梨花醫大誌：第 29 卷 第 1 號 2006
Ewha Med J Vol. 29, No. 1, 2006

Sodium Butyrate에 의한 사람간세포 분화유도에서 반응성 산소기의 역할

이화여자대학교 의과대학 내과학교실, 의과학 연구소
김 태 헌

= Abstract =

Role of Reactive Oxygen Species on Sodium Butyrate Induced Human Hepatocyte Differentiation

Tae Hun Kim

Department of Internal Medicine, Ewha Medical Research Institute,
Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aim : Reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide, superoxide anion and hydroxy radicals are produced in various physiologic and pathologic conditions and involved in many cellular processes as proliferation, differentiation and apoptosis. Studies investigating the role of ROS in various cellular behaviors especially in proliferation and apoptosis have been widely conducted in many cell types but the role of ROS in nontransformed human hepatocyte differentiation has not been investigated yet. thus we were going to elucidate the role of ROS on human hepatocyte differentiaiton using sodium butyrate (SB) induced hepatocyte differentiation model of our own establishment.

Methods : Intracellular ROS and apoptotic cell death were monitored by flowcytometry using peroxide sensitive probe (Dicholorofluorscein diacetate) and Annexin V/Propidium iodide, respectively. Urea nitrogen in culture media was measured by colorimetric methods. Ornithine transcarbamylase (OTC) and albumin trasncription was evaluated by RT-PCR.

Results : Intracellular ROS production was increased by SB. SB induced urea production was significantly decreased with antioxidant treatment ($p<0.05$) and SB induced OTC and albumin transcription were also attenuated with antioxidant treatment. SB induced increase in apoptosis was significantly inhibited by antioxidant treatment ($p<0.05$).

Conclusion : ROS produced during the process of sodium butyrate induced human hepatocyte differentiation auguments hepatoctye differentiation and apoptosis.

KEY WORDS : Reactive oxygen species · Sodium butyrate · Human hepatocyte · Differentiation · Apoptosis.

서 론

세포의 증식과 분화, 사망 기전 등에 관한 연구는 발생과 성장과정에서 이루어지는 분화와 항상성유지를 이해하는데 중요한 정보를 제공할 뿐 아니라 여러 가지 질환들의 병태생리를 이해하는데도 도움이 될 수 있다. 특히

dCollection @ ewha

간세포의 분화와 증식에 관여하는 기전에 관한 연구는 간부전환자의 치료에 이용될 수 있는 생인공간의 개발에 중요한 정보를 제공할 수 있다[1]. 최근에는 줄기세포를 이용한 간세포 분화연구가 활발히 이루어 지고 있으며 분화에 영향을 미치는 여러 가지 물질들이 분자생물학적 수준에서 밝혀지고 있다[2)3)].

Hydrogen peroxide(H_2O_2), Superoxide anion(O_2^-) and Hydroxyl radical(OH°) 등과 같은 반응성 산소기는 주로 산소를 소모하는 세포내 생리적반응이나 PDGF, EGF, angiotensin II, UV radiation 등과 같은 다양한 외부자극에 의해 발생이 증가되는 것으로 알려져 있으며 세포의 노화와 질병, 사망 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 과량의 반응성 산소기는 세포에 해로운 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 증가된 반응성 산소기는 세포응집력(cell intergrity)과 세포내 여러 효소들의 기능, 유전자의 안정성 등에 손상을 입히고 세포자멸사(apoptosis)를 조장하기 때문으로 생각되고 있다. 한편, 대식세포와 백혈구에 의한 반응성 산소기의 생성은 세균성 감염에 대한 생체의 면역학적 방어기전에 필수적인 요소로 이해되고 있다.

소량의 반응성 산소기는 세포내 항산화작용과의 균형변화에 따라 여러 가지 세포내 신호전달의 2차 전달자(second messenger)역할을 하여 유전자의 발현양상에도 다양한 영향을 미치고 세포의 증식과 분화에도 관여하는 것이 알려져 있는데[4], 반응성 산소기는 일반적으로 세포의 증식을 촉진하고 세포사망을 조장하는 것으로 알려져있다. 그 동안 세포 증식과 세포 사망에 관여하는 반응성 산소기의 역할에 관한 연구는 많이 보고되고 있으나 세포 분화에 미치는 영향은 일부에서만 밝혀져 있으며[5-9], 사람 간세포의 분화에서 반응성 산소기의 역할은 아직 명확히 알려져 있지 않다.

