J. Fd Hyg. Safety 11(4), 227 - 234(1996)

일차 배양 랫드 혈관 평활근 세포에서 Prostaglandin 생성에 미치는 Bacterial Lipopolysaccharide의 작용 특성

이수환

아주대학교 의과대학

Effects of Bacterial Lipopolysaccharide on Prostaglandin Production in Primary Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells

Soo Hwan Lee

Department of Physiology, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

ABSTRACT — This study was designed to characterize endotoxin-induced prostaglandin production in primary cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC). The time course for prostaglandin synthesis in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated VSMC showed that the maximum production was reached in 12 hours. LPS induced prostaglandin H_2 synthase (PGHS) activity in VSMC and the time course profile in the changes of PGHS activity paralleled that of total prostaglandin production. Differential treatment showed that 4 hours' exposure to LPS was enough for the maximum effect on the prostaglandin production and this effect was completely inhibited by the co-treatment of actinomycin D, a transcription inhibitor. These results suggest that LPS effect might be determined within 4 hours. Actinomycin D increased PGHS activity without affecting prostaglandin production if added 4 hours after LPS treatment. On the other hand, cycloheximide, a translation inhibitor, augmented LPS-induced prostaglandin production if treated during first four hours, but it inhibited LPS-induced PGHS activity regardless of treatment schedule. These results suggest the existence of multiple regulating mechanisms in the LPS-induced prostaglandin synthesis.

Key words □ Prostaglandin synthesis, Bacterial lipopolysaccharide, Prostaglandin H_2 synthase

Eicosanoid란 prostaglandin, thromboxane, 15-hydroxyeicosatetraenoic acid(HETEs) 등과 같은 arachidonic acid 대사산물을 통칭하는 말로써, 이들 eicosanoid 류들은 염증, 면역조절 및 세포 분열등과 같은 다양한 생체 반응에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 생체 반응에서의 arachidonic acid 대사 산물들의 역할을 이해하기 위해서는 downstream에서의 세포내 신호 전달체계에 대한 이해가 매우 중요한데, 이는 최근 들어 지방산 대사체들이 광범위한 생리 기능을 조절하는 신호전달 체계들에 영향을 미친다는 사실이 알려지기 시작하였기 때문으로, 따라서 이와 관련한 eicosanoid의 생성 조절에 대한 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다.[1-4] Eicosanoid의 생성은 phospholipase에 의해 세포막 인지질로 부터 arachidonic acid가 유리됨으로 부터 시작되는데, 이 단계가 eicosanoid, 특히 prostaglandin의 생성에 있어 가장 중요한 조절 단계인 것으로 인식되어져 왔다.[5,6] 유리된 arachidonic acid는 prostaglandin G/H synthase(PGHS)에 의해 PGH_2로 변환되며 이 대사체는 thromboxane을 비롯한 모든 prostaglandin의 전구물질로 작용하게 된다. PGHS mRNA 및 protein level은 대부분의 조직에서 커다란 변동을 보이지 않는 것으로 알려져 있으나, prostaglandin 합성량에는 상당한 편차를 보이고 있어, PGHS가 관여하는 단계는 prostaglandin 합성에 있어서 주요 조절 단계가 아닌 것으로 여겨져 왔다.[1] 그러나 최근 Simmons등에 의해 새로운 형태의 inducible PGHS가 발견되어 이를 PGHS-2로 명명한 바 있다.[7,8] 이 isozyme은 여러 세포내,외의 자극에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려져 있으며,[9-13] 특히 다양한 세포들에서 mitogenic stimulation의 결과로 나타나는 prostaglandin 합성 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되는 등,[14-21] 지금 까지의 연구 결과에 의하면 PGHS가 관여하는 단계는 이전에 추론 되었던 것과는 달리 prostaglandin 합성에 있어 가장 중요한 조절 단계일 것으로 추정되고 있으며, 최근에는 PGHS-1 및

PGHS-2의 생리학적 기능에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.[3,4]

