

정상세포종 세포에서 Hydrogen
Peroxide에 의한 Fas, Fas Ligand
및 TRAIL의 발현 조절

연세대학교 대학원

의과학사업단

권 대 호

정상세포종 세포에서 Hydrogen
Peroxide에 의한 Fas, Fas Ligand
및 TRAIL의 발현 조절

지도 최 인 홍 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

권 대 호

권대호의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

연세대학교 대학원

2000년 6월 일

감사의 글

깊은 푸르름이 눈이 부시게 아름다운 계절에 결실을 맺습니다.
연구자로서의 덕목과 자세를 일깨워 주시고 연구의 즐거움을 가르쳐주신
최인홍 교수님께 크나 큰 감사를 드립니다. 바쁘신 가운데서도 논문을 지도해 주신 김세종 교수님, 안영수 교수님, 박주영 교수님, 오영준 교수님께
도 깊은 감사를 드립니다. 언제나 연구에 대한 조언과 아낌없는 배려를 해주신 박전한 교수님께도 깊은 감사를 드리고 항상 저를 지켜봐 주신 오영근 교수님, 이은호 교수님, 김명원 교수님, 최인호 교수님께도 감사를 드립니다. 또한 연구에 많은 조언을 해주신 이해영 박사님과 신전수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 항상 어려움을 같이 했던 이서울 선배님과 동고동락했던 미생물학 교실의 연구원 선생님들과 후배들에게도 감사를 드립니다. 끝으로 걱정과 사랑으로 지켜봐 주신 부모님과 항상 기쁨을 주는 동생내외와 수빈 그리고 늘 힘이 되어준 상현에게 감사와 사랑을 드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	9
1. 세포주의 배양	9
2. 세포죽음의 측정	9
3. H ₂ O ₂ 와 시약의 처리	10
4. 전체 RNA의 분리 및 cDNA의 합성	10
5. Fas, Fas ligand, TRAIL, TRAIL 수용체 및 bcl-2 mRNA 의 측정	11
6. Fas, Fas ligand 및 TRAIL 단백질 측정	12
7. Cytotoxicity assay	13
III. 결과	15
1. H ₂ O ₂ 처리 후 정상세포종 세포의 세포죽음	15
2. 정상세포종 세포의 bcl-2 mRNA 전사	16
3. H ₂ O ₂ 처리 후 정상세포종 세포의 Fas mRNA 전사	17
4. H ₂ O ₂ 처리 후 정상세포종 세포의 Fas 단백질 발현	18
5. H ₂ O ₂ 전처리 후 정상세포종 세포에서 유발된 Fas 매개 세포고사	20

6. H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas ligand mRNA 전사 ..	21
7. H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas ligand 단백 발현 ..	23
8. H ₂ O ₂ 전처리 후 정상세포종 세포의 Fas ligand에 의한 MOLT-4 세포의 세포고사	24
9. H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 TRAIL 수용체 mRNA 전사	26
10. H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 TRAIL mRNA 전사	27
11. H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 TRAIL 단백 발현	29
12. H ₂ O ₂ 전처리 후 정상세포종 세포의 TRAIL에 의한 Peer 세포의 세포고사	30
IV. 고 찰	32
V. 결 론	39
참고문헌	41
영문요약	52

그림 차례

그림 1.	H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 세포죽음	16
그림 2.	정상세포종 세포의 bcl-2 mRNA 전사	17
그림 3.	H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas mRNA 전사	18
그림 4.	H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas 단백 발현	19
그림 5.	H ₂ O ₂ 전처리 후 정상세포종 세포에서 유발된 Fas 매개 세포고사	21
그림 6.	H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas ligand mRNA 전사 ..	22
그림 7.	H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas ligand 단백 발현	24
그림 8.	H ₂ O ₂ 전처리 후 정상세포종 세포의 Fas ligand에 의한 MOLT-4 세포의 세포고사	26
그림 9.	H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 TRAIL 수용체 mRNA 전사	27
그림 10.	H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 TRAIL mRNA 전사 ..	28
그림 11.	H ₂ O ₂ 처치 후 정상세포종 세포의 TRAIL 단백 발현	29
그림 12.	H ₂ O ₂ 전처리 후 정상세포종 세포의 TRAIL에 의한 Peer 세포의 세포 고사	31

국 문 요 약

정상세포종 세포에서 Hydrogen Peroxide에 의한 Fas, Fas Ligand 및 TRAIL의 발현 조절

뇌 손상부위에서는 산화 스트레스에 의한 세포죽음이 관찰된다. 산화 스트레스는 세포에 직접 영향을 미쳐 세포괴사 (necrosis) 또는 세포고사 (apoptosis)를 유발할 수 있으며 이차적으로는 세포고사 관련 유전자의 전사를 조절함으로써 세포죽음에 영향을 미친다. 본 연구에서는 산화 스트레스가 정상세포종 세포의 세포고사 관련 분자들의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리하여 산화 스트레스를 주고 Fas, Fas ligand, TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) 및 TRAIL 수용체의 발현을 관찰하였다. 그 결과 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리하면 Fas mRNA 전사와 단백질 발현이 증가하였으며, 효현성 항Fas 항체인 CH-11에 의한 세포고사가 증가되었다. Fas ligand mRNA 전사와 단백질 발현도 H_2O_2 처리 후에 증가하였으며, Fas ligand 매개 세포고사에 민감한 MOLT-4 세포와 반응시키면 MOLT-4 세포의 세포고사가 증가함을 관찰하였다. 이를 통하여 H_2O_2 처리로 발현이 증가된 Fas ligand가 세포고사를 유도한다는 것을 확인하였다. TRAIL mRNA 전사와 단백질 발현도 H_2O_2 처리 후에 증가하였으며 TRAIL 매개 세포고사에 민감한 Peer 세포와 반응시키면 Peer 세포의 세포고사가 증가함을 관찰하였다. 이를 통하여

H₂O₂ 처치로 발현이 증가된 TRAIL이 세포고사를 유도한다는 것을 확인하였다.

이상의 결과로 H₂O₂에 의한 산화 스트레스에 의하여 정상세포종 세포의 Fas, Fas ligand 및 TRAIL의 발현이 증가함을 관찰하였다. H₂O₂와 같은 산화 스트레스에 의하여 세포고사 관련 분자들의 발현이 조절된다면 증가된 Fas에 의하여 정상세포가 세포고사에 더 민감해질 수 있어 조직내의 항상성 유지에 기여할 수 있다. 그리고 Fas ligand와 TRAIL의 발현이 증가하는 경우 면역세포나 신경세포 등 주변 구성 세포의 세포고사를 유도할 수 있어 면역특권 또는 퇴행성뇌질환 유발에 관여하리라고 생각한다.

핵심되는 말 : 산화 스트레스, H₂O₂, 세포고사, 정상세포종 세포, Fas, Fas ligand, TRAIL

정상세포중 세포에서 Hydrogen Peroxide에 의한 Fas, Fas Ligand 및 TRAIL의 발현 조절

< 지도 최 인 홍 교수 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

권 대 호

I. 서 론

세포는 heat shock, 이온조사, 자외선 조사, 다양한 화학물질의 산화와 호흡과정에 미토콘드리아를 통해 superoxide, H₂O₂, 산소유리기를 생산하여 산화 스트레스 (oxidative stress)를 유발하고,¹ 산화 스트레스가 일어난 세포는 세포괴사 (necrosis)와 세포고사 (apoptosis)를 통하여 죽게 된다.² 산화 스트레스를 유발하는 산소유리기 또는 reactive oxygen species (ROS)의 양은 세포의 상태에 따라 다르지만 전체 소비되는 산소의 2%가량으로 추산되며 특히 중추신경계는 산화 스트레스에 민감하다.³ 산화 스트레스는 종양이나 동맥경화와 같은 혈관계 질병에서도 유발되며,⁴ 신경조직에 있어서는 뇌졸중, 간질, 파킨슨씨병 그리고 알차이머씨병과도 관련 있다.⁵ 세포가 호흡하는 동안에도 환원된 산소가 소량 생성되지만 가장 활성화된 형태인 hydroxyl radical은 뇌손상 때 생성되어 신경조직을 파괴한다. 산화 스트레스에 의한 세포죽음은 세포내의 'free radical의 생성과 제거'의 균형에

의해 결정된다. 세포내의 free radical은 원형질막의 lipoxygenases, cyclooxygenases, NADPH oxidase, 미토콘드리아의 전자전달계, 세포질의 xanthine oxidase, hemoglobin, catecholamine, riboflavin, transition metal, peroxisome의 oxidases, flavoproteins에 의하여 생산된다.⁴ Free radical의 균형은 acidosis, metals, amyloid beta-peptide, glutamate, nitric oxide, 산소, 당, 지방산의 사용이 증가하면 파괴된다.⁶ 이에 대한 보호작용을 하는 것은 catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase,⁷ glutathione,⁸ ascorbate, α -tocopherol,⁹ uric acid, α -phenyl-*tert*-butyl nitron^{10,11} 등이 있다.

세포대사 과정에서 생성된 산화유리기들은 미생물에 대한 방어기전으로 사용되기도 하지만 세포 내부로 신호를 전달하는 신호전달자 작용을 하는 경우도 있다. 간암세포,¹² 내피세포¹³와 평활근세포¹⁴ 등 다양한 세포에서 ROS가 세포의 유전자 전사를 조절하는 신호전달자 역할을 하고 있음이 밝혀졌다. 산화 스트레스를 유발하는 ROS는 protein tyrosine kinase를 활성화하거나 protein tyrosine phosphatase의 활성을 억제하기도 하며 직접 유전자 전사에 영향을 미치는 전사인자인 c-fos, c-Jun, NF- κ B, Rel, Myb 등과 세포분열과 세포고사에 영향을 주는 p53의 발현 조절에도 관여한다.¹⁵ 그리고 ROS는 염증반응에 관여하는 유착분자의 발현을 조절한다.⁴ 혈관내피 세포에서는 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 와 성장인자에 의해 superoxide가 증가하여 다시 스스로의 세포 신호전달 기전에 영향을 주는 것으로 보고되었다.¹⁶ Nitric oxide에 의해서는 NF- κ B가 활성화되고 vascular cell adhesion molecule-1의 전사가 조절된다.^{17,18} Ca²⁺은 유전자 전사, neurotransmission, 세포 운동성, 세포 성장을 유도하는 이차 신호전달자인데 산화 스트레스를 받고 있는 세포는 세포질 내로의 Ca²⁺의 양이 증가되고, Ca²⁺에 의한 신호전달이 유발된다.¹³ 또한 정상세포를 H₂O₂로 처

치하면 신호전달에 관여하는 c-Jun N-terminal kinase와 p38 MAP kinase가 활성화되며 이는 항산화제인 N-acetyl-cystein과 α -phenyl-tert-butyl nitrone에 의하여 억제된다.^{15,19} 퇴행성뇌질환과 관련하여 알짜이머씨병 환자의 뇌병변에서 활성화 산화유리기가 정상인에 비해 높다고 보고되었고, p38 MAP kinase의 활성화도 또한 높은 것으로 보고되었다.^{10,19} 산화유리기는 AP-1, NF- κ B의 활성을 조절하며, H₂O₂는 AP-1을 통해 monocyte chemoattractant protein-1²⁰과 intracellular cell adhesion molecules-1²¹의 유전자 전사를 조절하여 염증반응에 관여한다. 또한 산화 스트레스의 유리기는 NF- κ B가 활성화되는 기전에서 I κ B degradation을 유발하여 NF- κ B가 핵 내로 이동하는데 관여한다.²² ROS에 의하여 전사조절자의 활성이 변하면 이어서 표적 유전자의 전사가 변화되어 세포기능을 변화시키고 궁극적으로 세포가 변화된 환경에 적응하도록 유도한다.

