

의학 석사학위 논문

폐포 상피세포주에서 실리카에 의한
Peroxi-redoxin의 발현 변화

아주대학교 대학원

의학과

이혜림

폐포 상피세포주에서 실리카에 의한
Peroxi-redoxin의 발현 변화

지도교수 황 성 철

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2006년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 혜 림

이혜림의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 황 성 철 인

심 사 위 원 윤 계 순 인

심 사 위 원 박 광 주 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2006년 6월 22일

I. 서론

활성 산소종 (Reactive oxygen species, ROS)은 superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals (HO^\cdot), ROOH 등을 일컫는 말로 이들은 세포의 정상적인 호흡과정에서도 발생하지만 펩티드 성장 인자, 사이토카인 및 다양한 신호에 의한 자극에 대해 세포가 성장, 분화, 암성 변이 등을 일으킬 때도 생성 된다(John R. Hoidal, 2001). 이런 ROS는 공기 중의 산소를 호흡해서 산화에 얻어지는 에너지를 이용하여 생명을 유지하는데 절대적으로 필요하지만, 이런 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되어 생체 조직을 공격하여 세포를 산화시키거나, 노화 손상시킬 경우의 주된 성분이며 이런 경우 유해산소라고도 한다(Rhee SG 등, 1994). 그러나 다른 한편으로는 병원체나 이물질을 제거하기 위한 생체방어 과정에서 O_2^- , H_2O_2 와 같은 활성산소가 대량 발생하며 ROS의 강한 살균작용을 통해서 병원체로부터 인체를 보호하는 작용을 하며 (John R. Hoidal, 2001), 비교적 낮은 농도의 활성 산소종은 세포내 신호전달 반응에 관여하는 제2차 신호전달 물질이라는 사실이 이미 기정사실화 되어 있다 (John R. Hoidal, 2001; Rhee SG 등, 1999). 이미 잘 알려진 바와 같이 활성 산소종 중에서 특히 H_2O_2 의 경우, 효소작용에 의해 비교적 높은 농도가 빠른 시간 내에 생성되며, peroxidase와 catalase 등의 효소에 의해 필요할 때 신속하게 소멸되고, 비교적 안정성이 있어 조직과의 비 특이적 반응이 적은데다가, 확산이 자유롭고, 세포막의 외부와 내부 사이에 뚜렷한 농도 차이 (concentration gradient)가 존재하며, 세포 소기관들 (organelles) 내에서 차별화된 국지적인 분포 (local concentration difference)를 보인다는 점에서 2차 신호전달물질로서 주목을 받고 있다(Stone JR, 2004).

Peroxiredoxin (Prx)는 효모에서 처음 발견된 약 25kDa의 단백질로 거의 모든 생명체에 공통적으로 (ubiquitous) 보존되어 있으며, ROS계의 신호전달 물질인 저농도 H_2O_2 를 조절하는 기능을 가져, 세포 내외에서 항산화효소 뿐만 아니라 2차 신호전달 물질의 농도를 조절하는 인자로서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(John R. Hoidal, 2001). 현재 Prx는 포유류 세포에서는 모두 6 종류의 동위효소 (isoform)들이 밝혀져 있으며, 주로 세포질 내에서 발견되는 Prx I 과 Prx II, mitochondria 내부에만 존재하는 PrxIII가 있고, 소포체 내에서 생성되어 세포 밖으로 분비되는 PrxIV가 있다. 그리고 라이소좀 또는 퍼옥시좀 내에서는 Prx V가 발견되고, 세포의 핵 내에서는 Prx I 과 Prx II가 미량 존재한다고 하며, 또한 1개의 보존된 cysteine 잔기만을 갖고 있는 비전형적인 (atypical) PrxVI가 있으며 이는 특히 폐에 많이 발현되는 것으로 알려져 있다 (Chae HZ 등, 1993; Chae HZ와 Rhee SG, 1994; Hofmann B등, 2002). Prx는 외부 자극에 의해 생성된 H_2O_2 , alkylhydroperoxide를 환원시켜 물과 알코올로 만드는 효소이다. 이 과정에서 thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase (TR) 및 NADPH 등과 연계되는 전자전달체계를 형성한다(Chae HZ 등, 1993; Chae HZ와 Rhee SG, 1994). 폐 조직은 항상 산화 스트레스 및 염증반응에 노출되기 때문에 조직 내의 glutathione 등의 항산화 효소의 종류도 많고 풍부한 것으로 알려져 있는데, 특히 PrxVI는 폐 조직에 많이 발현되어 있으므로 이 비전형적인 Prx 아형이 폐의 산화에 대한 방어 기능을 담당하는 것으로 보고 된 바 있다 (Dierick JF 등, 2003). 일반적으로 Prx의 작용과 발현에 관한 연구는 비교적 많이 시행되어 왔지만 내, 외부 자극에 의한 발현 감소 및 분해 과정은 잘 알려져 있지 않다. Rat2 세포주를 이용한 한 실험보고에서 실리카 (SiO_2 , silica)에 의한 Prx 단백질의 분해가 보고되었고 이 과정에는 proteasome 경로가 관여하지 않는

것으로 시사된 바 있으나 Prx의 분해 과정에 대한 자세한 기전에 대한 연구는 매우 빈약한 실정이다(Seo MS 등, 1999). 이에 본 연구에서는 이를 토대로 하여 실리카에 의한 Prx의 분해 과정에 대한 기전을 연구하고자 하였다. 특히 실리카는 호흡기 질환 중에서 잘 알려진 진폐증의 하나인 규폐증의 원인물질로서 잘 알려져 있어 폐포 상피세포기원 세포주를 대상으로 실험을 하였다.

