

Inhibition of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 by Dicumarol Reduces Tight Junction in Human Colonic Epithelial Cells

Ji Hong, Peng Zhang, I Na Yoon and Ho Kim*

Division of Life Science and Chemistry, College of Natural Science, Daejin University, Pocheon, Gyeonggido 487-711, Korea

Received February 15, 2016 / Revised May 23, 2016 / Accepted May 23, 2016

We previously showed that NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) knockout (KO) mice exhibited spontaneous inflammation with markedly increased mucosal permeability in the gut, and that NQO1 is functionally associated with regulating tight junctions in the mucosal epithelial cells that govern the mucosal barrier. Here, we confirm the role of NQO1 in the formation of tight junctions by human colonic epithelial cells (HT29). We treated HT29 cells with a chemical inhibitor of NQO1 (dicumarol; 10 μ M), and examined the effect on the transepithelial resistance of epithelial cells and the protein expression levels of ZO1 and occludin (two known regulators of tight junctions between gut epithelial cells). The dicumarol-induced inhibition of NQO1 markedly reduced transepithelial resistance (a measure of tight junctions) and decreased the levels of the tested tight junction proteins. *In vivo*, luminal injection of dicumarol significantly increased mucosal permeability and decreased ZO1 and occludin protein expression levels in mouse guts. However, in contrast to the previous report that the epithelial cells of NQO1 KO mice showed marked down-regulations of the transcripts encoding ZO1 and occludin, these transcript levels were not affected in dicumarol-treated HT29 cells. This result suggests that the NQO1-dependent regulation of tight junction molecules may involve multiple processes, including both transcriptional regulation and protein degradation processes such as those governed by the ubiquitination/proteasomal, and/or lysosomal systems.

Key words : Gut mucosal epithelial cells, gut inflammation, mucosal barrier function, NQO1, tight junction

서 론

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)은 플라보 단백질 계통으로서 환원효소이며, NADH 또는 NADPH를 보조 인자로 인식하여 quinone 계통의 화합물을 환원시키는 효소로 알려져 있다[1, 6, 11, 16-18]. 이 과정을 통해서 에너지 대사 중계 물질로 잘 알려진 NAD와 NADH의 세포 속 비율이 조절된다[4, 6, 15]. NQO1은 세포 속에서 형성된 활성산소(reactive oxygen species)를 제거해주는 항산화제 역할을 하는 것으로 알려져 있다[22, 23]. NQO1은 다른 기질에 작용하여 해독 또는 독성을 야기하는 양면적인 성격을 가지고 있음도 확인되었으며 특히 암 치료를 위한 표적 단백질로도 제시되었다[21]. 예를 들어, NQO1에 의해 생성되는 친수성 hydroquinone의 경우 세포 밖으로 배출되기 때문에 세포 독성을 야기하지 않는 것으로 알려져 있지만 NQO1이 조절하는 대사를 통해 강한

세포 독성을 나타내는 물질로 바뀌기도 한다고 보고되었다[21]. 이러한 물질들은 DNA의 알킬화를 야기하거나 반응성이 높은 활성산소종의 발생을 야기하여 세포독성을 초래함으로써 항암효과를 나타낸다고 밝혀졌다.

NQO1 발현은 다양한 장기들에서 관찰되는데, 특히 소장과 대장에서 높게 발현된다[13]. 면역세포의 활성화와 분화과정에서도 NQO1이 주요하게 관여한다는 보고들이 있지만[5], 소장과 대장에서 관찰되는 NQO1 단백질의 양에 비해 극히 적은 양이 면역 기관에서 확인되었다[13]. 이는 소장과 대장에서 NQO1이 중요한 생리학적 역할을 담당하고 있음을 보여준다. 우리는 최근 연구를 통해, NQO1 knockout (결핍) 생쥐의 대장에서 염증이 발생함을 확인하였다[13]. Macromolecular permeability 실험을 통해, NQO1 wild type (대조군) 생쥐 보다 NQO1 결핍 생쥐의 소장에서 점막 투과율이 유의하게 증가되어 있음을 확인하였다[13]. DSS (dextran sulfate sodium salt) 약물을 처치하여 확립하는 생쥐 대장 염증 모델에서도, 대조군 생쥐에 비해 NQO1 결핍 생쥐가 높은 민감도를 보임도 관찰하였다. 실제로 밀착연접(tight junction) 조절인자인 occludin과 claudin 단백질 양이 대조군에 비해서 NQO1 결핍 생쥐에서 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다[13]. 상기 단백질 감소의 원인이 전사과정 억제에 기인함도 밝혔다. 이상의 결과들은 대장 속에서 관찰되는 NQO1의 주요기능이 상피세포

