

Hydrogen Proxide에 의해 손상된 배양 혈관내피세포에 대한 Allopurinol의 영향

석승한*

원광대학교 의과대학 산본병원 신경과학교실

Effect of Allopurinol on Vascular Endothelial Cells Damaged by Hydrogen Peroxide In Vitro

Seung Han Suk*

Department of Neurology, Wonkwang University Sanbon Medical Center

In order to examine the effect of oxygen free radicals on the vascular endothelial cells, cell viability was measured by XTT assay after bovine pulmonary vascular endothelial cell line(BPVEC) was treated only with hydrogen peroxide. In addition, the antioxidant effect of allopurinol on cells treated with hydrogen peroxide was examined by colormetric assay. In this study, the BPVEC treated with hydrogen peroxide showed the significantly decreased cell viability compared with control. Whereas, the viability of cells treated with hydrogen peroxide and allopurinol has significantly increased when compared with that of cells treated only with hydrogen peroxide. These results suggested that hydrogen peroxide, one of the oxygen free radicals showed cytotoxic effect and allopurinol has protective effect on oxygen free radical-induced cytotoxicity.

Key words : BPVEC, Hydrogen peroxide, Allopurinol

서 론

혈관내피세포의 손상은 내피세포의 혈관벽의 기능을 변화시켜 죽상경화증 (atherosclerosis)과 같은 병변을 초래하게 된다¹⁾. 혈관내피세포의 손상이 생기면 내피세포와 염증세포간의 부착력이 증가되며 활성산소의 산화에 의해 내피하층에 형성된 산화 저밀도지단백 (oxidized LDL)과 활성산소에 의해 전사요소인 nuclear factor kappa B(NF-kB)가 활성화 되면서 내피세포로 하여금 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)이나 monocyte chemotactic protein-1(MCP-1) 또는 macropage colony-stimulating factor(M-CSF)의 분비를 유도한다¹⁻³⁾. 특히, 산화 저밀도지단백은 혈관 이완을 위한 NO(nitric oxide)의 기능을 저하시키고 혈관 수축 물질인 endothelin의 분비를 촉진시킬 뿐만 아니라⁴⁾, 지질산화과정중 isoprostane과 같은 혈관수축물질

의 형성을 가속화 시켜 그 결과 동맥혈관의 탄력성에 이상을 일으키고 결국죽상경화증과 같은 병변을 생기게 한다^{1,6)}. 동시에 산화 저밀도지단백은 혈액응고에도 영향을 주어 혈소판의 응집을 촉진시키며 plasminogen activator inhibitor(PAI)의 분비를 야기하여 혈전(thrombosis)형성을 유도하기도 한다¹⁾. 또한 활성산소는 세포에 calcium channel에 영향을 주어 세포내 다량의 칼슘유입을 유발하여 결국 세포사멸을 초래하는데 관여하기도 한다^{7,8)}. NO는 반응성 질소로서 혈관내피세포에서 분비되는 혈관 확장 인자 중 하나인데 superoxide 같은 활성 산소와 반응하여 peroxynitrite라는 강력한 산화제를 형성하여 세포손상을 일으키며 저밀도지단백의 산화를 유도한다고 알려져 있다^{3,5)}. 죽상경화증의 형성에 시발점이 되는 내피세포의 손상은 정상적인 혈관 기능을 저하시켜 혈관수축이나 혈전형성 및 염증세포의 침윤과 같은 혈관 변화를 초래하는데^{1,9)}. 이러한 내피세포의 기능변화에 관여하고 있는 요인들을 정리하면 다음과 같다. 첫째, NO의 합성과 분비의 이상은 내피세포의 기능변화를 유발한다^{1,10)}. 둘째, 활성산소인데 이는 저밀도지단백을 산화시킴으로서 혈관내피에 손상을 준다^{1,11)}. 셋째, 혈관수축제인 prostanoid의 증가¹¹⁾. 넷째,

* 교신저자 : 석승한, 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대산본병원 신경과학교실
· E-mail : suksh@wonkwang.ac.kr, · Tel : 031-390-2231
· 접수 : 2005/05/22 · 수정 : 2006/07/08 · 채택 : 2006/08/02

