Journal of Korean Association
of Cancer Prevention
2001; 6(3): 155-164

저산소 및 저포도당에 의한 혈관내피세포의 세포사멸에 대한 Ofloxacin의 억제효과 및 그 작용기전에 관한 연구

부산대학교 분자생물학과, [1]대구가톨릭대학교 의과대학 생화학교실 및
[2]정신과학교실, [3]서울대학교 약학대학 약학과, 종합약학연구소

김해선 · 이유미 · 유미애 · 이종원[1] · 류석환[2] · 김규원[3]

Ofloxacin Inhibits Hypoxia/Hypoglycemia-Induced Apoptosis in Bovine Aortic Endothelial Cells

Hae-Sun Kim, You Mie Lee, Mi-Ae Yoo, Jongwon Lee[1], Seuk Hwan Ryu[2] and Kyu-Won Kim[3]

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan, Korea
[1]Department of Biochemistry and [2]Psychiatry, Catholic University of Taegu, Daegu, Korea, [3]Angiogenesis Research Laboratory, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea

Hypoxia/hypoglycemia can cause apoptosis, an important feature in the progression of ischemic diseases such as ischemic infarction, stroke and athroscleosis. It was reported that previous use of the flouquinolone type antibiotic ofloxacin decreases the risk of developing acute myocardial infarction. On the basis of previous reports, we hypothesize that ofloxacin may prolong survival of endothelial cells against hypoxia/hypoglycemia-induced apoptosis. The ofloxacin treatment increased the viability of BAECs (Bovine Aortic Endothelial Cells) exposured to hypoxia/hypoglycemia for 48h compared with the control. Ofloxacin reduced the DNA fragmentation and the nuclear condensation. By using FACSscan analysis after PI staining, we found that the proportion of apoptotic sub-diploid cells was decreased by the treatment of ofloxacin under hypoxia/hypoglycemia. In order to investigate the anti-apoptotic mechamism of ofloxacin under hypoxia/hypoglycemia, we examined the expression levels of antiapoptotic protein Bcl-2 and proapoptotic protein Bax by immunoblot analysis. The treatment of ofloxacin induced the relatively higher expression levels of Bcl-2 in BAECs under hypoxia/hypoglycemia. However, the expression levels of Bax were not changed. Taken together, these results suggest that ofloxacin inhibits hypoxia/hypoglycemia-induced apoptosis and increases the viability of BAECs through enhancement of Bcl-2 protein expression under hypoxia/hypoglycemia.

Key Words: Ofloxacin, Hypoxia, Hypoglycemia, Apoptosis

책임저자 : 김규원, ㉾ 110-799, 서울특별시 관악구 신림동, 서울대학교 약학대학 약학과
Tel: 02-880-6988, Fax: 02-872-1795, E-Mail: qwonkim@plaza.snu.ac.kr

서 론

세포사멸(apoptosis)현상은 발생과정, 조직 항상성의 유지 및 비정상 세포의 제거 등에 필수적인 과정으로서, 인산화된 세린잔기의 외부노출, DNA 절편화, 핵의 응집, 세포의 수축, 그리고 막의 기포 등의 형태적 특징을 나타내는 현상이다.[1,2] 이러한 세포사멸을 조절하는 대표적인 인자로 Bcl-2 family가 알려져 있다. Bcl-2 family는 세포사멸 억제단백질인 Bcl-2와 Bcl-xL 그리고 세포사멸 유발단백질인 Bax와 Bad 등의 세포사멸 현상 조절에 관련된 중요단백질들을 포함하고 있다. 특히, Bcl-2와 Bax의 발현비율은 세포의 생존에 매우 핵심적인 요소로서,[3,4] Bcl-2의 세포내 존재 위치(세포질 혹은 미토콘드리아)에 따라 세포의 생존 여부가 결정된다. 세포사멸 신호에 의한 Bax 간의 결합체(homodimer)의 증가와 그에 따른 Bcl-2의 감소는 Bax의 세포질에서 미토콘드리아 세포막으로의 이동을 유발하고, 이는 막 전위의 손실과 세포질로의 cytochrome C 방출 등의 미토콘드리아 기능장애를 일으킨다. 이때 방출된 cytochrome C는 세포사멸 활성화인자와 복합체를 형성하여 세포사멸에 직접적으로 관여하는 단백질분해효소인 caspase 9를 활성화시켜 결국 세포사멸을 초래한다.[5,6]

