

## 전이성이 다른 대장암 세포주에서 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) 유전자의 발현 비교

조선대학교 의과대학 일반외과학교실, <sup>1</sup>생화학교실

박진영 · 김정용 · 이병래<sup>1</sup>

### Changes of Nitric Oxide Synthase (NOS) Isozymes in Cultured Human Colon Carcinoma Cell

Jin-Young Park, M.D., Cheong-Yong Kim, M.D. and Byoung-Rai Lee, M.D.<sup>1</sup>

Departments of Surgery and <sup>1</sup>Biochemistry, College of Medicine, Chosun University

**Purpose:** Nitric oxide (NO), the production of which is dependent on Nitric oxide synthase (NOS), has been shown to contribute to pathogenesis in various diseases. Recent investigations of NOS expression in tumor tissues indicate that NO may mediate one or more roles during the growth of human cancers. The aim of this study was to determine whether iNOS is expressed in human colon carcinoma cell lines and to determine the types of NOS isozymes in colon carcinoma cell lines with high and low metastatic potentials. **Methods:** We measured the expressions of iNOS and eNOS and the formation of nitrotyrosine which indicates peroxynitrate production in highly metastatic colon cancer cell (KM1214) and lowly metastatic colon cancer cell (KM12C) by Western blots. **Results:** The iNOS were detected in both KM1214 and KM12C by Western blot analysis. The expression of iNOS in KM1214 cells was significantly higher than in KM12C cells. The expression of iNOS was increased with lipopolysaccharide (LPS) in colon cancer cells but the rate of increase was higher in KM1214 cells than in KM12C cells. **Conclusions:** In human colon carcinoma cells, iNOS is expressed in cancer cells and expression of iNOS is higher in highly metastatic colon cancer cells than in lowly metastatic colon cancer cells and iNOS expression may have some role in colon cancer metastasis. (JKSCP 2000;16:209-214)

**Key Words:** NOS, Colon cancer cell, Metastasis

### 서 론

Nitric oxide (NO)는 혈관내피세포, 신경세포 및 대식세포 등의 다양한 세포에서 nitric oxide synthase (NOS)에 의해서 생성되는 물질로서<sup>1-7</sup> 지난 수년간의 연구결

과에서 암의 발생과 성장에 있어 신생혈관 생성, 세포손상 그리고 미세전이 조절 등의 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>8-10</sup> 현재까지 3가지의 NOS isozymes가 발견되었는데 소뇌에서 처음 확인된 neuronal NOS (nNOS), 대식세포에서 처음 확인된 inducible NOS (iNOS), 그리고 내피세포에서 확인된 endothelial NOS (eNOS)이다. NOS는 효소활성화 및 합성유도의 기전에 따라 nNOS와 eNOS는 constitutive NOS (cNOS)로 iNOS는 inducible NOS (iNOS)로 구분된다. cNOS를 함유하는 세포가 acetylcholine, bradykinin, ADP 등의 물질에 의해 수용체가 활성화되면 세포막의 채널이 열려 세포내 칼슘 이온의 농도가 증가되어 calmodulin과 반응하여 cNOS를 활성화시켜 NO 생성을 촉진한다.

책임저자 : 김정용, 광주시 동구 서석동 588번지  
조선대학교 부속병원 일반외과(우편번호: 501-140)  
(062-220-3068, Fax: 062-228-3441)

본 연구는 1999년도 조선대학교 학술연구비를 지원받아 이루어 졌음.

본 논문의 요지는 1999년 대한대장항문학회 추계학술대회에서 구연되었음.

그러나 iNOS는 칼슘이온에 대한 친화력이 매우 높기 때문에 생리적 농도의 칼슘이온 농도에서도 충분히 활성화되기 때문에 증가된 칼슘이나 calmodulin의 농도에 대한 활성변화는 거의 없고, iNOS 량에 비례하여 NO가 생성된다. 그러므로 iNOS에 의한 NO 합성의 조절은 효소의 활성화 여부로 조절되는 cNOS와는 달리 iNOS 유전자의 발현조절에 의존하므로 iNOS라 불리며 lipopolysaccharide (LPS) 등의 bacterial endotoxin과 interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ 와 같은 inflammatory cytokines에 의해서 유도될 수 있다.<sup>1,5,11</sup>