세포내 이차 전달자인 protein kinase C (PKC)의 활성도가 내피세포의 기능변화에 관여한다¹²⁻¹⁴. 이 밖에도 G-protein이나 phosphoinositol (PI)등도 관여하고 있다¹². 이러한 인자들 중에서 특히 활성산소는 내피세포의 기능을 저하시킬 뿐만 아니라 혈관의 평활근의 증식을 유발하며, 혈소판에서 platelet-derived growth factor(PDGF)나 TXA2등을 분비를 자극하는 동시에 단핵세포에서 interleukin-1(IL-1)이나 tumor necrosis factor(TNF) 등의 분비를 촉진시킴으로써 죽상경화증을 더욱 가속화 시킨다^{1,15}. 특히 당뇨병 환자에서 활성산소에 의한 산화 스트레스는 혈관성 질환을 가속화 시키는데 중요한 인자이므로 임상적으로도 중요하다^{16,17}.

본 연구는 활성산소의 항산화 독성과 이에 대한 allopurinol의 세포 보호 효과를 세포수준에서 확인하기 위하여, 배양된 혈관내피세포에 활성산소의 일종인 hydrogen peroxide를 처리한 후 이의 영향을 정량적인 방법에 의하여 조사하였으며 또한 hydrogen peroxide에 대한 allopurinol의 항산화 효과를 세포생존율분석에 의하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용한 Eagles' minimum essential medium (EMEM)과 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사에서 구입하였으며, 이들을 냉장 또는 냉동에 보관후 사용하였으며, penicilin, fungizone(Sigma Co), trypsin(Sigma, Co), allopurinol은 각각 냉장보관 하였다.

2. 방법

1) 세포배양

혈관내피세포주(bovine pulmonary vascular endothelial cell line, BPVEC)의 배양은 MEM에 10% FBS이 포함된 배양액에 넣어 세포를 부유시킨 후 1×10^5 /well로 산정된 세포를 96-multiwell에 넣어 37°C, 5% CO₂/95% air로 조절된 정온기에서 5일 동안 배양하였다. 새로운 배양액은 3일 간격으로 교환하여 주었으며 배양 완료 후 실험에 사용하였다.

2) Hydrogen peroxide의 처리

배양이 완료된 세포에 활성산소종인 hydrogen peroxide(Sigma Co)를 각각 1, 5, 15, 25 uM로 5 시간 처리한 후 이의 영향을 대조군과 비교 조사하였다.

3) Allopurinol의 처리

배양이 완료된 세포에 allopurinol이 15, 25, 35 uM로 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전처리한 다음 25 uM hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 5 시간 동안 처리한 후 이의 영향을 XTT assay에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

4) XTT 정량

PBS에 녹인 1 mg laminin의 저장액을 냉장고에 보관한 후 실험당일 필요한 양을 희석한 다음 24 well plate에 200 µl씩 분주하여 하루밤 동안 건조시켰다. 건조 완료후 PBS로 두세번 세

척한 다음 3% BSA (Bovine serum albumin, Sigma Co.)를 각 well당 200 µl씩 첨가하여 잘 진탕한 후 다시 이를 PBS로 두세번 세척하였다. 배양된 혈관내피세포를 5×10^5 cells/ml 밀도로 배양용기에 넣고 24 시간 동안 배양하였다. 배양 완료후 CrO₃를 각각의 농도를 처리한 다음 48 시간 동안 배양한 다음 PBS로 두세번 세척하였다. 세척 완료후 XTT와 혼합후 각 배양용기에 200µl씩을 주입하여 4-6 시간 동안 배양한 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

5. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. Hydrogen peroxide 농도의 영향

Hydrogen peroxide가 혈관내피세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1, 5, 15, 25 uM의 hydrogen peroxide가 각각 포함된 배양액에서 5 시간 동안 처리한 후 hydrogen peroxide가 세포에 대한 영향을 세포생존율로 분석하였다. 그 결과 1 uM hydrogen peroxide의 처리에서는 대조군인 100%(4.80±0.27)에 비하여 71.3%(3.42±0.31)로 나타났으며 5 uM의 처리에서는 69.2%(3.32±0.49)로 나타났다. 또한 15 uM의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 79.7%(3.26±0.38)로 나타나 대조군에 비하여 다소 감소하였으나 25 uM의 처리에서는 57.5%(2.77±0.14)로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (p<0.05)(Table 1).