연구자 등은 PGHS isozyme들의 생체내 역할에 대한 일련의 연구를 수행하여 오고 있으며, 이러한 연구의 일환으로 행하여진 예비 실험 결과에 의하면, 일차 배양 혈관 평활근 세포에 bacterial lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 후 prostaglandin합성능 변화를 측정한 결과, 시간 경과에 따라 prostacyclin의 합성이 현저히 증가되며, 이는 PGHS-2의 선택적 발현 증가에 기인함을 확인한 바 있다.[22,23] 이와같은 사실은, prostacyclin의 강력한 혈관 확장 작용을 감안할 때, 매우 중요한 의미를 내포하고 있음을 알 수 있는데, 즉, 이미 잘 알려져 있는 바와 같이, LPS에 의한 septic shock의 발현은 prostacyclin의 생성 증가와 밀접한 관련성이 있으며,[24] 이때, PGHS-2의 발현 증가가 중심적인 역할을 하고 있을 가능성을 추정할 수 있다. 따라서 PGHS-2의 선택적 발현을 제어함으로써, septic shock으로 부터의 위험성을 효과적으로 배제할 수 있다는 추론도 가능할 것이다. 본 연구에서는 이와같은 추론을 확인하기 위한 연구의 일환으로 우선, translation inhibitor인 cycloheximide 및 transcription inhibitor인 actinomycin D를 시간을 달리하여 처리함으로써, 일차 배양 혈관 평활근 세포에서 LPS에 의해 유발되는 prostaglandin 합성 증가 특성을 검토함으로써 패혈증의 발현기전에 대한 이해를 넓히고, 궁극적으로는 패혈증의 치료 및 조절에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

시 약

Bacterial lipopolysaccharide(E. coli 0111:B4), aspirin, cycloheximide, actinomycin D, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 등은 Sigma chemical 사에서, Dulbecco's Modified MEM, fetal calf serum 등은 GIBCO 사에서, [^{3}H]-6-keto-$PGF_{1\alpha}$는 New England Nuclear(NEN)에서 각각 구입하였으며, 기타의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

혈관 평활근 세포의 분리 및 배양

Sprague-Dawley계(180~200 g) 웅성 랫드를 Diethyl ether로 마취시킨 후, 가슴 및 배 부위를 70% ethanol로 적시고, 복부 대동맥으로 부터 채혈하여 실혈 치사 시켰다. 흉강을 열어 thoracic aorta를 무균적으로 적출하여 Ham's F12 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 넣어 이후의 분리 배양에 이용하였다. 혈관 평활근 세포의 분리 및 배양은 Tyberg 등의 방법에[25] 준하여 행하였다. 무균적 조건 하에서 connective tissue와 세동맥들을 제거한 후, aorta를 길이 방향으로 자른 다음, 0.1% collagenase가 함유된 Ham's 12배지에서 1시간 동안 전처리 배양하였다. Aorta의 inner lining을 rubber policeman으로 긁어 제거한 뒤, medial layer를 1 mm^2의 크기로 잘게 세절하고 다시 0.1% collagenase를 overnight 처리하였다. 분리된 세포를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 10% fetal calf serum이 함유된 Dulbecco's modified essential medium(DMEM, GIBCO)에 resuspend하여 5% CO_2/95% air, 37°C 조건에서 배양하였다. 배지는 일주일에 2번씩 교체하였으며 본 실험에는 2회~3회 계대한 세포를 이용하였다.

일차 배양 혈관 평활근 세포의 배양 및 처리

위에서 분리한 혈관 평활근 세포는 2~3회 계대한 것만을 사용하였으며, 실험 개시전 48시간 동안의 serum deprivation을 통해 growth arrest시킨 조건하에서 처리를 시작하였다. 세포 배양액에는 10 μg/ml의 LPS를 가하여 prostacyclin(PGI_2)의 생성에 미치는 영향을 시간에 따라 전반적인 합성에의 영향 및 PGHS의 활성 변화로 나누어 검토하였다. 또한 LPS의 critical한 작용 시점을 알아보기 위하여 transcription inhibitor인 actinomycin D, translation inhibitor인 cycloheximide를 시간을 달리하여(4시간을 기준으로하여 전,후 처리 하였음) 처리함으로써 LPS에 의한 반응성의 변화를 살펴보았다. 변화의 지표로는 PGI_2 생성능의 변화, PGHS 활성의 변화 등을 주요 지표로하여 검토하였다.

6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 생성능과 PGHS 활성의 측정

세포에 10% fetal calf serum(FCS, GIBCO BRL, USA)이 포함된 DMEM 배지를 가하고 LPS(10 μg/ml. Sigma, USA) 등의 약물과 함께 37°C에서 배양하였다.

4시간 동안 배양한 후 배지를 세척해내고, 다시 새로운 배지를 가하여 4시간 동안 배양한 후, 배지를 전량 취하여 -20°C에 보관하였다가, 생성된 6-keto-$PGF_{1\alpha}$의 양을 radioimmunoassay(RIA)로 측정하였다. PGI_2는 vascular smooth muscle cell의 endogenous arachidonic acid가 PGHS에 의해 대사 되어 생성하는 활성화 형태의 주 대사체이지만, 불안정하여 즉시 6-keto-PGF_{1a}로 전환되므로 6-keto-PGF_{1a}를 측정 지표로 삼았다.