*Corresponding author

Tel : +82-31-539-1855, Fax : +82-31-539-1850

E-mail : hokim@daejin.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 밀착연접 형성 과정과 강하게 연관되어 있음을 보여준다.

본 연구에서는 NQO1이 인간 대장상피세포의 밀착연접 형성에 관여하는지를 확인하고자 하였다. 이를 위해, 인간 대장상피세포주인 HT29 세포에 NQO1-억제제인 dicumarol을 처리한 다음 밀착연접 조절인자들의 단백질 양과 전사량 변화 등을 확인해보았다. 본 연구는 향후 NQO1이 조절하는 장 점막-상피세포 밀착연접 조절 기작을 규명하는데 기초 연구자료가 될 것으로 기대한다.

재료 및 방법

시약

ZO1 (zona occludens protein 1), occludin, PKC- δ , α -tubulin, Sp1, HDAC6 (histone deacetylase 6), β -actin 항체 등은 Santa Cruz biotech (USA)으로부터 구매하였다. Dicumarol과 Avertin 마취제, 이중구조배양판(transwell plate), 그리고 형광-텍스트란(fluorescein-labeled dextran, 분자량: 4,000) 등은 Sigma Aldrich (USA)에서 구매하여 사용하였다.

세포배양

인간 대장상피세포주 HT29 세포는 ATCC (USA)에서 구매하여 사용하였고 McCoy's 5A 배양액(invitrogen, USA)에 10% FBS (Invitrogen, USA)을 첨가하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다[9].

생쥐 대장 점막 투과율 변화 측정(Mucosal macromolecular permeability)

6주령 수컷 CD1 생쥐를 Avertin (240 mg/kg)을 이용 마취시킨 다음, 수술실을 이용하여 양쪽 신장다리를 묶어 4시간의 수술시간 동안 소변 배출이 되지 않도록 하였다. 또한 맹장 옆 대장 2 cm를 수술실로 묶어 대장주머니를 형성한 다음, 형광-텍스트란(25 mg/ml)을 10 μ M dicumarol과 함께 인슐린 주사기를 이용하여 주입하였다. 대조군은 형광-텍스트란과 생리식염수(PBS)만을 주입하였다. 절개 부위를 봉합한 뒤 4시간 동안 마취를 유지한 다음, 경동맥 혈액을 채취하여 형광 수치를 측정함으로써 대장 내강에 주입한 형광-텍스트란의 체내 침투 정도, 즉 대장 점막 투과율을 측정하였다. 본 연구는 대전대학교 동물실험위원회(Animal Care and Use Committee of Daejin University)의 방침 및 범규에 따라 진행되었다(승인번호: 2013-03)[10].

인간 대장상피세포 단층의 전기저항 측정(trans epithelial resistance)

인간 대장상피세포(HT29 세포) 단층의 전기저항 값은 배양관에 세포를 배양한 후 Millicel ERS Voltometer (Millipore, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포를 5일 이상 배양하여 저항

값이 3,000 Ω cm² 이상일 때 dicumarol을 처리하고 전기저항 값을 측정하였다. 측정치에서 배양액과 이중구조배양관이 가지는 기본 저항 값을 빼고 최종 결과로 나타내었다[14].

Immunoblot analysis를 통한 단백질 변화 측정

HT29 세포에 dicumarol을 처리 한 후 세포들은 SDS sample buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40)를 첨가하여 용해시켰다. 단백질 정량은 BCA protein assay kit (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 실시하였다. SDS-PAGE를 실시하여 분리한 단백질은 transfer 과정을(120 V, 1시간) 통해 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 일차 항체들을 이용해 4°C에서 밤새 항원-항체 반응을 수행한 다음 HRP가 결합된 이차 항체를 이용하여 1 시간 동안 상온에서 추가 반응시켰다. LumiGlo 시약(New England Biolabs, USA)을 이용하여 발색시킨 후 Fusion FX (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 현상하였다[14].