뇌와 심장은 혈액으로부터 산소와 영양분을 공급받아 그 기능을 유지하는데, 뇌혈관이나 심장에 혈액을 공급하는 관상동맥의 손상은 뇌세포와 심장세포로의 산소 및 영양분의 공급을 차단하여 세포사멸현상을 유발한다. 이러한 세포사멸현상은 알츠하이머씨병, 후천성면역결핍증에 기인한 뇌기능 장애 그리고 뇌졸중 등의 신경퇴행성 질환과 선천적 심장질환(congestive heart failure) 및 허혈성질환(ischemic injury) 등의 심혈관계 질환(cardiovascular disease)에서 조직 손상의 직접적 원인이 된다.[7,8] 특히, 허혈(ischemia)로 인한 조직 손상은 심근 경색 및 심장 발작 그리고 동맥경화 등의 심혈관계 질환에서 사망을 초래하는 주요 원인으로 알려져 있다.[9,10] 이 때 필연적으로 허혈에 기인한 혈관내피세포의 사멸이 나타나는데, 동맥경화증의 경우 관상동맥의 내층에서 혈관내피세포의 세포사멸이 관찰되었다.[11] 혈관내피세포는 혈관의 운동상태, 혈소판과 단핵세포의 부착력, 평활근의 성장, 세포 외 기질의 생성 등을 조절하여 혈관의 항상성을 유지하고, 항응고 및 항염증에 대한 보호막으로 작용하는 등 주변 조직의 세포사멸과 생존에 관련된 신호를 직접 받는다.[12] 따라서, 허혈로 인한 혈관내피세포의 사멸현상을 차단하는 것은 주변조직의 손상을 최소화하는 일차적 방어막이 되며, 이는 질병의 치료에 있어 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

Ofloxacin (Fig. 1)은 플루오르퀴놀론계 항생제로 항염증 효과[13]와 박테리아 topoisomerase II의 특이적 저해제로써 탁월한 항세균 효과를 가지고 있다. 일반적으로 클라미디아 폐렴쌍구균과 같은 박테리아의 만성 감염은 발병한 급성 심근 경색(acute myocardial infarction; AMI)의 위험을 더욱 증가시킨다. 최근 AMI환자에 ofloxacin을 투여하였을 경우 그 위험이 감소되었다고 보고되었는데, 이는 ofloxacin이 박테리아 만성 감염을 해소시켜 급성 심근경색의 위험을 감소시키는 것으로 볼 수 있다.[14,15] 이러한 결과는 실제 심근 경색 및 동맥경화의 질환의 예방이나 치료에 항생제가 효과가 있다고 결론을 내릴 수는 없다. 그러나 최근 테트라사이클린 계열의 항생제를 뇌허혈 실험 동물에 투여시 항염증효과를 나타내어 세포의 손상을 억제시키는 것으로 보고[16]되었는데, 이러한 보고는 항생제가 항염증 기작 이외에 직접적으로 세포사멸을 억제하여 조직 및 세포의 손상을 차단할 수 있는 가능성을 제시하였다.

따라서, 본 연구에서는 ofloxacin이 허혈에 의한 조직과 세포의 세포사멸을 직접적으로 억제함으로써 허혈성 질환의 회복에 기여할 것이라고 가

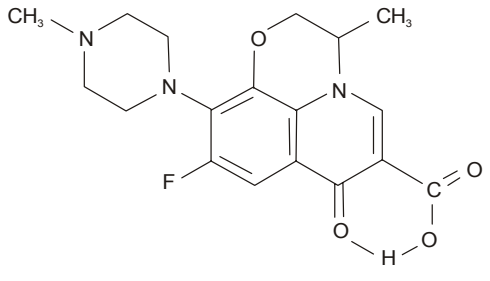

Fig. 1. Structure of ofloxacin.

설을 세웠고, 특히 혈관내층을 형성하고 있는 혈관내피세포의 세포사멸에 대한 ofloxacin의 억제 효과 및 작용기전을 연구하고자 하였다.