산화 스트레스에 의한 세포 죽음은 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째는 산화 스트레스가 세포죽음의 직접적인 원인으로 작용할 수 있으며,² 둘째는 산화 스트레스가 세포 고사와 관련된 유전자의 전사에 영향을 주는 신호 전달자로 작용하는 것이다.^{12,23-25} 산화 스트레스에 의한 세포고사 기전으로는 미토콘드리아가 기능을 상실함으로써 시작된 신호가 caspase를 거쳐 세포고사를 유도한다는 가설이 있으며, 또 다른 가능성으로 산화 스트레스에 의하여 세포고사 관련 분자인 Fas와 Fas ligand 발현이 증가하는 것이다. 림프종세포,²³ 자연살세포,²⁴ 그리고 간암세포¹²에서 산화 스트레스에 의하여 Fas ligand의 유전자 전사가 증가하며, 내피세포에서 Fas 유전자 전사가 증가되었다고 보고되었다.²⁵

중추 신경계는 신경세포와 신경교세포로 구성되어 있으며 성상세포 (astrocyte)는 소교세포 (microglia), 희돌기교세포 (oligodendrocyte)와 더불어 신경교세포에 속한다. 성상세포는 최근까지 중추신경계에서 신경을 지지하는 수동적인 역할을 하는 것으로 여겨 왔으나 최근 들어 그 역할의 중요성이 알려지고 있다. 성상세포는 혈관 내피세포와 함께 혈-뇌 장벽 (blood-brain barrier)을 형성하며,²⁶ 신경세포의 활동전위가 유발되면서 세포 외로 방출된 K^+ 이온을 흡수함으로써 신경조직의 이온 항상성 유지에 관여한다.²⁷ 또한 신경 펩타이드²⁸와 신경전달 물질²⁹에 대한 특이 수용체와 운반체를 발현하고 있어 신경 활성도를 조절하는 기능을 수행하며, 소교세포가 생성하는 IL-1에 의해 major histocompatibility complex class II 분자를 발현하여 항원제공 세포로 작용하고,³⁰ IL-6와 신경성장인자를 분비하여 신경조직내의 면역반응에 관여한다.³¹

성상세포는 신경조직 구성 세포 중에서 산화 스트레스에 가장 강하다. 성상세포가 신경세포³²나 희돌기교세포³³에 비하여 glutamate, metal binding-protein의 작용^{34,35} 그리고 glutathione의 양이 많고 glutathione peroxidase 활성도가 크기 때문이다.^{36,37} 항산화제인 ascorbate도 신경조직 전체에 2 mM의 농도로 존재하지만 성상세포에는 10 mM의 농도로 존재하여 성상세포의 항산화성을 높여준다.^{38,39} 실제로 성상세포와 신경세포를 함께 배양하면서 산화 스트레스를 주면 신경세포의 세포죽음이 감소한다고 보고되어,^{40,41} 성상세포가 신경조직에서 산화 스트레스에 대한 보호작용을 하고 있음을 시사한다. 간질과 퇴행성뇌질환 (neurodegenerative disease) 모델의 실험동물 뇌에서 reactive gliosis가 유발되면 cystein 및 glutathione 등과 같은 항산화제의 활성도가 증가하는데 성상세포가 주된 역할을 한다고 보고되었다.^{42,43} 성상세포는 다른 신경조직 세포와 비교하여 항산화제의 양이 많으며 glutathione의 재생산 능력 또한 우수하고

ascorbate의 양이 비교적 많기 때문에 산화 스트레스에 강하며, reactive gliosis를 통하여 항산화제를 생산함으로써 산화유리기로부터 신경세포를 보호한다.⁴⁴

정상세포는 Fas와 Fas ligand를 발현하기 때문에 뇌세포의 세포죽음에 중요한 역할을 하리라 여겨진다.^{45,46} Fas는 TNF 수용기 군에 속하며 N-terminal이 세포내에 존재하는 45kDa의 type I 단백질로서 세포 내에 80여개의 아미노산으로 구성된 death domain이 있다.⁴⁷ Fas는 활성화된 T 세포 또는 자연살세포에 발현된 Fas ligand와 결합하여 중합체를 형성하고, Fas associated death domain (FADD)과 caspase 경로를 통하여 세포고사를 유발한다. Fas ligand는 40kDa의 TNF 군의 단백질로서 세포 독성을 나타내는 면역세포와 면역특권 조직에 국한되어 발현된다. 중추신경계 질병에 있어서도 Fas-Fas ligand의 결합은 세포죽음을 유도하는데 중요하다. 다발성 경화증 (multiple sclerosis) 환자에서는 병변부위의 조직에서 Fas와 Fas ligand 발현이 증가하는데,⁴⁸ 주로 정상세포와 희돌기교세포에서 Fas ligand가 발현된다.⁴⁶ TRAIL은 여러 종류의 조직에서 발현되며 TRAIL의 수용체인 DR4와 DR5를 발현하는 표적세포의 세포고사를 유도한다.^{49,50} TRAIL에 의한 세포고사는 FADD를 경유하지 않고 caspase로 연결되는 신호전달 체계를 가지고 있다는 보고가 있으며, 이는 아직도 논란이 되고있다.⁵⁰ 수용체 중에 decoy 수용체인 DcR1과 DcR2는 TRAIL의 신호를 전달할 수 있는 세포질 내 부분이 없기 때문에 TRAIL에 의한 세포고사 신호를 전달하지 못한다. 정상세포는 decoy 수용체를 발현하고 있어, TRAIL에 의한 세포고사는 종양세포에서만 선택적으로 유도되는 것으로 알려져 있다.^{49,51}

이에 본 연구에서는 산화 스트레스가 정상세포종 세포에서 세포고사와 관련된 Fas, Fas ligand, TRAIL 및 TRAIL 수용체의 발현을 조절하는지

관찰하고자 하였다. 정상세포종 세포를 hydroxyl radical을 생산하는 H_2O_2 로 처리하여 산화 스트레스를 주고 세포고사 관련 유전자들의 mRNA 전사와 단백질의 발현 양상 그리고 생물학적 기능을 관찰함으로써, 중추신경계의 면역특권 유지 또는 뇌손상 때 일어나는 세포죽음과 산화 스트레스와의 연관성을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주의 배양

사람의 정상세포종 세포주인 LN215 세포와 LN319 세포는 Dr. E.G. Van Meir (Department of Neurosurgery, Laboratory of Tumor Biology and Genetics, Lausanne, Switzerland)의 연구실로부터 분양 받았다. 정상세포종 세포의 배양은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 비필수 아미노산 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 1%, 우태아 혈청 (Gibco BRL)을 10% 첨가하여 배양하였고, 사람의 T 세포 림프종 세포주인 MOLT-4 세포와 Peer 세포는 RPMI 배지 (Gibco BRL)에 우태아 혈청을 10% 첨가하여 37°C, 5% CO₂하에서 배양하였다. DMEM 배지와 RPMI 배지에는 L-glutamine 2 mM/ℓ, Penicillin-Streptomycin 10 U/ℓ 첨가하여 사용하였다.

2. 세포죽음의 측정

세포죽음은 lactic dehydrogenase (LDH) release assay⁵²와 유세포 분석 방법 (flow cytometry)을 이용하여 관찰하였다. LDH release assay는 배양액에 유리된 효소와 세포 전체의 효소 활성 비를 구함으로써 죽은 세포의

비율을 구하였다. LDH release assay를 위하여 세포를 1×10^5 세포/well로 분주한 후 H_2O_2 (Sigma)로 처리하고 각 실험군에서 세포 배양 상청액 100 μ l, 0.3 mg/ml의 β -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphatate (Sigma) 100 μ l와 22.7 mM pyruvate (sigma) 25 μ l를 혼합한 후 A_{340} 에서 O.D. 값을 측정하였다. 전체 효소의 활성은 1% Triton X-100 (Sigma)으로 처리한 후 얻은 상청액에서 측정하였다. 유세포 분석은 표적세포를 분리한 후 1,500 rpm에서 5 분간 원침한 후 annexin V-FITC와 propidium iodide (Clontech, palo Alto, CA, USA)를 이용하여 세포를 염색한 후 FACstar (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 세포죽음을 분석하였다.

3. H_2O_2 와 시약의 처리

세포의 죽음과 유전자 전사에 미치는 H_2O_2 의 영향을 관찰하기 위하여 LN215 세포와 LN319 세포를 200, 400, 600, 800, 1,000 μ M의 H_2O_2 로 처리하였고 항산화제인 catalase (Sigma)는 1,600 U/ml의 농도로 처리하였다.

4. 전체 RNA의 분리 및 cDNA의 합성

H_2O_2 로 처리한 LN215 세포와 LN319 세포를 trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 처리하여 분리한 후, modified acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 이용한 RNeasy Mini kit (Qiagen, Santa Claris, CA, USA)로 전체 RNA를 분리하였다. First strand complementary DNA

를 합성하기 위하여 전체 RNA 3 μ g에 0.1 O.D.의 random hexanucleotide primers (Pharmacia, Uppsala, Sweden)와 200 units의 Molony murine leukemia virus 역전사 효소 (Gibco BRL)를 첨가하여 42 °C에서 2 시간 반응시켰다.

5. Fas, Fas ligand, TRAIL, TRAIL 수용체 및 bcl-2 mRNA의 측정

역전사 중합효소 연쇄반응과 RNase protection assay (RPA)를 이용하여 Fas, Fas ligand, TRAIL, TRAIL 수용체 및 bcl-2의 mRNA를 관찰하였다. 합성된 cDNA에 Fas ligand, TRAIL 및 β -actin에 대한 primer를 각각 10 pg/ml의 농도로 첨가하고 1.25 U의 Taq polymerase (Perkin Elmer)를 첨가하여 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. Fas ligand에 대한 primer 염기서열은 5'-CAg AgA gAg CTC AgA gAC gTT gAC-3', 5'-ATg TTT CAg CTC TTC CAC CTA CAg AAg gA-3'이고, DcR1에 대한 primer의 염기서열은 5'-gAT CCC CAA gAC CCT AAA gTT-3', 5'-ggT TTC CAC AgT ggC ATT ggC-3'이고, DcR2에 대한 primer의 염기서열은 5'-Agg gAT ggT CAA ggT CAg TAA T-3', 5'-gAT gTC AgC ggA gTC Agc gTC-3'이고, DR4에 대한 primer의 염기서열은 5'-TTA CAC CAA TgC TTC CAA CAA T-3', 5'-Agg Agt CAA Agg gCA CgA TgT T-3'이고, TRAIL에 대한 primer의 염기서열은 5'-CCC AAT gAC gAA gAg AgT ATg A-3', 5'-ggA ATA gAT gTA gTA AAA CCC T-3'이며, β -actin에 대한 primer의 염기서열은 5'-CTg ggg CCg CCC TAg gCA CCA-3', 5'-TTg GCC TTA ggg TTC Agg ggg g-3'이

다. 중합효소 연쇄반응으로 denaturation을 94 °C에서 30 초간 시행하였으며, annealing은 59 °C에서 30 초간, extension은 72 °C에서 1 분간 시행하였다. 중합효소 연쇄반응의 완충용액은 10 mM Tris-HCl (pH 10), 2.0 mM MgCl₂, 50 mM KCl의 조성으로 사용하였다. Fas ligand를 위한 연쇄 중합 반응은 40회, TRAIL은 29회, DcR1은 35회, DcR2는 30회, DR4는 30회, β -actin은 24회를 각각 시행하였다. Fas, TRAIL, DR5와 bcl-2에 대한 RPA는 세포에서 분리한 전체 RNA 20 μ g과 RiboQuant multiprobe RNase protection assay kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 이용하여 실행하였다. 간단히 요약하면 Fas, TRAIL, DR5와 bcl-2에 대한 anti-sense RNA template와 세포에서 분리한 RNA를 hybridization 한 후 RNase를 처리하고 sequencing acrylamide gel에서 전기 영동을 시행한 후 chromatography paper에 blotting하여 autoradiography를 시행하였다.