PGHS의 활성은 Fu 등[9]에 의한 실험 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 생성능을 측정하기 위해 배지를 제거한 cell에, 과량의 arachidonic acid(10 μg/ml, Sigma, USA)가 함유된 PBS를 가하여 10분간 배양하였다. 그후, 배지를 취하여 여기에 포함된 6-keto-$PGF_{1\alpha}$의 양을 RIA에 의해 정량함으로써 PGHS의 활성을 측정하였다. 외부에서 직접 과량의 arachidonic acid를 가하여 합성된 6-keto-PGF

$_{1\alpha}$는 PLA_2가 작용하는 과정을 거치지 않게 하므로 PGHS의 활성을 반영하는 것으로 여겨질 수 있다.

일부의 세포는 LPS 처리 4시간 후에 약물 처리를하여 4시간을 더 배양한 후 총 생성량과 PGHS의 활성을 측정하였다.

6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 정량을 위한 radioimmunoassay

RIA는 다음의 방법에 준하여 실시하였다. 적당량의 배지를 취해 PBS-gel(0.1% gelatin in PBS buffer, pH 7.4)에 희석하여 600 μl로 만든 후, 여기에 [^{3}H]-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 용액 (142.10 Ci/mmol, DuPont NEN, USA) 100 μl와 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 항체 200 μl를 가하여 잘 혼합하고, 4°C에서 12시간 동안 방치하여 반응액 중의 6-keto-$PGF_{1\alpha}$와 [^{3}H]-6-keto-$PGF_{1\alpha}$가 항체에 경쟁적으로 결합하도록 하였다. 반응하여 생성된 6-keto-$PGF_{1\alpha}$-6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 항체 복합체를 제외한 유리 6-keto-$PGF_{1\alpha}$를 제거하기 위하여 600 μl의 charcoal(1 mg/ml dextran, 6 mg/ml charcoal in PBS, Sigma, USA)을 가해 섞은 후, 4°C에서 15분간 방치하였다. 흡착된 유리 6-keto-$PGF_{1\alpha}$는 2000 g에서 5분간 원심분리를 행하여 침전시켜 제거하며, 상층에 남겨진 [^{3}H]-6-keto-$PGF_{1\alpha}$의 radioactivity는 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다. Scintillation cocktail은 xylene과 Triton X-100을 3:1의 비율로 혼합한 용액에 PPO가 0.3% 함유되도록 조제하여 사용하였다. 검체 중의 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ 양은 PGM-2 program에 의해

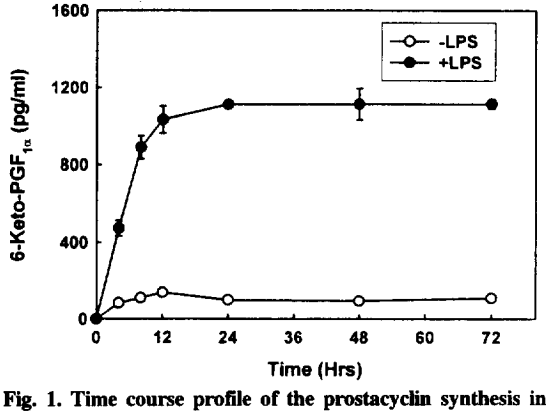

Fig. 1. Time course profile of the prostacyclin synthesis in primary cultured rat vascular smooth muscle cells treated with bacterial lipopolysaccharide (LPS).
Rat vascular smooth muscle cells were incubated with or without LPS (10 μg /ml) in the presence of 10% fetal calf serum for indicated time. Cells culture supernatants were collected and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ were quantified by radioimmunoassay.

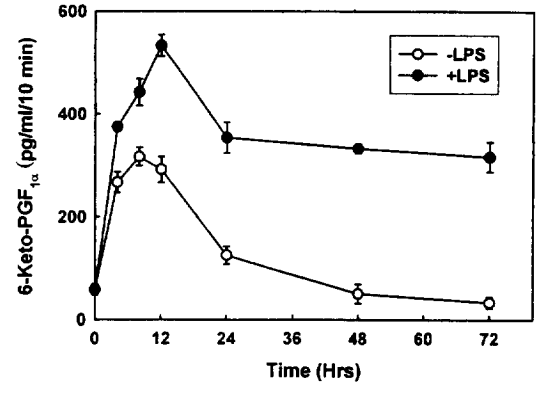

Fig. 2. Time course profile of the activity of prostaglandin H_2 synthase in primary cultured rat vascular smooth muscle cells treated with bacterial lipopolysaccharide (LPS).
Rat vascular smooth muscle cells were incubated with or without LPS (10 μg/ml) in the presence of 10% fetal calf serum for indicated time. Cells were then incubated with 30 μM of arachidonic acid for 10 minutes and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ were quantified by radioimmunoassay.

