

# PC12 세포주에서 Lipopolysaccharide/Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ /Interferon- $\gamma$ 로 유도된 Inducible Nitric Oxide Synthase 발현과 세포자멸사

김지연 · 김지영 · 강구성 · 곽은경  
박지영 · 박태인 · 손윤경

경북대학교 의과대학 병리학교실

## Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide Mediated Apoptosis in Neuronal PC12 Cells after Lipopolysaccharide/Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ /Interferon- $\gamma$ Treatment

Jiyeon Kim, Jiyoung Kim, Kuseong Kang, Eunkyong Kwak, Jiyoung Park  
Taein Park and Yoonkyung Sohn

Department of Pathology, Kyungpook University School of Medicine, Daegu, Korea

**Background :** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) has been detected in a number of pathologic conditions in the central nervous system. This study was investigated the patterns of iNOS expression in the neuronal PC12 cell and the effects of nitric oxide on the apoptosis of PC12 cells. **Methods :** The stimulating agents for induction of iNOS expression in PC12 cells were bacterial lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). **Results :** The expression iNOS mRNA and protein in PC12 cells stimulated with LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  were profoundly increased. The expression of iNOS mRNA arose at 6 hours, peaked at 12 hours, and declined to 48 hours after LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  treatment. iNOS protein was increased up to 24 hours in LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  treated PC12 cells while the expression of nNOS was unaffected. Accumulation of NO derivatives in the culture media was markedly increased at least at up to 48 hours after LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  treatment. The induction of iNOS expression and NO production in differentiated PC12 cells was correlated with apoptotic cell death judged by transmission electron microscopy and DNA fragmentation from the results of the Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUDP biotin nick end-labeling (TUNEL) method. After treatment with NOS inhibitor, N-monomethylarginine (NMMA), a profound decrease in NO production by LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  treated PC12 cells was noted. And the LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  induced apoptosis was prevented by the NMMA treatment. **Conclusions :** From the above results it is concluded that the expression of iNOS in differentiated PC12 cells is induced by the combined application of LPS, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . And the apoptosis of cultured PC12 cells is mediated by iNOS-derived NO.

**Key Words :** PC12 Cells-Apoptosis-Nitric Oxide Synthase-Lipopolysaccharides-Tumor Necrosis Factor

접 수 : 2002년 6월 29일  
게재승인 : 2002년 8월 2일

책임저자 : 손 윤 경  
우 700-721 대구광역시 중구 삼덕 2가 50  
경북대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 053-420-6943  
Fax: 053-426-1525  
E-mail: yksohn@knu.ac.kr

일산화질소(nitric oxide, NO)는 유리기를 가진 기체로서 정상적으로 중추신경계와 말초신경계에 존재하며 혈류의 조절이나 시냅스 가소성 혹은 세포의 신호 전달 등에 관여한다.<sup>1,2</sup> 하지만 과량의 일산화질소가 생성될 경우 세포 손상을 초래할 수 있는데, 뇌의 허혈성 손상, 뇌염이나 뇌막염 등의 감염성 질환, 알츠하이머병이나 파킨슨병, 헌팅톤병, 근위축측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 퇴행성 질환 등에서 보고되었으며 이때 일산화질소는 세포자멸사에 의한 신경세포사

를 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>3-5</sup>

일산화질소는 L-arginine이 L-citrulline으로 변환되는 과정 중에 형성되는데 이 과정에는 nitric oxide synthase (NOS)가 관여한다.<sup>6</sup> NOS는 현재까지 세 종류가 밝혀졌는데, 제 1형 NOS (neuronal nitric oxide synthase, nNOS)는 처음 신경세포에서 발견되었고, 제 2형 NOS (inducible nitric oxide synthase, iNOS)는 큰포식세포에서 처음 발견되었다. 제 3형인 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)는 내피세포에서 발

견되었다. 세 종류의 NOS 중 nNOS와 eNOS는 세포 내에 항상 존재하는 constitutive nitric oxide synthase로 알려져 있으며 이들 효소의 활성화에는  $Ca^{2+}$ 이 관여하는 반면, iNOS의 활성화는 세포 내  $Ca^{2+}$ 에 영향을 받지 않으며 조직 손상이 있거나 염증, 혹은 면역반응 등에 의해 활성화된 큰포식세포를 위시한 여러 종류의 세포에 의해서 발현된다.<sup>7</sup> 세 가지 NOS는 모두 뇌 기능에 영향을 미칠 수 있는데 eNOS에 의해 생성된 일산화질소는 신경 조직내의 혈관을 확장시키고 뇌 혈류를 조절하며, nNOS는 주로 신경 세포 내에 존재하여 신경 전달 물질로 작용하고 있다.<sup>8</sup> iNOS는 정상 상태의 신경계에서는 발현되지 않으나 자극에 의해 활성화된 미세아교세포 등에서 발현될 경우 단시간 내에 대량의 일산화질소를 생성하는데 그 양은 nNOS가 만들어내는 일산화질소량보다 약 100배에서 1,000배 많다.<sup>9</sup> 이러한 대량의 일산화질소는 산소가 있는 환경에서 자가 산화하여 각종의 질소 화합물을 형성한다.<sup>10</sup> 그 결과로 만들어진  $NO_2$ 나  $N_2O_3$ 같은 기체는 발암물질인 nitrosamine의 전구 물질이 될 수 있으며, nitrite나 nitrate 그리고 peroxyxynitrite anion 등으로 변환될 수 있다. 이 질소화합물들은 중양 세포, 체내로 침입한 미생물, 그리고 감염된 세포에 강력한 독성 물질로 작용 할 뿐 아니라 조직 내 정상 세포에도 손상을 유발한다.<sup>11-13</sup>