사람 간세포의 분화기전을 연구하기 위하여 간세포 고유의 기능을 향상시킬 수 있는 여러 가지 자극물질들이 간세포 분화유도를 위해 시도되었다. Sodium butyrate (SB)는 대장에서 생성되는 단쇄 지질(short chain fatty acid)로서 대장암 세포 뿐 아니라 간세포를 포함한 여러 가지 세포의 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 사람 간세포주에서 SB가 간세포의 특이 작용인 요소합성과 알부민 합성을 증가시키고 세포자멸사를 유도함이 알려져 있으며 저자등은 이 과정에서 산화질소(NO)합성을 억제함으로써 간세포분화를 촉진시킬 수 있음을 규명한 바 있다[10].

SB에 의한 간세포의 분화유도 과정에서 일어나는 여러 가지 변화들은 이미 다른 연구들에서 밝혀진 반응성 산소기의 역할과 비슷하고 다른 세포주에서 SB처리에 의해 반응성 산소기의 생성이 증가됨이 보고된 바 있어 연구자 등은 이미 확립된 사람 간세포의 SB에 의한 분화유도 과정에서 반응성 산소기의 역할에 관하여 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 세포 배양 및 처리

연구대상 세포는 형질전환능이 없는 사람 간세포주를 이용하였으며 SB에 의한 이 세포의 분화능 향상은 이미 발표한 바 있다[11]. 단위 부피(ml)당 4×10^5개의 사람 간세포를 6well plate에 깔고 규정 배양액(10ug/mL insulin, 5ug/mL transferrin, 3.5uM hydrocortisone, 2 mM glutamine, 0.1uM $CuSO_4.5H_2O$, 0.03uM H_2SeO_3, 0.5nM $ZnSO_4.7H_2O$, 1ng/mL glucagon, 6.5ng/mL growth hormone, 0.5ug/mL linoleic acid이 함유된 Ham's F-12 배양액, Sigma사, St Louis, 미국)으로 CO_2 5%가 함유된 37℃의 가습공기에서 24시간 배양하여 약 70%의 confluency를 확인하고, 배양액만 갈아준 경우(LM), Sodium butyrate 5mM이 포함된 배양액을 갈아준 경우(SB), SB와 N-acetyl cycteine(NAC) 10mM이 함께 포함된 배양액을 처리한 경우(SB/NAC)로 나누어 48시간 더 배양시킨 후 다른 연구를 실시하였다.

2. RNA 추출 및 중합효소연쇄반응

각 well에서 전체 RNA는 Trizol용액을 이용하여 분리하였으며 cDNA는 1ug의 RNA와 random hexamer primers를 이용하여 합성하였다. cDNA의 PCR 반응은 각 시발체 쌍 [ornithine transcarbamylase(OTC), 5'-GAGTTTTCAAGGGCATAGAA-3'와 5'-CAGATCTGCTGATAGCCAT-3' ; 알부민, 5'-AGAAAGTACCCCA AGTGTCAA-3' 5'-AGCTGCGAAATCATCCATAAC-3']20pmol과 200uM deox-ynucleoside triposphate, 2mM $MgCl_2$ 혼합체를 DNA thermal cycler(Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 94 30초, 55 30초, 72 1분으로 구성된 cycle을 30회 진행하였다. PCR 반응 산물은 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel 전기영동을 통하여 확인하였으며 밴드의

dCollection @ ewha

강도(intensity)는 beta-actin의 PCR 산물과 비교하여 densitometer scanner를 이용하여 측정하였다.

3.요소(Urea) 측정

각 세포군에 NH_4Cl 20mM이 첨가된 같은 배양액으로 24시간 더 배양시킨 후 배양액내의 Urea nitrogen은 Sigma kit no.535를 이용하여 525nm 파장의 흡광도를 측정하였다(ELISA). 세포없이 NH4Cl만 함유한 배양액을 음성대조군으로 이용하였으며 Urea nitrogen의 농도에 따른 표준값(standard)을 측정하였다. 측정된 Urea nitrogen은 각 well에서의 세포수를 분모로하여 nmol/24hr/10^6cells로 나타내었다.