NOS 발현의 증가는 여러 종양에서 보고되고 있으며 그 예로는 두경부의 편평 세포암, 뇌종양, 유암 그리고 부인과적인 종양에서 현저한 발현증가가 보고되고 있다.<sup>12-18</sup> 대장암에서는 아직 논란의 여지가 남아 있는데 Takahashi등<sup>19</sup>은 생쥐의 대장암에서 iNOS와 eNOS의 발현 증가를 보고하였지만 Mochhala등<sup>20</sup>은 인체의 대장암조직에서 정상조직보다 감소된 iNOS의 발현을 보고하였다. 또한 최근에 Siedlar등<sup>21</sup>은 대장암 조직에서 대장암 세포의 직접적인 자극을 받아 종양 침습 대식세포가 iNOS를 발현한다고 보고한 반면 Konur등<sup>22</sup>은 인체 내 단핵구의 유도로 대장암 세포가 NO를 생성한다고 보고하여 대장암조직에서 면역세포와 암세포가 공존할 때 iNOS 발현이 증가되거나 NO의 생성이 증가된다고 보고하였다. 이에 저자 등은 본 연구에서 LPS, cytokines 그리고 면역세포의 영향이 배제된 환경에서 대장암 세포주의 NO 생성과 NOS 발현 여부를 알아보고자 대장암 세포주를 이용하여 이들의 생성과 발현량을 측정하였다. 또한 대장암의 전이성과 NOS 발현과의 상관관계를 알아보고자 전이성이 높은 대장암 세포주와 전이성이 낮은 대장암 세포주에서의 nitrotyrosine 생성량과 NOS 발현량을 비교하였다.

## 방 법

### 1) 세포주 및 세포배양

대장암 세포주는 한국 세포주 은행에서 분양 받은 타장기로의 전이성이 높은 KM1214 세포주와 전이성이 낮은 KM12C 세포주를 2  $\mu$ M/L glutamine, 100 U/mL penicilline, 100 U/mL streptomycin 및 10% 열 비활성화 우태아혈청이 포함된 Dulbecco's Modified Engle's Medium (DMEM)으로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 각각 배양하였다. KM1214와 KM12C 세포주 배양 중 세포배양액에 lipopolysaccharide (LPS) 2  $\mu$ g/ml (Sigma. Co. USA)가

되게 첨가하고 12시간 배양한 후 세포를 수집하여 LPS 첨가군 시료로 사용하였다.

### 2) Western blot 분석

수집된 세포( $7.5 \times 10^7$ )를 2 mM PMSF와 10  $\mu$ g/ml leupeptin를 함유한 세포용해 완충액(1% NP 40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, PBS, pH 7.4)에 부유시킨 후 초음파세포막분쇄기로 세포막을 파쇄하여 원심분리 후 상층액을 얻어 시료로 사용하였다. Western blot은 Towbin등<sup>23</sup>의 방법을 약간 변형하여 시행하였다. 즉 시료를 단백질 총량이 50  $\mu$ g이 되게 하여 0.1% SDS를 함유한 10% polyacrylamide gel에서 100 V로 1시간 동안 전기영동한 후 electroblotting 방법으로 nitrocellulose (NC) filter에 옮겨 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 5% 탈지분유를 함유한 Tris-buffered saline (TBS) 용액에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS 용액으로 15분간씩 3회 세척하였다. NC filter에 가토에서 생성된 일차항체 anti-iNOS Ab (Sigma. Co, USA), anti-eNOS Ab (Sigma Co, USA), anti-nitrotyrosine Ab (Upstate Co, USA)를 반응시킨 후 이차항체 peroxidase conjugated anti-rabbit-IgG Ab (Sigma Co, USA)로 반응시키고 chemiluminescence kit (ECL<sup>TM</sup>, Amersham)로 발색시켜 X-ray film에 감광시켰다.

단백량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 사용하여 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Co.)를 이용하여 측정하였다.