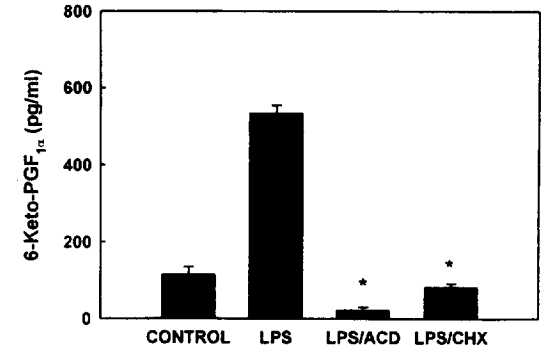

Fig. 3. Prostacyclin synthesis during 4 hrs of incubation in the primary cultured rat vascular smooth muscle cells.
Rat vascular smooth muscle cells were incubated with or without LPS (10 μg/ml) in the presence of 10% fetal calf serum for 4 hours. Cells culture supernatants were collected and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ were quantified by radioimmunoassay.
LPS : Bacterial lipopolysaccharide (10 μg/ml)
LPS/ACD: LPS (10 μg/ml) and Actinomycin D (2 μg/ml)
LPS/CHX: LPS (10 μg/ml) and Cycloheximide (2 μM)
* : $p < 0.01$ vs LPS

작성된 검량선으로부터 산출하였다.

통계처리

모든 data는 mean±SE로 나타내었으며, student's t-test에 의하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

LPS는 gram negative bacteria 의 cell wall의 성분으로 bacterial infection의 주요 증상을 발현하는 주 원인 물질로 알려져 있다.[24,26] LPS는 lipi A 와 polysaccharide 부분으로 크게 나뉘며, 이중 lipid A는 LPS의 생리 활성의 많은 부분을 대변해 주고 있으나, 최근 polysaccharide 부분도 LPS의 활성 발현에 있어 중요한 역할을 하고 있으리라는 시사적인 보고가 발표되고 있어, 각 구성성분의 중요도에 대해서는 아직 논란이 지속되고 있다. LPS는 표적 세포에 작용하여 다양한 생리, 생화학적인 반응을 일으키며 특히 macrophage로 부터의 다양한 생리활성 mediator들의 생성을 유도함으로써 면역 기능의 변화, 세포 괴사, 염증 반응 및 endotoxic shock 등 다양한 반응을 일으키게 된다.[24] LPS에 의하여 유도되는 반응중 prostaglandin의 합성 증가에 대해서는 많은 보고가 되어 있으나 그 자세한 반응 특성, 반응 양식 또는 반응 기전 등에 대해서는 그다지 많은 연구 성과가 축적되어 있지 않은 실정이다. 본 연구에서는 LPS의 prostaglandin 합성 증진 작용에 대한 작용 기전과 그 반응 특성을 검토함으로써, LPS에 의한 혈관 평활근 세포로 부터의 비정상적인 prostacyclin 합성증진에 대한 기초적 지견을 얻고 이로부터 적절한 대응 방법을 모색하고자 하는 연구의 일환으로 우선 랫드의 혈관 평활근 세포를 분리 배양하여 이에 LPS를 처리하

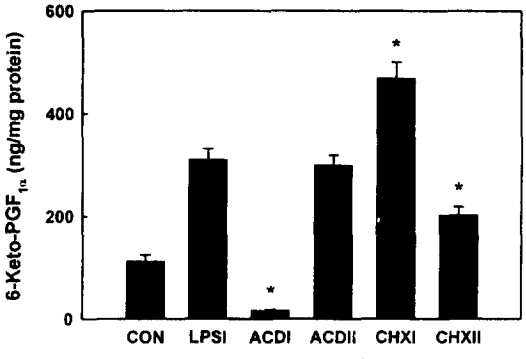

Fig. 4. Prostacyclin synthesis in the primary cultured rat vascular smooth muscle cells treated with LPS for 8 hrs.