4. 반응성 산소기 측정과 세포자멸사 분석

반응성 산소기의 발생을 측정하기 위하여 trypsin 처리로 분리한 각 그룹의 세포에 5uM DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate)를 처리하여 30분간 반응시킨 후 Mg2+, Ca2+가없는 PBS(phosphate buffered-saline)로 씻고 다시 trypsin 처리 후 원심분리하여 분리한 세포를 차가운 PBS에 담아 유세포분석(FACScan : Becton Dickinson, Mountain View, CA) 하였다[12].

세포자멸사 분석을 위해 Well에 붙어있는 세포를 trypsin 처리하여 분리한 후 미리 분리한 각 well의 상층액에 더 하였다. 여기에 PBS 10ml를 첨가 후 원심분리하여 세포만 침전시키고 이것을 Annexin V buffer 200ul로 부유하여 Facs tube로 옮긴 후 Annexin V 4ul와 Propidium iodide 10ul를 차례로 더한 후 유세포분석을 시행하였다.

5. 통계분석

각 측정치는 적어도 세 번 이상의 독립실험의 결과로 나타내었으며, 측정치의 차이는 student's t test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. SB에 의한 반응성 산소기의 생성

SB 처리에 따른 반응성 산소기의 생성을 유세포분석을 통하여 확인하였다. SB처리 48시간에 ROS의 생성이 대

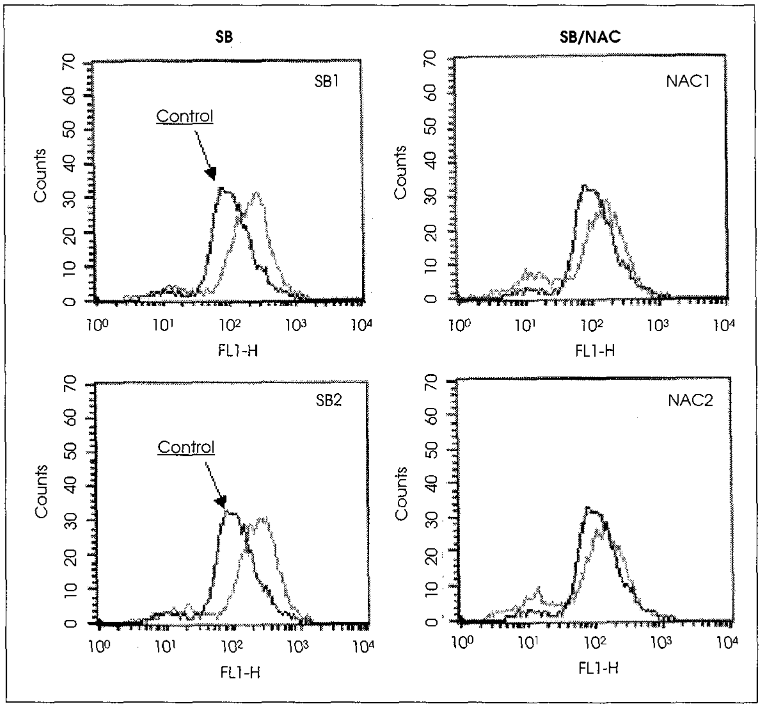

Fig. 1. Intracellular ROS production in hepatocyte by SB and its inhibition by NAC. Hepatocyte ROS production was increased after 24hr-incubation with 5mM SB(SB) and its inhibition was evident by concomitant treatment of NAC 10mM in 48hr-incubation. Representative results are shown. ROS : reactive oxygen species, SB : sodium butyrate, NAC : N-acetyl cysteine.

dCollection @ ewha

조군(LM)에 비하여 현저히 증가됨을 확인할 수 있었으며 이러한 ROS생성의 증가는 N-acetyl cycteine(NAC) 처리에 의하여 상쇄되었다. 각각의 경우 약품처리 후 시간별로 ROS생성의 변화를 측정하였는데 시약처리 24시간부터 ROS생성의 차이가 나타났으나 이전 연구 결과에 따라[11] 간세포의 분화된 특성을 비교하기에 적당한 시간인 48시간째 변화를 기준으로 하였다(Fig. 1).