RNA 분리 및 RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction) 이용 전사량 측정

HT29 세포의 RNA는 TRIzol 시약(Life Technologies, USA)을 이용하여 추출하였다. Reverse Transcription kit (Applied Biosystem, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 인간 ZO1 (sense: 5'-CGGTCTCTGAGCCTGTAAG, antisense: 5'-GGA TCTAG-ATGCGACGACAA)과 인간 occludin (sense: 5'-TATGAGACAGACTACACAAC-TGGCGGCGAGTCC, antisense: 5'-ATCATAGTCTCCAACCATCTTCTTGATGTG) primer들은 제작하여 사용하였다(바이오니아, 한국). PCR은 ABI 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, USA)을 통해 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 수행한 다음 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다[19].

Statistical analysis

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 표준오차로 나타내었고 SIGMA-STAT professional statistics software program (Jandel Scientific Software, USA)의 t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

NQO1 억제제 dicumarol에 의한 생쥐 대장 점막 장벽기능 감소

이전 연구를 통해서, 우리는 NQO1 유전자 결핍이 생쥐의 소장 점막-밀착연접을 유의하게 감소시킴을 확인하였다[13]. 이 결과는 NQO1 유전자가 점막의 장벽 기능 형성에 있어서 주요한 조절인자임을 보여준다. 따라서 본 연구에서는 NQO1

에 대한 특이적 화학 억제제인 dicumarol 처치가 NQO1 결핍 생쥐와 유사한 증상을 나타내는지 확인해보고자 하였다. 이를 위해, 생쥐를 마취시키고 대장 내에 형광-덱스트린과 dicumarol (10 μ M)을 동시에 주입한 다음, 경동맥 혈액 속 형광을 측정하여 대장 점막의 장벽기능 변화를 확인하였다. Fig. 1A에서처럼, dicumarol 처치에 의해 NQO1이 억제되면 대장 점막 투과율이 유의하게 증가한다는 사실을 확인하였다. 다음으로 점막의 장벽기능 감소가 밀착연접 형성 인자들의 감소에 기인한 것인지 확인해보고자 하였다. 이를 위해 dicumarol이 처치된 대장을 적출하고 단백질을 분리한 다음 immunoblot analysis를 수행하였다. 생식식염수만을 공급한 대조군에 비해서 dicumarol이 처치된 대장에서는 ZO1과 occludin 단백질 양이 유의하게 감소되어 있음을 확인하였다(Fig. 1B). 이 결과는 dicumarol 처치에 의한 NQO1 억제과정이 인간 대장상피세포의 밀착연접을 감소시키며, 그 기작이 밀착연접 조절 단백질들의 감소에 기인함을 보여준다. 폐포를 구성하는 상피세포의 장벽기능이 NQO1 전사량 변화에 의존적이라는 연구 결과도

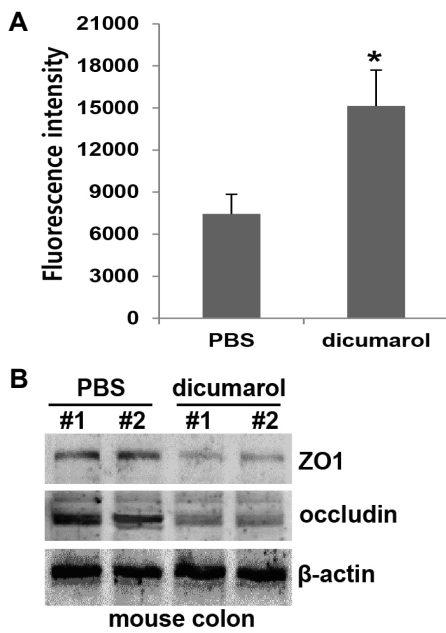


Fig. 1. Dicumarol-mediated inhibition of NQO1 causes loss of mucosal epithelial cell tight junctions in mouse guts. (A) Colonic loops of CD1 mice (n = 10) were prepared and lumenally injected with fluorescein-labeled dextran in the presence or absence of dicumarol (10 μ M), and blood fluorescence was determined. The bars represent the mean \pm SEM of three independent experiments (*, $p < 0.05$ vs. PBS treated mice). (B) Protein extracts were isolated from colon samples of the dicumarol-treated mice described above. Total proteins were resolved on polyacrylamide gels, and blots were probed with antibodies against ZO1, occludin, and β -actin. Data are representative of three independent samples.