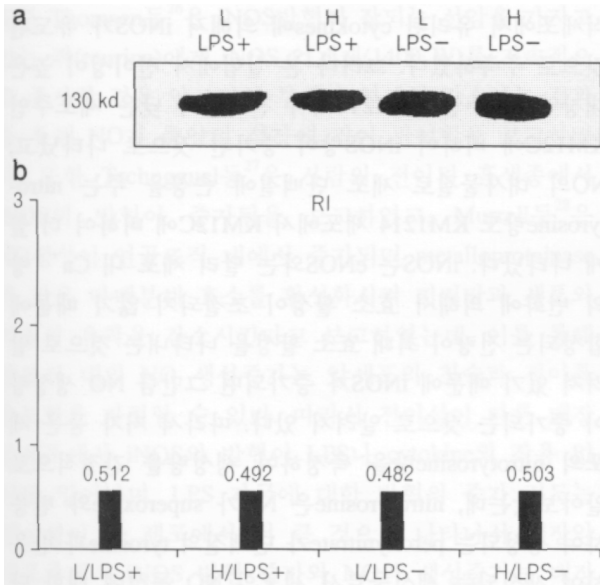
### 3) eNOS, iNOS 및 nitrotyrosine량 분석

KM1214와 KM12C의 eNOS와 iNOS 발현량과 nitrotyrosine량은 western blot 후 감광된 X-ray film을 densitometry로 측정하여 relative intensity (RI)를 구해서 비교 분석하였다.<sup>29</sup>

## 결 과

### 1) 대장암 세포주에서 eNOS량과 LPS 자극에 대한 반응(Fig. 1)

eNOS는 KM1214와 KM12C 두 대장암 세포주에서 모두 검출되었는데, 검출량은 각각 RI가 0.503과 0.482로 전이성에 따른 세포주간의 차이가 없었으며, LPS 첨가군의 RI는 KM1214와 KM12C에서 각각 0.492와 0.512로 전이성에 따른 세포주간에서 모두 LPS 자극에 대한 eNOS 검출량의 유의한 차이가 없었다.



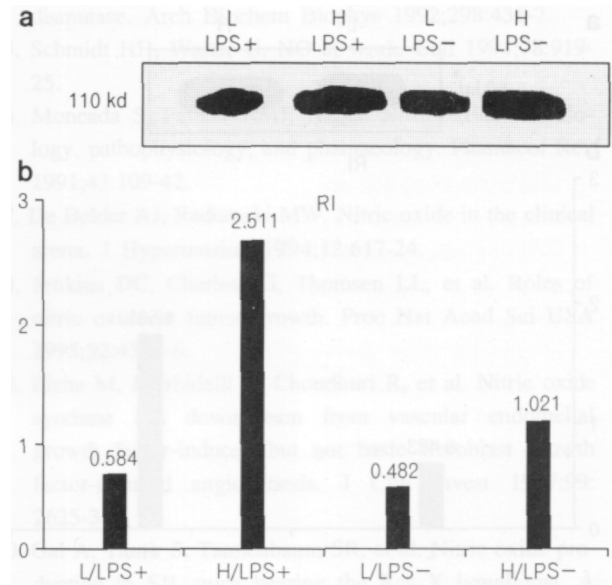
**Fig. 1.** The expressions of eNOS in cultured colon cancer cells. The expressions of eNOS in cells were determined by Western blot. a. eNOS Western blot in cultured colon cancer cells. Each samples (50  $\mu$ g of protein) were loaded to each slot and electrophoresis was performed at 100 V for 1 hrs. After electrophoresis gels were transferred to NC filter and wetern blot developed using anti-eNOS antibody and measured by using chemiluminescence kit. Details were described in the sections of methods. b. densitometric analysis of eNOS western blot. H = highly metastatic colon cancer cell line (KM1214); L = lowly metastatic colon cancer cell line (KM12C); LPS- = cells were cultured without lipopolysaccharide; LPS+ = cells were cultured with lipopolysaccharide (2  $\mu$ g/ml media).

## 2) 대장암 세포주에서의 iNOS량과 LPS 자극에 대한 반응(Fig. 2)

iNOS는 KM1214와 KM12C 두 대장암 세포주에서 모두 검출되었는데, 검출량은 각각 RI가 1.021과 0.492로 전이성이 높은 세포주인 KM1214에서 전이성이 낮은 KM12C 세포주에서보다 iNOS량이 2배 가량 높았으며, LPS 첨가군의 iNOS량은 전이성이 높은 세포주인 세포주에서 전이가 되지 않는 세포주에서보다 2.5배 가량 높았다.