본 실험은 위의 가설을 검증하기 위해 저산소 및 저포도당 조건의 *in vitro* 모델[17,18]을 사용하여 bovine aortic endothelial cell (BAECs)의 세포사멸 현상을 DNA fragmetation 실험법 및 DAPI 염색법, 그리고 FACSscan flow cytometry를 이용하여 사멸된 세포를 확인하고, Bcl-2와 Bax의 발현을 조사하여 혈관내피세포의 세포사멸 억제 효과에 대한 ofloxacin의 작용기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 세포주와 세포배양

혈관내피세포인 bovine aortic endothelial cells (BAECs; 소 대동맥 혈관내피세포)은 10% fetal bovine serum (FBS) 을 첨가한 Dulbecco's modified eagle media (DMEM, Gibco)에 1% Penicillin-Streptomycin (P-S) 을 첨가한 배지에서 단층 배양되며, 2일에서 3일에 한번씩 trypsinization으로 subculture하여 유지하고 세포배양 환경은 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO_2 배양기에서 시행되었다. Passage 10~12의 세포를 실험에 사용하였다.

2) 저산소 및 저포도당 상태에 대한 조건과 약물 처리

혈관내피세포인 BAECs을 4×10^4 cells/cm^2로 subculture한 후, 24시간 동안 배양하였고, 세포의 confluence가 약 90% 정도에 이르렀을 때, 포도당을 포함하지 않은 DMEM으로 배지를 교환한 후, ofloxacin을 10μg/ml로 처리한 다음, 1% O_2농도를 유지하는 저산소 배양기(hypoxic chamber)에서 48시간 동안 배양하였다. Ofloxacin은 증류수에 녹인 후, 0.22μm filter에 여과하여 사용하였다.

3) Viability assay

세포의 생존율은 trypan blue 염색법으로 측정하였다. 배지를 제거하고, trypsinization한 뒤, 0.4% trypan blue 용액을 동량으로 실온에서 5분간 처리한 후, 광학현미경하에서 세포 수를 세었다. 결과는 전체 세포수에 대한 정상세포의 백분율을 계산하여 나타내었다.

4) DNA fragmentation assay

BAECs를 48시간 동안 각각의 조건에서 배양한 후, 차가운 phosphate-bufferd saline (PBS)으로 두 번 세척한 후, lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5, 0.1% Triton X-100)를 4°C에서 30분간 처리하였다. 세포를 모아 30분간 원심 분리하여 상층액을 취한 다음, phenol-chloroform 용액으로 DNA를 분리하였다. RNase (100μg/μl)를 처리한 후, 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide (1.5μg/ml)에 염색하여 UV파장에서 관찰하였다.

5) DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) staining

커버글래스가 놓인 12 well plate에 BAECs를 subculture한 후, 24시간 동안 배양하였다. 각각의 실험조건에서 48시간 후, 12 well plate를 꺼내어 차가운 PBS로 두 번 세척하고 3.7% 파라포름알데하이드 용액으로 고정시켜 DAPI (5μM)로 염색한 다음, 차가운 PBS로 두 번 세척한 후, crystal mount로 봉입하여 UV 파장에서 관찰하였다.

6) PI (propidium iodide) staining

BAECs를 48시간 동안 각각의 조건에서 실험한 후, 배지를 제거하고 trypsinization하여 세포를 모았다. 차가운 PBS로 세포를 한 번 세척한 후, 70% 에탄올 용액으로 고정시켰다. PI와 RNase (50μg/ml)를 30분 동안 처리한 후, FACSscan flow cytometry (Becton Dickinson)를 사용하여 세포사멸을 일으키는 세포의 수(apoptotic sub-diploid cell)를 측정하였다.

7) Immunoblot analysis

BAECs를 48시간 동안 실험군의 조건에 따라 배양한 후, 차가운 PBS으로 두 번 세척한 후, lysis buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Nonidet P-40, protease inhibitor)를 처리하여 단백질을 분리하였다. 50μg 단백질을 15% polyacrylamide gel에 전기영동한 후, nitrocellulose paper로 transfer하였다. anti-Bcl-2 항체와 anti-Bax 항체로 면역반응 후,