2. 항산화제에 의한 간세포분화능의 변화

1) 요소합성

간세포의 요소합성능력의 변화에 미치는 반응성 산소기의 영향을 알아보기 위하여 세포 배양액내에서 Urea nitrogen을 측정하였다. 대조군(LM)에서는 요소 생성이 거의 관찰되지 않았으며 SB를 처리에 의해 증가된 요소생성은 항산화제(NAC) 처리에 의하여 상쇄되었다($p<0.05$) (Fig. 2).

2) 요소합성효소(OTC) 및 알부민 전사

요소합성에 관여하는 효소 중 특히 OTC는 SB처리시 발현이 증가됨이 확인되어 있다. 본 실험 결과 대조군(LM)에 비해 SB처리가 된 경우 OTC와 알부민 mRNA의 증가가 뚜렷이 나타났으며 항산화제(NAC) 처리에 의해 OTC

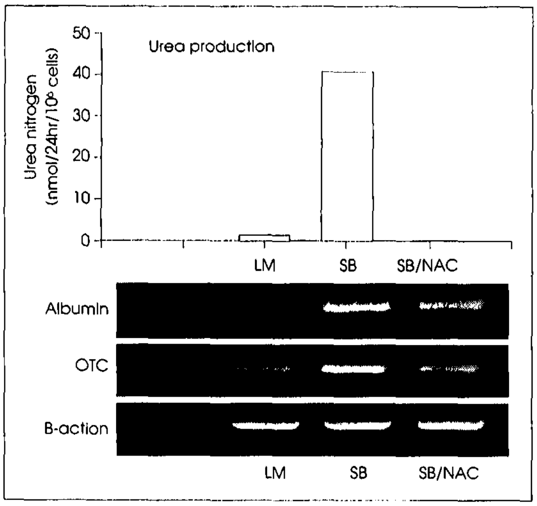

Fig. 2. OTC and albumin transcription and urea production by SB and their inhibition by concomitant treatment of NAC. Urea nitrogen which was negligible in plain media increased significantly by SB 5mM treatment($p<0.05$) and decreased by concomitant treatment of antioxidant(NAC 10 mM)($p<0.05$). Significant induction of albumin mRNA and mild induction of OTC mRNA by SB treatment were attenuated by concomitant NAC treatment. Representative results were shown. OTC, ornithine transcarbamylase, ROS : reactive oxygen species, SB : sodium butyrate, NAC : N-acetyl cysteine.

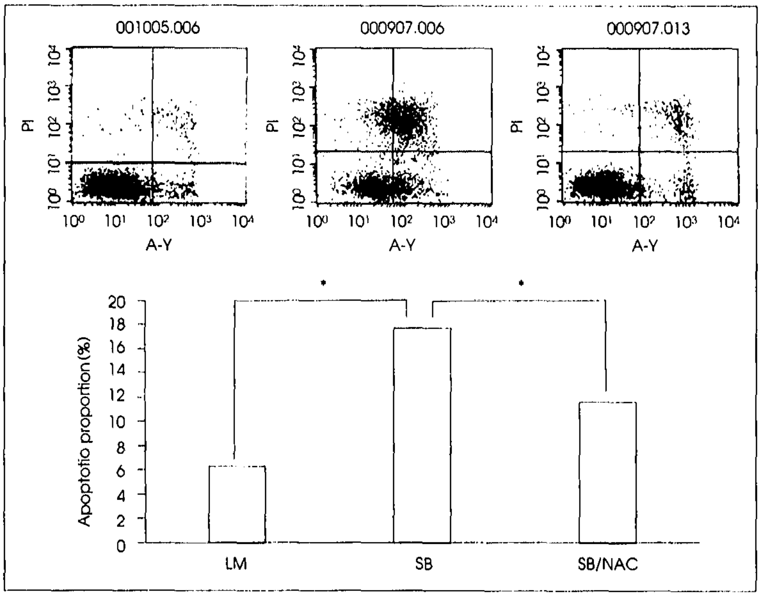

Fig. 3. Increased apoptosis induced by SB, is attenuated by antioxidant treatment. Increased apoptotic cell fraction with 5mM SB treatment is signifycantly decreased by concomittant addition of NAC 10mM(6.29% vs 17.81% vs 11.67%). ROS : reactive oxygen species, SB : sodium butyrate, NAC : N-acetyl cysteine. * : $p<0.05$.