## 3) 대장암 세포주에서의 nitrotyrosine 생성(Fig. 3)

두 대장암 세포주에서 nitrotyrosine은 모두 검출되었는데, KM1214와 KM12C의 nitrotyrosine 생성량은 각각 RI가 1.501과 0.483으로 전이성이 높은 세포주에서 전



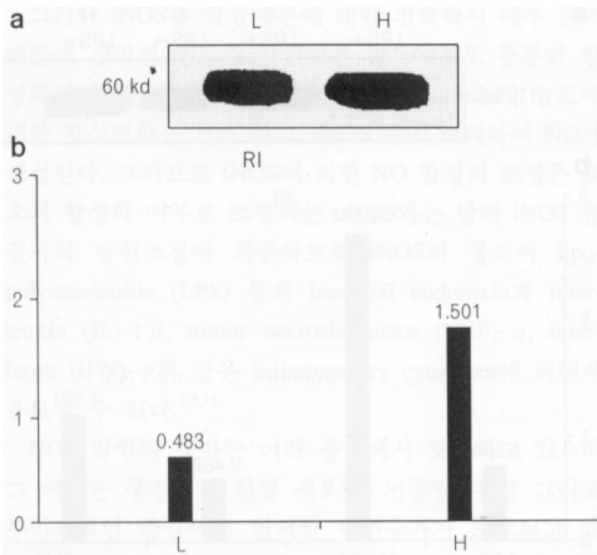
**Fig. 2.** The expressions of iNOS in cultured colon cancer cells. The expressions of iNOS in cells were determined by Western blot. a. iNOS Western blot in cultured colon cancer cells. b. densitometric analysis of iNOS western blot. The iNOS were detected in both KM1214 and KM12C by Western blot analysis. The expression of iNOS in KM1214 cells was significantly higher than in KM12C cells. The expressions of iNOS were increased with LPS in colon cancer cells but the rate of increase was higher in KM1214 cells than in KM12C cells. H = highly metastatic colon cancer cell line (KM1214); L = lowly metastatic colon cancer cell line (KM12C); LPS- = cells were cutued without lipopolysaccharide; LPS+ = cells were cutued with lipopolysaccharide (2  $\mu$ g/ml media).

이성이 낮은 세포주에 비하여 약 3배 더 많았다.

## 고 찰

생체내의 신호전달물질로 여러 가지 생리적 반응에 관여하고 있음이 알려진 NO는 생체 내 다른 신호 전달 물질과는 다른 특성의 화학적 신호전달물질이다. 즉 NO는 전기적으로 중성이기 때문에 세포 내, 외로 이동 시에 특이한 채널이나 운반체가 필요없고, 합성된 곳에서 곧바로 주위조직으로 확산되어 작용하며 일반적으로 신경전달, 혈액응고, 혈압의 조절 및 종양세포나 세포 내 기생충에 대한 숙주 면역계의 방어 기능 등에 관여하고 있다.<sup>8-10</sup>

최근에 NO는 인체 내 여러 종양의 발생과 성장에 있어서 신생혈관 생성, 미세전이 조절, 세포손상 등에 중



**Fig. 3.** The formation of nitrotyrosine in cultured colon cancer cells. The presence of nitrotyrosine were determined with western blot and densitometric analysis. In highly metastatic colon carcinoma cell line nitrotyrosine level was elevated compared to that in lowly metastatic colon carcinoma cell line. a. Western blot analysis b. densitometric analysis (relative intensity).