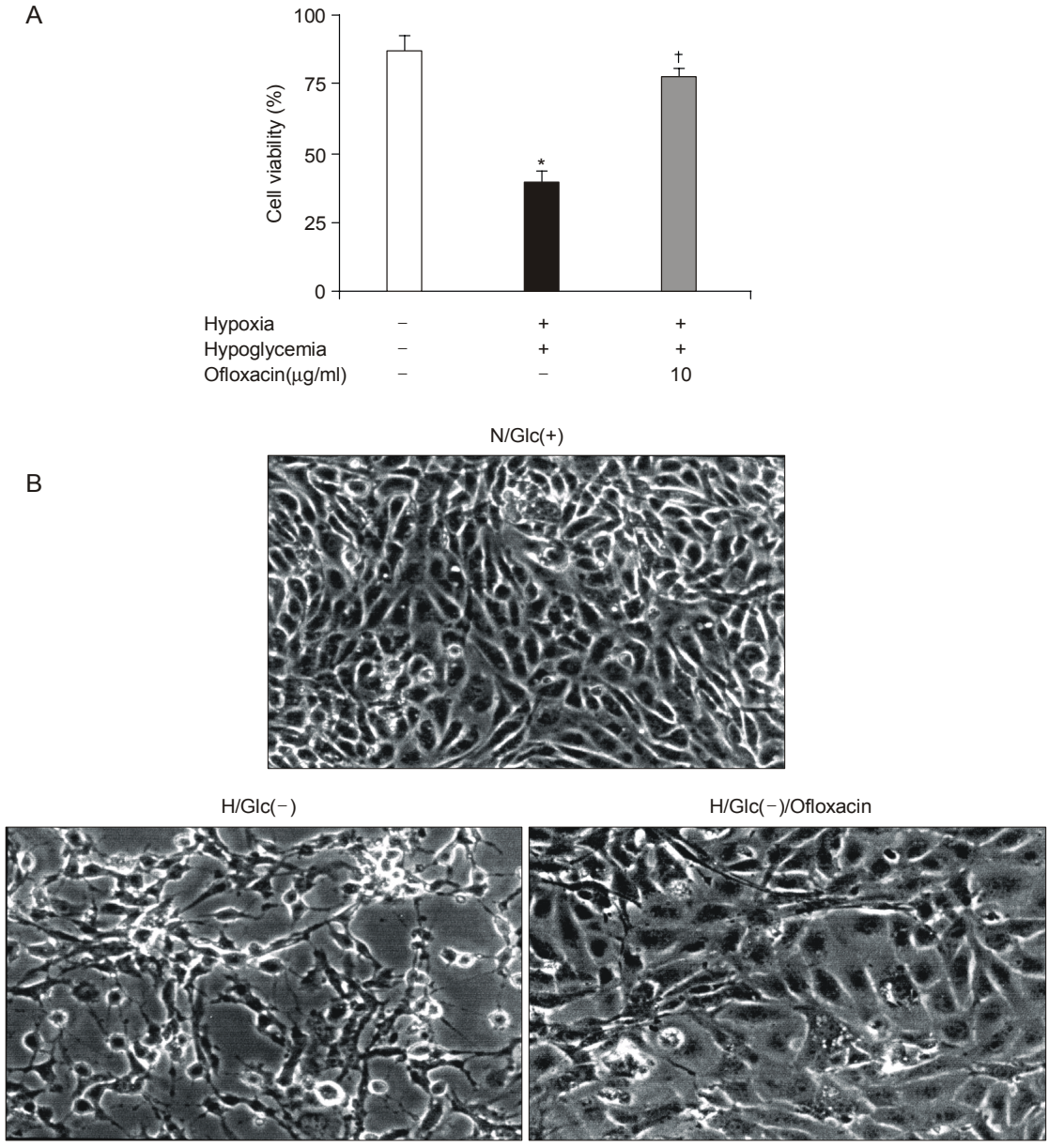

Fig. 2. Effects of ofloxacin on the viability and morphology of BAECs. The cell viability was assessed by Trypan blue staining. BAECs were incubated under normoxia/ normal glucose (□) and under hypoxia/hypoglycemia without (■) or with 10μg/ml ofloxacin (▨) for 48h. Data represents mean values of three replicates with bars indicating SD±Mean. *$p < 0.001$ compared to normoxia/ normal glucose, #$p < 0.001$ compared to hypoxia/ hypoglycemia (A). The morphology of BAECs was observed by phase-contrast microscope. N; Normoxia, H; Hypoxia, Glc; Glucose (B).

chemiluminescent 용액(Amersham Pharmacia Biotechnology)을 사용하여 얻은 band는 densitometer를 사용하여 정량하였다.