규폐증 (silicosis)의 원인물질인 실리카는 지각에서 가장 풍부한 원소인 규소와 산소로 이루어진 화합물로 석영, 트리다이마이트, 크리스토팔라이트의 3가지의 주요결정형태로 분류된다. 규폐증은 실리카를 포함한 먼지의 장기적 흡입 및 침전에 의해 발생하는 진행성의 만성 폐섬유화 질환으로서 주로 채석장 인부, 석공, 산업근로자 등에게 많이 발생한다. 일부 실리카 다형체들은 또한 폐암의 원인이 될 수 있는 것으로 보고된 바 있다. 흡입된 실리카는 폐포 대식세포에 탐식되어 세포사 및 조직손상을 초래하며 결국 섬유아세포의 증식 및 섬유성 결절을 형성하는 것으로 알려져 있으나 정확한 이 질환의 발병기전은 아직 규명되지 않은 상태이다. 실리카는 ROS를 유리하는 작용이 알려져 있는데 이러한 산화스트레스가 발병기전에 일부 관여할 것으로 사료되나 그 외의 다른 세포독성 작용 또한 있을 것으로 추정되고 있다(Binaya Rimal 등, 2005).

본 연구에서는 실리카에 의한 폐 손상 기전에 대한 연구의 일환으로서 폐포 상피세포를 대상으로 실리카를 처리하여 세포사 유무 및 세포의 형태학적 변화를 관찰하고자 하였으며, 이때 전술한 바와 같은 Prx의 분해현상이 폐포 상피세포주에서도 발생하는지 여부와 그 양상을 확인하고 분해경로에 대한 좀 더 구체적인 연구 분석을 하고자 하였다. 이러한 연구는 규폐증의 병인에 있어서 Prx 등의 항산화체계관련 인자들의 역할과 관련성 연구에 대한 기초 자료를 마련하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

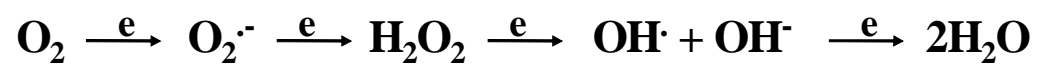


Fig. 1. Illustration of Sequential reduction of O₂

II. 재료 및 방법

A. 재조합 DNA

Ubiquitin cDNA의 완전한 염기서열은 human brain cDNA library (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.)를 주형으로 이용하여 forward primer (5'-GCGGCCGCATGCAGATCTTCGTGAAGA-3')와 reverse primer (5'-GCGGCCGCTTACCCACCTCTGAGACGGAG-3')로 PCR (95°C, 1' - 37°C, 1' - 72°C, 1' - [95°C, 1' - 55°C, 1' - 72°C, 1']³⁰-72°C, 10')을 했다. 우선 증폭된 ubiquitin 유전자를 pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, U.S.A.)에 T4 DNA Ligase (Invitrogen Life Technologies)를 사용하여 ligation 하였다. 이 복제된 유전자와 pCMV-HA Vector (Clontech, Mountain View, CA, U.S.A.)를 제한효소 Apa I 와 Sal I (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, U.S.A.)로 처리한 후 ligation해서 HA-tagged ubiquitin을 제작하였다.

B. 실험 대상 및 세포배양

사람 폐포 상피세포의 1형 및 2형 세포에서 각각 기원한 WI26 세포주와 A549 세포주 (ATCC, Rockville, MD, U.S.A.)를 사용하였고, 또 mouse 대식세포주 기원인 Raw264.7 세포주 (ATCC)를 이용하였다. 배양은 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)과 각각 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL), RPMI1640 (Gibco BRL) 배양액을 이용하여 37°C 5% CO₂의 조건하에서 배양하였다. 배양액은 매 3일마다 교환하였고, 세포가 융합상태가 되면 0.25% trypsin/ethylene diamine tetraacetic

acid (EDTA, Gibco BRL)를 사용하여 주기적으로 분주하였다.

C. 세포주에 시약 처리

실리카(Sigma) 1mg/ml는 0, 24, 48 시간을 기준으로 A549세포주와 WI26세포주에 처리하였다. 또한, ROS의 축적을 막는 *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.)와 diphenyleneiodonium (DPI, Calbiochem, Darmstadt, Germany)를 A549 세포주에 먼저 처리하고 1시간 후에 실리카(Sigma) 1mg/ml를 처리하여 24, 48 시간에 수확 후 이후 실험을 수행하였다. proteasome 저해제인 MG-132 (Calbiochem) 10uM은 세포에 실리카를 처리한 후 세포를 수확하기 12시간 전에 처리하였다.

D. A549 세포주에 HA-ubiquitin의 transfection

Transfection 하기 24시간 전 A549 세포주를 분주하여 안정화 시킨 후 다음 날 배지 교환 후 HA-ubiquitin plasmid (20 μ g)을 IipofectamineTM 2000 (Invitrogen Life Technologies)을 사용하여 A549 세포주에 transfection시키고 (Ubiquitin-A549) 24시간 후 실리카와 MG-132를 처리하였다.

E. Western blot 분석

실험 대상 세포주로부터 얻어진 세포를 protein lysis buffer (20mM Tris pH7.4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 100mM NaCl, 5ug/ml leupeptin, 10ug/ml aprotinin)로 protein을 추출하여 12,000rpm에서 약 10분 원심 분리하여 침전시킨 후 상층액을 취하고 이를 bradford (Bio-rad, CA, U.S.A.)로 단백 정량하여 12% SDS PAGE로 전기 영동하여 분리한 후 nitrocellulose membrane에 이동시켰다.

각 polyclonal peroxiredoxin (Prx) I-VI antibody (Labfrontier, Seoul, Korea) 및 monoclonal HA antibody (Sigma), monoclonal I κ B- α antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) 항체를 사용하여 1차로 처리하고, peroxidase가 conjugation된 sheep anti-mouse나 donkey anti-rabbit antibody로 2차 항체 처리 후 ECL (enhanced chemilluminescence, Amersham biosciences, England)를 시행하였다.