6. Fas, Fas ligand 및 TRAIL 단백질 측정

LN215 세포와 LN319 세포에서 H₂O₂에 의한 Fas, Fas ligand와 TRAIL 단백질의 발현 변화를 측정하기 위하여 각 세포를 H₂O₂로 처리한 후 유세포 분석방법으로 Fas와 Fas ligand 단백을 측정하였고 Western blot 방법을 사용하여 TRAIL 단백질 발현을 측정하였다. Fas 또는 Fas ligand 단백을 측정하기 위하여 trypsin-EDTA로 세포를 분리하여 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 세척하고 1,500 rpm에서 5 분간 원심한 후 20 μ l의 PBS 용액으로 부유시키고 Fas 단백을 측정하기 위하여 항Fas 항체 (Becton Dickinson)와 4 °C에서 30 분간 반응시킨 후 PBS 용액으로 세척하고 1,500 rpm에서 5 분간 원심하여 FACstar로 분석하였다. Fas ligand

단백을 측정하기 위하여 항Fas ligand 항체 (Pharmingen)와 4 °C에서 30 분간 반응시키고 PBS 용액으로 세척하여 1,500 rpm에서 5 분간 원침하였다. 그 후 PBS 용액 20 μ l로 부유시킨 후 IgG-FITC (Becton Dickison)와 30 분간 반응시키고 PBS 용액으로 세척하여 1,500 rpm에서 5 분간 원침한 후 FACstar를 이용하여 분석하였다. Irrelevant 항체는 mouse IgG₁-FITC (Becton Dickinson)와 30 분간 반응시킨 후 FACstar를 이용하여 분석하였다.

TRAIL 단백을 측정하기 위하여 trypsin-EDTA로 세포를 분리하여 PBS 용액으로 세척하고 1,500 rpm에서 10 분간 원침한 후 500 μ l의 PBS 용액으로 부유시키고 초음파 분쇄기에서 10 초간 3회씩 초음파 분쇄 방법으로 세포를 파쇄한 후 12,000 rpm에서 20 분간 원침하여 상청액을 얻어 전체 단백질을 분리하였다.⁵³ 각 실험군의 전체 단백에서 20 μ g의 농도를 취하여 SDS-PAGE를 통하여 단백을 분리한 후 nitrocellulose membrane (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)에 옮기고 skim milk-PBS 용액으로 실온에서 1 시간 동안 blocking한 후 1% Tween 20 (Sigma)을 첨가한 PBST 용액으로 10 분씩 3회 세척하였다. 그 후 항 TRAIL 항체 (Pharmingen)로 2 시간 동안 실온에서 반응시키고 PBST 용액으로 10 분씩 3회 세척하였다. 그 후 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson Immuno Reserch, Baltimore, MD, USA)로 1 시간 동안 실온에서 반응시킨 후 PBST 용액으로 10 분씩 4회 세척하고 Western blotting luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 autoradiography를 시행하였다.

7. Cytotoxicity assay

Fas를 통한 LN215 세포와 LN319 세포의 세포고사율을 측정하기 위하여 우태아 혈청이 들어 있지 않은 DMEM 배지에서 2×10^5 세포/well의 LN215 세포 및 LN319 세포를 600 또는 800 μM 의 H_2O_2 로 18 시간 전처리한 후 DMEM 배지로 2회 세척하고 효현성 항Fas 항체인 CH-11 (Medical and Biological Laboratories, Watertown, MA, USA)을 250 ng/ml 또는 500 ng/ml의 농도로 24 시간 처리한 후 세포를 분리하여 1,500 rpm에서 5 분간 원심하고 annexin V-FITC와 propidium iodide로 반응시킨 후 FACstar를 이용하여 분석하였다.

LN215 세포와 LN319 세포의 Fas ligand를 통한 MOLT-4 세포의 세포고사율을 측정하기 위하여 우태아 혈청이 들어 있지 않은 DMEM 배지에서 2×10^5 세포/well의 LN215 세포 및 LN319 세포를 800 μM 의 H_2O_2 로 18 시간 전처리한 후 RPMI 배지로 2회 세척하고, 우태아 혈청이 들어 있지 않은 RPMI 배지에서 5×10^4 세포/well의 MOLT-4 세포와 함께 24 시간 배양하였다. 그 후 부유세포주인 MOLT-4 세포를 회수하여 annexin V-FITC와 propidium iodide로 염색한 후 FACstar를 이용하여 분석하였다.

LN215 세포의 TRAIL을 통한 Peer 세포의 세포고사율을 측정하기 위하여 우태아 혈청이 들어 있지 않은 DMEM 배지에서 2×10^5 세포/well의 LN215 세포를 800 μM 의 H_2O_2 로 18 시간 전처리한 후 RPMI 배지로 2회 세척하고 우태아 혈청이 들어 있지 않은 RPMI 배지에서 5×10^4 세포/well의 Peer 세포와 함께 24 시간 배양하였다. 그 후 부유세포주인 Peer 세포를 회수하여 annexin V-FITC와 propidium iodide로 염색한 후 FACstar를 이용하여 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. H₂O₂ 처리 후 정상세포종 세포의 세포죽음

본 연구에서 사용한 LN215 세포와 LN319 세포의 H₂O₂에 의한 세포죽음을 LDH release assay로 측정하였다. 그 결과 LN215 세포와 LN319 세포는 H₂O₂에 대한 민감도가 달랐다. 같은 농도의 H₂O₂에 의하여 LN215 세포에서 LN319 세포에 비하여 세포죽음이 더 많이 유발되었다 (그림 1). LN215 세포에서는 H₂O₂ 1,000 μ M로 48 시간 동안 첨가하였을 때 약 80%의 세포죽음이 유발되었으며, LN319 세포에서는 약 60%의 세포죽음이 관찰되었다. LN215 세포에서는 H₂O₂의 농도가 높아질수록 세포죽음이 더 많이 유도되었고, H₂O₂ 처리 후 시간에 따라 세포죽음이 현저하게 증가하였다. LN319 세포에서는 200-800 μ M의 H₂O₂ 농도에서 세포죽음이 유사하게 일어났으며, 48 시간까지 크게 변하지 않았다. 두 세포 모두 H₂O₂로 처리하지 않은 control 군에서는 48 시간까지 세포죽음이 변하지 않았다. 1,000 μ M H₂O₂는 두 종류의 정상세포종 세포 모두에서 세포죽음을 높게 유도하였기 때문에 세포죽음을 지나치게 유발하지 않는 600 μ M 또는 800 μ M의 H₂O₂를 이후 실험 농도로 결정하였다.

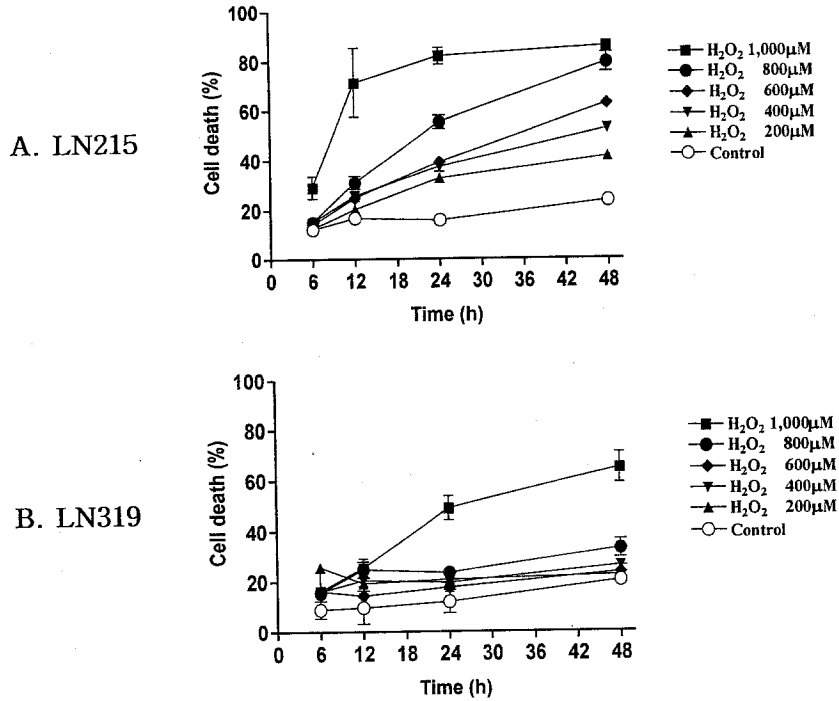


그림 1. H₂O₂ 처치 후 정상세포종 세포의 세포죽음. LN215 세포(A) 또는 LN319 세포(B)를 200, 400, 600, 800, 1000 μM의 H₂O₂로 처치하고 6, 12, 24, 48 시간 동안 배양한 후 LDH release assay로 세포죽음을 관찰하였다. Control 군은 H₂O₂ 처치하지 않은 군이다.

2. 정상세포종 세포의 bcl-2 mRNA 전사

LN215 세포와 LN319 세포의 bcl-2 mRNA 전사를 RPA로 관찰하였다.

LN319 세포에서 LN215 세포에 비하여 bcl-2 mRNA 전사가 많이 관찰되었다 (그림 2).

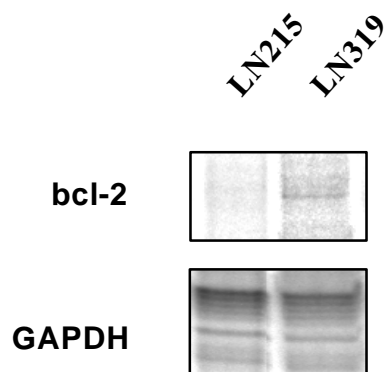


그림 2. 정상세포종 세포의 bcl-2 mRNA 전사. LN215 세포 또는 LN319 세포에서 전체 RNA를 얻어 RPA를 시행하였다. GAPDH는 대조 유전자이다.

3. H₂O₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas mRNA 전사

정상세포종 세포를 800 μ M의 H₂O₂로 처치한 후 시간별로 Fas mRNA 전사를 RPA로 관찰하였다. Fas mRNA의 전사는 두 세포 모두에서 H₂O₂로 처치한 1 시간 후부터 계속하여 증가하였다. LN215 세포에서는 24 시간까지 Fas mRNA의 전사가 지속적으로 증가하였으며, LN319 세포에서는 12 시간까지 전사가 증가하였다가 24 시간에서 감소하였다 (그림 3). LN215 세포에서는 control 군과 비교하여 4 시간에서 6 시간 사이에 1.5배로 가장 많이 증가하였고, LN319 세포는 control 군과 비교하여 6 시간에서 1.4배로 가장 많이 증가하였다.

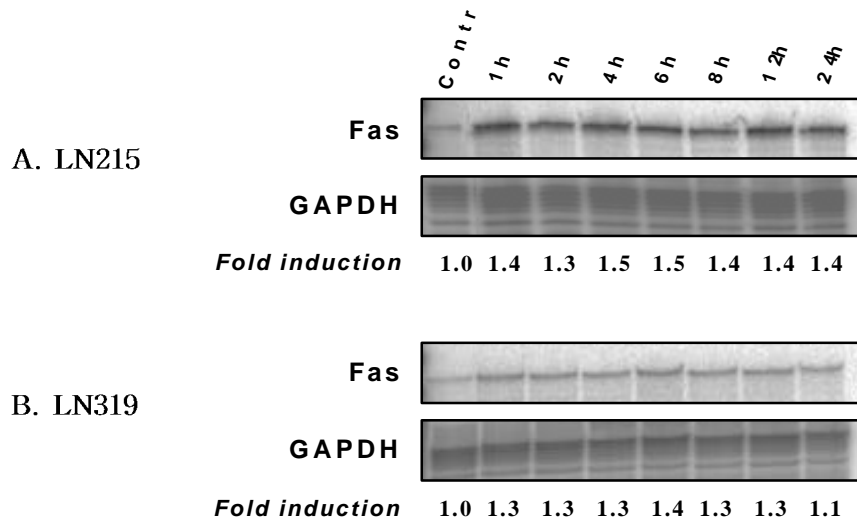


그림 3. H₂O₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas mRNA 전사. LN215 세포(A) 또는 LN319 세포(B)를 800 μ M H₂O₂로 처치하여 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 시간 배양한 후 각 실험군에서 전체 RNA를 얻어 RPA를 시행하였다. Control 군은 H₂O₂ 처치하지 않은 군이다. GAPDH는 대조 유전자이다. Fold induction은 각 실험군에서 Fas/GAPDH density 비율을 산정한 후 control 군의 값을 1.0으로 하였을 때 각 군의 상대값이다.