결 과

1) 저산소 및 저포도당 상태에서 혈관내피세포의 생존율 및 세포형태에 대한 ofloxacin의 영향

저산소 및 저포도당 상태에서 ofloxacin의 혈관내피세포 생존율에 대한 효과를 측정하기 위하여 trypan blue 염색법을 실시하였다(Fig. 2A). 정상적인 조건에서 48시간 동안 배양된 BAECs에서는 약 90%의 생존율이 나타났으나, 저산소 및 저포도당 조건에서는 약 40%로 생존율이 감소하였다. 저산소 및 저포도당 조건에서 ofloxacin을 처리시, 혈관내피세포의 생존율이 약 78% 정도로 증가됨을 관찰하였다. 한편, 저산소 및 저포도당 조건에서 혈관내피세포의 형태는 정상세포에 비해 둥글고 위축됨을 위상차 현미경으로 관찰하였다. 이에 비해 저산소 및 저포도당 조건에서 ofloxacin을 처리한 경우, 세포의 모양이 정상세포와 유사하게 회복됨을 관찰하였다 (Fig. 2B). 위의 결과로, ofloxacin이 저산소 및 저포도당 상태에 의한 혈관내피세포의 생존율을 증가시키고, 세포의 형태를 정상적으로 유지시킴을 확인하였다.

2) 저산소 및 저포도당 상태에서 혈관내피세포의 DNA fragmentation에 대한 ofloxacin의 영향

저산소 및 저포도당 상태에서 ofloxacin에 의한 혈관내피세포의 생존율 회복이 세포사멸현상과 관련되었는지 조사하기 위하여 DNA fragmentation assay를 수행하였다. 저산소 및 저포도당 상태에서 24시간 동안 배양한 BAECs에서는 DNA fragment를 관찰하였으나, ofloxacin을 처리시 DNA fragment가 관찰되지 않았다(Fig. 3A). 저산소 및 저포도당 조건에서 48시간 동안 배양한 BAECs에서 DNA fragment가 24시간 배양시보다 더욱 증가함을 관찰하였고, ofloxacin을 처리시 저산소 및 저포도당상태에 의한 DNA fragment가 현저히 줄어듦을 관찰하였다(Fig. 3B). 이 결과를 통해 ofloxacin이 저산소 및 저포도당 상태에 의한 BAECs의 DNA fragmentation을 저해함을 확인하였다.