F. 면역 침강법 (Immunoprecipitation)

A549 세포주에 ubiquitin을 과발현 시켜서 얻은 단백질에 20 μ l protein A agarose (Upstate, Charlottesville, VA, U.S.A.)를 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C 냉장실에서 1시간 반응시키고, 4 $^{\circ}$ C, 4,000rpm에서 5분간 원심분리를 해서 정제과정을 진행하였다. 상층액만 취하여 Anti-HA (2 μ g)를 넣고 4 $^{\circ}$ C 냉장실에서 2시간 반응시키고, protein A agarose (20 μ l)를 넣고 다시 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 4 $^{\circ}$ C, 4,000rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 상층액은 제거하고 침전물을 취하였다. 이를 protein lysis buffer로 수세하고 4 $^{\circ}$ C, 4,000rpm에서 5분간 원심 분리하는 과정을 총 5회 실시하였다. Immunoprecipitation한 sample에 1X sample buffer를 넣어 10 μ l/lane 으로 전기영동 후 western blot 분석을 시행하였다.

III. 결 과

A. 사람 폐포 상피세포주에서 각각의 Prx 동위효소의 발현 양상

사람 폐포 상피세포주 A549, WI26세포주 그리고 Raw 264.7 mouse 대식 세포주에서 Prx 각각의 유형에 대한 발현양상을 살펴본 결과 세포 특이적으로 발현 양상이 달랐다. 사람 2형 폐포 상피세포를 대표하는 A549 세포주에서는 Prx I, III, IV, V 및 VI가 관찰되었지만 효모 또는 인체 적혈구에서 주요 항 산화단백질로 알려진 PrxII는 거의 관찰되지 않았다. 또한 사람 1형 폐포 상피세포에서 기원한 WI26 세포주는 모든 Prx 동위 효소들이 관찰되었다. Raw 264.7 대식 세포주에서는 Prx IV, VI 아형을 제외한 다른 네 가지 유형의 Prx 동위효소들이 검출되었다 (Fig. 2).

B. 사람 1형 및 2형 폐포 상피세포주에서 실리카에 의한 Prx의 발현 변화

사람 2형 폐포 상피세포주인 A549와 1형인 WI26 세포주에서 실리카의 영향은 기존에 알려진 정보들을 참고로 실리카 농도는 1mg/ml을 기준으로 하였으며, 실리카 노출 시간을 0시간, 24시간, 48시간으로 하여 Prx의 발현 변화를 보았다. Prx의 발현 변화는 2형 A549 세포주에서는 Prx I이 비교군보다 발현 감소 (Fig. 3A)를 보였지만, 다른 동위효소에서는 발현 변화가 거의 없었고, PrxII는 Fig. 2에서와 같이 발현이 없었다 (Fig. 4A). 1형 상피세포주인 WI26 세포주에서는 Prx I, PrxII의 발현 변화가 비교군보다 많은 감소를 보였지만 (Fig. 3B), 다른 Prx 아형은 A549세포주에서와 같이 변화가 거의 없었다 (Fig. 4B).

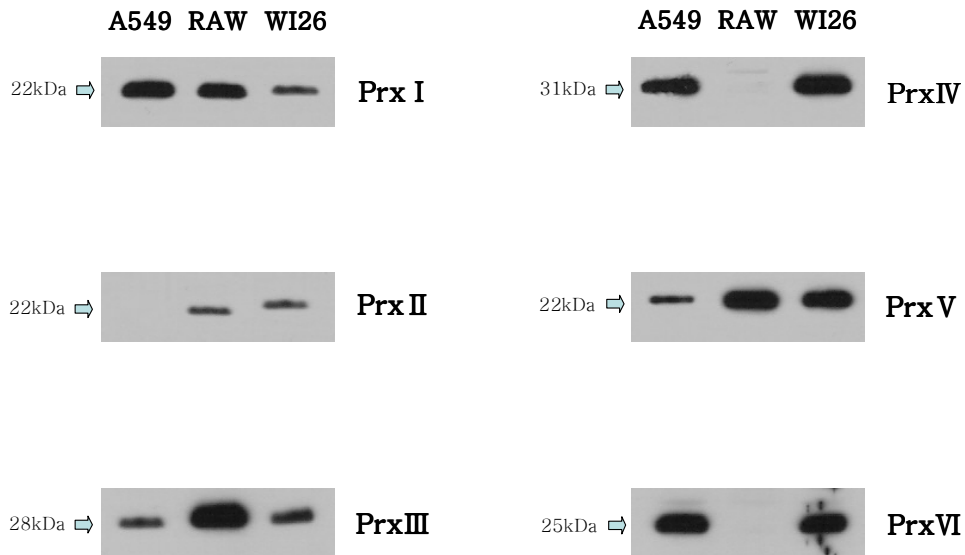


Fig. 2. Expression of Prx isoforms in lung cells. Various cell lines (A549, Raw264.7 and WI26) were lysed in lysis buffer and 10 μ g/lane of the total protein extract was loaded onto 12% reducing SDS PAGE with subsequent western blot analysis by Prx isoform specific antibodies. The lysates were incubated with the sample buffer containing both DTT and β -mercaptoethanol, which reduce the intermolecular disulfide linkages of the Prx proteins.