iNOS는 발생기에 일시적으로 발현될 수 있으나 정상 상태인 뇌에서는 발현되지 않는다.<sup>14</sup> iNOS는 체외 세포 배양실험에서 세균 외벽의 인지질(lipopolysaccharides, LPS)이나 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )와 같은 시토카인의 단독 혹은 병합 투여로 큰포식세포, 별아교세포, 미세아교세포에서 발현이 일시적으로 증가한다고 알려져 있다.<sup>15-17</sup> 동물 실험에서는 인지질에 의해 뇌의 미세아교세포와 별아교세포에서 iNOS가 발현되었다.<sup>18-20</sup> 이러한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 여러 병리적 상황에서 iNOS의 발현에 의한 일산화질소의 생성이 세포 손상에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 아교세포가 활성화되면 시토카인이나 일산화질소와 같은 자유 유리가 생성되고 이들이 뇌의 염증을 유발하고 동시에 신경세포사를 야기하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 iNOS의 발현을 알츠하이머병 환자의 신경세포나 해마, 소뇌과립신경세포의 일차 배양을 통해 확인함으로써<sup>5,21,22</sup> 신경세포에서도 iNOS의 발현이 증명되고 있으나, 아직 신경세포 자신이 스스로 iNOS를 발생시키고 그에 따른 세포자멸사가 초래되는지에 대한 연구는 미비한 상태다. 그러나 신경세포사는 아교세포의 활성화와 밀접한 연관성을 가지는 것으로 보고되었지만,<sup>23</sup> 신경세포 스스로가 iNOS를 발현한다면 아교세포에 의한 신경세포사뿐만 아니라 신경세포 자신의 독성으로도 세포사에 이를 수 있음을 시사한다.

본 연구는 신경세포의 특징을 가지는 PC12 세포를 사용하여 인지질, IFN- $\gamma$  그리고 TNF- $\alpha$ 를 병합 처리하여 배양세포의 세포자멸사가 일어나는 조건을 확립하고, 이때 PC12 세포에서 iNOS 발현 유무와 발현 정도 및 일산화질소 생성 정도를 관찰

함으로써 PC12 세포에서 발현된 iNOS에 의해 생성된 일산화질소가 세포자멸사에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

## 재료와 방법

### PC12 세포주 배양 및 세포자멸사 유도

#### 세포주 배양

PC12 세포주(한국 세포주 은행, Seoul, Rep. Korea)의 배양을 위해서 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)가 첨가된 RPMI1640 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.) 배지를 사용하였고, 배양 기간 동안 5%  $CO_2$  상태를 유지하였다. 배양세포가 바닥 면적의 90% 가량 차도록 자라면 계대 배양을 하였는데, 이때 PC12 세포주를 신경세포로 분화시키기 위해 nerve growth factor (NGF) (50 ng/mL, R&D, Minneapolis, MN, U.S.A.)와 1% fetal calf serum (FCS)을 첨가한 RPMI1640 배지에서 12일 동안 배양하였다.

#### 세포자멸사 유도

신경세포로 분화한 PC12 세포의 배지를 모두 제거하고 이어 신선한 RPMI1640으로 한 번 세척한 후 1% FCS와 NGF가 포함된 RPMI1640에 LPS (10  $\mu$ g/mL, *E. coli* 0127:B8, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.), IFN- $\gamma$  (10 ng/mL, R&D, Minneapolis, MN, U.S.A.)을 첨가한 배지를 사용하였으며 5%  $CO_2$  상태를 유지하면서 각각 3시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일간 배양하였다.

### 조직내 세포자멸사 검사(Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUDP biotin nick end-labeling, TUNEL)

커버글라스 위에 키운 세포를 4% paraformaldehyde에 고정 한 후 인산염완충액 (0.1 M, pH 7.4)로 세척한 다음 *in situ* apoptosis detection kit (Roche, Indianapolis, IN, U.S.A.)를 사용하여 정해진 검사 순서에 따라 시행하였다. 요약하면 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 0.6%  $H_2O_2$  용액에 20분간 반응시키고 인산염완충액으로 수세하였다. 다음 세포의 투과성을 높이기 위해 0.1% TritonX-100이 함유된 0.1% sodium citrate 용액을 상온에서 1분간 처리하고 다시 인산염완충액으로 수세하였다. 이어 TdT와 dNTP mix가 섞인 반응액과 2가 양이온 및 TdT 혼합 용액에 담가 37°C 항온조에서 90분간 반응시켰다. 다시 인산염완충액으로 충분히 수세하여 반응을 종료시킨 후 streptavidin-HRP 용액을 30분간 처리하여 diaminobenzidine (DAB)으로 갈색이 나오도록 발색시킨 후 Meyer hematoxylin 용액으로 대조염색을 하였다.