있다[3]. 이상의 결과들은 상피세포 속 NQO1의 기능이 상피세포의 주요 기능인 장벽 형성 과정에 밀접하게 연관되어 있음을 시사한다.

인간 대장상피세포에서 NQO1 억제에 의한 밀착연접 변화

다음으로 인간 대장상피세포주인 HT29에 dicumarol을 12 시간 동안 처치한 다음 밀착연접 변화를 확인하기 위해 TER (transepithelial resistance)을 측정하였다. 인간 대장상피세포 (HT29)에서 확인되는 기본 TER 값이 dicumarol 처치로 인해 약 35% 이상 감소함을 확인하였다(Fig. 2). 이 결과는 이전 생쥐 실험결과와 동일하게, NQO1 효소의 활성이 억제되면 인간 대장상피세포 밀착연접이 감소한다는 사실을 보여준다. 이는 인간 대장상피세포에서도 NQO1의 주요 기능이 밀착연접 조절과 연관되어 있음을 보여준다.

인간 대장상피세포에서 NQO1 억제에 의한 밀착연접 조절 인자 변화

다음으로 dicumarol이 처치된 HT29 세포에서 밀착연접 조절 단백질인 ZO1과 occludin의 양이 감소되는지를 확인해 보았다. 이를 위해 HT29 세포에 dicumarol을 처치한 후 단백질을 분리하고 immunoblot analysis를 수행하였다. Fig. 3A에서처럼, dicumarol 처치는 밀착연접 구성 단백질인 ZO1과 occludin의 양을 유의하게 감소시켰다. 10 μ M dicumarol에서 가장 강한 단백질 감소현상이 관찰되었다. 또한 처치 12시간 이내에서 상기 밀착연접 조절단백질들의 감소가 나타남을 확인하였다(Fig. 3B). 그러나 다른 신호분자들의 변화는 관찰되지 않았다. 이 결과들은 NQO1에 의해 특이적으로 조절되는 경로가 밀착연접 형성과 관련되어 있음을 보여준다.

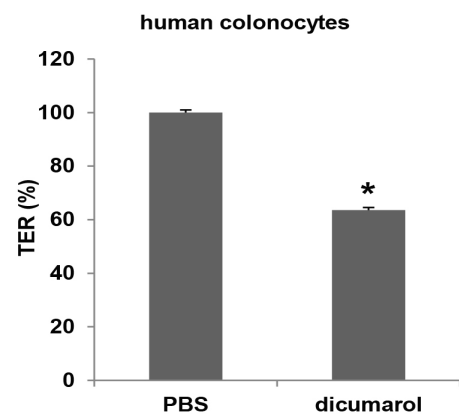


Fig. 2. Effect of dicumarol on the paracellular permeability of human colonocyte HT29 cells. Dicumarol (10 μ M) was applied to the HT29 cells for 12 hr. Effect of dicumarol (10 μ M) was expressed as a percent of the basal values at 0 min; *, $p < 0.05$ compared with the PBS-incubated control. The bars represent the mean \pm SEM of three independent experiments (n = 4).