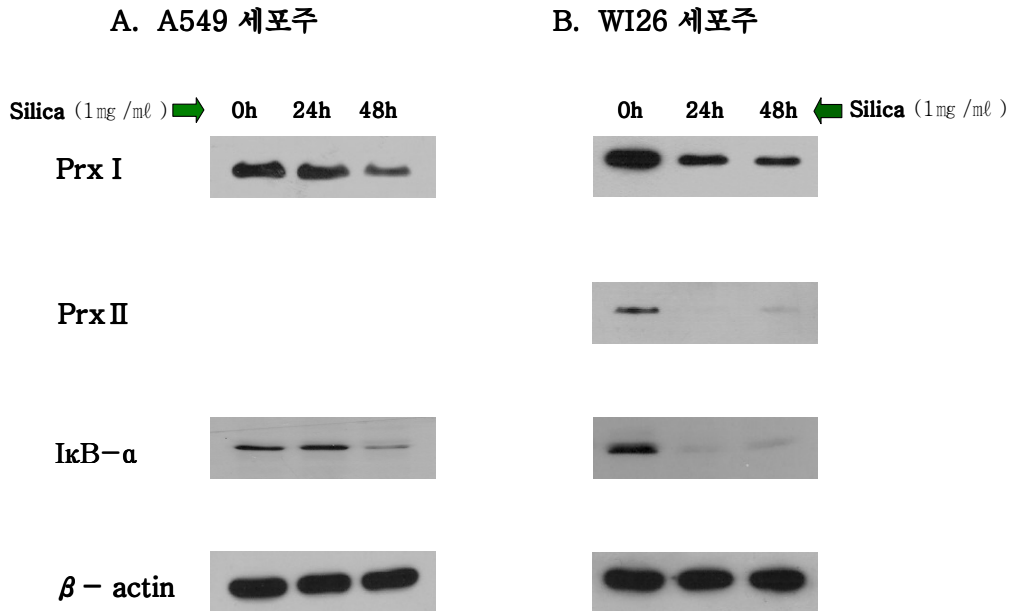


Fig. 3. Effect of silica on the abundance of Prx I , PrxII and IκB-α in lung epithelial cell lines. (A) A549 cells were exposed to silica (1mg/ml) for the indicated times, after which cell lysates (10μg or 30μg of protein per lane) were subject to western blot analysis with specific antibodies. (B) WI26 cells were exposed to silica (1mg/ml) for the indicated times. The samples were treated in the same way as in the (A).

A. A549 세포주

B. WI26 세포주

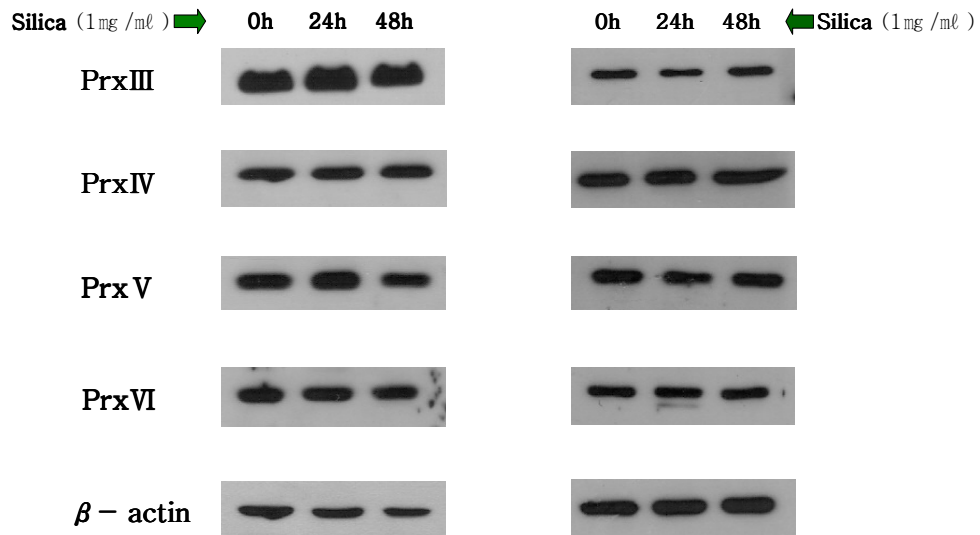


Fig. 4. Effect of silica on the abundance of Prx isoforms (PrxIII - VI) in lung epithelial cell lines. (A) A549 cells were exposed to silica (1mg/ml) for the indicated times, after which cell lysates (10 μ g or 30 μ g of protein per lane) were subject to western blot analysis with specific antibodies. (B) WI26 cells were exposed to silica (1mg/ml) for the indicated times. The samples were treated in the same way as in the (A).

C. 실리카에 의해 유발된 Prx 발현 변화의 기전 분석

실리카에 의한 Prx 단백질 발현 감소는 실리카에서 직접적으로 형성되는 ROS로 인한 단백질 합성 저해 때문은 아닌 것으로 알려진 바 있다(Seo MS 등, 1999). 따라서 실리카에 의해 생성되는 ROS와의 연관성을 재확인하기 위해 직, 간접적으로 생성된 ROS를 제거하는 NAC와 NADPH oxidase system의 산화, 환원 관련 단백질 성분의 활성화로부터 ROS 산물을 저해하는 DPI를 이용하여 확인한 결과, 실리카 처리시 ROS inhibitor와 상관없이 Prx의 발현은 여전히 감소하는 것으로 확인되었다. 대조군을 ROS에 의해 단백질 분해가 촉진되어 발현 양이 감소하는 것으로 알려진 I κ B- α 의 발현은 실리카만 처리 시 발현이 감소하였으나 ROS 저해제를 같이 처리하였을 때에는 발현감소가 없었다 (Fig. 5). 이 결과로 실리카에 의해 유도된 Prx 단백질 발현 감소에는 ROS가 관여하고 있지는 않으며 Prx에 대해 특이적인 작용인 것으로 나타났다.