dCollection @ ewha

와 알부민 mRNA 발현의 경미한 감소를 확인할 수 있었으나 통계적 유의성을 나타내지는 못 하였다(Fig. 2).

3. 항산화제에 의한 간세포 자멸사의 변화

각 군에서 분리한 세포에 Annexin V와 Propidium iodide를 반응시킨 후 유세포분석을 시행한 결과 SB에 의해 증가된 세포자멸사가 NAC 처리에 의해 감소됨을 알 수 있었다. SB 처리에 의해 자멸사에 빠진 세포의 분획(우측하 사분면)은 대조군에 비해 증가하였으며(6.29% vs 17.81%, p=0.00014) NAC를 함께 처리한 경우 유의하게 감소하였다(17.81% vs 11.67%, p=0.005) (Fig. 3).

고 찰

SB는 포유류의 대장에서 섬유질이나 소화되지 않은 전분, 단백질 등이 미생물에 의해 발효되어 정상적으로 생성되는 단쇄지질로서 여러 종류의 세포에서 분화와 세포자멸사를 유도함이 밝혀져 있다. 특히 SB에 의한 대장암세포의 분화유도와 세포자멸사 촉진은 고섬유질 섭취에 의한 대장암발생 억제를 설명하는 기전의 하나로 제시되기도 한다[13].

대장에서 생성된 Butyrate는 다른 지방산들과 같이 간문맥을 통해 간으로 유입되어 간세포에도 영향을 미칠 것으로 예상될 수 있는데, 실제 간암세포와 간세포에서도 분화유도와 증식억제 기능이 있음이 이미 밝혀져 있다[10]. 이러한 영향은 간의 혈액 관류 경로를 고려할 때 실제 생체내(*in vivo*)에서도 충분히 나타날 수 있을 것으로 예상되나 이에 대한 직접적인 증거는 아직 없는 상태이다. 그러므로 SB가 간세포에 미치는 영향에 대한 연구분석은 생체외(*in vitro*)에서의 간세포분화에 대한 이해뿐만 아니라 생체내(*in vivo*)에서의 간세포 항상성유지에 관한 연구의 기초가 될 수 있을 것이다.

저자 등은 이미 확립된 사람 간세포주에서 SB가 간세포의 특이작용인 요소합성과 알부민 합성을 증가시키고 세포자멸사를 유도함을 밝혔으며[10], 이 과정에서 증가된 Nitric oxide(NO)가 세포분화를 억제하는 기능이 있음을 규명한 바 있다. 그런데 이때 SB에 의해 일어나는 일련의 변화들 즉, 분화와 세포자멸촉진, 증식억제, NO 합성효소(inducible NO synthase) 유전자 발현의 증가 등은 다른 여러 연구들에서 알려졌듯이 반응성 산소기의 생성 증가 때 나타나는 변화와 일치하며 일부세포주에서는 SB에 의해 반응성 산소기의 생성이 증가됨이 알려져 있다[14]. 그러므로 간세포 분화에 있어서 NO의 역할은 반응성 산소기의 발생에 따른 변화와 함께 분석할 필요가 있겠다. 한편, 세포내 반응성 산소기의 생성과 기능은 세포 자극물질에 따라, 세포의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있는데 본 연구에서는 형질전환능이 없는 사람간세포에서 SB에 의한 분화유도때 반응성 산소기의 역할을 규명하였다.