요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.<sup>8-10</sup> Takahashi 등<sup>19</sup>은 생쥐의 대장암에서 iNOS와 eNOS의 발현 증가를 보고하였고, Ambts 등<sup>24</sup>은 대장선종과 대장암조직에서 iNOS 발현이 증가되고 nitrotyrosine량도 증가됨을 보고하였는데, 본 연구에서도 두 대장암 세포주에서 eNOS와 iNOS가 모두 발현되어 이들의 연구결과와 일치한다.

iNOS 발현량이 종양 조직내에서 조절되는 정확한 기전은 알려져 있지 않지만, 실제 진행된 대장암 조직 검사에서 그람음성 박테리아에 의해 생성되는 LPS나, 종양 침습 단핵구에서 생성되는 cytokines이 다량 함유된 것으로서 LPS와 cytokines이 대장암 조직에서의 iNOS 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있는데,<sup>15</sup> 세포주 배양을 이용한 본 연구에서 저자 등은 이러한 LPS나 cytokines 그리고 대식세포와 같은 면역세포 등 영향을 배제한 조건에서도 대장암세포에서 iNOS가 검출되므로 대장암 세포에서 iNOS의 발현이 계속되고 있음을 시사하는 결과라 할 수 있다.

대장암에서의 NOS발현은 Rodomski 등<sup>25</sup>에 의해서 보고되었는데 환자의 대장암 조직과 림프절에 전이된 암 조직에서 iNOS가 발현이 증가됨을 보고하였는데, 이때 iNOS 발현의 증가 기전으로 암세포 주위에 침윤된 대

식세포에서 유리된 cytokines에 의해서 iNOS가 유도된 것으로 추측하였다. 그러나 본 실험에서 전이성이 높은 대장암세포주인 KM1214에서 전이율이 낮은 세포주인 KM12C에 비하여 iNOS량이 증가된 것으로 나타났고, NO의 대사물질로 세포 단백질에 손상을 주는 nitrotyrosine량도 KM1214 세포에서 KM12C에 비하여 더 높게 나타났다. iNOS는 eNOS와는 달리 세포 내  $Ca^{++}$ 량의 변화에 의해서 효소 활성이 조절되지 않기 때문에 합성되는 전량이 최대 효소 활성을 나타내는 것으로 알려져 있기 때문에 iNOS가 증가되면 그만큼 NO 생성량이 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 저자 등은 세포의 nitrotyrosine량을 측정하여 생성량을 간접적으로 알아보았는데, nitrotyrosine은 NO가 superoxide와 반응하여 생성되는 peroxynitrate가 단백질의 tyrosine과 반응하여 생성되는 생성물로서 세포의 NO 독성에 대한 단백질손상의 표지자로 이용되고 있다.<sup>4,6</sup> 따라서 전이성이 높은 KM1214 세포와 전이성이 낮은 KM12C 세포를 배양하여 iNOS량과 nitrotyrosine량을 측정한 결과 모두 전이성이 높은 세포주에서 더 높게 나타나서 iNOS 발현은 전이성이 높은 KM1214 세포주에서 전이성이 낮은 KM12C 세포주에 비하여 증가되어 있는 것으로 생각된다. 이러한 실험결과는 전이한 대장암 세포의 iNOS 발현 증가가 대식세포의 cytokine에 의한 결과로 보고한 Rodomski 등<sup>25</sup>의 결과와 상응한다. 그러나 Siedlar 등<sup>21</sup>이 인체의 대식 세포주나 대장암 세포주에서는 iNOS 발현이 저명하지 않았지만 이들 두 세포주를 함께 배양했을 때 발현이 현저함을 근거로 대장암조직에서의 iNOS는 종양침습 대식세포가 대장암 세포의 직접적인 자극을 받아 발현된다고 보고한 것이나 Knour 등<sup>22</sup>이 인체 내 단핵구의 유도로 대장암세포가 NO를 생성한다고 보고한 결과와는 다른 소견이다.

본 실험에서 전이성이 높은 KM1214 세포주와 전이성이 낮은 KM12C 세포주에서 LPS가 iNOS 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 세포배양액에 LPS를 첨가하여 배양한 결과 iNOS량은 KM1214 세포주와 KM12C 세포주에서 모두 증가되어서 LPS가 iNOS를 유도함을 알 수 있었으며, LPS를 첨가하지 아니한 군에 대한 LPS 첨가군의 iNOS 증가비율은 KM1214세포가 KM12C보다 더 높아서 LPS에 의한 INOS 발현 유도가 KM1214 세포에서 더 잘 일어남을 알 수 있었다.

NO는 종양 내의 혈관신생과 혈류량 및 혈관의 투과성을 증가시키는 것으로 보고되고 있는데,<sup>8-10</sup> 이는 NO가 종양의 진행에 중요한 역할을 수행함을 의미한다.