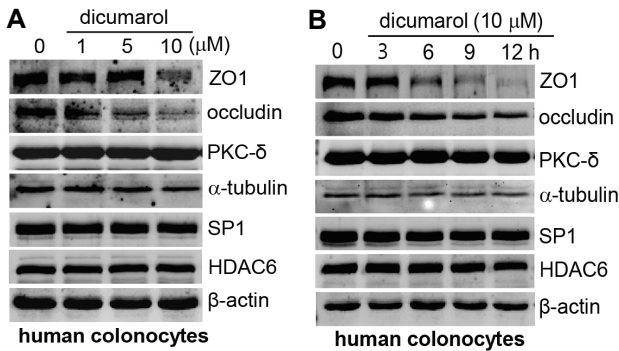


Fig. 3. Dicumarol-treatment reduces the expression of tight junction proteins in HT29 cells. (A) HT29 cells (10^5 cells/well) were treated with dicumarol (0, 1, 5, or 10 μ M) for 12 hr, cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and blots were probed with antibodies against ZO1, occludin, PKC- δ , α -tubulin, SP1, HDAC6, and β -actin. The presented results are representative of three independent experiments. (B) HT29 cells were treated with 10 μ M dicumarol for the indicated time points. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and blots were probed with antibodies. The presented results are representative of three independent experiments.

NQO1 억제제에 의한 ZO1과 occludin 전사량 변화

dicumarol 처치로 NQO1을 억제한 세포 속에서 ZO1과 occludin 단백질 양이 감소된다는 사실을 통해, 각 유전자들의 전사량 감소를 확인해보았다. 그러나 dicumarol (10 μ M)을 처치한 인간 대장상피세포에서 ZO1과 occludin 전사체 양이 감소되지 않았다(Fig. 4). 이는 dicumarol 처치에 의해 야기된 단백질 감소가 전사에 의해 조절되지 않음을 보여준다. 이 연구결과와는 달리, 이전 연구에서 우리는 NQO1 결핍 생쥐에서 나타나는 점막 투과율 증가현상이 점막 상피세포의 밀착연접 조절 유전자의 전사량 감소에 기인한다고 보고하였다[13]. 이것은 상피세포 속 NQO1의 기능이 밀착연접 조절과 연관되어 있음은 명확하지만 작용기작은 서로 상이할 수 있음을 보여준다.

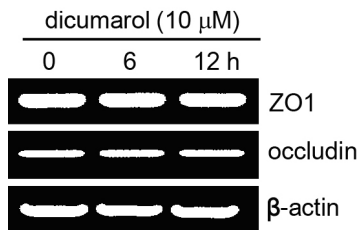


Fig. 4. Dicumarol-mediated inhibition of NQO1 does not affect the transcript levels of tight junction molecules in HT29 cells. (A) HT29 cells (10^5 cells/well) were treated with 10 μ M dicumarol for the indicated durations. Total RNA was isolated, cDNA was synthesized, and fragments corresponding to ZO1, occludin, and β -actin were amplified by PCR. The results shown are representative of three separate experiments.

세포 속 단백질 양은 전사조절에 의해 영향을 받지만 또한 단백질 변성과정(degradation)에 의해서도 빠르게 감소될 수 있다[2, 7, 8]. 단백질 변성과정에는 유비퀴틴화(ubiquitination)와 연관된 proteasomal protein degradation 경로[2, 7, 8]와 lysosomal protein degradation 경로[12, 20] 두 가지가 대표적으로 알려져 있다[7]. 이전 연구결과에서도, NQO1 결핍 생쥐의 대장 상피세포에서 ZO1과 occludin 단백질의 감소 정도에 비해 전사체 감소는 상대적으로 적은 것으로 확인되었다[13]. 이것은 밀착연접 단백질들의 양적 조절이 단지 전사과정에만 의존적이지 않음을 보여준다. 전사과정 억제 이외에 단백질 파괴절차의 하나인 변성 축진을 통해 단백질이 감소했을 가능성이 있다. 향후 이 부분에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 대전대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