## 투과전자현미경 검사

단층으로 자란 세포를 인산염완충액으로 수세한 후 100 mm의 plate에 1 mL의 인산염완충액을 넣고 긁어서 세포를 모은 후 400×g에서 10분간 원심분리하여 세포를 가라 앉혔다. 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)로 전 고정하고, 1% OsO<sub>4</sub> 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 실온)으로 후 고정한 다음, 계열 ethanol에 탈수, propylene oxide로 치환한 후 epon mixture에 포매하였다. 포매된 조직은 1 μm 두께로 박절하고 alkali-toluidine blue로 염색하여 관찰 부위를 결정한 다음, 40-60 nm 두께로 초박절하였다. 초박절한 조직은 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 하여 가속전압 75 kV에서 Hitachi H-7000 (Hitachi, Ibraki-ken, Japan) 전자현미경으로 관찰하였다.

## 일산화질소 측정

일산화질소 대사과정에서 발생하는 여러 가지 질소 화합물 중 안정된 형태의 최종 산물인 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 측정함으로써 일산화질소의 양을 결정하였다. 인지질, TNF-α 그리고 IFN-γ를 처리하여 세포의 자멸사를 유도한 PC12 세포주의 세포 배양으로 얻은 세포 배양액 100 μL와 동량의 Griess 반응액 (40 mg/mL, Sigma)를 잘 섞은 다음 96 well plate에서 15분간 반응시켰다. 그 후 microtiter plate reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite standard curve로부터 nitrite의 농도를 결정하였다.<sup>25</sup>

NOS와 경쟁적으로 일산화질소 생성 기질인 L-arginine과 반응하여 NOS의 일산화질소 생성 효과를 억제하는 NMMA (N-monomethyl L-arginine) 최종 농도가 1 mM 되게 하여 24시간 동안 처리한 후 일산화질소의 생성 양상을 관찰하였다.

## iNOS mRNA 역전사중합효소연쇄반응

### RNA 분리

단층으로 자란 세포를 인산염완충액으로 수세한 후 지름 100 mm의 plate에 Life Technologies사의 TRIzol 용액 1 mL 첨가하여 피펫으로 여러번 통과시켜 용액화시켰다. Cell lysate를 즉시 polypropylene tube로 옮겨 0.2 mL의 chloroform을 넣고 잘 섞어준 다음 3분간 상온에서 반응시키고, 4°C 15,000×g에서 7분간 원심분리하여 생긴 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞어준 후 상온에서 10분간 반응시키고 15,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 생긴 침전물을 75%의 알코올을 첨가하여 vortex한 후 7,500×g에서 5분간 원심분리하여 용액을 털어낸 다음 침전물을 공기 중에서 말린 후 각각의 튜브마다 30 μL의 RNase free water를 첨가하여 녹인 후 원액을 100배 희석하여 260 nm 파장에서 정량을

하였다. RNA를 분리하는데 사용된 용기와 용액은 모두 0.1% 4-diethyl pyrocarbonate를 처리하였다.

### cDNA 합성

각각의 튜브에 전체 RNA의 양이 5 μg, Oligo dT primer를 0.5 μg 되게 넣고 전체 부피가 11 μL되게 첨가하여 70°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에서 2분간 반응시켰다. 이 반응액에 10X polymerase chain reaction (PCR) buffer 2 μL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 μL, 10 mM dNTP mix 1 μL, 0.1 M DTT를 2 μL, RNase inhibitor 1 μL (40 units)를 첨가하여 42°C에서 5분간 반응시키고 여기에 reverse transcriptase 1 μL (200 units)를 첨가하여 42°C에서 50분간 반응시켰다. 그 후 75°C에서 15분간 반응시켜 반응을 종료시킨 후 얼음에서 5분간 반응시켜 cDNA를 만들었다.

### iNOS 중합효소연쇄반응과 전기영동

중합효소연쇄반응에 사용된 각각의 primer 서열은 다음과 같다.

β-actin sense primer:

5'-TTG TAA CCA CCT GGG ACG ATA TGG-3'

β-actin antisense primer:

5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3'

iNOS sense primer:

5'-GAT CAA TAA CCT GAA GCC CG-3'

iNOS antisense primer:

5'-GCC CTT TTT TGC TCC ATA GG-3'

각각의 중합효소연쇄반응 산물의 크기는 β-actin은 764 bp, iNOS는 576 bp이다. 중합효소연쇄반응 반응액의 조성은 다음과 같다. 10×PCR Buffer 5 μL, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 μL, 10 mM dNTP mix 1 μL, β-actin sense primer (10 μm) 1 μL, β-actin antisense primer (10 μm) 1 μL, amplification sense primer (10 μm) 1 μL, amplification antisense primer (10 μm) 1 μL, Taq DNA polymerase (5 units/μL) 0.5 μL, cDNA (from the first strand reaction) 2 μL을 넣고 멸균증류수로 최종 부피가 50 μL가 되도록 하였다.

위의 반응액을 95°C에서 5분간 반응시키고, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초간, 72°C에서 1분씩 30 cycle을 수행한 후 72°C에서 5분간 반응시키고 2% agarose gel에서 전기영동하여 자외선 하에서 사진을 찍었다.

### 반정량 분석

ID Main (Bioneer, Taejeon, Rep. Korea) 프로그램을 사용하여 각각의 시료당 2-3개의 강도를 결정하여 평균값으로 준정량 분석하였다.

## Western blotting을 이용한 iNOS와 nNOS 발현 양상

단층으로 자란 세포를 0.1 mg/mL phenylmethyl sulfonyl fluoride가 포함된 차가운 인산염완충액으로 두 번 씻어 준 후 세포를 모아 4°C 500×g에서 10분간 원심분리하여 cell lysate를 얻었다. 여기에 lysis buffer (20 mM tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM benzamidine)로 세포를 파쇄하였다. 단백 정량 후 sample loading buffer (0.0625 M tris-HCl pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 0.001% bromophenol blue)와 섞어 5분간 끓여 단백 시료를 준비한 다음 7% Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에 한 줄에 200  $\mu$ g씩 단백질을 loading 하고 40 mA로 2시간 동안 전기영동을 하였다.