반응성 산소기는 다양한 세포외 자극에 의해 생성이 증가되는 것으로 알려져 있는데 SB에 의해서도 그 생성이 증가되고 TNF alpha, Fas ligand에 의한 apoptosis를 증가시킴이 대장암 세포주에서 이미 밝혀져 있다[13]. 본 연구에서는 SB에 의한 간세포 분화 유도과정에서 반응성 산소기의 생성이 증가되는 지를 알아보기 위해 DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate)염색 후 유세포분석을 통하여 세포내 반응성 산소기의 변화를 분석하였다. SB 처리 이후 시간별로 반응성 산소기의 생성을 측정하였을 때 초기 24시간까지는 SB처리에 의한 반응성 산소기의 생성증가와 NAC동시 처리에 의한 반응성산소기의 감소가 뚜렷하지 않았으나 이후 반응성 산소기 생성의 변화가 나타났다. 대장암세포주에서의 연구에서는 SB처리 수십분 후부터 반응성 산소기의 증가가 나타나 본 연구 결과와 시간적인 차이를 보이고 있다. 이는 세포주에 따라 항산화 능력에 차이가 있고 반응성 산소기를 측정하는 방법이 다르기 때문일 것으로 생각된다. 세포에서의 반응성 산소기 생성을 측정하는 방법은 여러 가지가 있지만 이상적인 방법은 간단하면서 민감하고 특정 반응성 산소기에 특이적으로 반응하면서 그 생성위치를 파악할 수 있어야 한다 그러나 아직까지 이 같은 조건을 모두 만족시키는 방법은 없는 실정이다. 본 연구에서 사용한 방법은 특정 반응성 산소기에만 특이적으로 반응하지 않고 측정에 여러 가지 산화제가 영향을 미칠 수 있는 단점이 있으나 세포내 전체 반응성 산소기 생성을 비교적 쉽게 측정할 수 있어 배양된 세포내에서의 반응성 산소기 생성 측정에 많이 이용되고 있다[12].

본 연구에서는 SB처리에 의해 증가된 반응성 산소기가 간세포의 분화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 환원제(NAC)를 처리하여 반응성 산소기 생성을 억제하였을 때 요소와 알부민생성에 미치는 영향을 분석 하였다. NAC는 효율적인 환원제로서 세포내 Glutathione의 생성을 증가시켜 Glutathione peroxidase에 의한 Peroxide의 환

dCollection @ ewha

원을 촉진시키는 것으로 알려져 있다[15]. SB 처리에 의한 요소합성과 알부민 생성의 증가는 NAC처리로 감소되었으며 요소합성의 주요 효소인 OTC mRNA 발현 역시 감소되었다. 이는 SB에 의한 간세포분화유도에서 반응성 산소기가 분화를 촉진시키는 방향으로 작용함을 나타낸다. 반응성 산소기가 세포증식을 억제하고 세포자멸사를 촉진시키는 것은 비교적 많이 연구되어 알려져 있으나 세포분화에 미치는 영향은 많이 알려져 있지 않다. 화학적으로 유도된 백혈병 세포의 분화[7][8]와 줄기세포(stem cell)의 분화에 관여함이 밝혀져 있으며[5] Pheochromocytoma 세포의 신경분화(neuronal differentiation)에도 반응성 산소기의 생성이 필요한 것으로 알려져 있다[6]. 또한, 간암세포주에서 간암세포의 분화를 촉진하는 작용이 있음이 보고되고 있다[16]. 그러나 형질전환능이 없는 사람간세포의 분화에 미치는 영향은 처음 밝혀진 것으로 다른 세포들에서와 같이 분화유도물질에 의한 반응성 산소기의 생성은 세포분화를 촉진하는 작용이 있음을 확인할 수 있었다.