Rat vascular smooth muscle cells were treated with or without LPS, cycloheximide (2 μM) or actinomycin D (2 μg/ml) as described below. After 4 hours, cells were thoroughly washed with phosphate buffered saline and incubated with fresh media for another 4 hours. LPS (10 μg/ml) was present during whole incubation time except control. Cell culture supernatants were collected and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ were quantified by radioimmunoassay.

LPSI : LPS (10 μg/ml) treatment during whole incubation time (8 hrs)

ACDI: Actinomycin D treatment during first 4 hrs

ACDII: Actinomycin D treatment during second 4 hrs

CHXI: Cycloheximide treatment during first 4 hrs

CHXII: Cycloheximide treatment during second 4 hrs

* : $p < 0.01$ vs LPSI

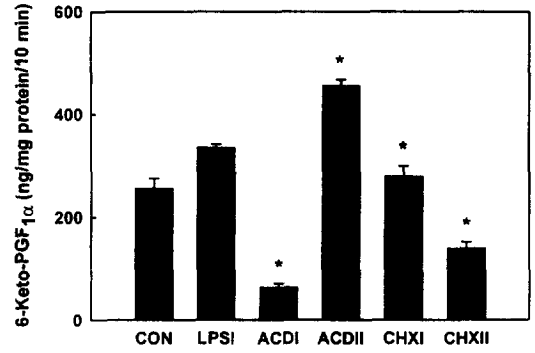

Fig. 5. Activities of Prostaglandin H_2 synthase in the primary cultured rat vascular smooth muscle cells treated with LPS for 8 hrs.

Rat vascular smooth muscle cells were treated with or without LPS, cycloheximide (2 μM) or actinomycin D (2 μg/ml) as described below. After 4 hours, cells were thoroughly washed with phosphate buffered saline and incubated with fresh media for another 4 hours. LPS (10 μg/ml) was present during whole incubation time except control. Cells were then incubated with 30 μM of arachidonic acid for 10 minutes and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ were quantified by radioimmunoassay.

LPSI : LPS treatment during whole incubation time (8 hrs)

ACDI: Actinomycin D treatment during first 4 hrs

ACDII: Actinomycin D treatment during second 4 hrs

CHXI: Cycloheximide treatment during first 4 hrs

CHXII: Cycloheximide treatment during second 4 hrs

* : $p < 0.01$ vs LPSI

여 시간별 반응 경과를 확인하고, transcription inhibitor인 actinomycin D 및 translation inhibitor인 cycloheximide를 시간을 달리하여 처리하여 그 반응 변화를 살펴 보았다. 우선 랫드의 thoracic aorta로부터 얻은 혈관 평활근 세포는 전형적인 hill and valley 현상을 관찰할 수 있어 제대로 분리되었음을 형태학적으로 확인할 수 있었다.[25] LPS 처리 후의 prostacyclin 합성은 macrophage에서와는 달리 처음부터 그 합성이 증진됨을 확인할 수 있었으며 8시간까지 가파른 합성 증가 양상을 보이다가 24시간 이후에는 합성이 더 이상 증가되지는 않았다.(Fig. 1) 이때, PGHS 활성 변화 추이는 역시, LPS 처리후 급격한 증가를 보이다가 12시간째를 정점으로 하여 급격히 감소하는 양상을 보여, macrophage에서의 결과[14]와는 매우 다른 결과를 얻을 수 있었다.(Fig. 2) 이러한 결과는 PGHS의 평활근 세포 내에서의 조절 기전이 macrophage의 그것과는 상당히 다를 수 있음을 시사한다고 추론할 수 있다. 본 연구자[22] 및 Feng 등[23]의 연구 결과에 의하면, LPS에 의한 PGHS 활성 증가는 PGHS-2의 선택적 발현에 기인하는 것으로 알려져 있으며, 이때 LPS는 transcription level에서 영향을 미치는 것으로 확인된 바 있다. 그러나 본 연구자 등에 의한 macrophage를 대상으로한 이전의 실험 결과에 따르면 transient한 mRNA level의 증가만으로는 PGHS-2의 de novo synthesis가 일어나지 않음을 알 수 있어,[14] 그 이외의 단계에서의 작용 또는 다른 factor의 관여 가능성 까지도 추론할 수 있었기에 본 실험에서는 prostacyclin의 합성 증가가 최대로 일어나는 8시간을 기준으로 하여 각각 4시간 씩의 전, 후처치를 행한 후, prostacyclin 합성능 및 PGHS 의 활성 변화를 평가하여 보았다. LPS는 Fig. 1에서와 마찬가지로 4시간 처리에 의해서도 대조군에 비해