전기영동이 끝난 후 nitrocellulose membrane으로 transfer한 다음 TTBS buffer (25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20)에 2.5% bovine albumin을 녹인 용액으로 차단한 후 일차 항체인 iNOS, nNOS와 반응시키고 이차 항체로 horseradish peroxidase-conjugated IgG를 사용하였다. Amersham사의 electrochemiluminescent (ECL) kit (Piscataway, NJ, U.S.A.)로 blot 결과를 얻었고 전기영동과 transfer는 Bio Rad (Hercules, CA, U.S.A.) 제품의 사용 설명서를 참조하여 시행하였다.

단백질 정량은 표준 물질로 BSA (bovine serum albumin, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)를 사용하여 Bicinchoninic

Acid (BCA) 방법에 따라 정량하였다.

## 결 과

### 조직내 세포자멸사 검사와 투과전자현미경 검사 소견

TUNEL 검사는 세포의 핵이 흑갈색으로 빈틈없이 염색이 된 것을 양성으로 판정하였으며, 세포의 핵이 갈색을 띠더라도 염색 질 모양이 남아 있는 것은 위양성 반응으로 이들은 양성 세포에 포함시키지 않았다. 무처리 대조군은 TUNEL 양성 세포가 거의 관찰되지 않았으나 배양액에 인지질과 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 를 첨가하고 24시간이 경과한 실험군에서는 양성 세포수가 현저하게 증가되었다(Fig. 1A, C). 또한 인지질과 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 를 투여한 후 NOS 저해제인 NMMA를 투여한 실험군에서 TUNEL 양성 세포의 수가 현저하게 감소되었다(Fig. 1B, D).

TUNEL 양성 세포의 세포자멸사 여부를 확인하기 위한 투과전자현미경 검사 소견으로 세포자멸사가 일어난 세포의 핵은 염색질이 농축되어 있고 농축된 염색질이 핵막 주변에 응결되는 전형적인 세포자멸사의 소견을 나타내었다(Fig. 2).

### 배지내 일산화질소 농도측정 결과

배양세포의 일산화질소 생성을 알아보기 위해서 인지질과 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 를 투여한 후 시간대별로 배지내의 일산화질

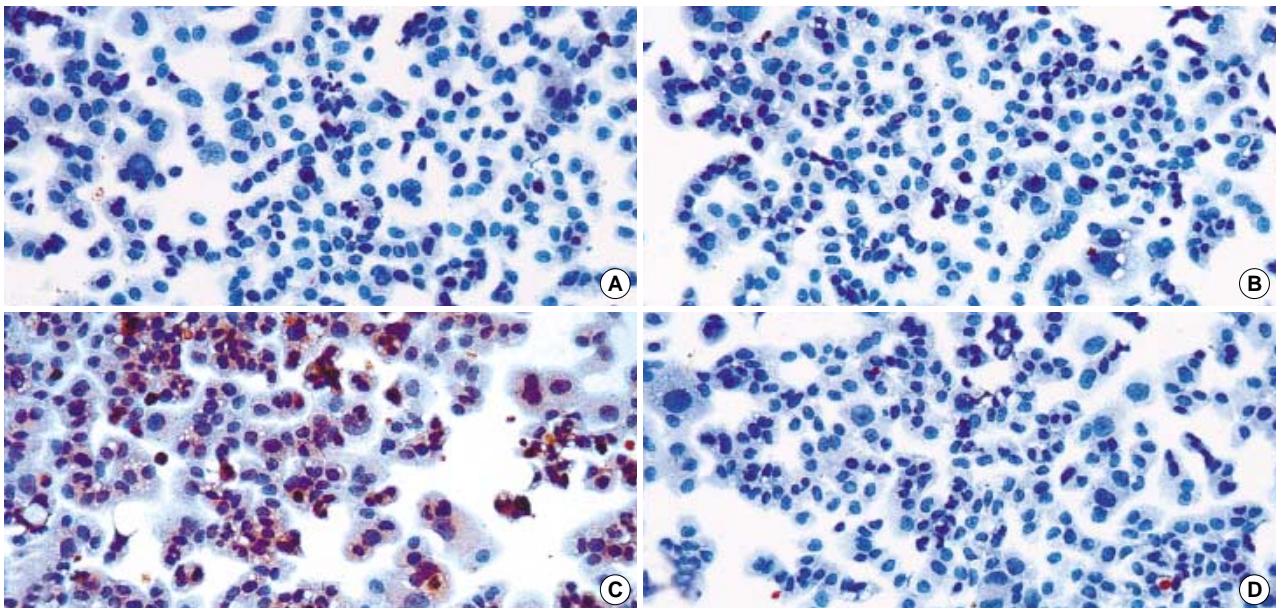


Fig. 1. DNA breaks are detected by using the terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUDP biotin nick end-labeling (TUNEL) method. Stimulation of cells with lipopolysaccharide (LPS)/tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )/Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) for 24 hours (C) reveal numerous TUNEL positive cells. The control PC12 cells (A), non-treated PC12 cells with N-monomethylarginine (NMMA) (B), and the cells co-incubated with LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  and NMMA (D) show a few TUNEL positive cells.