4. H₂O₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas 단백 발현

정상세포종 세포를 H₂O₂로 처치한 후 Fas 단백 발현을 관찰하였다. 정상세포종 세포를 H₂O₂ 600 μ M 또는 800 μ M로 18 시간 처치하고 항Fas

항체와 반응시킨 후 FACstar로 분석하였다. H₂O₂로 처리하지 않은 control 군에서 Fas의 발현은 LN215 세포에서 LN319 세포보다 높았다. 두 세포 모두 H₂O₂로 처리한 후 Fas 단백질 양성세포 비율이 LN215 세포에서는 42.2% (control)에서 62.5% (600 μ M H₂O₂) 및 68.7% (800 μ M H₂O₂)로 LN319 세포에서는 42.2% (control)에서 65.8% (600 μ M H₂O₂) 및 68.7% (800 μ M H₂O₂)로 증가하였다 (그림 4). LN215 세포에서 항Fas항체 염색 후 mean intensity 값은 14.8 (control)에서 18.2 (600 μ M H₂O₂) 및 19.6 (800 μ M H₂O₂)으로, LN319 세포에서는 10.9 (control)에서 15.3 (600 μ M H₂O₂) 및 15.8 (800 μ M H₂O₂)로 증가하였다.

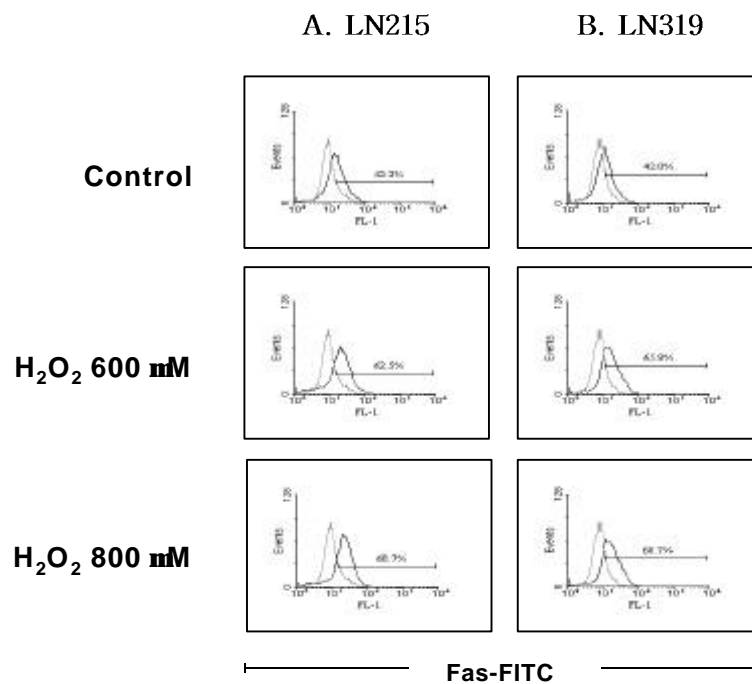


그림 4. H₂O₂ 처리 후 정상세포종 세포의 Fas 단백질 발현. LN215 세포(A) 또는 LN319 세포(B)를 600 μ M 또는 800 μ M H₂O₂로 처리하여 18 시간 배양한 후 항Fas 항체로 염색한 후 FACstar로 분석하였다. 점선은 irrelevant 항체와 반응한

것이고, 실선은 항Fas 항체와 반응한 것이다. Control 군은 H₂O₂ 처리하지 않은 군이다.

5. H₂O₂ 전처리 후 정상세포종 세포에서 유발된 Fas 매개 세포고사

H₂O₂에 의하여 발현이 증가한 Fas 단백질이 세포고사에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, H₂O₂로 전처리한 후 효현성 항Fas 항체인 CH-11을 사용하여 정상세포종 세포의 세포고사를 측정하였다. 세포고사는 annexin V와 propidium iodide 염색을 통하여 측정하였다. LN215 세포에서 H₂O₂ 전처리하지 않은 군은 세포고사율이 13.1% (annexin V 양성세포 비율)와 4.9% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율의 합)로 관찰되었고, H₂O₂ 전처리한 군은 40.3% (annexin V 양성세포 비율)와 14.0% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율의 합)로 관찰되었다 (그림 5). LN319 세포에서 H₂O₂ 전처리하지 않은 군은 세포고사율이 9.4% (annexin V 양성세포 비율)와 0.4% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율의 합)로 관찰되었고, H₂O₂ 전처리한 군은 19.1% (annexin V 양성세포 비율)와 0.3% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율)로 관찰되었다 (그림 5). 이 결과를 통하여 H₂O₂ 전처리에 의하여 증가된 Fas 단백질이 정상적으로 기능을 수행하여 세포고사를 유도함을 알 수 있었다. Control 군은 H₂O₂ 전처리한 후 CH-11을 첨가하지 않고 24 시간 더 배양한 후 세포고사를 측정한 군으로 세포죽음이 0.1% 미만이었다.

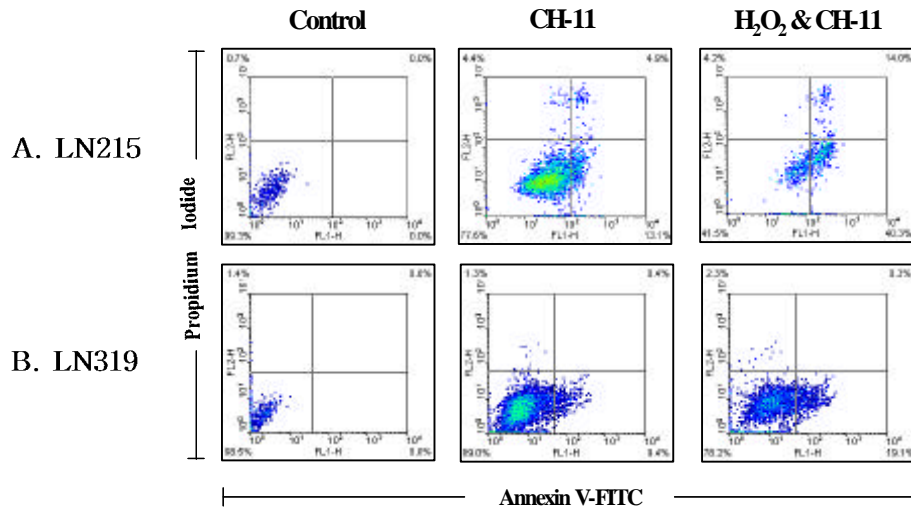


그림 5. H₂O₂ 전처리 후 정상세포종 세포에서 유발된 Fas 매개 세포고사. LN215 세포(A) 또는 LN319 세포(B)를 600 μ M(A)과 800 μ M(B) H₂O₂로 전처리하여 18 시간 배양한 후 효현성 항Fas 항체인 CH-11을 250 ng/ml(A) 또는 500 ng/ml(B)의 농도로 처리하여 24 시간 배양하고 annexin V-FITC와 propidium iodide로 염색하여 FACstar로 분석하였다. Control 군은 H₂O₂로 처리하고 18 시간 배양한 후 CH-11을 첨가하지 않고 24 시간 더 배양한 군이다. CH-11은 H₂O₂로 처리하지 않고 18 시간 배양한 후 CH-11을 첨가한 군이다. H₂O₂ & CH-11은 H₂O₂로 처리하고 18 시간 배양한 후 CH-11을 첨가한 군이다.

6. H₂O₂ 처리 후 정상세포종 세포의 Fas ligand mRNA 전사

정상세포종 세포를 H₂O₂로 처리한 후 시간과 농도별로 Fas ligand

mRNA 전사를 관찰하였다. 시간별 mRNA 전사를 관찰하기 위하여 두 세포를 800 μM 의 H_2O_2 로 처리한 후 1, 2, 4, 6, 8, 12 시간별로 mRNA 전사를 역전사 중합효소 연쇄반응으로 관찰하였다. LN215 세포는 1 시간부터 12 시간까지 지속적으로 Fas ligand mRNA 전사가 증가하였으며 control 군과 비교하여 4 시간에서 8 시간 사이에 2.3-2.7배로 전사가 증가하다가 8 시간 이후 증가 정도가 감소하였다 (그림 6). LN319 세포는 1 시간부터 8 시간까지 Fas ligand mRNA 전사가 증가하였으며 2 시간에서 4 시간 사이에 1.5배로 전사가 증가하였으며 8 시간 이후 증가 정도는 감소하였다 (그림 6).

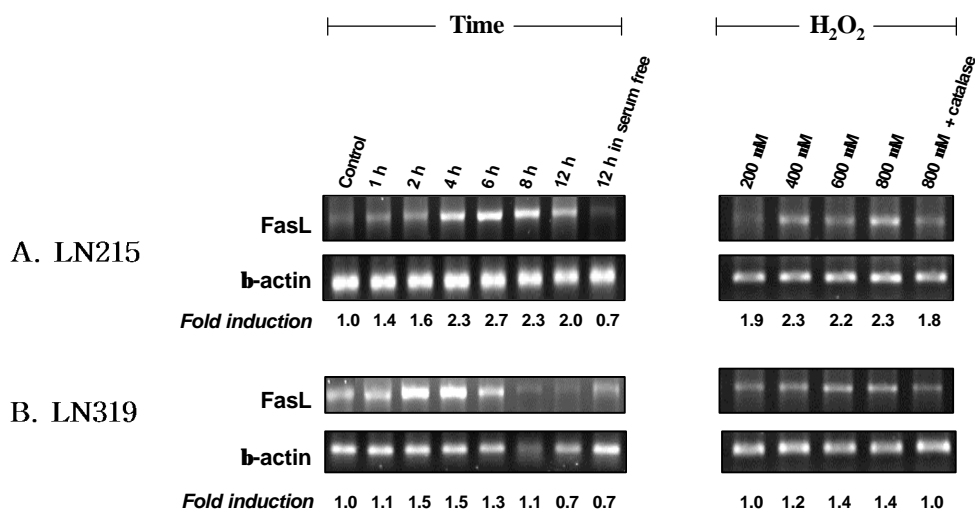


그림 6. H_2O_2 처리 후 정상세포종 세포의 Fas ligand mRNA 전사. LN215 세포(A) 또는 LN319 세포(B)를 800 μM H_2O_2 처리한 후 1, 2, 4, 6, 8, 12 시간 배양하였다. H_2O_2 농도별 효과를 관찰하기 위하여 200, 400, 600, 800 μM 의 H_2O_2 로 4 시간 배양하였다. Catalase는 1,600 U/ml로 첨가하였다. Control 군은 H_2O_2 처리하지 않은 군이다. β -actin은 대조 유전자이다. Fold induction은 각 실험군에서 Fas ligand/ β -actin density 비율을 산정한 후 control 군의 값을 1.0으로 하였을

때 각 군의 상대값이다.

H₂O₂로 처치한지 4 시간 후 두 세포 모두에서 Fas ligand mRNA 전사가 많이 증가하였기 때문에 4 시간을 기준으로 H₂O₂ 농도에 따른 Fas ligand mRNA 전사를 관찰하였다. LN215 세포는 400-800 μ M의 H₂O₂ 농도에서, LN319 세포는 600-800 μ M의 H₂O₂ 농도에서 Fas ligand mRNA 전사가 많이 증가하였다. 정상세포종 세포를 H₂O₂로 처치하였을 때 항산화제인 catalase를 동시에 첨가하면 LN319 세포의 Fas ligand mRNA 전사는 control 군과 같은 수준으로 관찰되었고, LN215 세포는 H₂O₂만을 처치한 군보다 Fas ligand mRNA 전사가 다소 감소함을 관찰하였다 (그림 6).