D. 실리카에 의한 Prx 분해 경로 분석

A549 세포주에 실리카 (1mg/ml)에 의해 나타난 Prx I 단백질 발현 감소 현상은 Proteasome 저해제인 MG-132에 의해 회복되지 않았다(Fig. 6). 혹시 Proteasome의 protease 활성이 관여하지 못하는 이유가 ubiquitination의 활성저하에 의한 것이 아닌지를 확인하기 위해 ubiquitin을 A549 세포주에 과발현 (Ubiquitin-A549) 시켜서 Prx I의 발현양을 관찰하였으며, 면역 침강법을 통해서 ubiquitin이 결합되어 있는 Prx I의 양을 확인하고자 했다. 그러나 ubiquitin이 과발현된 세포주에서도 실리카에 의한 감소를 MG-132가 저해하지는 못하였고 (Fig. 7A), 면역 침강법을 이용하여 확인한 결과 또한 ubiquitin이 결합된 Prx I은 확인되지 않았다 (Fig. 8). 따라서 Prx I의 분해는 ubiquitination을 통한

proteasome 경로가 관여하지 않는 것으로 확인되었다. 실험과정 중 ubiquitin 과 발현에 사용한 LipofectamineTM 2000의 영향만으로도 Prx I의 약한 감소가 보였지만 (Fig. 7B), 실리카와 같이 처리한 경우에 Prx I의 감소가 더 현저하게 나타나는 것으로 보아 실리카의 영향이 큰 것으로 보인다 (Fig. 7A).

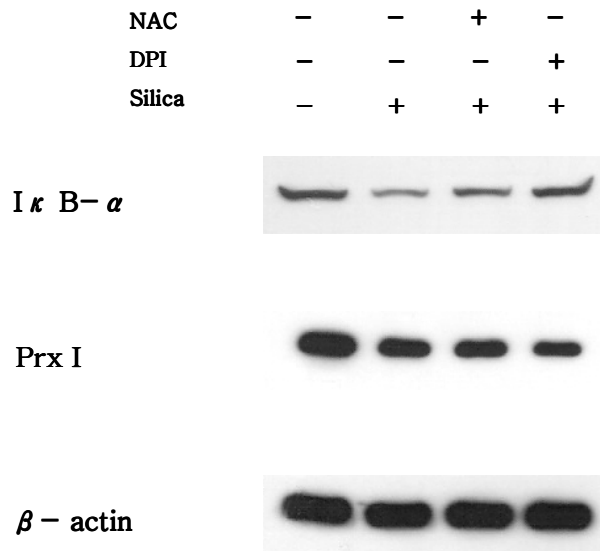


Fig. 5. Effects of NAC and DPI on silica-induced degradation of Prx I and I κ B- α in A549 cells. Cells were incubated for 1 hour in the absence or presence of 1mM NAC or 1 μ M DPI, and then for 48 hour with or without silica (1mg/ml). Cell lysates were prepared and subject to western blot analysis with specific antibodies.

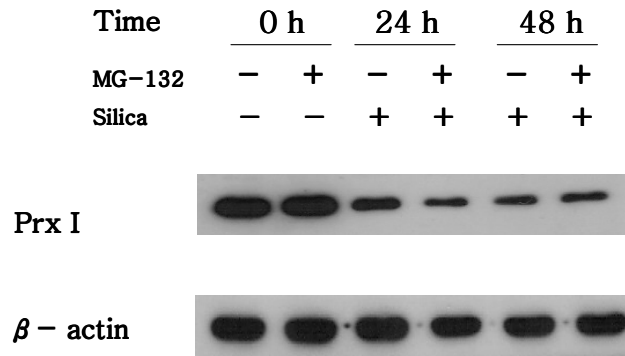


Fig. 6. Effects of MG-132 on silica-induced degradation of Prx I in A549 cells. Cells were incubated for 12 hour in the absence or presence of MG-132 (10uM) and then incubated with or without silica (1mg/ml) for indicated times. Cell lysates were prepared and subject to western blot analysis with specific antibodies.