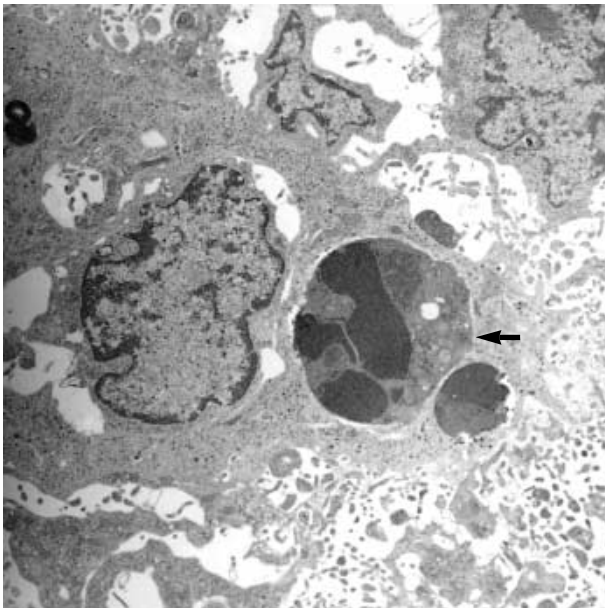


Fig. 2. Electron microscopic photomicrograph illustrating the apoptotic PC12 cell. The apoptotic cell shows chromatin condensation and fragmentation of nucleus ( $\times 3,000$ ).

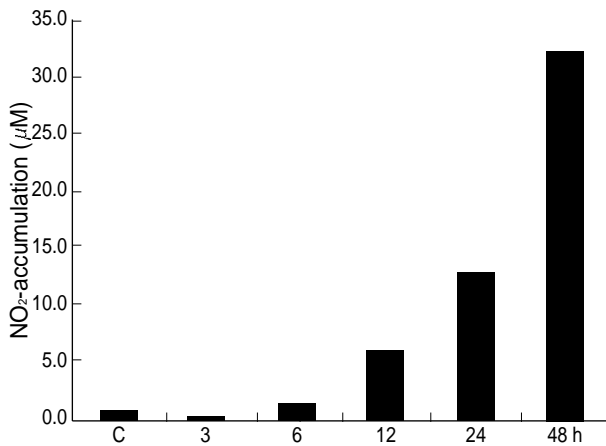


Fig. 3. Representative example of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> accumulation in culture media. The culture media of experimental group which treated with lipopolysaccharide (LPS)/Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )/Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) reveal that the accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> is definite at 6 hours and increase until 48 hours after LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  stimulation. C; control.

소의 양을 측정하였다. 인지질과 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 를 투여한 실험군은 6시간 이후부터 일산화질소 생성이 시작되었고 이는 시간이 지날수록 그 양이 증가하여 48시간 후에는 최고치를 나타내었다. 그러나 대조군은 일산화질소를 거의 생성하지 않았다 (Fig. 3). 또한 인지질/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 를 투여하고 여기에 NOS 저해제인 NMMA를 처리한 실험군은 일산화질소 생성이 현저하게 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 4).

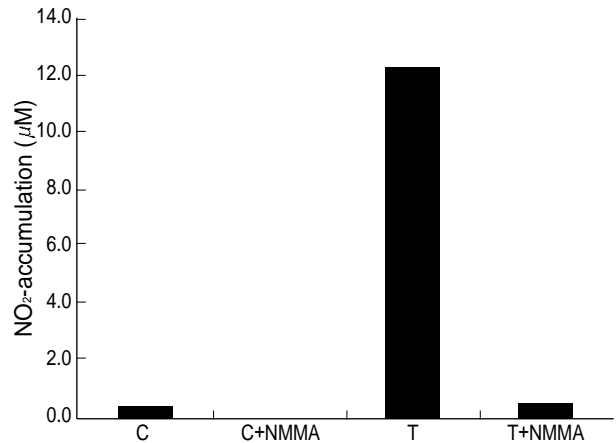


Fig. 4. The graph illustrates the effect of NOS inhibitor N-monomethylarginine (NMMA). The amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> production is profoundly decreased in lipopolysaccharide (LPS)/tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )/Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and NMMA co-incubated group. C; control, C+NMMA; PC12 cells are cultured in media for 24 hour containing the 1 mM NMMA, T; PC12 cells are treated with LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 24 hour, T+NMMA; PC12 cells are treated with LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 24 hour with 1 mM NMMA.