References

- Berger, F., Ramirez-Hernandez, M. H. and Ziegler, M. 2004. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* **29**, 111-118.
- Brehm, A., Liu, Y., Sheikh, A., Marrero, B., Omoyinmi, E., Zhou, Q., Montealegre, G., Biancotto, A., Reinhardt, A., de Jesus, A., Pelletier, A., Tsai, M., W. L., Remmers, E. F., Kardava, L., Hill, S., Kim, H., Lachmann, H. J., Megarbane, A., Chae, J. J., Brady, J., Castillo, R. D., Brown, D., Casano, A. V., Gao, L., Chapelle, D., Huang, Y., Stone, D., Chen, Y., Sotzny, F., Lee, C. C., Kastner, D. L., Torrelo, A., Zlotogorski, A., Moir, S., Gadina, M., McCoy, P., Wesley, R., Rother, K. I., W. Hildebrand, P., Brogan, P., Kruger, E., Aksentijevich, I. and Goldbach-Mansky, R. 2016. Additive loss-of-function proteasome subunit mutations in CANDLE/PRAAS patients promote type I IFN production. *J. Clin. Invest.* **126**, 782-795.
- Fan, X., Staitieh, B. S., Jensen, J. S., Mould, K. J., Greenberg, J. A., Joshi, P. C., Koval, M. and Guidot, D. M. 2013. Activating the Nrf2-mediated antioxidant response element restores barrier function in the alveolar epithelium of HIV-1 transgenic rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **305**, L267-277.
- Hwang, J. H., Kim, D. W., Jo, E. J., Kim, Y. K., Jo, Y. S., Park, J. H., Yoo, S. K., Park, M. K., Kwak, T. H., Kho, Y. L., Han, J., Choi, H. S., Lee, S. H., Kim, J. M., Lee, I., Kyung, T., Jang, C., Chung, J., Kweon, G. R. and Shong, M. 2009. Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes* **58**, 965-974.
- Iskander, K., Li, J., Han, S., Zheng, B. and Jaiswal, A. K. 2006. NQO1 and NQO2 regulation of humoral immunity

- and autoimmunity. *J. Biol. Chem.* **281**, 30917-30924.
6. Jaiswal, A. K. 2000. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 254-262.
 7. Kim, D. H., Lee, I. H., Nam, S. T., Hong, J., Zhang, P., Hwang, J. S., Seok, H., Choi, H., Lee, D. G., Kim, J. I. and Kim, H. 2014. Neurotropic and neuroprotective activities of the earthworm peptide Lumbricisin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **448**, 292-297.
 8. Kim, D. H., Lee, I. H., Nam, S. T., Hong, J., Zhang, P., Lu, L. F., Hwang, J. S., Park, K. C. and Kim, H. 2015. Antimicrobial peptide, lumbricisin, ameliorates motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1640-1647.
 9. Kim, H., Kokkotou, E., Na, X., Rhee, S. H., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2005. Clostridium difficile toxin A-induced colonocyte apoptosis involves p53-dependent p21 (WAF1/CIP1) induction via p38 mitogen-activated protein kinase. *Gastroenterology* **129**, 1875-1888.
 10. Kim, H., Rhee, S. H., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2007. Inflammation and apoptosis in Clostridium difficile enteritis is mediated by PGE2 up-regulation of Fas ligand. *Gastroenterology* **133**, 875-886.
 11. Long, D. J., Iskander, K., Gaikwad, A., Arin, M., Roop, D. R., Knox, R., Barrios, R. and Jaiswal, A. K. 2002. Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity. *J. Biol. Chem.* **277**, 46131-46139.
 12. Machado, J., Manfredi, L. H., Silveira, W. A., Goncalves, D. A., Lustrino, D., Zanon, N. M., Kettelhut, I. C. and Navegantes, L. C. 2015. Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagic-lysosomal proteolysis through cAMP/PKA signaling in rat skeletal muscles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **72**, 40-50.
 13. Nam, S. T., Hwang, J. H., Kim, D. H., Park, M. J., Lee, I. H., Nam, H. J., Kang, J. K., Kim, S. K., Hwang, J. S., Chung, H. K., Shong, M., Lee, C. H. and Kim, H. 2014. Role of NADH: quinone oxidoreductase-1 in the tight junctions of colonic epithelial cells. *BMB. Rep.* **47**, 494-499.
 14. Nam, S. T., Seok, H., Kim, D. H., Nam, H. J., Kang, J. K., Eom, J. H., Lee, M. B., Kim, S. K., Park, M. J., Chang, J. S., Ha, E. M., Shong, K. E., Hwang, J. S. and Kim, H. 2012. Clostridium difficile toxin A inhibits erythropoietin receptor-mediated colonocyte focal adhesion through in activation of Janus Kinase-2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1629-1635.
 15. Oh, G. S., Kim, K. J., Choi, J. H., Shen, A., Choe, S. K., Kama, A., Lee, S. H., Jo, H. J., Yang, S. H., Kwak, T. H., Lee, C. H., Park, R. and So, H. S. 2014. Pharmacological activation of NQO1 increases NAD levels and attenuates cisplatin-mediated acute kidney injury in mice. *Kidney Int.* **85**, 547-560.
 16. Palming, J., Sjöholm, K., Jernas, M., Lystig, T. C., Gummesson, A., Romeo, S., Lonn, L., Lonn, M., Carlsson, B. and Carlsson, L. M. 2007. The expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 is high in human adipose tissue, reduced by weight loss, and correlates with adiposity, insulin sensitivity, and markers of liver dysfunction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2346-2352.
 17. Pollak, N., Dolle, C. and Ziegler, M. 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.* **402**, 205-218.
 18. Radjendirane, V., Joseph, P., Lee, Y. H., Kimura, S., Klein-Szanto, A. J., Gonzalez, F. J. and Jaiswal, A. K. 1998. Disruption of the DT diaphorase (NQO1) gene in mice leads to increased menadione toxicity. *J. Biol. Chem.* **273**, 7382-7389.
 19. Rushworth, S. A., MacEwan, D. J. and O'Connell, M. A. 2008. Lipopolysaccharide-induced expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes. *J. Immunol.* **181**, 6730-6737.
 20. Schnoder, L., Hao, W., Qin, Y., Liu, S., Tomic, I., Liu, X., Fassbender, K. and Liu, Y. 2016. Deficiency of neuronal p38alpha MAPK attenuates amyloid pathology in alzheimer disease mouse and cell models through facilitating lysosomal degradation of BACE1. *J. Biol. Chem.* **291**, 2067-2079.
 21. Siegel, D., Yan, C. and Ross, D. 2012. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1033-1040.
 22. Yang, H. L., Lin, S. W., Lee, C. C., Lin, K. Y., Liao, C. H., Yang, T. Y., Wang, H. M., Huang, H. C., Wu, C. R. and Hseu, Y. C. 2015. Induction of Nrf2-mediated genes by Antrodia salmonea inhibits ROS generation and inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Funct.* **6**, 230-241.
 23. Zhu, H., Jia, Z., Zhang, L., Yamamoto, M., Misra, H. P., Trush, M. A. and Li, Y. 2008. Antioxidants and phase 2 enzymes in macrophages: regulation by Nrf2 signaling and protection against oxidative and electrophilic stress. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **233**, 463-474.