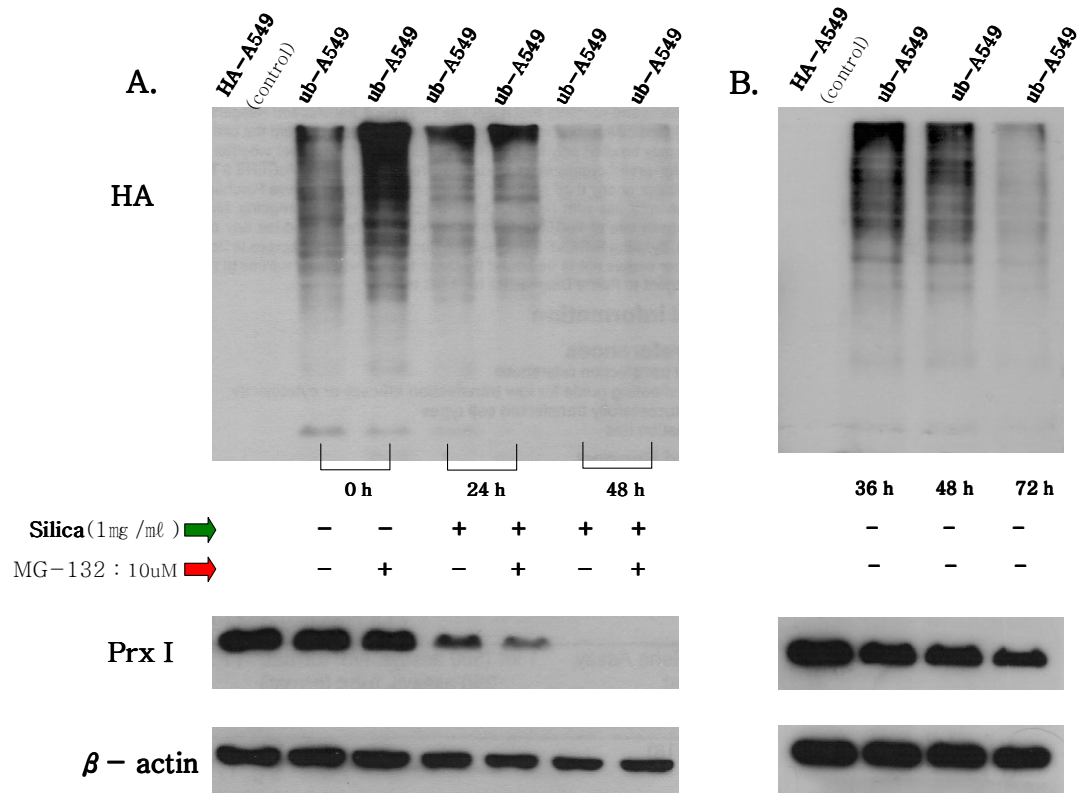


Fig. 7. Effects of MG-132 on silica-induced degradation of Prx I in ubiquitin-A549. (A) A549 cells were transfected with HA-ubiquitin construct. After 24 hours, cells were cultured in the presence of silica or/and MG-132 for the indicated times. Cell lysates were prepared and subject to western blot analysis with specific antibodies. (B) The cells were harvested at the indicated times after being transfected with HA-ubiquitin construct.

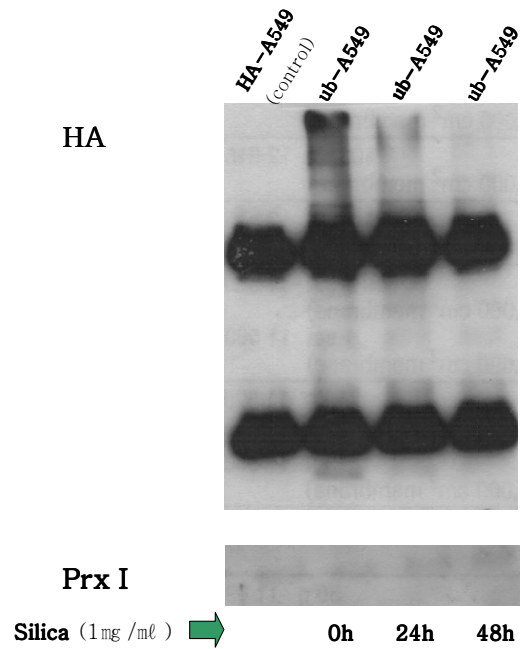


Fig. 8. Identification of interaction between ubiquitin and PrxI in A549 cells by co-immunoprecipitation. Ubiquitin-A549 lysates were co-immunoprecipitated with anti-HA and reacted with anti-HA and anti-Prx I antibodies.

IV. 고 찰

그 동안 산소는 세포나 생명체가 생명을 유지하고 에너지를 공급 받는 데 있어서 없어서는 안 될 중요한 원소로 알려져 있다. 하지만 과량의 산소는 활성 산소종의 유출을 통해 산화 스트레스를 생명체에 가하게 되고, 이러한 손상으로 인해 단백질, 지질 막, 염색체나 핵산 등이 변화되고 노화되거나 염증 반응을 유발한다고 알려져 왔다(Finkel T와 Holbrook NJ, 2000). 따라서 그 동안 학자들이 활성 산소종을 바라보는 시각은 세포 손상에 대한 세포내의 방어기전 측면이 중심을 이루어 왔다. 하지만 H_2O_2 를 포함한 활성 산소종은 2차 신호전달물질로서 세포의 정상적인 mitochondria 호흡과정, 세포막 수용체를 통한 성장인자나 cytokine 자극 등에 의해 생성되는 것이 기정사실화 되어 있고, 호중구나 대식 세포 등의 면역 세포뿐만 아니라 섬유 모세포, 대장 상피세포, 혈관 내피세포, 평활근세포 등의 거의 모든 종류의 세포가 NADPH oxidase 등의 효소를 이용해 활성 산소기를 이용한 신호 전달을 하고 있음이 밝혀지고 있다(Stone JR, 2004; Rhee SG 등, 2003; Forman HJ와 Torres M, 2001). 폐암을 비롯한 각종 암 종의 경우 지속적인 성장과 증식이 이루어지고 발암물질에 대해 끊임없이 노출되어 있으므로, 각종 성장인자의 자극에 따른 성장인자 수용체 tyrosine 인산화 과정, 탈 인산화 효소 억제로 인한 세포주기의 활성화 과정 및 MAP kinase 활성화 과정에서 많은 양의 산화 스트레스로 인한 활성 산소기, 특히 H_2O_2 의 발생이 많을 것이며, 이를 처리하는 Prx의 발현 또한 증가 할 것이다. 이렇듯 모든 질환의 발병기전에 있어서 산화환원 작용 및 산소기의 역할이 공통적이고 주요한 원인으로 대두되고 있으며, 비교적 근자에 발견된 Prx의 경우도 생체 내 항산화작용 및 신호전달계에서의 역할이 알려지고 있으며, 다양한 질환의 병인에 있어서의 역할

에 대해서도 활발히 연구되고 있다. 하지만 현재까지 Prx에 관한 연구들은 대부분이 발현 양상, 기능, 상호작용 등에 대한 것들이 주종을 이루었으며, 세포내 단백질의 trafficking이나 분해 과정 등에 대한 연구는 상대적으로 미진한 실정이다.