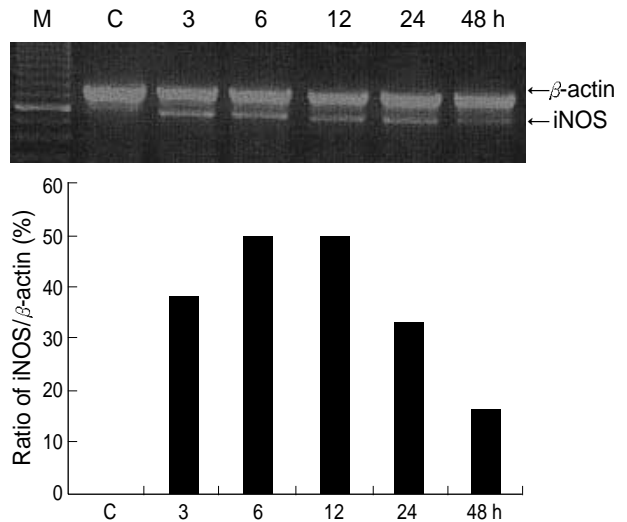
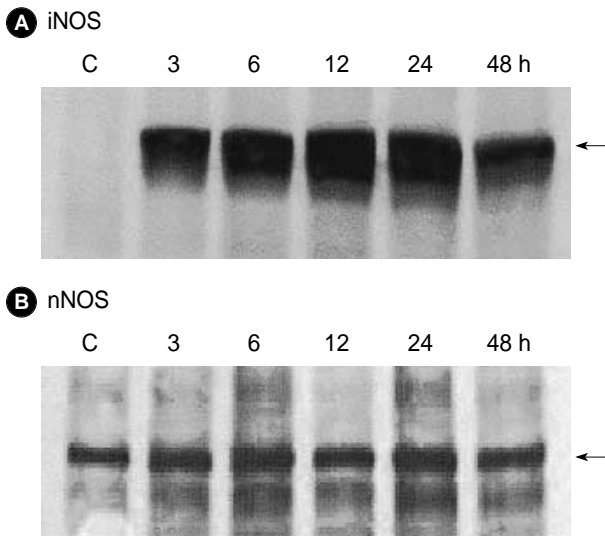


Fig. 5. Semi-quantitative analysis of inducible nitric oxide synthase mRNA expression in response to lipopolysaccharide (LPS)/tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )/Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in neuronally differentiated PC12 cells. Agarose gel electrophoresis (upper panel) and densitometric analysis (lower panel).  $\beta$ -actin is taken as a standard in the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) studies. iNOS mRNA arises at 3 hours, peaks at 12 hours and declines until 48 hours after LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  incubation.

### PC12 세포주내의 iNOS 역전사중합효소연쇄반응 및 western blotting 결과

iNOS mRNA 발현 정도를 관찰하기 위해서 반정량 역전사



**Fig. 6.** Western blot analysis of inducible nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase protein levels in response to lipopolysaccharide (LPS)/tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )/interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in neuronally differentiated PC12 cells. iNOS protein arises at 3 hours, peaks at 24 hours after LPS/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  incubation, and then declines (upper panel). Both control and experimental groups reveal the same levels of nNOS protein expression (lower panel).

중합효소연쇄반응을 수행한 결과 무처리 대조군은 iNOS mRNA의 발현이 관찰되지 않았다. 반면 인지질과 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 를 배지에 투여한 실험군은 투여 후 3시간부터 iNOS mRNA가 발현되었으며, 이는 12시간 후 최대치를 나타내었고 이후 감소하였다(Fig. 5).

iNOS 단백을 관찰하기 위한 western blotting 결과 인지질과 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 를 배지에 투여한 실험군은 iNOS 단백질이 3시간 후부터 발현되기 시작해서 12시간 및 24시간 후 가장 증가하였고 그후 감소하는 양상을 나타내었다. 반면 대조군에서는 iNOS 단백질이 발현되지 않았다. iNOS 발현의 위양성 여부를 판단하기 위하여 nNOS에 대한 western blotting을 시행하였으며 그 결과 대조군과 실험군 모두에서 nNOS가 발현되었으나 양자간의 차이가 없었다. 또한 시간의 경과에 따른 변화를 나타내지 않았다(Fig. 6).

## 고 찰

지금까지 중추신경계에서 인지질이나 시토카인을 매개로 iNOS의 발현을 유도한 실험은 주로 아교세포의 체외 세포배양 실험을 통해 이루어졌는데, 특히 별아교세포나 미세아교세포의 일차 배양이나 별아교세포의 한 종류인 C6 glioma cell line 등이 이용되었다. 또한 동물 실험에서 뇌실질에 인지질이나 시토카인을 주입함으로써 뇌 조직의 손상이 초래되고 이때 뇌 버팀

질 조직의 별아교세포나 미세아교세포에서 iNOS 발현이 유도되었다고 보고된 바 있다. 이와 같이 뇌 조직에서 iNOS의 발현은 주로 아교세포에서 일어나며 이들이 생성한 대량의 NO는 해당 부위 신경세포에 세포자멸사를 위시한 심각한 손상을 초래할 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 알츠하이머병 환자의 뇌 신경세포 중 신경섬유 농축체(neurofibrillary tangle)가 있는 신경세포에서 iNOS가 발현되었다는 보고가 있다. 또한 소뇌과립신경세포의 일차 배양이나 쥐의 뇌 신경세포 배양 혹은 PC12 세포 등에서도 iNOS의 발현을 증명한 연구들이 보고된 바 있다.<sup>5,21,22</sup> 그러나 아직까지 신경세포에서 iNOS가 발현되는 기전은 확실하게 규명되어 있지 않으며, iNOS에 의한 NO 생성과 이에 따른 신경세포 손상의 양상도 밝혀져 있지 않다.