7. H₂O₂ 처치 후 정상세포종 세포의 Fas ligand 단백질 발현

정상세포종 세포를 H₂O₂로 처치한 후 Fas ligand 단백질 발현을 측정하였다. 세포를 600 μ M 또는 800 μ M의 H₂O₂로 처치하여 18 시간 배양한 후 Fas ligand 단백질 발현 정도를 항Fas ligand 항체로 반응시킨 후 FACstar로 분석하였다. 두 세포 모두 control 군에서는 Fas ligand가 약하게 발현되었다. H₂O₂로 처치한 후 Fas 단백질 양성세포 비율이 LN215 세포에서는 16.3% (control)에서 42.0% (600 μ M H₂O₂) 및 47.3% (800 μ M H₂O₂)로, LN319 세포에서는 16.4% (control)에서 27.5% (600 μ M H₂O₂) 및 33.4% (800 μ M H₂O₂)로 증가하였다 (그림 7). Mean intensity의 값은 LN215세포가 8.2 (control)에서 10.4 (600 μ M H₂O₂) 및 11.1 (800 μ M H₂O₂)로, LN319 세포는 6.7 (control)에서 8.0 (600 μ M H₂O₂) 및 8.3 (800

$\mu\text{M H}_2\text{O}_2$)으로 증가하였다.

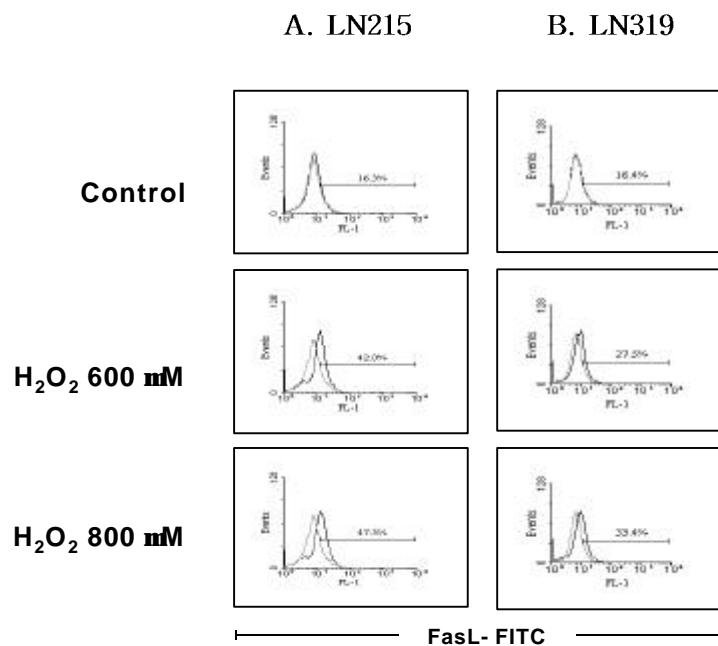


그림 7. H₂O₂ 처리 후 정상세포종 세포의 Fas ligand 단백 발현. LN215 세포 (A) 또는 LN319 세포(B)를 600 μM 또는 800 μM H₂O₂로 처리하여 18 시간 배양한 후 항Fas ligand 항체로 염색하여 FACstar로 분석하였다. 점선은 irrelevant 항체와 반응한 것이고, 실선은 항Fas ligand 항체와 반응한 것이다. Control 군은 H₂O₂ 처리하지 않은 군이다.

8. H₂O₂ 전처리 후 정상세포종 세포의 Fas ligand에 의한 MOLT-4 세포의 세포고사

정상세포종 세포를 H_2O_2 로 전처리한 후 증가된 Fas ligand 단백질이 MOLT-4 세포의 세포고사에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여, 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 18 시간 전처리한 후 MOLT-4 세포와 24 시간 공동 배양한 후 MOLT-4 세포의 세포고사를 측정하였다. MOLT-4 세포는 Fas 매개 세포고사에 민감한 세포이기에 정상세포종 세포와 함께 배양하면 MOLT-4 세포에서 Fas/Fas ligand 결합을 매개로 한 세포고사가 일어난다. LN215 세포에서 H_2O_2 전처리하지 않은 군은 MOLT-4 세포의 세포고사율이 8.9% (annexin V 양성세포 비율)와 15.8% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율의 합)로 관찰되었고, H_2O_2 전처리한 군은 8.8% (annexin V 양성세포 비율)와 35.1% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율의 합)로 관찰되었다 (그림 8). LN319 세포에서 H_2O_2 전처리하지 않은 군은 MOLT-4 세포의 세포고사율이 18.4% (annexin V 양성세포 비율)와 12.6% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율의 합)로 관찰되었고, H_2O_2 전처리한 군은 25.4% (annexin V 양성세포 비율)와 12.6% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율)로 관찰되었다 (그림 8).

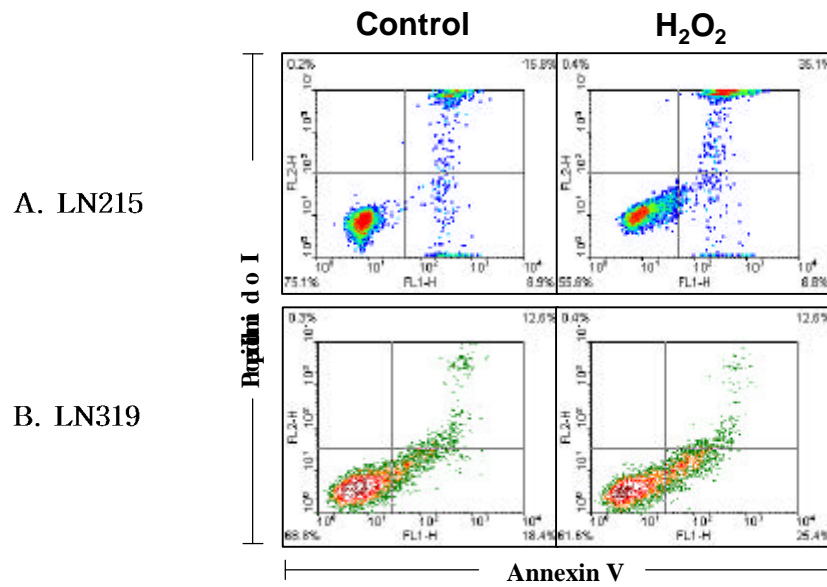


그림 8. H₂O₂ 전처리 후 성장세포종 세포의 Fas ligand에 의한 MOLT-4 세포의 세포고사. LN215 세포(A) 또는 LN319 세포(B)를 800 μ M H₂O₂로 전처리하고 18 시간 배양한 후 MOLT-4 세포를 표적세포로 하여 우태아 혈청이 첨가되지 않은 RPMI 배지에서 24 시간 공동 배양하였다. 표적세포만을 annexin V-FITC와 propidium iodide로 염색한 후 FACstar로 분석하였다. 주효세포 대 표적세포 비율은 4:1 이다. Control 군은 H₂O₂ 처리하지 않은 군이며, H₂O₂는 H₂O₂ 전처리한 군이다.

9. H₂O₂ 처리 후 성장세포종 세포의 TRAIL 수용체 mRNA 전사

LN215 세포를 H_2O_2 800 μM 로 처리한 후 시간에 따라 DR4, DR5, DcR1 및 DcR2 mRNA 전사를 관찰하였다. 그 결과 각 TRAIL 수용체의 mRNA 전사는 변화가 없었거나 미비하였기에 H_2O_2 는 TRAIL 수용체 전사에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다 (그림 9).

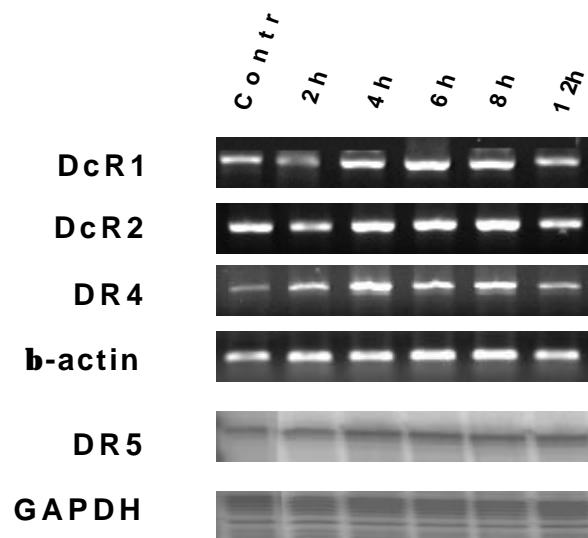


그림 9. H_2O_2 처리 후 정상세포종 세포의 TRAIL 수용체 mRNA 전사. LN215 세포를 800 μM H_2O_2 로 2, 4, 6, 8, 12 시간 처리한 후 TRAIL 수용체 mRNA 전사를 관찰하였다. DR5는 RPA를 통하여 관찰하였으며 GAPDH는 대조 유전자이다. DcR1, DcR2, DR4는 역전사 증합효소 연쇄반응으로 관찰하였으며 β -actin은 대조 유전자이다. Control 군은 H_2O_2 로 처리하지 않은 군이다.

10. H_2O_2 처리 후 정상세포종 세포의 TRAIL mRNA 전사

LN215 세포를 H_2O_2 800 μM 로 처리한 후 시간에 따른 TRAIL mRNA 전사를 관찰하였다. TRAIL mRNA의 전사는 H_2O_2 처리 후 1 시간부터 24

시간까지 지속적으로 증가하였으며, 4 시간 이후 control 군과 비교하여 1.2배로 mRNA 전사가 증가하였다. H₂O₂ 농도에 따른 TRAIL mRNA 전사를 관찰하기 위하여서는 200, 400, 600, 800 μ M의 H₂O₂로 4 시간 처치한 후 TRAIL mRNA 전사를 관찰하였다. 농도에 따른 TRAIL mRNA 전사를 관찰 결과 400-800 μ M의 H₂O₂로 처치하였을 때 H₂O₂로 처치하지 않은 군보다 1.3배로 mRNA 전사가 증가하였다 (그림 10).

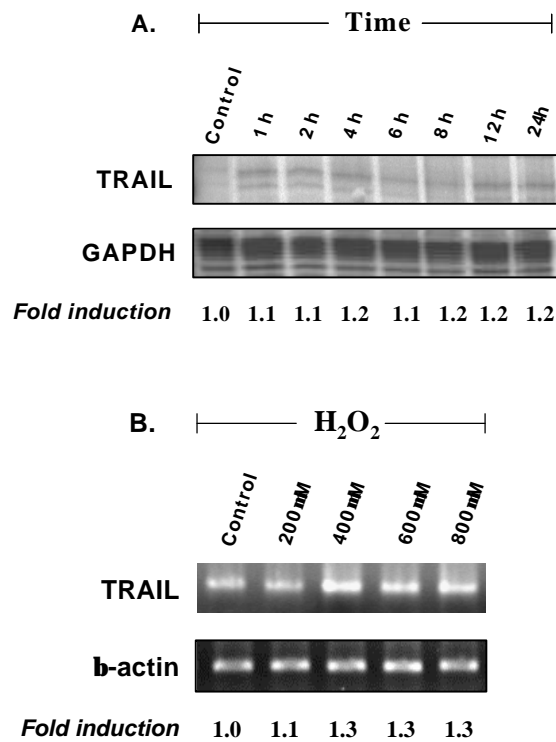


그림 10. H₂O₂ 처치 후 정상세포종 세포의 TRAIL mRNA 전사. LN215 세포를 H₂O₂로 처치한 후 시간(A)과 농도(B)별로 TRAIL mRNA 전사를 RPA(A)와 역전사 증합효소 연쇄반응(B)으로 관찰하였다. LN215 세포를 800 μ M H₂O₂로 처치한 후 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 시간 배양하였다. H₂O₂농도에 따른 mRNA 전사 차이를 관찰하기 위하여 200, 400, 600, 800 μ M의 H₂O₂로 4 시간 배양하였다. Control

군은 H_2O_2 처리하지 않은 군이다. GAPDH와 β -actin은 대조 유전자이다. Fold induction은 TRAIL/GAPDH 또는 TRAIL/ β -actin density 비율을 산정하고 control을 1.0으로 하였을 때의 각 군의 상대값이다.

11. H_2O_2 처리 후 정상세포종 세포의 TRAIL 단백질 발현

LN215 세포를 $800 \mu M$ 의 H_2O_2 로 처리한 후 시간에 따라 TRAIL 단백질 발현을 관찰하였다.