또한 Thomsen<sup>26</sup>은 iNOS발현이 잘되는 선암을 가지고 있는 쥐(murine)에게 iNOS 억제제(1400 W)를 지속적으로 주사할 경우 암조직의 무게가 현저히 감소하는 결과를 통해 NO가 종양의 성장에 깊이 관여함을 보고하였다. 또한 Tschugguel<sup>27</sup>은 사람의 진이된 흑색종에서 iNOS의 발현이 증가됨을 보고하였고, Murrell<sup>28</sup>은 NO생성이 연골조직 내에서 증가되면 metalloproteinase와 같은 단백분해 효소를 활성화시켜 기저막과 세포외기질의 유착을 감소시킨다고 보고하였는데, 이를 통해 암조직 내의 NO 생성증가는 암세포의 침습과 전이를 유도함을 가정할 수 있다. 따라서 전이성이 다른 대장암세포에서 iNOS의 발현이 LPS나 cytokine의 작용 없이도 일어나며, LPS 자극에 대한 발현의 증가 정도는 전이성이 큰 세포에서 더 큰 것으로 나타나서 대장암 세포주에서 iNOS 발현 증가와 NO의 생성증가는 대장암의 성장과 전이에 밀접하게 관계되는 것을 추측되며, 전이기전과 iNOS의 발현과의 연관성에 관한 계속적인 추적이 있어야 할 것으로 추측된다.

### 결 론

iNOS의 발현은 cytokine 등의 여러 물질에 영향을 받지만 이러한 영향을 배제한 조건에서 배양한 대장암세포에서도 iNOS 발현이 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 전이성이 낮은 대장암세포보다 전이성이 높은 대장암세포에서 iNOS의 발현이 더 증가되었고, 대장암 세포에서 LPS 자극에 대한 iNOS 발현 증가도 전이성이 높은 세포에서 더 크게 나타나는 것으로 보아 대장암의 전이성이 높은 대장암세포에서 LPS나 cytokine의 작용 없이도 iNOS의 발현이 증가된 것을 알 수 있으며, 대장암의 전이성과 iNOS 발현 사이에 관련성이 있는 것으로 추측된다.

### REFERENCES

1. Nathan C, Xie Q-W. Nitric oxide synthase: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-8.
2. Billiar TR. Nitric oxide: novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 1995;221:339-49.
3. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990;87:1620-4.
4. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide

- dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:431-7.
5. Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994;78:919-25.
6. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
7. De Belder AJ, Radomski MW. Nitric oxide in the clinical arena. *J Hypertension* 1994;12:617-24.
8. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995;92:4392-6.
9. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997;99:2625-34.
10. Gal A, Tamir S, Tannenbaum SR, et al. Nitric oxide production in SJL mice bearing the Rcs X lymphoma: A model for in vivotoxicological evaluation of NO. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996;93:11499-503.
11. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 1994. p. 258-98.
12. Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, et al. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:541-9.
13. Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, et al. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 1995;55:727-30.
14. Thomsen LL, Miles DW, Happertield L, et al. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J cancer* 1995;72:41-4.
15. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, et al. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 1994;54:1352-4.
16. Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen D, Mayer B, Reidnegger G, et al. Calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase activity in the human cervix carcinoma cell line MB-180. *Biochem J* 1993; 289:357-61.
17. Sherman PA, Laubach VE, Reep BR, Wood ER. Purification and cDNA sequence of inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry* 1993;32:11600-5.
18. Fujisawa H, Ogura T, Hokari A, Weisz A, Yamashita J, Esumi H. Inducible nitric oxide synthase in a human glioblastoma cell line. *J Neurochemistry* 1995;64:85-91.
19. Takahashi M, Fukuda K, Ohata T, et al. Increased expression of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthases in rat colon tumors induced by azoxymethane. *Cancer Res* 1997;57:1233-7.
20. Moochhala S, Chhatwal VJ, Chan ST, et al. Nitric oxide