Table 1. The cell viability in different dosage of hydrogen peroxide on bovine pulmonary vascular endothelial cells(BPVEC) by XTT assay.

Concentration of H ₂ O ₂ (µM)	Group	
	Mean±S.D.	(% of control)
control	4.80±0.27	100
1	3.42±0.31	71.3
5	3.32±0.49	69.2
15	3.26±0.38	67.9
25	2.77±0.14	57.7*

Bovine pulmonary vascular endothelial cells(BPVEC) were incubated with or without 1-25 µM hydrogen peroxide for 48 hours. The value represent the mean±SD for triplicate experiments. *p<0.05 (Student's t-test).

2. 시간별 hydrogen peroxide의 영향

Hydrogen peroxide가 혈관내피세포에 미치는 영향을 시간별로 조사하기 위하여 25 uM의 hydrogen peroxide가 포함된 배양액에서 1, 3, 5, 7 시간 동안 처리한 후 hydrogen peroxide가 세포에 대한 영향을 세포생존율로 분석하였다. 그 결과 1 시간 동안 hydrogen peroxide의 처리에서는 대조군인 100%(5.32±0.47)에 비하여 58.3%(3.10±0.45)로 나타났으며 3 시간 동안의 처리에서는 55.8%(2.97±0.17)로 나타났다. 또한 5 시간 동안의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여

50.9%(2.71±0.24)로 나타났으며 7시간 동안의 처리에서는 47.4%(2.52±0.16)로 나타나 세포생존율이 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소한 것으로 나타났다(p<0.05)(Table 2).

Table 2. The time interval-dependent cell viability of hydrogen peroxide on bovine pulmonary vascular endothelial cells(BPVEC) by XTT assay.

Incubation time of H ₂ O ₂ (hour)	Group	
	Mean±S.D.	(% of control)
control	5.32±0.47	100
1	3.10±0.45	58.3*
3	2.97±0.17	55.8*
5	2.71±0.24	50.9*
7	2.52±0.16	47.4*

Bovine pulmonary vascular endothelial cells(BPVEC) were incubated with 25 μM hydrogen peroxide for 1-7 hours. The value represent the mean±SD for triplicate experiments. *p<0.05 (Student's t-test).

3. Allopurinol의 항산화 효과

Allopurinol이 hydrogen peroxide에 미치는 영향을 조사하기 위하여 25 μM hydrogen peroxide로 세포를 처리하기 2 시간 전에 15, 25, 35 μM allopurinol이 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 영향을 알아보기 위하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 25 μM hydrogen peroxide만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군인 100%(6.88±0.54)에 비하여 49.9%(3.43±0.41)로 나타났는데 비하여 15 μM의 allopurinol로 전처리한 세포들에서는 50.6%(3.48±0.27)로 나타났다. 또한 25 μM의 allopurinol 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 61.8%(4.25±0.43)로 나타나나 hydrogen peroxide만 처리한 군에 비하여 다소 증가하였으나 35 μM의 처리에서는 73.1%(5.03±0.47)로 나타나 전처리한 allopurinol의 농도가 높을 수록 낮은 농도에 비하여 세포생존율이 증가한 것으로 나타났다(p<0.05)(Table 3).

Table 3. The cell viability of dosage of allopurinol on bovine pulmonary vascular endothelial cells (BPVEC) treated with hydrogen peroxide(H₂O₂) by XTT assay.

Concentration of allopurinol (μM)	Group	
	Mean±S.D.	(% of control)
control	6.88±0.54	100
H ₂ O ₂	3.43±0.41	49.9
15	3.48±0.27	50.6
25	4.25±0.43	61.8
35	5.03±0.49	73.1*

Bovine pulmonary vascular endothelial cells(BPVEC) were incubated allopurinol with hydrogen peroxide for 5 hours. The value represent the mean±SD for triplicate experiments. *p<0.05 (Student's t-test).