초록 : 인간 대장상피세포 밀착연접 형성과정에서 NQO1 저해 효과

홍지 · 장평 · 윤이나 · 김호*

(대전대학교 자연과학대학 생명화학부 생명과학전공)

본 연구는 최근 연구자 등이 보고한 NQO1 knockout (결핍) 생쥐의 점막기능 감소 및 장염유발 현상을 인간 대장상피세포에서 재확인하는 것이다. 이를 위해, 사람 대장상피세포주인 HT29 세포에 NQO1 억제제인 dicumarol을 처치한 다음 밀착연접 조절인자의 변화를 평가하였다. HT29 세포에 10 μ M dicumarol을 처치하여 NQO1을 억제하면 인간 대장상피세포의 밀착연접이 유의하게 줄고 구성인자들(ZO1, occludin)의 단백질 양도 감소함을 확인하였다. 생쥐 대장 내강에 dicumarol (10 μ M)을 직접 처치한 결과 점막 투과율이 현저하게 증가함도 확인하였다(장벽기능 감소). 이는 인간 대장상피세포의 밀착연접 형성과정이 NQO1에 의존적임을 보여준다. 그러나 dicumarol 처치는 ZO1과 occludin의 전사량을 억제하지 않았다. NQO1 결핍 생쥐에서 ZO1과 occludin의 전사량이 크게 감소한다는 이전 보고를 감안하면, NQO1에 의한 밀착연접 단백질의 양적 조절 과정이 전사를 포함하는 다양한 경로와 연관되어 있음을 시사한다. 즉, NQO1에 의한 ZO1과 occludin 조절 과정에 프로테오솜 의존-단백질 변성과 같은 단백질 파괴 경로가 이용될 수 있다고 사료된다.