배양세포에서 세포자멸사를 유발하기 위한 방법으로는, 배양세포로부터 혈청이나 배양인자를 제거하거나 배양세포에 항암제 등의 화학물질을 처리하거나 자외선이나 방사선을 이용하여 물리적으로 처리하는 방법 등이 알려져 있다.<sup>24</sup> 신경계의 각종 병리적인 상황의 예를 들면 신경계의 감염 질환이나 외상성 병변, 허혈성 장애, 외독소에 의한 신경 손상과 탈수조성 병변이나 신경 퇴행성 질환 등의 병리 기전에서 염증 세포의 침윤이나 아교세포의 활성화가 일어나며, 이들이 분비하는 시토카인이 질병의 발생과 진행에 중요한 역할을 할 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 사이토카인 중 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 를 선택하였고, 여기에 이들 시토카인의 생산과 분비를 자극할 수 있는 물질인 인지질을 함께 사용하였다.<sup>25-27</sup> 본 연구에서 사용한 세포는 신경세포의 특징을 가지는 세포주로 널리 쓰여지고 있는 PC12 세포주를 실험 재료로 선택하여 TNF- $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ , 그리고 인지질을 혼합하여 세포배양액에 투여하고 이들 세포에서 발현되는 iNOS를 준정량분석 하였으며 또한 iNOS에 의해 생성되는 일산화질소를 정량분석하였다. 또한 이와 동반된 PC12 세포의 세포자멸사양상을 관찰하여 iNOS와 세포자멸사의 상관관계를 규명하였다.

본 실험에서 인지질/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 에 의한 PC12 세포의 일산화질소의 생성 양상을 관찰한 결과, 6시간이 경과한 후 배지 내 일산화질소가 처음 측정되었으며 이는 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 48시간이 경과한 후에는 약 대조군의 30배 이상 증가하였다. 이는 자극을 받은 PC12 세포는 대량의 일산화질소를 생성할 수 있음을 나타내는 것이다. 이는 C6 glioma cell line에 인지질(100 ng/mL), IFN- $\gamma$  (100 units/mL), 그리고 TNF- $\alpha$  (10 ng/mL)를 처리하였을 때 30  $\mu$ M 가량의 nitrite가 생성되고, 일차 배양한 별아교세포에 저산소증 유발과 함께 IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)를 처리한 후 24시간이 경과하였을 때 18  $\mu$ M 정도의 일산화질소가 생성되었다는 다른 연구 결과와 비슷한 양상이다.<sup>23,24</sup> 이러한 일산화질소의 생성에 관여하는 NOS의 종류를 확인하기 위하여 iNOS mRNA와 단백질의 발현 양상을 측정하였다. 그 결과 대조군에서는 iNOS mRNA나 단백질이 전혀 측정되지 않았으나, 인지질/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 를 투여한 PC12 세포에서 iNOS mRNA는 3시간 후부터 발현되어 12

시간대까지 계속 증가하다가 이후 감소하였고, iNOS 단백질은 3 시간 후부터 나타나기 시작하여 24시간까지 증가하다가 이후 감소하였다. 그에 반해 nNOS는 대조군과 실험군 모두에서 발현되었으며 발현 정도에도 별다른 차이가 없었다. 이러한 결과는 인지질/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처치로 초래된 PC12 세포의 일산화질소 대량 생산에는 PC12 세포에서 발현된 iNOS에 의한 것임을 증명한다고 생각된다. 이것은 미세아교세포나 PC12 세포주에서 인지질이 여러 시토카인 처치로 iNOS 발현이 12시간과 24시간 사이에 최고치를 이룬다는 다른 연구와 일치되는 결과이다.<sup>27,28</sup>

본 실험에서 iNOS의 발현이 최대치를 이루는 시점인 인지질/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리 후 24시간대에 세포자멸사를 TUNEL로 관찰한 결과, 세포자멸사 양성 세포수가 현저하게 증가되었으며 이들 세포는 투과 전자현미경 하에서 염색질이 핵막 주변으로 응결되고 세포핵의 농축이 일어나는 전형적인 세포자멸사의 형태학적 특징을 나타내는 것을 확인하였다. 그리고 NOS 저해제인 NMMA를 처리하였을 때 PC12 세포에서 일산화질소 생성 능력이 강력하게 억제되었으며 이에 따라 일산화질소의 생산량이 감소하였다. 또한 같은 시간대에 관찰한 TUNEL 검사에서 세포자멸사 양성 세포수가 현저하게 감소되는 것을 확인하였다. 따라서 본 실험의 결과에 의하면 인지질, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$  처리에 의한 PC12 세포의 세포자멸사에는 대량의 일산화질소가 관여함을 알 수 있고 이러한 대량의 일산화질소 생성은 PC12 세포에서 발현된 iNOS와 직접적인 관계가 있음을 알 수 있었다. Michael T. *et al.*이 발표한 바에 의하면, 신경세포 분화를 보이는 PC12 세포에서 시토카인에 의해 유도된 iNOS mRNA와 iNOS 단백질은 시토카인 처리 4시간 이후에 증가하기 시작해서 24시간까지 지속하는 것으로 나타났다.<sup>29</sup> 본 실험에서는 iNOS mRNA는 시토카인 처리 3시간 후부터 발현되어 12 시간대까지 증가하다가 그 이후 감소한 반면, iNOS 단백질은 시토카인 처리 3시간 후부터 발현되어 24시간까지 증가하였다. 또한 인지질/TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 에 의한 PC12 세포의 일산화질소 생성 양상은 6시간이 경과한 후 처음 측정되고 48시간이 경과할 때까지 증가하였다. 따라서 시토카인에 의한 iNOS mRNA 발현이 감소하고 난 이후에도 12시간까지 iNOS 단백질이 생산되고, iNOS 단백질 생산이 감소되고 난 이후에도 24시간까지 일산화질소가 생산되는 것을 알 수 있다.