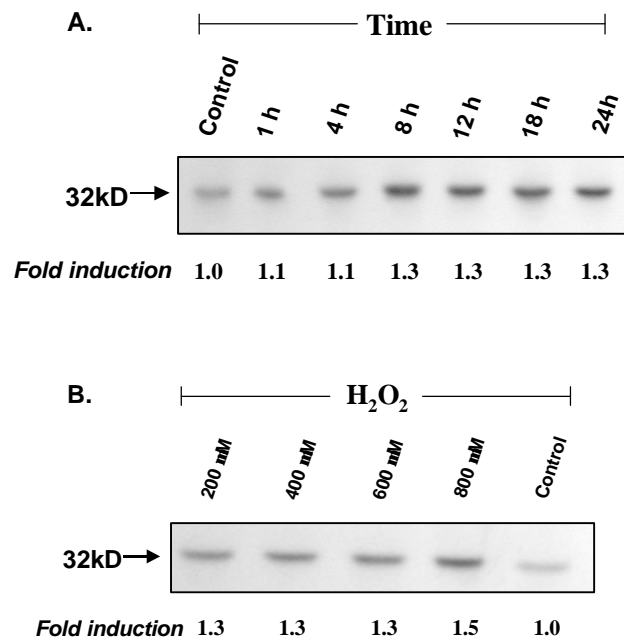


그림 11. H_2O_2 처리 후 정상세포종 세포의 TRAIL 단백질 발현. LN215 세포를 H_2O_2 로 처리한 후 TRAIL 발현을 시간(A)과 농도별(B)로 비교한 Western blot의 결과이다. LN215 세포를 $800 \mu M$ H_2O_2 로 처리한 후 1, 4, 8, 12, 18, 24 시간 배양하였다. H_2O_2 농도에 따른 단백질 발현 차이를 관찰하기 위하여 200, 400, 600, $800 \mu M$ 의 H_2O_2 로 18 시간 배양하였다. Control은 H_2O_2 처리하지 않은 군이다. Fold

induction은 control의 density 비율을 1.0으로 하였을 때의 각 군의 상대값이다.

8 시간 이후 control 군과 비교하여 TRAIL 단백질이 1.3배로 증가하였으며, 그 증가는 24 시간까지 지속하였다. LN215 세포를 200-800 μ M의 H_2O_2 로 18 시간 처치한 후 TRAIL 단백질 발현을 관찰하였다. 200-800 μ M의 H_2O_2 처치 군은 H_2O_2 처치하지 않은 군과 비교하여 1.3배 이상으로 단백질 발현이 증가하였으며, 800 μ M의 H_2O_2 로 처치하였을 때 1.5배로 단백질 발현이 증가하였다 (그림 11).

12. H_2O_2 전처치 후 정상세포종 세포의 TRAIL에 의한 Peer 세포의 세포고사

정상세포종 세포에서 H_2O_2 에 의해 증가된 TRAIL 단백질 발현이 Peer 세포의 세포고사에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, LN215 세포를 H_2O_2 로 18 시간 전처치하고 Peer 세포와 함께 24 시간 공동 배양한 후 Peer 세포의 세포고사를 FACstar로 분석하였다. Peer 세포는 Fas/Fas ligand에 의한 세포고사가 잘 일어나지 않고 비교적 TRAIL 매개 세포고사에 민감한 세포이므로 TRAIL에 의한 세포고사를 확인하는데 이용되는 세포이다. H_2O_2 전처치하지 않은 군에서 Peer 세포의 세포고사율은 10.0% (annexin V 양성세포 비율)와 11.2% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율의 합)로 관찰되었고, H_2O_2 전처치한 군은 11.4% (annexin V 양성세포 비율)와 26.4% (annexin V 양성세포 비율과 propidium iodide 양성세포 비율의 합)로 관찰되었다 (그림 12).

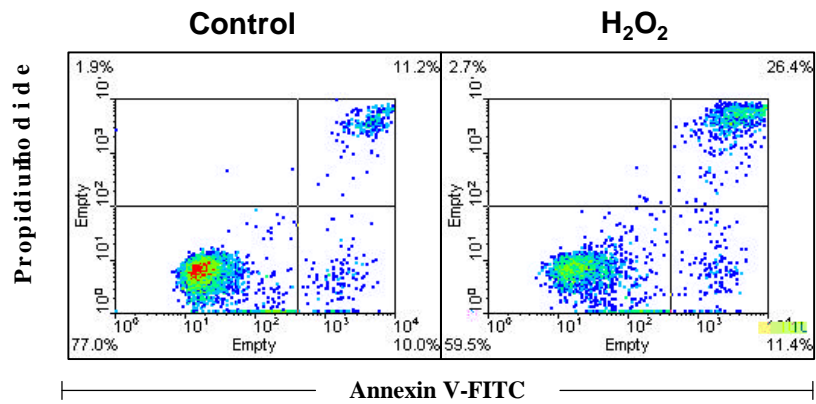


그림 12. H₂O₂ 전처리 후 정상세포중 세포의 TRAIL에 의한 Peer 세포의 세포고사. LN215 세포를 800 μ M H₂O₂로 전처리하여 18 시간 배양한 후 Peer 세포를 표적세포로 우태아혈청이 첨가되지 않은 RPMI 배지에서 함께 24 시간 배양하였다. 그 후 표적세포인 Peer 세포를 annexin V-FITC와 propidium iodide로 염색한 후 FACstar로 분석하였다. 주효세포 대 표적세포 비율은 4:1 이다. Control 군은 H₂O₂ 전처리하지 않은 군이다. H₂O₂는 H₂O₂로 전처리한 군이다.

IV. 고 찰

ROS는 세포의 lipid peroxidation, 단백 변성 및 DNA 손상을 초래하여 세포죽음을 유도한다. ROS에 의한 세포고사는 TNF 관련 세포독성이나 성장인자의 고갈과 같은 상황에서 일어나는 세포고사와는 다른 기전으로 세포고사가 유발되며, 항산화제를 처리하거나 항산화 효소를 과발현시키면 ROS에 의한 세포고사를 감소시킬 수 있다. ROS가 고농도로 존재할 때 세포에 직접 독성을 나타내지만 낮은 농도에서는 유전자 전사를 조절하는 전달자로서 작용하여 전사인자의 활성화를 통하여 유전자 전사를 조절한다. NF- κ B와 AP-1 같은 전사인자들의 활성화에 ROS가 관여하며 세포죽음이 일어나는 도중에도 *de novo* 단백 합성이 일어나기 때문에 ROS들이 관련된 유전자 전사는 세포고사에 영향을 줄 수 있다.^{23,51} 산화 스트레스는 세포의 정상적인 대사과정이나 세포 외부로부터 생리화학적 반응으로 발생한다. 알짜이머씨병⁵⁴이나 허혈성 손상⁵⁵ 등의 뇌병변 부위에서 세포고사를 통한 세포죽음이 관찰되며, 아울러 뇌병변 부위에 과도한 산화 스트레스가 관찰되기 때문에 중추신경계 손상 부위의 세포고사와 산화 스트레스는 서로 관련 있을 것으로 추정된다. 산화 스트레스에 의한 직접적인 세포고사를 유도하는 신호기전은 미토콘드리아 막전위에 영향을 미쳐 미토콘드리아로부터 cytochrome *c*가 방출되고 이어서 caspase가 활성화됨으로써 세포고사 신호를 전달하는 것으로 알려져 있다.^{56,57} 그러나 직접적인 세포고사를 유발하는 요인 외에 세포고사와 관련된 유전자의 전사에 관여함으로써

세포고사에 영향을 미칠 가능성도 있다. 림프종세포²³ 와 자연살세포²⁴에 H₂O₂를 처리하여 또는 간암세포¹²에 bleomycin을 처리하여 산화 스트레스를 유발하면 Fas ligand의 유전자 전사가 증가한다는 보고와, 내피세포²⁵에서 H₂O₂ 처리에 의한 산화 스트레스에 의하여 Fas 유전자 전사가 증가한다는 보고를 통하여 산화 스트레스는 세포고사와 관련된 유전자의 전사 조절을 통해 세포고사에 영향을 미칠 가능성이 제시되었다.

세포내의 ROS는 superoxide, hydroxyl, peroxy, alkoxy, hydroperoxyl의 radical 형태와 H₂O₂, HOCl과 O₃의 nonradical 형태로 존재한다. 이중 nonradical 형태인 H₂O₂는 세포막을 쉽게 통과하며, H₂O₂에서 만들어지는 hydroxyl radical은 뇌손상 때 생성되어 신경조직을 파괴한다.⁵⁸ 본 연구에서 H₂O₂는 세포 내에 존재하는 ROS의 형태이며, 세포외부에서 처리하여 쉽게 세포막을 통과함으로써 세포내의 산화 스트레스를 유발할 수 있어 사용하였다.

H₂O₂는 세포내의 많은 전사인자들을 활성화시키며, 허혈성 손상 (ischemia-reperfusion injury), 저산소증 (hypoxia)과 면역반응이 유발되는 조직과 세포에서 발견된다.^{59,60} 세포 내 대사과정에서 생긴 superoxide가 superoxide dismutase의 작용에 의해 H₂O₂로 전환되며, IFN- γ ,⁶¹ TGF- β ¹^{62,63}과 phorbol esters⁶⁴에 의해서도 생산된다. 생산된 H₂O₂는 hydroxyl radical의 형태로 바뀌어 산화 스트레스를 유발한다. *In vitro* 실험에서 산화 스트레스를 유발하기 위하여 사용하는 H₂O₂의 양은 세포에 따라 다르다. 갈색세포종에서 유래된 PC12 세포를 사용한 실험에서 100 μ M부터 5 mM의 농도까지 사용하였고,⁶⁵ Burkitt's 림프종 세포에는 100 μ M부터 500 μ M의 농도까지 사용하였으며,⁶⁶ HeLa 세포에는 200 μ M부터 1,000 μ M의 농도까지 사용하였고,⁶⁷ 사람의 교아세포종 세포에는 1 mM의 농도로 처리하였다.⁶⁸ 본 연구에서 정상세포종 세포를 H₂O₂ 200 μ M과 400 μ

M의 농도로 처치시 세포고사 관련 분자들의 증가가 뚜렷하지 않았고 H₂O₂ 1,000 μ M의 농도는 정상세포에 강한 세포독성을 나타내므로, 산화 스트레스를 주기 위해 600 μ M 또는 800 μ M의 H₂O₂를 사용하였다. 이 농도는 다른 연구자들이 사용한 H₂O₂ 농도와 비교하여 *in vitro* 실험에 사용하기에 지나치게 강한 농도는 아니라고 생각된다.

본 연구에서 사용한 정상세포종 세포들을 대상으로 H₂O₂에 의한 세포고사 관련 유전자의 전사조절을 관찰하기 전에, H₂O₂에 의한 세포독성 민감도를 측정하였다. 그 결과 LN215 세포와 LN319 세포는 H₂O₂에 의한 세포죽음 민감도가 달랐다. LN215 세포가 LN319 세포보다 산화 스트레스에 더욱 민감하게 세포죽음이 유발되었으며, 800 μ M의 H₂O₂로 처치하였을 경우 LN215 세포에서 LN319 세포와 비교하여 2배의 세포죽음이 관찰되었다. 두 세포가 산화 스트레스에 의한 세포죽음의 차이를 보이는 것은 두 세포에 기본적으로 표현하고 있는 bcl-2 발현의 차이와도 관련된 것으로 추정하는데 LN319 세포가 LN215 세포보다 기본적으로 mRNA 수준에서 bcl-2 전사가 많기 때문이다 (그림 2). Bcl-2는 산화 스트레스에 대해 항산화 작용을 하거나 미토콘드리아를 경유하는 세포고사 신호전달에 있어 cytochrome *c*의 방출을 억제함으로써 세포고사를 저지하고 있으며,^{56,57,65} 각질세포주에서 유래된 HaCaT 세포⁶⁹와 PC12 세포⁷⁰에서 bcl-2를 transfection하여 산화 스트레스에 의한 세포죽음을 억제시킨 보고가 있다. bcl-2 transgenic 마우스가 허혈성 손상에 매우 강하다는 보고를 통하여 산화 스트레스에 의한 손상에 있어 bcl-2가 산화 스트레스에 의하여 유도되는 세포고사에 중요한 역할을 수행하고 있음을 알 수 있다.⁷¹

본 연구에서는 bcl-2 발현에 의한 산화 스트레스 민감도와는 다른 측면에서 산화 스트레스에 의한 세포고사 관련 유전자 조절 차이가 있는지 관찰하기 위하여 두 종류의 정상세포종 세포를 대상으로 실험을 진행하였다.

