. O'Donnell, V. B., D. G. Tew, O. T. Jones, and P. J. England. 1993. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.* **290**, 41-49.
 16. Pandian, R. P., V. K. Kutala, A. Liaugminas, N. L. Parinandi, and P. Kuppusamy. 2005. Lipopolysaccharide-induced alterations in oxygen consumption and radical generation in endothelial cells. *Mol. Cell Biochem.* **278**, 119-127.
 17. Park, S. E., J. D. Song, K. M. Kim, N. D. Kim, Y. H. Yoo, and Y. C. Park. 2007. Diphenyleiiodonium induces ROS-independent p53 expression and apoptosis in human RPE cells. *FEBS Lett.* **581**, 180-186.
 18. Petrace, I., L. E. Otterbein, J. Alam, G. W. Wiegand, and A. M. Choi. 2000. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **278**, L312-L319.
 19. Sanders, S. A., R. Eisenthal, and R. Harrison. 1997. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase - generation of superoxide anion. *Eur. J. Biochem.* **245**, 541-548.
 20. Shan, Y., R. W. Lambrecht, S. E. Donohue, and H. L. Bonkovsky. 2006. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* **20**, 2651-2653.
 21. Siow, Y. L., K. K. Au-Yeung, C. W. Woo, and O. Karmin. 2006. Homocysteine stimulates phosphorylation of NADPH oxidase p47^{phox} and p67^{phox} subunits in monocytes via protein kinase C activation. *Biochem. J.* **398**, 73-82.
 22. Stuehr, D. J., O. A. Fasehun, N. S. Kwon, S. S. Gross, J. A. Gonzalez, R. Levi, and C. F. Nathan. 1991. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleiiodonium and its analogs. *FASEB J.* **5**, 98-103.
 23. Sumimoto, H., K. Miyano, and R. Takeya. 2005. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 677-686.
 24. Taketani, S., H. Kohnno, T. Yoshinaga, and R. Tokunaga. 1989. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett.* **245**, 173-176.
 25. Tanigawa, S., M. Fujii, and D. X. Hou. 2007. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1690-703.
 26. Tenhunen, R., H. S. Marver, and R. Schmid. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 748-755.
 27. Tkachev, V. O., E. B. Menshchikova, and N. K. Zenkov. 2011. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry* **76**, 407-422.
 28. Tsan, M. F., J. E. White, and C. L. Rosano. 1989. Modulation of endothelial GSH concentrations: effect of exogenous GSH and GSH monoethyl ester. *J. Appl. Physiol.* **66**, 1029-1034.
 29. Yu, R., C. Chen, Y. Y. Mo, V. Hebbbar, E. D. Owuor, T. H. Tan, and A. N. Kong. 2000. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **275**, 39907-39913.
 30. Zhong, J. L., G. P. Edwards, C. Raval, H. Li, and R. M. Tyrrell. 2010. The role of Nrf2 in ultraviolet A mediated heme oxygenase 1 induction in human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 18-24.

초록 : 인간 간암세포주 HepG2에서 NADPH oxidase 활성 억제에 의한 heme oxygenase-1 발현의 조절

이상권¹ · 김강미² · 박광훈² · 박영철^{2*}

(¹양산부산대학교병원 심혈관센터, ²부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학교실)

CoPP는 다양한 세포에서 HO-1의 유전자 발현과 활성을 증가시키는 강력한 유도제로 알려져 있다. HO-1는 세포 및 조직의 손상을 보호한다는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 그 작용 기전에 대해서는 아직 잘 모르고 있다. 본 논문에서는 porphyrin 계열의 CoPP의 자극에 의해 유도되는 HO-1 유전자 발현에서 NADPH oxidase의 활성이 미치는 영향을 인간 간암세포주 HepG2에서 조사하였다. 배양 중인 HepG2 세포에서 CoPP는 HO-1의 발현을 농도의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. NADPH oxidase 저해제로 잘 알려져 있는 DPI를 전처리 한 후 CoPP로 자극한 세포에서는 HO-1의 발현이 강력하게 억제되는 것으로 나타났다. DPI의 이런 억제 효과가 HO-1의 전사 조절인자 Nrf2의 활성에도 영향을 줄 수 있기 때문에 DPI를 전처리 한 후 CoPP 자극에 의한 Nrf2의 핵으로의 이동을 분석하였다. 그 결과, DPI는 CoPP에 의해 유도되는 Nrf2의 핵으로의 이동과 세포 내 존재하는 양을 감소시키는 것을 확인하였다. 다른 HO-1 발현 유도제로 알려져 있는 hemin에 의한 자극의 경우에도 DPI는 HepG2 세포의 HO-1의 발현을 억제하는 효과를 나타내었다. 그리고, p47^{phox}에 대한 siRNA를 사용하여 효과적으로 p47^{phox} 유전자 발현을 knockdown 시켜서 NADPH oxidase의 활성을 억제시키는 방법을 사용하였다. 그 결과, p47^{phox} silencing한 세포에 CoPP를 처리한 경우는 control siRNA를 처리한 세포와 비교할 때 HO-1 발현이 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다. 마지막으로, 세포 내 ROS 생성을 억제하는 GSHmee가 처리된 세포에서는 CoPP나 hemin이 Nrf2의 활성을 증가시키지 못하였고, 그 결과 HO-1의 발현을 유도하지 못하는 것을 알 수 있었는데, 이는 ROS가 CoPP나 hemin에 의한 HO-1 유전자 발현 과정에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 이를 종합해 볼 때, 인간 간암세포주 HepG2에서 CoPP나 hemin의 자극에 의한 HO-1 유전자의 발현에는 NADPH oxidase의 활성이 요구된다는 것을 알 수 있고, 그 활성은 세포 내 ROS를 생성시키는 것으로 역할을 한다고 여겨진다.