이상과 같은 본 논문의 결과는 인지질과 TNF- $\alpha$  및 IFN- $\gamma$ 가 PC12 세포에 자극을 가했을 때 iNOS가 발현되며 여기서 생성된 대량의 일산화질소는 PC12 세포의 세포자멸사에 직접적인 관계가 있다는 것을 객관적으로 증명한 것이라 볼 수 있다. 본 논문의 결과와 다소 상반된 것으로 NGF 처리를 줄였을 때 일산화질소가 PC12 세포의 세포자멸사를 지연시킨다거나, 신경세포로 충분히 분화된 PC12 세포주는 오히려 일산화질소의 독성에 저항성을 나타낸다는 보고가 있다.<sup>29,30</sup> 이러한 다소 다른 연구 결과는 일산화질소의 생물학적 작용의 다양성을 시사하는 것이며, 일산화질소와 시토카인 그리고 자유 유티기 등이 복합

적으로 관계하는 것으로 알려진 신경퇴행성 질환을 비롯한 각종 신경계 질환을 이해하는 데 있어 일산화질소의 생물학적 작용을 규명하는 것이 필수적이라 생각된다. 더하여 아직 완전히 알려져 있지 않은 신경세포의 일산화질소 생성과 세포자멸사의 신호 전달 기전에 관한 자세한 분석은 앞으로 연구되어야 할 것이다.

## 참고문헌

1. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 477-81.
2. Torrealles F, Salman-Tabcheh S, Guerin M, Torrealles J. Neurodegenerative disorder: the role of peroxynitrite. *Brain Res Rev* 1999; 30: 153-63.
3. Endoh M, Maises K, Wager J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res* 1994; 651: 92-100.
4. Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, *et al.* Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 1996; 72: 355-63.
5. Vodovotz MS, Lucia KC, Flanders L, *et al.* Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* 1996; 184: 1425-33.
6. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
7. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915-8.
8. Dawson TM, Zhang J, Dawson VL, Snyder SH. Nitric oxide: cellular regulation and neuronal injury. *Prog Brain Res* 1994; 103: 365-9.
9. Kuo PC, Abe KY. Cytokine-mediated production of nitric oxide in isolated rat hepatocytes is dependent on cytochrome P-450III activity. *FEBS Lett* 1995; 360: 10-4.
10. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. ADP-ribosylation as a mechanism for the action of nitric oxide in the nervous system. *New Horiz* 1995; 3: 86-92.
11. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12: 274-7.
12. Gentikoni SN, Mazzone M, Portale G, Carbone L. Nitric oxide. A general review about the different roles of this innocent radical. *Minerva Med* 2001; 92: 167-71.
13. Murad F. Nitric oxide signalling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? *Recent Prog Horm Res* 1998; 53: 43-59.
14. Galea E, Reis DJ, Xu H, Feinstein DL. Transient expression of calcium-independent nitric oxide synthase in blood vessels during

- brain development. *FASEB J* 1995; 9: 1632-7.
15. Zhao ML, Liu JS, He D, Dickson DW, Lee SC. Inducible nitric oxide synthase expression is selectively induced in astrocytes isolated from adult human brain. *Brain Res* 1998; 813: 402-5.
  16. Suk KH, Lee JS, Hur JY, *et al.* Activation-induced cell death of rat astrocytes. *Brain Res* 2001; 900: 342-7.
  17. Lee P, Lee J, Kim S, *et al.* NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells. *Brain Res* 2001; 892: 380-5.
  18. Heiko P, Heiko N, Jorg P, Gerald W, Helmut S. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: *in vitro* and *in vivo* studies. *Glia* 2000; 32: 51-9.
  19. Kitamura Y, Takahashi H, Matsuoka Y, *et al.* *In vivo* induction of inducible nitric oxide synthase by microinjection with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Glia* 1996; 18: 223-43.
  20. Park SK, Murphy S. Duration of expression of inducible nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurosci Res* 1994; 39: 405-11.
  21. Serou MJ, DeCoster MA, Bazan NG. Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J Neurosci Res* 1999; 15: 58: 593-8.
  22. Minc-Golomb D, Tsarfaty I, Schwartz JP. Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokine. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 720-2.
  23. Rothwell NJ. Neuroimmune interactions: the role of cytokines. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 841-7.
  24. Danno K, Horio T. Formation of UV-induced apoptosis relates to the cell cycle. *Br J Dermatol* 1992; 107: 423-8.
  25. de Bock F, Dornand J, Rondouin G. Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *Neuroreport* 1996; 7: 1125-9.
  26. Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis-regulation by Th1 cytokines. *J Neuroimmunol* 1995; 89: 168-76.
  27. Zhang WY, Gotoh T, Oyadomari S, Mori M. Coinduction of inducible nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in cytokine-stimulated PC12 cells and high output production of nitric oxide. *Mol Brain Res* 2000; 83: 1-8.
  28. Tamatani M, Ogawa S, Niitsu Y, Tohyama M. Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J Neurochem* 1998; 71: 1588-96.
  29. Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, *et al.* Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- $\alpha$ /lipopolysaccharide. *J Neurochem* 1998; 71: 88-94.
  30. Pahan K, Namboodiri AM, Sheikh FG, Smith BT, Singh I. Increasing cAMP attenuates induction of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. *J Biol Chem* 1997; 121; 272: 7786-91.
  31. Wada K, Okada N, Yamamura T, Koizumi S. Nerve growth factor induces resistance of PC12 cells to nitric oxide cytotoxicity. *Neurochem Int* 1996; 29: 461-7.