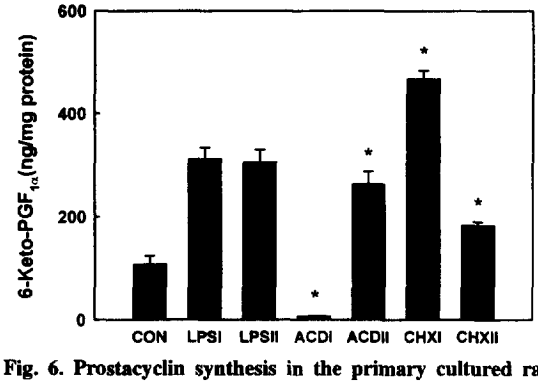

Fig. 6. Prostacyclin synthesis in the primary cultured rat vascular smooth muscle cells treated with LPS for 4 hrs.

Rat vascular smooth muscle cells were treated with or without LPS, cycloheximide (2 μM) or actinomycin D (2 μg/ml) as described below. After 4 hours, cells were thoroughly washed with phosphate buffered saline and incubated with fresh media for another 4 hourss incubation. Cell culture supernatants were collected and 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ were quantified by radioimmunoassay.

LPSI : LPS treatment during whole incubation time (8 hrs)

LPSII : LPS treatment during first 4 hrs

ACDI: Actinomycin D treatment during first 4 hrs

ACDII: Actinomycin D treatment during second 4 hrs

CHXI: Cycloheximide treatment during first 4 hrs

CHXII: Cycloheximide treatment during second 4 hrs

* : $p < 0.01$ vs LPSI, II

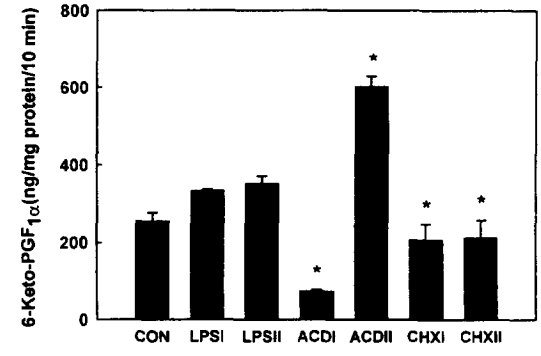

Fig. 7. Activities of Prostaglandin H_2 synthase in the primary cultured rat vascular smooth muscle cells treated with LPS for 4 hours.

Rat vascular smooth muscle cells were treated with or without LPS, cycloheximide (2 μM) or actinomycin D (2 μg/ml) as described below. After 4 hours, cells were thoroughly washed with phosphate buffered saline and incubated with fresh media for another 4 hours. LPS (10 μg/ml) was present during only first 4 hours incubation except LPSI. Cells were then incubated with 30 μM of arachidonic acid for 10 minutes and 6-keto-PGF1α were quantified by radioimmunoassay.

LPSI : LPS treatment during whole incubation time (8 hrs)