- synthase activity and expression in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 1996;17:1171-4.
21. Siedlar M, Mytar B, Krzeszowiak A, Baran J, et al. Demonstration of iNOS-mRNA and iNOS in human monocytes stimulated with cancer cells in vitro. *J Leukoc Biol* 1999;65(5):597-604.
  22. Konur A, Krause SW, Rehli M, et al. Human monocytes induce a carcinoma cell line to secrete high amount of nitric oxide. *J Immunology* 1996;157:2109-15.
  23. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350.
  24. Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: Implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 1998;58:334-41.
  25. Radomski MW, Jenkins DC, Holmes L, Moncade S. Human colorectal adenocarcinoma cells: Differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Res* 1991;51:6073-8.
  26. Thomsen LL, Scott JM, Topley P, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1,400 W, a novel inhibitor. *Cancer Res* 1997;57(15):3300-4.
  27. Tschugguel W, Pustelnik T, Lass H, Mildner M, Weninger W, Scheeberger C, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression may predict distant metastasis in human melanoma. *Br J Cancer* 1999;79:1609-12.
  28. Murrell GAC, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:15-21.
  29. Herce-Pagliai C, Kotecha S, Shuker DE. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* 1998;2:324-36.

= 편집인의 글 =

대장암에서의 NO의 역할을 구명하려는 시도의 논문이다. 전이성이 다른 세포주를 배양하면서 자극 후에 생성되는 각 종류의 NO 합성효소인 NOS를 western blot 방법으로 측정하였다. NO는 기체이므로 세포에서 생성된 후 3~4초간만 존재 작용하고 확산되어 없어진다(aerocrine). 그러므로 NO를 직접적으로 측정하는 방법은 쉽지 않다. 그러므로 1) NO가 iron protein과 결합한 상태를 electron paramagnetic resonance (EPR)를 이용하여 측정한다. 2) 전기화학적인 방법인 ultramicroelectrode를 이용하여 in situ에서 NO를 직접 측정하거나 NO가 NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>로 변한 전체적인 NO양을 azo dye + NO<sub>2</sub>가 반응하여 색조를 나타내는 것을 UV-visible spectroscopy로 정량한다(Griess reaction). NO 합성효소인 NOS에 대한 단일클론항체가 개발되어 면역조직화학검사나 Western blot 방법으로 NOS를 측정함으로써 NO양의 증감을 측정한다. 그 이외에도 iNOS의 경우에는 mRNA를 Northern blot을 이용하여 측정한다. 이상의 방법 이외에도 NO 혹은 그 부산물을 측정하는 chemiluminescence 방법들이 제안되었으나 실제적으로 사용이 어렵다. 본 논문의 심사가 4차까지 진행되면서 열기를 더 했던 이유도 NO의 측정방법에 대한 의견과 해석이 다양하였기 때문이었다.

NO에 대한 연구 역사가 20~30년 되었지만 다양한 세포에 의하여 합성되고 다양한 역할을 수행하므로 암세포에 대하여서도 일관된 결론을 유도하기가 어렵다. NO 합성효소인 NOS (NO synthase; L-arginin, NADPH: oxygen oxidoreductase, NO forming)는 크게 세가지로 구분된다. 1) NOS I: regulated by calcium; b-, c-, n-NOS, 2) NOS II: cytokine과 LPS에 의하여 유도된다; i-, mac-, hep-NOS, 3) NOS III: regulated by calcium; e-, c-NOS.

iNOS의 경우 핵이 있는 인체의 모든 세포에서 사이토카인이나 LPS에 의하여 적당한 조건이 주어지면 유도발현 될 수 있다. 본 논문을 통하여 보면 대장암 세포의 경우도 예외는 아니며 전이성이 강한 암세포에서 발현의 정도가 유의하게 높아진 점은 흥미롭다. 단지 저자가 결론에 언급을 하지 않았지만 nitrotyrosine의 증가에 대하여서는 LPS의 자극에 의한 일반적인 증가현상인지 아니면 NOS와 같은 의미를 둘 수 있는지에 대하여서는 추후 추가적인 실험이 필요할 것이다. 끝으로 본 논문의 심사 에 전력을 다하신 심사위원과 원광의대 면역학교실의 정헌택 교수, 교수님의 저서에 감사를 드린다.

한림대학교 의과대학 외과 이 봉 화