형태학적 변화의 양상에 따라 세포사망은 크게 세포괴사(necrotic death)와 자멸사(apoptotic death)로 나누어진다. 세포자멸사를 유도하는 물질은 여러가지가 알려져 있는데 Sodium butyrate도 분화유도과정에서 사람간세포의 세포자멸사를 촉진시키는 것이 알려져 있다[10]. 세포자멸사는 괴사와 달리 형태학적으로 둥글게 응축되고 핵소체의 분절화와 핵내 변연부로의 응축이 나타나는데 이 과정에서 나타나는 DNA 분절화가 세포자멸사에 의한 세포 사망의 생화학적 표지자로 인정되며 그 결과 나타나는 DNA 사다리가 세포자멸사에 의한 세포사망의 한 지표로 사용되어 왔다. 그러나 간세포와 상피세포 일부에서는 이러한 변화가 동반되지 않으면서도 세포자멸사에 의한 세포사망이 일어날 수 있음이 알려져[17] 이것이 세포자멸사의 특이적인 현상으로 받아들여 지기는 어렵다. 본 연구에서는 Annexin V와 Propidium iodide를 이용한 유세포분석을 통하여 세포자멸사를 보다 정확히 측정하고자 하였는데, 정상적으로 세포막내부에 위치하는 Annexin V는 세포자멸사 초기에 세포외부로 노출되게 되는데 이러한 현상은 비교적 초기에 일어나고 유세포분석에 의해 정확히 측정될 수 있다[18]. 일반적으로 반응성 산소기는 다양한 세포에서 여러 가지 자극 물질에 의해 발생이 촉진되어 세포의 자멸사를 촉진하는 것으로 알려져 있는데 본 연구에서는 이러한 반응성 산소기의 작용이 사람간세포에서도 일어남을 확인하였다.

이상의 연구결과 SB에 의한 사람간세포의 분화 유도 과정에서 반응성 산소기는 간세포의 분화와 세포자멸사를 촉진시킴을 알 수 있겠다. 그러나 이러한 결과는 본 실험의 특정 조건하에서 나타난 현상으로 간세포 분화에 미치는 반응성 산소기의 작용을 보다 정확히 이해하기 위해서는 SB에 의해 증가되는 반응성 산소기의 종류에 대한 정밀한 분석과 함께 NAC외 다른 환원제에 의한 변화 관찰이 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 반응성산소기의 역할을 환원제를 이용하여 반응성 산소기 생성을 억제함으로서 간접적으로 입증하였기 때문에 생성되는 반응성 산소기의 종류나 사용한 환원제의 종류에 따라 결과의 차이를 보일 가능성이 있다. 다른 예비 실험에서 NAC외에 Ascorbic acid 3mM을 처리하여 같은 실험을 하였을 때 요소합성과 알부민 생성은 NAC 처리 때에 비해 더욱 억제 되었으나 세포자멸사에 미치는 영향은 차이를 보이지 않았다. 이는 특정 반응성 산소기의 특이 작용과 환원제 종류에 따른 생성억제 정도의 차이에 의한 결과일 수 있겠다. 또한, SB에 의해 합성이 증가되는 NO의 분화, 세포자멸 촉진 및 증식억제 등의 작용이 함께 증가된 반응성 산소기에 의한 것인지[19] 혹은 반응성 산소기 생성에 따른 이차적인 현상인지에 대한 추가 연구가 기대된다. 그러므로 SB에 의한 간세포 분화의 기전을 보다 잘 이해하기 위해서는 다양한 종류의 환원제와 NO 생성억제제를 각각 혹은 복합 처리하였을 때 변화를 분석하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목 적 :

Hydrogen peroxide(H_2O_2), Superoxide anion(O_2^-) 및 Hydroxy radical($OH^{\cdot}$) 등과 같은 반응성 산소기는 여러가지 생리적, 병적 상황에서 생성이 증가되며 세포의 증식과 분화, 사망 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 여러 세포주에서 반응성 산소기가 세포증식을 억제하고 세포자멸사를 촉진함이 알려져 있으나, 세포분화에 미치는 영향은 일부세포에서만 밝혀져 있다. 이에 본 연구에서는 형질전환 되지 않은 사람간세포의 분화유도에 있어서 반응성 산소기의 역할을 규명하려 하였다.

대상 및 방법 :

사람간세포를 규정배양액만으로 배양한 경우(CM), SB 5mM이 포함된 배양액을 처리한 경우(SB), SB와 N-

dCollection @ ewha

acetyl cycteine(NAC) 10mM이 함께 포함된 배양액을 처리한 경우(SB/NAC)로 나누어 48시간 배양시킨 다음 각 경우에서 변화를 관찰하였다. 세포내 반응성 산소기의 생성과 세포자멸사는 각각 Dichlorofluorscein diacetate와 Annexin V/Propidium iodide 염색 후 유세포분석을 통하여 측정하였다. 배양액내에서 요소생성은 colorimeter를 이용하여 측정하였으며 Ornithine transcarbamylase(OTC)와 albumin의 전사는 역전사 중합반응을 통하여 측정하였다.