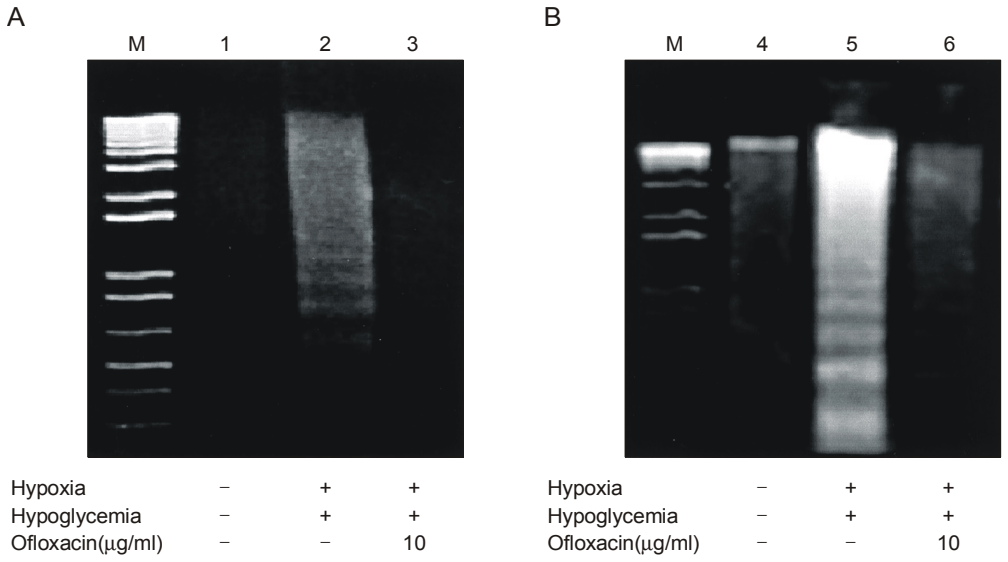

Fig. 3. Electrophoretic analysis of DNA from BAECs with ofloxacin treatment under hypoxia/hypolycemia. DNA was analyzed on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. Cells were incubated under normoxia/normal glucose (lane1, 4) and under hypoxia/hypoglycemia without (lane 2, 5) or with 10μg/ml ofloxacin (lane 3, 6) for 24h (A) and 48h (B). Lane M represents the 1kb DNA size marker.

3) 저산소 및 저포도당 상태에서 혈관내피세포의 핵 응집현상에 대한 ofloxacin의 영향

세포사멸현상의 특징으로 나타나는 핵의 응집현상과 절편현상에 대한 ofloxacin의 효과를 조사하기 위하여 DAPI 염색법을 수행하였다. 정상적인 조건에서 48시간 동안 배양된 BAECs에 비해 저산소 및 저포도당 상태의 BAECs에 핵 응축과 절편이 나타남을 관찰하였다. 그러나 저산소 및 저포도당 상태에 ofloxacin을 처리시에는 응축 및 절편화된 핵이 정상상태의 혈관내피세포의 핵과 같이 회복됨을 관찰하였다(Fig. 4). 이상의 결과로 ofloxacin이 저산소 및 저포도당 상태에 기인한 핵의 응집현상과 절편현상을 억제함을 확인하였다.

4) FACSscan analysis를 통한 혈관내피세포의 DNA degradation에 대한 ofloxacin의 영향

세포사멸현상에서 필수적으로 동반되는 DNA degradation의 정도를 분석하기 위해 PI로 염색한 후, FACSscan flow cytometry를 이용하여 저산소 및 저포도당 상태에서의 ofloxacin 효과를 조사하였다(Fig. 5). 정상적인 조건에서 48시간동안 배양된 BAECs의 경우, apoptotic sub-diploid cell이 7.3%를 나타내는 반면, 저산소 및 저포도당 조건의 경우 15.4%로 정상상태보다 약 2배 이상이 증가함을 관찰하였다. 그러나, 저산소 및 저포도당 상태에 ofloxacin을 처리하였을 경우, apoptotic sub-diploid cell이 5.2%로 나타나 오히려 정상상태 보다 apoptotic cell의 수가 감소함을 보여주었다(Fig. 5B). 위의 결과를 통해서 ofloxacin이 DNA degradation