뇌병변 부위 조직은 정상인의 뇌조직보다 산화 스트레스를 더 많이 받고 있어, 산화 스트레스가 Fas의 발현을 조절할 가능성이 있다. 본 연구에서 정상세포종 세포를 H₂O₂로 처리한 후 4 시간 또는 6 시간에서 Fas mRNA 전사가 가장 많이 증가하였다. Fas mRNA 전사의 증가와 더불어 Fas 단백질 발현 또한 증가하였는데 H₂O₂로 처리한 후 18 시간에서 Fas 단백질이 증가하였다. 정상세포종 세포는 기본적으로 Fas를 발현하고 있으며, H₂O₂로 전처리한 후 효현성 항Fas 항체와 반응시키면 세포고사는 더욱 증가하였다. 이는 H₂O₂에 의해 발현이 증가된 Fas에 의하여 정상세포종 세포가 효현성 항Fas 항체에 더욱 민감해졌으며 이는 산화 스트레스 상황에서 Fas ligand 자극이 있을 때 Fas 매개 세포고사가 더 잘 일어날 수 있음을 의미한다. Fas ligand mRNA 전사도 H₂O₂ 처리 후 4 시간 또는 6 시간에서 전사가 가장 많이 증가하였으며 Fas ligand 단백질 발현 또한 증가하였다. 이와 같이 발현이 증가된 Fas ligand가 적절하게 기능 한다는 것은 정상세포종 세포를 H₂O₂로 전처리한 후 MOLT-4 세포와 공동 배양하면 MOLT-4 세포의 세포고사가 증가함을 통하여 확인할 수 있었다. MOLT-4 세포는 TRAIL 수용체인 DR4나 DR5의 발현이 적기 때문에 TRAIL 매개 세포고사에 저항성을 갖고 Fas ligand 매개 세포고사에 민감하다. 그러므로 MOLT-4 세포의 세포고사 증가는 정상세포종 세포의 Fas ligand에 의하여 유발되었으리라 추정된다. 정상세포종 세포가 T 세포 림프종 세포주인 MOLT-4 세포의 세포고사를 유도하는 것으로 보아 뇌질환에 있어 산화 스트레스로 인하여 정상세포 또는 정상세포종 세포의 Fas ligand 발현이 증가되면 신경조직에 침윤된 면역반응 세포의 세포고사를 유도하거나 Fas를 표현하고 있는 주변의 신경 구성 세포의 세포고사를 유발하여 신경조직의 손상을 초래할 가능성을 제시한다.

TRAIL 전사에 관해서는 아직까지 많은 부분이 알려져 있지 않았으며,

아직 산화 스트레스와 TRAIL 전사와의 연관성에 대한 보고는 없다. 보고에 의하면 섬유아세포⁷²는 IFN- γ 에 의해, 활성화된 T 세포⁷³는 IFN- α 에 의해 그리고 신경모세포종 세포⁷⁴는 C₂-ceramide에 의해 TRAIL의 전사가 증가되며, 마우스 T 세포에서 TRAIL 전사는 protein tyrosine kinase, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase에 대한 억제제와 cyclosporin A를 처리하였을 때 감소하였다.⁷⁵ 본 연구에서 정상세포종 세포 중 LN215 세포를 H₂O₂로 처리하면 TRAIL mRNA 전사와 단백질 발현이 8 시간부터 현저히 증가함을 관찰하여, 산화 스트레스 또한 TRAIL 발현을 증가시킴을 관찰하였다. 그리고 LN215 세포를 H₂O₂로 전처리한 후 Peer 세포와 공동 배양하면 Peer 세포에서 세포고사가 증가하는데 T 세포 림프종 세포인 Peer 세포는 Fas ligand 매개 세포고사에 저항성을 갖고 TRAIL 매개 세포고사에 민감한 세포이므로 정상세포종 세포에서 발현이 증가된 TRAIL이 Peer 세포의 세포고사를 유도하는 것으로 생각된다. TRAIL은 신경조직 중 정상세포종 세포⁷⁶와 신경모세포종 세포⁷⁴에 표현되며, 허혈상태의 신경조직에서 세포고사를 유발하는 것으로 보고되었다.⁷⁷ 그러므로 산화 스트레스가 있는 상태에서 TRAIL 또한 Fas ligand와 더불어 신경조직에 침윤된 면역반응 세포의 세포고사를 유발하여 면역특권 유지에 기여할 것으로 생각되어진다. LN215세포를 H₂O₂로 처리하여 TRAIL 수용체 전사를 관찰한 결과 DR4, DR5, DcR1 및 DcR2 수용체 전사의 발현 변화는 관찰되지 않았다. 그 결과로 산화 스트레스 상황에서 정상세포종 세포의 TRAIL 수용체 발현 변화에 의한 세포고사의 변화는 없을 것으로 생각된다. 본 연구에 사용한 두 종류의 정상세포종 세포에서 H₂O₂ 처리 후 Fas, Fas ligand 및 TRAIL 발현이 증가하였다. 이를 통하여 정상세포종 세포에서 H₂O₂에 의한 세포죽음과 무관하게, H₂O₂가 Fas, Fas ligand 및 TRAIL 발현을 증가시킴을 확인하였다.

정상세포종 세포에서 산화 스트레스에 의하여 Fas ligand 발현이 증가하면, 중추신경계에 침윤된 면역세포의 세포고사를 유도할 수 있는 기전으로 생각되어진다. 최근 신경세포,⁴⁸ 소교세포⁷⁸와 희돌기교세포⁷⁹도 Fas를 발현하는 것으로 밝혀져 정상세포종 세포가 이들 세포의 세포고사를 유도하여 중추신경계 손상을 가중시킬 수 있을 가능성도 있다.

정상세포의 산화 스트레스에 의한 반응은 정상세포종 세포와 유사할 것으로 생각되어지며 면역반응에 의한 산화 스트레스의 강도가 증가하는 상황에서 Fas ligand와 TRAIL의 증가를 통해 Fas와 DR 수용체를 갖는 활성화된 면역세포의 세포고사를 유도함으로써 중추신경계의 면역특권을 유지할 것으로 생각된다. 그리고 Fas를 발현하는 희돌기교세포와 소교세포에서 세포고사를 유발하여 과도한 면역반응을 억제하며 필요 이상의 소교세포 증식을 억제함으로써 신경조직의 항상성 유지에 기여할 것으로 추정된다. 한편 정상세포는 조직내의 이온의 농도조절 기능⁸⁰과 항산화 기능⁴⁴ 등의 중추신경계의 항상성 유지에 관여하고 있다. 노화에 의해 기능을 수행하지 못하는 정상세포에서 세포고사를 유도하는 기전으로 산화 스트레스에 의한 Fas의 발현을 생각할 수 있고 reactive gliosis로 통해 증식된 정상세포의 적정 비율을 유지하기 위하여 필요한 세포고사에도 정상세포의 Fas 발현 증가가 기여할 수 있다. 또한 활성화된 정상세포는 면역반응과 관련 있는 IL-6와 신경성장인자³¹ 그리고 고착분자⁸¹를 발현하여 면역반응에 관계하고 활성화된 정상세포는 Fas를 발현하여 면역세포나 소교세포⁸²의 Fas ligand에 의해 세포고사가 유발되어 과도한 면역반응을 조절하는데 기여할 것으로 추측된다.

본 연구를 통하여 정상세포종 세포에서 산화 스트레스에 의한 Fas, Fas ligand 및 TRAIL의 발현이 증가함을 관찰하였다. 이러한 세포고사 관련 분자의 발현 증가는 신경조직 내로 침윤된 면역세포의 세포고사를 유도함

으로써 신경조직의 면역특권을 유지하는데 기여할 가능성이 있다. 그리고 신경조직 구성 세포의 세포고사를 유도할 수 있기 때문에 뇌병변 유발에 관여할 수 있으며 아울러 신경조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하리라 생각된다. 본 연구의 결과를 토대로 산화 스트레스 상황에서의 신경 세포, 회돌기교세포, 성상세포 및 소교세포와 면역 반응 세포들간의 상호 반응과 기능을 예상함으로써 퇴행성뇌질환과 허혈에 의한 신경조직 손상에 대해 바른 이해를 도모할 수 있을 것을 기대한다.

V. 결 론

본 연구에서 산화 스트레스가 정상세포종 세포의 세포고사 관련 분자들의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리하여 산화 스트레스를 주고 세포고사와 관련된 Fas, Fas ligand 및 TRAIL의 mRNA와 단백질 발현 그리고 발현된 단백질의 생물학적 기능을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리한 후 Fas의 mRNA 전사가 증가하였다.
2. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리한 후 Fas의 단백질 발현이 증가하였다.
3. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 전처리한 후 효현성 항Fas 항체인 CH-11에 의해 세포고사가 증가하였다.
4. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리한 후 Fas ligand의 mRNA 전사가 증가하였다.
5. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리한 후 Fas ligand의 단백질 발현이 증가하였다.
6. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 전처리한 후 MOLT-4 세포와 공동배양에서 표적세포인 MOLT-4 세포의 Fas ligand 매개 세포고사를 증가시켰다.
7. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리한 후 TRAIL의 mRNA 전사가 증가하였다.
8. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 처리한 후 TRAIL의 단백질 발현이 증가하였

다.

9. 정상세포종 세포를 H_2O_2 로 전처리한 후 Peer 세포와 공동배양에서 표적 세포인 Peer 세포의 TRAIL 매개 세포고사를 증가시켰다.

이상의 결과로부터 정상세포종 세포에서 산화 스트레스에 의한 Fas, Fas ligand 및 TRAIL 발현이 증가함을 관찰하였다. 이러한 세포고사 관련 분자의 발현 증가는 신경조직내의 면역반응이나 세포노화와 같은 세포내의 산화 스트레스가 증가되는 상황에서 조직내로 침윤된 면역세포의 세포고사를 유도함으로써 신경조직의 면역특권을 유지하는데 기여할 가능성이 있다. 그리고 신경조직 구성 세포의 세포고사를 유도할 수 있기 때문에 뇌병변 유발에 관여할 수 있으며 아울러 신경조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하리라 생각된다.

참고문헌

1. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organ. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
2. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton S. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxidase in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7162-6.
3. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA mechanism involved and relevant observations-on brain-under going oxidative stress. *Ann Neurol* 1992;32:S22-7.
4. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85:753-66.
5. Furuta A, Price DL, Pardo CA, Troncoso JC, Xu ZS, Taniguchi N, et al. Localization of superoxide dismutases in Alzheimer's disease and Down's syndrome neocortex and hippocampus. *Am J Pathol* 1995;146:357-67.
6. Zaleska MM, Nagy K, Floyd RA. Iron-induced lipid peroxidation and inhibition of dopamine synthesis in striatum synaptosomes. *Neurochemistry* 1989;14:597-605.

7. Marklund SL, Westman NG, Lundgren E, Roos G. Copper and Zinc containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res* 1982;42:1955-61.
8. Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA. Oxidative damage to brain protein, loss of glutamine synthetase activity and production of free radicals during ischemia/reperfusion induced injury to gerbil brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5144-7.
9. Shoulson I, Fahn S, Kieburtz K, Lanf A, Langston JW, Olanow CW. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1993;328:176-83.
10. Hensley K, Maitt ML, Yu Z, Markesbery WR, Floyd RA. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci* 1998;18:8126-32.
11. Hensley K, Pye QN, Maitt ML, Stewart CA, Robinson KA, Jaffrey F, et al. Interaction of α -phenyl-N-tert-butyl nitron and alternative electron acceptors with complex I indicates a substrate reduction site upstream from the rotenone binding site. *J Neurochem* 1998;71:2549-57.
12. Hug H, Strand S, Grambihler A, Galle J, Hack V, Stremmel W, et al. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem*

1997;272:28191-3.