결 과 :

SB 처리시 세포내 반응성 산소기의 생성이 증가되었다. SB 처리에 의한 요소합성의 증가는 항산화제 동시 처리에 의해 억제되었으며, 증가된 OTC와 알부민의 전사 역시 항산화제에 의해 줄어들었다($p<0.05$). SB에의해 증가된 세포자멸사는 항산화제 처리에 의해 의미있게 감소하였다($p<0.05$).

결 론 :

SB에 의한 사람 간세포 분화유도에서 SB에 의해 증가된 반응성 산소기는 간세포 분화와 세포자멸사를 촉진한다.

중심 단어 : 반응성 산소기 · Sodium butyrate · 사람간세포 · 분화 · 세포자멸사.

References

1) Chamuleau RA, Deurholt T, Hoekstra R. *Which are the right cells to be used in a bioartificial liver? Metab Brain Dis 2005 ; 20 : 327-335*
2) Tosh D, Strain A. *Liver stem cells--prospects for clinical use. J Hepatol. 2005 ; 42 Suppl (1) : S75-84*
3) Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman AX, Wang X. *Transcription factors in liver development, differenttiation, and regeneration. Hepatology 2003 ; 38 : 1331-1347*
4) Nagy K, Pasti G, Bene L, Zs-Nagy I. *Redox-dependent signal transduction.Finkel T. FEBS Lett 2000 ; 476 : 52-54*
5) Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M. *Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. FEBS Lett 2000 ; 476 : 218-223*
6) Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *Biochem J 1999 ; 338 : 465-470*
7) Role of Oxygen Radicals Generated by NADPH Oxidase in Apoptosis Induced in Human Leukemia Cells. *J Clin. Invest 1998 ; 102 : 1961-1968*
8) Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free Radic Biol Med 2000 ; 28 : 18-27*
9) Induction of granulocytic maturation in HL-60 human leukemia cells by free radicals : a hypothesis of cell differentiation involving hydroxyl radicals. *Free Radic Res Commun 1993 ; 19 : 1-15*
10) Yoon JH, Lee HS, Kim TH, Woo GH, Kim CY. *Augmentation of urea-synthetic capacity by inhibition of nitric oxide synthesis in butyrate-induced differentiated human hepatocytes. FEBS Lett 2000 ; 474 : 175-178*
11) Yoon JH, Lee HV, Lee JS, Park JB, Kim CY. *Development of a non-transformed human liver cell line with differentiated-hepatocyte and urea-synthetic functions : applicable for bioartificial liver. Int J Artif Organs 1999 ; 22 : 769-777*
12) Arakaki N, Kajihara T, Arakaki R, Ohnishi T, Kazi JA, Nakashima H, et al. *Involvement of oxidative stress in tumor cytotoxic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor. J Biol Chem 1999 ; 274 : 13541-13546*
13) Giardina C, Boulares H, Inan MS. *NSAIDs and butyrate sensitize a human colorectal cancer cell line to TNF-alpha and Fas ligation : the role of reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta 1999 ; 1448 : 425-438*
14) Giardina C, Inan MS. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. Biochim Biophys Acta 1998 ; 1401 : 277-288*
15) Meister A, Anderson ME. *Glutathione. Annu Rev Biochem. 1983 ; 52 : 711-760*
16) Ren JG, Zheng RL, Shi YM, Gong B, Li JF. *Apoptosis, redifferentiation and arresting proliferation simultaneously triggered by oxidative stress in human hepatoma cells. Cell Biol Int 1998 ; 22 : 41-49*
17) Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R. *Cell death by apoptosis and its protective role against disease. Trends Pharmacol Sci 1992 ; 13 : 245-251*
18) van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. *Annexin V-affinity assay : a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry 1998 ; 31 : 1-9*
19) Wei T, Chen C, Hou J, Xin W, Mori A. *Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells Biochim Biophys Acta 2000 ; 1498 : 72-79*

dCollection @ ewha