고 찰

죽상경화증은 동맥혈관의 내피세포 손상과 동반되어 혈관의 기능 및 형태 변화에 의해 생기는 흔한 혈관성 질환이다¹⁾. 내피세포의 손상은 혈소판의 흡착을 비롯하여 염증세포의 부착력 증가 및 여러 종류의 사이토카인(cytokine)의 분비를 촉진하므로 죽상경화증을 유발하는 병인으로 작용하는데¹⁸⁾, 특히

PDFG(platelet derived growth factor)를 비롯하여 TGF(transforming growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor)와 같은 성장인자와¹⁹⁾, interleukin(IL)-γ, IL-1, TNF등이 중요한 역할을 한다¹⁵⁾. 최근에 활성산소에 의한 산화 스트레스가 노화, 뇌졸중 및 심근경색증 같은 혈관성 질환과 관련성에 대한 연구가 활발하다. 따라서 본 연구는 활성산소가 혈관내피세포에 미치는 세포독성을 조사하기 위하여 hydrogen peroxide를 배양 BPVEC에 처리한 결과 세포생존율이 약재를 처리한 농도가 높아 질 수록에 점차 감소하여 25μM 농도에서는 대조군에 비하여 세포생존율이 유의하게 감소함을 확인하였다. 이는 활성 산소에 의한 산화스트레스가 클수록 BPVEC에 대하여 심한 세포독성을 가지고 있다는 것을 의미하며, hydrogen peroxide가 세포막을 침투하여 사립체 (mitochondria) 같은 세포내 소기관을 손상시킴으로서 내피세포의 생존에 영향을 준 것으로 생각된다^{20,21)}. 또한 hydrogen peroxide는 사립체 뿐 아니라 내형질체망(endoplasmic reticulum)이나 리보솜체(ribosome)등에도 영향을 줌으로서 세포의 단백질합성에 영향을 주었거나 또는 핵산의 합성을 저하시켜 DNA나 RNA에 손상을 주어 세포독성이 생길 수 있는 것으로 생각된다²²⁾. Borenfreund 등²¹⁾은 특정물질에 대한 독성판정기준을 정하였는데 이를 보면 MTT50이나 XTT50 또는 NR50 값이 100μM 이하이면 고독성으로 판정하였으며 100-1,000 μM 이면 중간독성, 1,000-2,000 μM이면 저독성, 2,000 μM 이상이면 무독성으로 분류하였다. 이러한 기준에 따르면 hydrogen peroxide는 BPVEC에 독성이 강한 것으로 나타났다.

Allopurinol은 갈슘체널의 활성화와 관련이 있는 물질의 하나인데²³⁾ 산소유리기를 제거함으로써 항산화효소와 같은 작용이 있다고 알려지면서 이에 대한 연구가 진행되어 왔다²⁴⁾. 세포내에 있는 glutamate 수용체들은 1가 이온과 2가 이온들과 밀접한 연관을 가지고 있는데 특히, 2가 이온과 밀접한 연관을 가지고 있는 수용체는 Ca²⁺ 채널과 매우 연관이 깊다⁸⁾. allopurinol은 특히 Ca²⁺과 연관이 깊은 수용체의 길항제로 작용함으로써 세포내 칼슘대사에 관여하고 있다^{23,24)}. 따라서 본 연구에서는 allopurinol의 항산화 효과를 조사하기 위하여 hydrogen peroxide를 처리한 내피세포에 allopurinol을 처리하여 이의 영향을 XTT assay에 의하여 정량 분석하였는데, allopurinol은 hydrogen peroxide에 의해 산화 스트레스를 이겨내고 남아 있는 내피세포의 생존율이 allopurinol의 농도가 높을수록 유의하게 커지는 결과를 보였다.

따라서 이러한 결과들은 활성산소에 의한 세포독성에 대한 보호효과, 즉 항산화 효과를 allopurinol이 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이 현상은 세포로 들어간 allopurinol이 SOD(superoxide dismutase) 나 catalase 또는 glutathione과 같은 항산화 효소처럼 활성산소의 산소유리기를 제거함으로써 hydrogen peroxide에 의한 손상으로부터 세포를 보호할 수 있을 것으로 생각된다. 또 다른 가능성으로 allopurinol이 세포의 갈슘체널의 활성화와 밀접한 관련이 있다는 것을 고려해 볼 때 활성산소에 의하여 유발되는 세포내 갈슘유입을 막으므로써 세포내 대사과정에 관여하였을 수도 있다^{23,25)}.