LPSII : LPS treatment during first 4 hrs

ACDI: Actinomycin D treatment during first 4 hrs

ACDII: Actinomycin D treatment during second 4 hrs

CHXI: Cycloheximide treatment during first 4 hrs

CHXII: Cycloheximide treatment during second 4 hrs

* : $p < 0.01$ vs LPSI, II

약 5배 정도 prostacyclin 합성을 증가 시켰으며 이때 actinomycin D 및 cycloheximide 처리에 의해 prostacyclin 합성은 현저히 억제되어 LPS 처리 후 4시간 이전에 벌써 transcription 및 translation이 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. (Fig. 3) LPS 처리시간을 4시간씩으로 나누어 처리한 결과, LPS는 4시간 전처치만을 행하여도 8시간을 처치한 것과 동일한 수준의 prostacyclin 합성증진을 보였다.(Fig. 4, Fig 6) 이때 actinomycin D 및 cycloheximide를 각각 전처치 및 후처치를 한 경우에는 앞서와는 다른 결과를 얻었는데, actinomycin D를 전처치한 경우엔 4시간 이후에 LPS가 존재함의 여부에 상관 없이 prostacyclin의 합성은 현저히 억제되었으며, 후처치에 의해서는 합성능에 별다른 영향을 주지 않았다.(Fig. 4) 그러나 cycloheximide의 경우엔 전처치에 의해서는 오히려 합성능이 증가되었으나, 후처치에 의해서는 기대하였던 것 보다는 약한 억제 현상을 보였다. 전반적으로는 actinomycin D 및 cycloheximide의 전, 후처치에 의한 반응변화는 LPS를 4시간 전처리한 경우와 8시간을 내리 처리한 경우 동일한 결과를 보여 LPS 처리에 의한 prostacyclin 합성 증가는 초기 단계에서의 영향이 매우 중요함을 알 수 있었다. 동일한 실험 조건하에서의 PGHS 활성 변화는 Fig. 5 및 Fig. 7에 보인 바와 같이 prostacyclin 생성량 추이와는 매우 다른 양상을 보였다. 즉, LPS 처리에 의한 PGHS 활성 증가는 4시간의 전처리만으로도 8시간을 처리한 경우와 동일한 정도의 효과를 나타내었으나, prostacyclin 총생성량과는 달리, actinomycin D 후처치에 의해서 오히려 현저한 활성 증가를 확인할 수 있었다. 또한, cycloheximide 처리에 의해서는 전, 후처리에 의해서 약간씩의 억제 작용을 보여, 이 또한 총생성량 profile과는 상이하였다. 일반적으로 PGHS-2의 mRNA는 early response gene의 특성을 지니며, cycloheximide에 의하여 stabilize된다고 알려져 있으나,[27] 본 연구 결과에서의 PGHS 활성 변화만을 볼때는 그러한 점을 확인하기는 어려웠으며, Nothern blotting 등을 통하여 좀더 확인되어야 할 사항이라고 여겨진다. 단지 여기서 주목할 것은, transcription 및 translation inhibitor 처리에 의해서 나타나는 총생성량과 효소 활성 사이의 반응성 변화의 차이점인데, 총생성량에 주도적으로 관여하는 효소들인 PLA_2 및 PGHS의 활성 변화를 비교해봄으로써 이러한 차이점을 설명할 수 있으리라 사료된다. 또한, 이와는 별도로, PLA_2나 PGHS의 발현에 영향을 미치는 제3의 factor(일종의 조절 인자)의 존재를 가정할 수 있으며, 만일 이러한 인자들이 inhibitor들에 의해 영향을 받아 이러한 차이점을 나타내었다면, prostaglandin 합성 조절 기전에 있어서의 의미는 매우 크리라 판단되며, 향후 이의 실체 규명을 위한 일련의 연구를 계획하고자 한다.

국문요약

Gram negative bacteria의 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 패혈증상은 표적세포에서 생성, 유리되는 여러 mediator가 직,간접적인 요인이 되며, 따라서 LPS가 유발하는 생리학적 이상에 대한 연구 역시 이러한 mediator들의 조절에 주된 관심이 집중되어 있다. 본 연구에서는 일차 배양 혈관 평활근 세포에서 LPS에 의해 유발되는 prostacyclin합성 증가 특성을 검토함으로써 LPS에 의한 septic shock의 발현기전에 대한 이해를 넓히고, 궁극적으로는 패혈증의 치료 및 조절에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다. 연구자등은 이미 일차 배양 혈관 평활근 세포에 LPS를 처리하면 prostacyclin의 합성이 현저히 증가되며, 이는 PGHS-2의 선택적 발현 증가에 기인함을 확인한 바 있다. 본 연구에서 행한 time course study 결과 LPS에 의한 prostacyclin 합성은 처리 후 12시간에 최대에 달했으며, 이때 PGHS 활성변화도 동일한 양상을 보였다. PGHS 활성변화는 예비 실험의 결과를 고려할 때 PGHS-2의 발현 증가에 기인할 것으로 추정되었다. LPS 및 translation inhibitor 인 cycloheximide 그리고 transcription inhibitor인 actinomycin D를 시간을 달리하여 처리한 실험 결과, LPS는 4시간의 전처치 만으로도 8시간의 처치와 같은 정도의 prostaglandin 합성 증가 및 PGHS 활성증진 작용을 나타내었으며, 이때 actinomycin D를 4시간 동안 LPS와 동시에 전처치한 경우에는 이러한 활성이 현저히 억제되었다. 이러한 사실은 LPS의 작용은 4시간 이전의 초기단계에 이미 결정된다는 사실을 의미하며, 이때 cycloheximide 전처리에 의해서는 PGHS 활성은 크게 영향받지 않았다. 다만 prostaglandin 생성능은 현저히 증가 되었는데, 이는 cycloheximide에 의한 PGHS m-RNA의 stabilizing effect 에 기인하는 것으로 추정되었다. Actinomycin D를 4시간 후에 처리한 경우는 오히려 PGHS 활성이 현저히 증가되었으며, 이때 prostaglandin 생성능의 변화는 보이지 않았다. 이러한 결과는 PGHS 발현을 포함한 prostaglandin 합성 과정을 조절하는 다른 factor의 존재 가능성을 시사하는 것으로 추후 이에 대한 보다 정밀한 연구가 요구된다 하겠다.