본 연구에서 실리카를 사용하여 Prx 단백질의 발현 감소와 분해 과정을 보고자 하였는데 그 결과 이전의 보고(Seo MS 등, 1999)에서와 같이 실리카에 의해 Prx의 발현 감소가 나타났지만 그 보고와는 달리 발현 감소가 시간적으로 매우 느리게 나타났다. 이러한 현상은 세포주의 특성의 차이에 의한 것으로 추정된다. 또한 그 실험보고에서는 MG-132 처리 후에 Prx 발현의 변화를 비교함으로써 proteasome 경로가 관여하지 않을 것이라는 사실을 간접적으로 시사하였는데 본 연구에서는 면역 침강법을 이용하여 Prx가 ubiquitination되지 않는다는 사실을 직접적으로 제시하였다는 점에서 의의가 있다고 할 것이다. Prx 분해가 proteasome 경로를 이용하지 않는다는 사실은 lysosome 경로를 이용할 것이라는 가능성을 추정할 수 있으나 본 실험에서는 실리카에 의한 현미경적 관찰의 장애 등으로 인하여 더 추가적인 실험을 하는데 어려움이 있어서 더 이상의 분해 경로에 대한 실험을 수행하지는 못하였다.

본 실험전의 예비실험 결과에서 강력한 단백질 분해 유도제로 알려진 TNF- α 를 처리 했을 때에도 Prx의 발현감소가 전혀 없었다는 점에서(data not shown) Prx는 매우 안정된 단백질로서 세포기능유지, 방어, 신호전달체계 유지 등에 있어서 매우 지속적이고 안정된 작용을 하고 있다는 사실을 간접적으로 시사한다고 할 것이다. 이러한 사실은 Prx가 반감기가 매우 길고 Trx, TR, NADPH 등과 연계된 전자전달계에 의해 재생되는 기전이 원활하게 작동한다는 점과도 상응하는 결과이며(Rhee SG 등, 2003), 최근에는 과거에 비가역적 반응으

로 생각되어 왔던 과산화된 sulfinic acid 형태의 Prx조차 sulfiredoxin이라는 단백질에 의해 환원, 재생된다는 사실까지 밝혀진 바 있어(Benoit 등, 2003) 더욱더 Prx의 안정성과 지속성을 뒷받침해주는 결과라고 할 수 있을 것이다. 또한 결과에서 제시한 바와 같이 DPI, NAC 처리 후 I κ B- α 발현변화를 관찰한 일련의 실험들을 통하여 실리카가 결코 단백질 합성에 장애를 초래하는 것은 아닌 것을 입증할 수 있었다.

실리카에 의해 폐포 상피세포의 세포사가 나타났다는 사실을 현미경적 관찰을 통하여 확인하였는데 실리카에 의한 간접작용에 의하여 정확한 수적인 평가를 시행하기는 어려웠으며, 또한 이미 알려진 바와 같이 실리카에 의해서 apoptosis가 일어나는 것으로 사료되기는 하나 caspase 관련 실험 및 apoptosis의 확인 실험 등은 기술적으로 어려움이 있어 본 연구 결과에서는 명확한 결과를 제시하지는 못하였다. 이 때 실리카의 작용에 있어서 한 가지 주목해야 할 점은 실리카의 세포사 유도에는 이미 알려진 바와 같이 ROS의 역할도 관여하겠지만 ROS를 길항했을 때에도 세포사가 관찰되었다는 점에서 또 다른 세포사 유도의 기전이 존재한다는 사실을 간접적으로 확인하였다는 사실이다. 그리고 Prx의 분해 작용에 있어서도 ROS의 작용이 주요기전은 아닌 것으로 나타났다. 대표적으로 ROS를 유도하는 물질인 TNF- α 를 처리했을 때 현저한 세포사는 관찰되었지만 Prx의 발현 감소는 전혀 없었다는 점 및 실리카 처리 시 ROS 길항제를 같이 투여했을 때에도 Prx 감소가 있었다는 사실은 실리카가 단순히 ROS의 작용에 의하여 Prx를 분해하는 것이 아니며, 그 고유의 어떠한 Prx 파괴기전이 존재할 것이라는 추정을 할 수 있으나 본 실험의 결과만으로는 이에 대한 정확한 해석은 어렵다. 보고에 따르면 실리카는 폐에 흡입이 되면 폐포 대식세포가 이를 섭취하고, 이 때 대식 세포는 TNF- α , IL-1 및 지방산의 대사 등에 의해 유도되

는 염증 반응에 의해 손상 및 활성화되며, 그 결과 ROS뿐만 아니라 NOS, TNF- α 등이 유리되어 결국 폐포 상피세포가 손상되고 이를 재생시키기 위해 섬유모세포의 증식이 일어나는 것으로 알려진 바 있다(Mossman BT 등, 1998; Robeldo R 등, 1999; Balaan MR 등, 1993). 이러한 일련의 병태생리적 과정과 관련되어 어떠한 단계에서 Prx 분해 작용이 초래될 수 있을 것이라는 것을 추정해 볼 수는 있겠으나 아직 규폐증에 대한 병인론 및 병태생리가 완전히 규명되지 않았고, Prx와의 관련성에 대한 연구가 미약한 관계로 향후 추가적인 연구가 필요할 것이다.

결과적으로 Prx는 매우 반감기가 길고 여러 파괴 작용에 대하여 저항성이 강한 안정적인 항산화체계임을 확인할 수 있었고 현재까지 알려진 바로는 다양한 형태의 단백질 파괴인자 및 특히 산화 스트레스에 대하여 매우 저항성이 있고 유독 실리카에 의해서만 분해된다는 사실을 볼 때 Prx가 폐에 있어서 중요한 방어 작용을 한다는 사실 및 나아가서는 규폐증의 발병기전에 있어서 Prx의 발현 변화가 일부 관여할 수 있을 것이라는 가설을 제시할 수는 있겠으나 본 연구에서는 이에 대한 구체적 연구를 수행하지는 못하였으므로 좀 더 추가적인 연구가 필요할 것이라고 생각된다.