13. Doan TN, Gentry DL, Taylor AA, Ellion SJ. Hydrogen peroxide activates agonist-sensitive Ca^{2+} -flux pathways in canine venous endothelial cells. *Biochem J* 1994;297:209-15.
14. Griending KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulate NADH and NADPH oxidase activity in culture vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-8.
15. Kamata H, Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 1999;11: 1-14.
16. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griending KK. Tumor necrosis factor alpha activate a p22 phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998;329:653-7.
17. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9114-9.
18. Taso PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness, nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 1996;94:1682-9.
19. Robinson KA, Stewart CA, Pye QN, Nguyen X, Kenney L, Salzman S, et al. Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture. *J Neurosci Res* 1999;55:724-32.
20. Wung BS, Cheng JJ, Bode C, Hsieh HJ, Shy YJ, Wang DL. Cyclin

- strain induced monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator protein 1. *Circ Res* 1997;81:1-7.
21. Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K, Malik AB. H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 gene transcription through distinct *cis*-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *J Biol Chem* 1995;270:18966-74.
 22. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic Res Commun* 1992;17:221-37.
 23. Bauer MKA, Vogt M, Los M, Siegel J, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) Ligand expression. *J Biol Chem* 1998;272:8048-55.
 24. Furuke K, Shiraishi M, Mostowski HS, Bloom E. Fas ligand induction in human NK cells is regulated by redox through a calcineurin-nuclear factors of activated T cell-dependent pathway. *J Immunol* 1999;162:1988-93.
 25. Suhara T, Fukuo K, Sugimoto T, Morimoto S, Nakahashi T, Hata S, et al. Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells. *J Immunol* 1998;160:4042-47.
 26. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987;325:253-7.
 27. Barres BA, Chun LLY, Corey DP. Ion channels in vertebrate glia.

- Ann Rev Neurosci 1990;13:441-74.
28. Kettenmann H, Backus KH, Schachner M. Aspartate, glutamate and gamma-amino butyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci Lett* 1984;52:25-9.
 29. Kimelberg HK, Katz DM. High-affinity uptake of serotonin into immuno cytochemically identified astrocyte. *Science* 1985;228:889-91.
 30. Williams KC, Dooley NP, Ulvestad E, Waage A, Blain M, Yong VM, et al. Antigen presentation by human fetal astrocytes with the cooperative effector of microglia or the microglial-derived cytokine IL-1. *J Neurosci* 1995;15:1869-78.
 31. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 1997;20:570-7.
 32. Bolanos JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 1995;64:1965-72.
 33. Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA, Volpe JJ. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanism, and prevention. *J Neurosci* 1993;13:1441-53.
 34. Nakajima K, Suzuki K. Immunochemical detection of metallothionein in brain. *Neurochem Int* 1995;27:73-87.
 35. Aschner M. The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB J* 1996;10:1129-36.

36. Lowndes HE, Beiswanger CM, Philber MA, Reuhl KR. Substrates for neural metabolism of xenobiotics in adult and developing brain. *Neurotoxicology* 1994; 15:61-73.
37. Huang J, Philbert MA. Cellular responses of cultured cerebral astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis. *Brain Res* 1996;711:184-92.
38. Grunewald RA. Ascorbic acid in the brain. *Brain Res Rev* 1993;18:123-33.
39. Siushansian R, Wilson JX. Ascorbate transport and intracellular concentration in cerebral astrocytes. *J Neurochem* 1995;65:41-9.
40. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 1996;16:2553-62.
41. Lucius R, Sievers J. Postnatal retinal ganglion cells in vitro: protection against reactive oxygen species-induced axonal degeneration by cocultured astrocytes. *Brain Res* 1996;743:56-62.
42. Dalton T, Pazdernik TL, Wagner J, Samson F, Andrews GK. Temporal-spatial patterns of expression of metallothionein- I and III and other stress related genes in rat brain after kainic acid-induced seizures. *Neurochem Int* 1995;27:59-71.
43. Sagara J, Makino M, Bannai S. Glutathione efflux from cultured astrocytes. *J Neurochem* 1996;66: 1876-81.
44. Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:1149-63.
45. Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Choi IH, et al. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes

- and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ . J Immunol 1999;162:1889-95.
46. Zipp F, Krammer PH, Weller M. Immune(dys)regulation in multiple sclerosis: role of the CD95-CD95 ligand system. Immunol Today 1999;20:550-4.
 47. Maria RD, Testi R. Fas-FasL interaction: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. Immunol Today 1998; 19:121-5.
 48. Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. J Exp Med 1996;184:1513-8.
 49. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science 1997;276: 111-3.
 50. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol 1999;11:255-60.
 51. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. Eur J Biochem 1998;254: 439-59.
 52. Konjevic G, Jurisic V, Spuzic I. Corrections to the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytotoxicity. J Immunol Methods 1997;200:199-201.
 53. Hochstadt J. Adenosine phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli*. Methods Enzymol 1978;51:558-67.
 54. Markesbery WR. the role of oxidative stress in Alzheimer disease.

- Arch Neurol 1999;56:1449-52.
55. Heales S, Bolanos JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 1999;1410:215-28.
 56. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
 57. Esposti MD, Hatzinisiroiu I, McLennan H, Ralph S. Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. *J Biol Chem* 1999;42:29831-7.
 58. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.
 59. Peuchen S, Bolanos JP, Heales SJ, Almeida A, Duchen MR, Clark JB. Inter relationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1997;52:261-81.
 60. Nicotera P, Ankarcrona M, Bonfocd E, Orrenius S, Lipton SA. Neuronal necrosis and apoptosis: Two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. *Adv Neurol* 1997;72:95-101.
 61. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;158:670-89.
 62. Thannickal VJ, Hassoun PM, White AC, Fanburg BL. Enhanced rate of H₂O₂ release from bovine pulmonary artery endothelial cells induced by TGF-1. *Am J Physiol* 1993;265: L622-6.

63. Ohba M, Shibamura M, Kuroki T, Nose K. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-1 and its involvement in induction of erg-1 in mouse osteoblastic cells. *J Cell Biol* 1994; 126:1079-88.
64. Krieger-Brauer HI, Kather H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest*. 1992;89:1006-13.
65. Maroto R, Perez-Polo JR. Bcl-2-related protein expression in apoptosis: oxidative stress versus serum deprivation in PC12 cells. *J Neurochem* 1997;69:514-23.
66. Lee YJ, Shacter E. Bcl-2 does not protect Burkitt's lymphoma cells from oxidant-induced cell death. *Blood* 1997;89:4480-92.
67. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 1998;333:291-300.
68. Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, Toyama I, Kimura H, Shimohama S, et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia* 1999;25:154-64.
69. Virgili F, Santini MP, Canali R, Polakowska RR, Haake A, Perozzi G. Bcl-2 overexpression in the HaCaT cell line is associated with a different membrane fatty acid composition and sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1998;24:93-101.
70. Satoh T, Enokido Y, Aoshima H, Uchiyama Y, Hatanaka H. Changes in mitochondrial membrane potential during oxidative

- stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurol Res* 1997;50:413-20.
71. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Pietra C. Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994;13:1017-30.
 72. Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, et al. IFN- γ mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 1999;163:920-6.
 73. Nobuhiko K, Noriko Y, Masafumi N, Hiroshi E, Ko O, Hideo Y. Type I interferon regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effect of type I IFNs. *J Exp Med* 1999;189:1451-60.
 74. Herr I, Martin-Villalba A, Kurz E, Roncaioli P, Schenkel J, Cifone MG, et al. FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain Res* 1999;826(2):210-19.
 75. Musgrave BL, Phu T, Butler JJ, Marrigiannis AP, Hoskin DW. Murine TRAIL expression induced by T cell activation is blocked by rapamycin, cyclosporin A and inhibitors of PI3-kinase, PKC and PTK : evidence for TRAIL induction via the T cell receptor signalling pathway. *Exp Cell Res* 1999;252:96-103.
 76. Rieger J, Ohgaki H, Kleihues P, Weller M. Human astrocytic brain tumors express AP02L/TRAIL. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;97:

1-4.

77. Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, et al. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 1999;19:3809-17.
78. Bonetti B, Pohl J, Gao YL, Raine CS. Cell death during autoimmune demyelination: effector but not target cells are eliminated by apoptosis. *J Immunol* 1997; 159:5733-41.
79. D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, et al. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 1996;184:2361-70.
80. Duffy S, MacVicar BA. Modulation of neuronal excitability by astrocyte. *Adv Neurol* 1999;79:573-81
81. Satoh J, Kastrukoff LF, Kim SU. Cytokine-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cultured human oligodendrocytes and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1991; 50:215-26.
82. White CA, McCombe PA, Pender MP. Microglia are more susceptible than macrophages to apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism not involving Fas (CD95). *Int Immunol*. 1998;10:935-41.

Abstract

**Hydrogen Peroxide triggers the expression of
Fas, Fas Ligand and TRAIL in astrocytoma cell lines**

Daeho Kwon

*Division of Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor In-Hong Choi)

Apoptosis is known to be involved in several central nervous system diseases such as Alzheimer-type dementia, Parkinsonian disease, postischemic situations, and CNS tumors. While the mRNA of Fas was detected in both normal mouse brain tissues and primary culture of human astrocytes, the expression of Fas has not been detected in normal human brain cells. Fas can be induced by $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IFN-}\gamma$ in glial cells *in vitro*. Fas ligand is detected in primary cultures of human astrocytes. In the diseased brain, Fas ligand is expressed in oligodendroglial cells in multiple sclerotic plaque and in microglial cells

in mice with experimental allergic encephalomyelitis. TRAIL, a member of death ligand/receptor pairs, is independent of Fas mediated apoptosis. TRAIL induces apoptosis in transformed cell lines via DR4 and DR5. The decoy receptors for TRAIL, DcR1 and DcR2, were found in many types of normal cells but not in brain or colon.

In brain diseases, reactive oxygen species (ROS) including H₂O₂, superoxide anion and hydroxyl radicals are important mediators of physical and chemical stresses. The ROS-mediated damage is known to cause necrosis, but according to recent observations, it also seems to play a potential role in apoptosis. Antioxidant as well as the over-expression of antioxidant enzymes inhibit apoptotic cell death. Recent observations showed ROS modulated the expression of Fas and Fas ligand. The expression of Fas and Fas ligand was up-regulated in human endothelial cells, hepatoma cells and microglial cells under oxidative stress.

In this study the effects of oxidative stress to the brain cells were monitored by estimating the expression level of Fas, Fas ligand, TRAIL and TRAIL receptors in human astrocytoma cell lines. mRNA transcripts for Fas, Fas ligand, TRAIL and TRAIL receptors were determined by RNase protection assay or RT-PCR. Protein levels were estimated by Western blot or flow cytometry. Functional assay for Fas ligand or TRAIL was done with appropriated target cells such as MOLT-4 cells (for Fas ligand) and Peer cells (for TRAIL). Cell death assay was done by lactic dehydrogenase release assay, annexin V staining or propidium iodide staining.

The level of Fas mRNA began to increase after 1 hr of H₂O₂ treatment and thereafter persisted for 12 hrs in both cell lines, LN215 and LN319 cells. The expression of Fas ligand increased within 1hr and peaked between 2-6 hrs, after the addition of H₂O₂ in both cell lines. TRAIL expression increased between 8-24 hrs following the addition of H₂O₂. Astrocytoma cell lines expressed DR4, DR5, DcR1 and DcR2 constitutively but the expression was not modulated significantly by H₂O₂. The up-regulated Fas was functional because cells became sensitive to agonistic anti-Fas antibody. The up-regulated Fas ligands induced cell death in MOLT-4 cells and the up-regulated TRAIL induced apoptosis in Peer cells, which suggest these ligands were functional.

These findings suggest that Fas, Fas ligand and TRAIL were up-regulated by oxidative stress. Up-regulated Fas in astrocytoma cells may cause the sensitive apotic response of astrocytoma cells when they are in oxidative stress. On the other hand, up-regulation of Fas ligand or TRAIL may render astrocytoma cells to be cytotoxic to neighboring brain tissues and infiltrating immune cells. Therefore, it seems that oxidative stress may play an important role in apoptosis in pathological conditions of brain and immune privilege during brain development.

Key Words : oxidative stress, apoptosis, astrocytoma cell lines, H₂O₂, Fas, Fas ligand, TRAIL