참고문헌

1. Shimizu, T. and Wolfe, L.S. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J. Neurochemistry,* **55**, 1-15, 1990
2. Smith, W. L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol.* **263**, F181-F191, 1992.
3. Williams, C.S. and DuBois, R.N., Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am. J. Physiology,* **270**, G393-G400, 1996.
4. Herschman, H. R., Prostaglandin synthase 2, *Biochim. Biophys. Acta,* **1299**, 125-140, 1996
5. Smith, W.L. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 251-262, 1986.
6. Needleman, P., Turk, J., Jakschi, B.A., Morrison, A.R. and Lefkowith, J.B. Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 69-102, 1986.
7. Simmons, D.L., Levy, D.B., Yannoni, Y. and Erikson, R. L. Identification of a phorbol ester-responsible v.src-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1178-1182, 1989.
8. Xie, W., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L. and Simmons, D.L., Expression of a mitogen responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Aci. USA* **88**, 2692-2696, 1991.
9. Fu, J.Y., Masferrer, J.F., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P., The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes *J. Biol. Chem.* **265**, 16737-16740, 1990.
10. Riese, J., Hoff, T., Nordhoff, A., DeWitt, D.L., Resch, K. and Kaever V. Transient expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 during mouse macrophage activation. *J. Leukocyte Biol.* **55**, 476-482, 1994.
11. Sirois, J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* **135**, 841-848, 1994.
12. Rester, M., Coroneos, E., Thomas P.J. and Dunn, M.J. Endothelin stimulates prostaglandin endoperoxide synthase-2 mRNA expression and protein synthesis through a tyrosine kinase signaling pathway in rat mesangial cell. *J. Biol. Chem.* **269**, 22574-22580, 1994.
13. Bazan, N.G., Fletcher, B.S., Herschman, H.R. and Mukherjee, P.K. Platelet activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5252-5256, 1994.
14. Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D.and Hwang, D., Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide *J. Biol. Chem.* **267**, 25934-25938, 1992.
15. Jones, D.A., Carlton, D.P., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. and Prescott, S.M. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* **268**, 9049-9054, 1993.
16. Kujubu, D.A. and Herschman, H.R., Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene, *J. Biol. Chem.* **267**, 7991-7994, 1992.
17. Hamasaki, Y., Kitzler, J., Hardman, R., Nettesheim, P. and Eling, T.E. Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 226-234, 1993.
18. O'Sullivan, M.G., Chilton, F.H., Huggins, E.M. and McCall, C.E. Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase, *J. Biol. Chem.* **267**, 14547-14550, 1992.
19. DuBois, R.N., Awad, J., Morrow, J., Roberts, L.J. and Bishop, P.R. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-α and phorbol ester. *J. Clin. Invest.* **93**, 493-498, 1994.
20. DeWitt, D.L. and Meade, E.A. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 94-102, 1993.
21. Coyne, D.W., Nickols, M., Bertrand, W. and Morrison, A.R. Regulation of mesangial cell cyclooxygenase synthesis by cytokines and glucocorticoids. *Am. J. Physiol.* **263**, F97-F102, 1992.
22. Lee, S.H., Hart, S., Qiao D. Chanmugam P., Soyoola E., Liou S., Kanemaru, Y. and Hwang, D. Expression of cyclooxygenase (COX) in smooth muscle cells (SMCs). Abstract in *FASEB Meeting* 1993.
23. Feng, L., Sun, W., Xia, Y., Tang, W.W., Chanmugam, P., Soyoola, E., Wilson E.B. and Hwang, D. Cloning of two isoforms of rat cyclooxygenase: differential re-

gulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 361-368, 1993.

24. Morrison, D.C. and Ryan, J.L. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.* **38**, 417-432, 1987.
25. Thyberg, J., Hedin, U., Sjolund, M., Palmbeg, L. and Bottger, B.A. Regulation of differential properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* **10**, 966-990, 1990.
26. Raetz, C.R.H. Biochemistry of endotoxins. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 129-170, 1990.
27. Maier, J.A.M., Hla, T. and Maciag, T. Cyclooxygenase is an immediate early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 10805-10808, 1990.