그러나 allopurinol의 항산화 효과의 기전을 규명하기 위해

서는 활성산소에 대한 allopurinol의 MDA(malonic dehydrogenase activity)의 정량분석을 비롯하여 세포내 Ca^{2+} 의 변화에 대한 정량적 분석과 같은 연구들이 추후에 병행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

죽상경화증의 병리적 요인의 하나인 혈관내피세포의 손상에 대한 활성산소의 영향을 조사하고 allopurinol의 항산화 효과를 확인하기 위하여 혈관내피세포인 BPVEC를 배양한 후 hydrogen peroxide를 처리한 다음 이의 영향을 XTT assay에 의해 정량적 분석을 시행하였으며 또한 hydrogen peroxide에 대한 allopurinol의 영향을 조사하였다. 그 결과 hydrogen peroxide를 처리한 세포에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 유의하게 감소함으로써 hydrogen peroxide는 BPVEC에 대하여 농도와 노출된 시간에 비례한 세포독성을 나타냈다. 또한, hydrogen peroxide에 대한 allopurinol의 영향 조사에서는 allopurinol을 처리한 세포는 hydrogen peroxide 만을 처리한 세포에 비하여 세포생존율이 유의하게 증가함으로써 내피세포에 대한 항산화 효과를 확인하였다.

감사의 말

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. Libby, P., Deanfield, J.E. A CME monograph : Atherosclerosis and vascular disease Academy for Health Education. pp 1-28, 2002.
2. Sellke, F.M., Armstrong, M.L., Harrison, D.G. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circ Res* 81:1586-1593, 1990.
3. Ballinger, S.W., Patterson, C., Yan, C.N., et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells *Circ Res.* 86:960-966, 2000.
4. Bevilacqua, M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 11:767-804, 1993.
5. Toda, N., Okamura, T. Role of nitric oxide in neurally induced cerebroarterial relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 258:1027-1032, 1991.
6. Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 89(suppl):87-102, 1994.
7. Kaneko, M., Elmban, V., Dhalla, N.S. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} pump by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 261:4948-4955, 1989.

8. Toraason, M., Breitenstein, M. Intercellular calcium transients in cardiac myocytes exposed to carbon tetrachloride(abstract). *Toxicologist* 11:310, 1991.
9. Gibbons, G.H., Dzau, V.J. Molecular therapies for vascular diseases. *Science* 272:689-693, 1996.
10. Johnstone, M.T., Creager, S.J., Scales, K.M. et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88:2510-2516, 1993.
11. Tesfamariam, B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 16:383-391, 1994.
12. Gawler, D., Milligan, G., Spiegel, A.M., et al. Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi activity in diabetes. *Nature* 327:229-232, 1987.
13. Greene, D.A., Lattimer, S.A., Sima, A.A.F. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complication. *N Engl J Med* 316:599-606, 1987.
14. Lee, T.S., MacGregor, L.C., Fluharty, S.L. et al. Differential regulation of protein C and (Na, K)-adenosine triphosphate activities by elevated glucose levels of retinal capillary endothelial cells. *J Clin Invest* 83:90-94, 1989.
15. Ganz, M.B., Saks, B., Saxena, R., Hawkins, K., Sedor, J.R. PDGF and IL-1 induce and activate specific protein kinase C isoforms in mesangial cells. *Am J Physiol* 217:F108-F113, 1996.
16. Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M. Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D., Stern, D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycosylation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897, 1994.
17. Dario, G., Antonio, C., Giuseppe, P. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267, 1996.
18. Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., Marunouchi, T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491:394-397, 1989.
19. Goldstein, R.H., Poliks, C.F., Pilch, P.F., Smith, B.D. Fine A. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts. *Endocrinology* 124(2):964-970, 1989.
20. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983.
21. Borenfreund, E., Babichi, H., Matin-Alcuacil, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay. The neutral red(NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro* 2:1-8, 1988.
22. Loft, S., Astrup, A., Buemann, B., Poulsen, H.E. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 8:534-537, 1994.

23. Elion, G.B., Kovensky, A., Hitchings, G.H., Metz, E., Rundles, R.W. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* pp 863-880, 1996.
24. Mayer, M.L., Westbrook, G.L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J Physiol* pp 501-527, 1987.
25. Tesfamariam, B., Cohen, R.A. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 263:H321-H326, 1992.