V. 결 론

Prx는 항산화제로서 뿐만 아니라 신호전달계 조절기능이 알려지고 있으며, 그 생화학적 기능이나 여러 질환에서 발현 변화에 대한 많은 연구가 있었으나 분해 과정에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 그래서 만성 폐질환인 규폐증을 일으키는 실리카 유도 Prx의 분해 과정을 알아보고자 폐포 상피세포주인 A549에 실리카를 처리하여 Prx의 분해에 의한 발현 감소를 확인하였고 그 분해과정은 ubiquitin-proteasome 경로는 아닌 것으로 확인하였다. 실리카에 의해 Prx가 분해되며, 이는 규폐증의 발병과정에 역할을 할 것으로 추정되나 이에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ: HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 165:2950-4, 2000
2. Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J: Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage-or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1137-45, 2000
3. Abraham E: Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis* 187 Suppl 2:S364-9, 2003
4. Balaan MR, Banks DE: Clinical aspects coal workers' pneumoconiosis and silicosis. *Occupational medicine* Jan-Mar;8(1):19-34, 1993
5. Benoit Biteau, Fean Labarre & Michel B. Toledano: ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* vol 425, 2003
6. Binaya Rimal, Alissa K, Greenberg and William N. Rom: Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 11:169-173, 2005

7. Biteau B, Labarre J, Toledano MB: ATP - dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425:980-4, 2003
8. Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM: Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* 304:596-600, 2004
9. Chae HZ, Kim IH, Kim K, Rhee SG: Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268:16815-21, 1993
10. Chae HZ, Rhee SG: A thiol-specific antioxidant and sequence homology to various proteins of unknown function. *Biofactors* 4:177-80, 1994
11. Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG: Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7017-21, 1994
12. Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J, Turner RB: NADPH oxidase in human lung fibroblasts. *J Biomed Sci* 11:617-22, 2004
13. Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-47, 2000

14. Forman HJ, Torres M: Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med* 22:189-216, 2001
15. Griendling KK: Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 90:491-3, 2004
16. Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L: Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383:347-64, 2002
17. Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH et al.: Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117:625-35, 2004
18. Jones RD, Hancock JT, Morice AH: NADPH oxidase: a universal oxygen sensor. *Free Radic Biol Med* 29:416-24, 2000
19. Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA, Roy AK: Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol* 35:521-32, 2000
20. Lee SC, Na YP, Lee JB: Expression of peroxiredoxin II in vascular tumors of the skin: a novel vascular marker of endothelial cells. *J Am*

Acad Dermatol 49:487-91, 2003

21. Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE: Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:633-44, 1996
22. Moon EY, Han YH, Lee DS, Han YM, Yu DY: Reactive oxygen species induced by the deletion of peroxiredoxin II (PrxII) increases the number of thymocytes resulting in the enlargement of PrxII-null thymus. *Eur J Immunol* 34:2119-28, 2004
23. Mossman BT, Churg A: Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1666-1680, 1998
24. Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Kim SW, Park IA, Chae HZ: Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* 21:2085-90, 2001
25. Park SH, Chung YM, Lee YS, Kim HJ, Kim JS, Chae HZ et al.: Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. *Clin Cancer Res* 6:4915-20, 2000
24. Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW: Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* 14:S211-5, 2003

25. Robeldo R, Mossman B: Cellular and molecular mechanisms of asbestosinduced fibrosis. *J Cell Physiol* 180:158-166, 1999
26. Seo MS, Kim FK, Kang SW, Cho YJ, Lee WK, Kim HF, Cho KK, Lee KH and Rhee SG: Rapid Degradation of Prx I and PrxII Induced by Silica in Rat2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265, 541-544, 1999
27. Stone JR: An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. *Arch Biochem Biophys* 422:119-24, 2004
28. Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang KS, Chae HZ, Rhee SG: Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J Biol Chem* 278:47361-4, 2003
29. Yanagawa T, Ishikawa T, Ishii T, Tabuchi K, Iwasa S, Bannai S et al.: Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett* 145:127-32, 1999

-ABSTRACT-

Expression of Peroxiredoxin Induced by Silica in Alveola Epithelial Cells

Hye Lim Lee

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Sung Chul Hwang)

All aerobic organisms on earth use the oxygen for their cellular respiration and to derive energy source for their survival growth, and differentiations. However reactive oxygen species (ROS) are produced drawing these normal cellular respiration processes, by various growth factors and cytokine stimulation, different types of acute and chronic inflammation, and proliferation, differentiation, and process of carcinogenesis. Therefore it can be said that ROS can either function to promote cellular survival or damage cellular proteins and cause senile changes, apoptosis, and carcinogenesis. Peroxiredoxins (Prx) are relatively new family of protein identified, which reduce H_2O_2 and alkyl hydroperoxide to water and O_2 with help of thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase (TR), and use of one molecular of NADPH.

There are six different forms of Prxs identified in mammalian cells thus far with each specific function and sub-cellular localization. However, in contrast to the well-established functional studies on Prxs, its trafficking or degradation pathway has not been extensively studied. Silica, causative agent of silicosis was reported to have a function of Prx degradation, suggesting possible pathogenetic role in the development of the disease.

The cellular change and degradation pattern of Prx were studied by treatment of silica on the lung epithelial cell lines and following results were obtained.

1. Silica induced cell death in the lung epithelial cell lines.
2. Silica degraded Prx I in A549 cells without impairing the protein synthesis even when the effect of ROS was chemically blocked.
3. Silica-induced degradation of Prx was not involved with the ubiquitin-proteasome pathway.

In conclusion, silica induces death or senescence of the lung epithelial cell lines and degraded Prx regardless of ROS, suggesting possible pathogenetic implication with respect to silicosis.

Key words : Peroxiredoxin, Silica, Protein degradation, Ubiquitin, Proteasome pathway, Silicosis