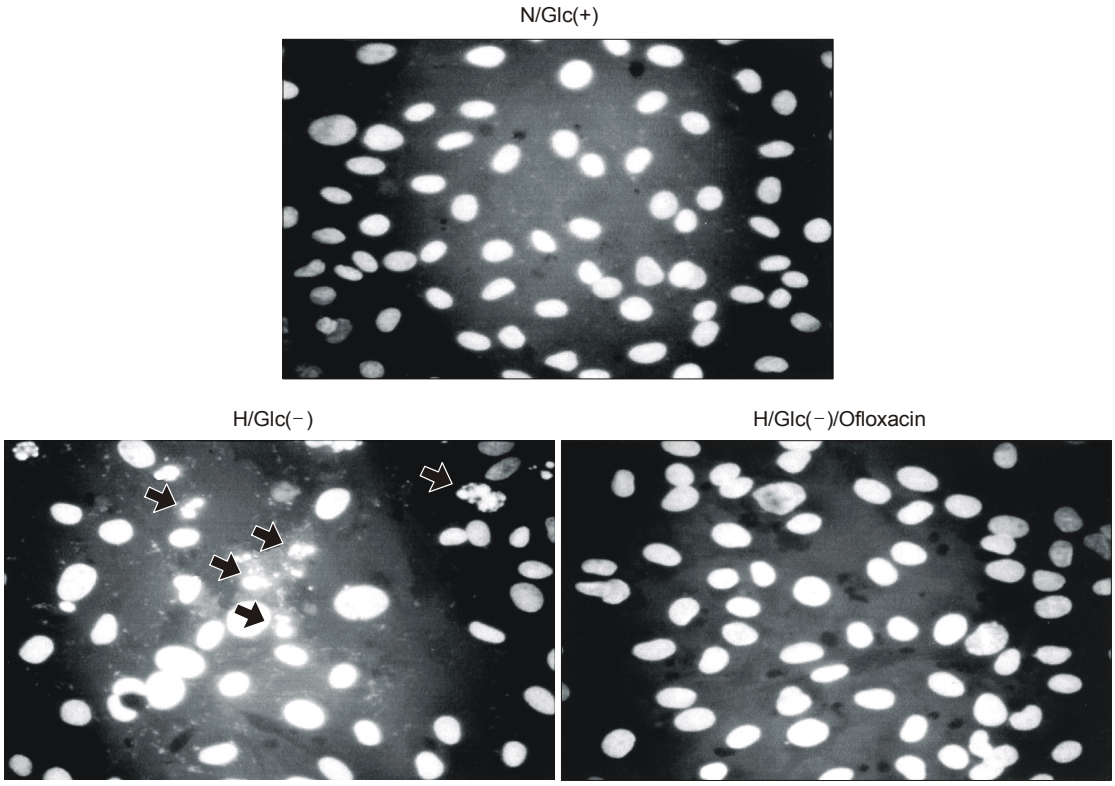

Fig. 4. Effects of ofloxacin on the nuclear morphology of BAECs exposed to hypoxia/ hypoglycemia for 48h. The morphology of nucleus was assessed by DAPI staining. Apoptotic cells with the condensated and fragmented nucleus are indicated by arrows.

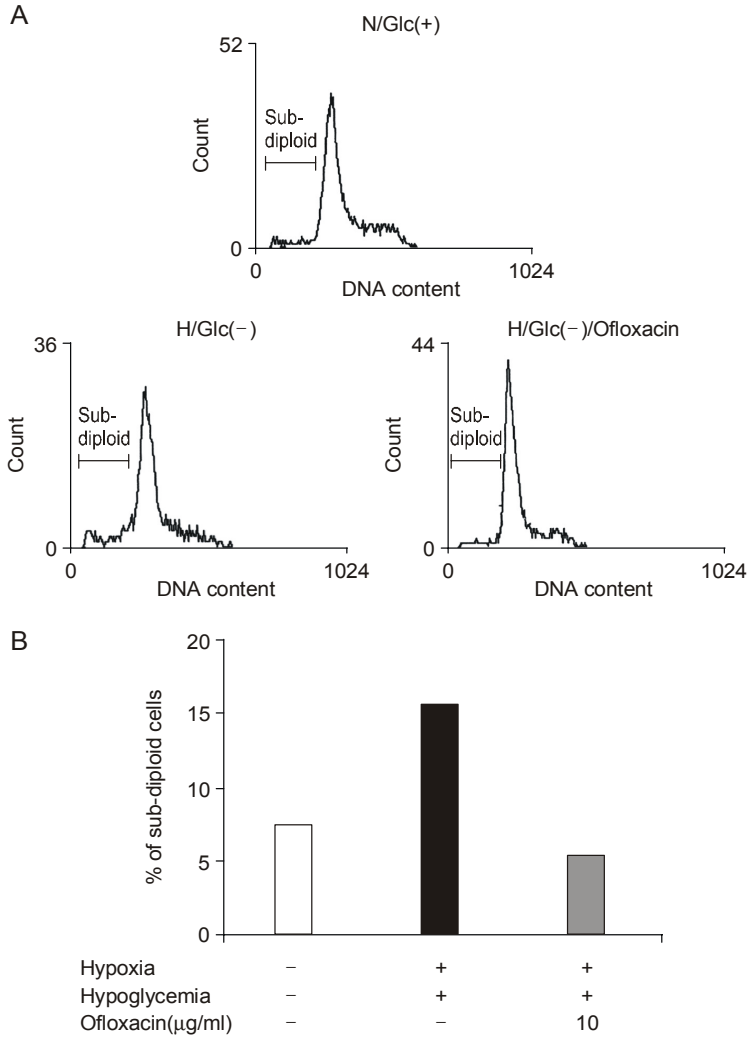

Fig. 5. Quantitation of apoptotic sub-dipoid cells by FACSscan flow cytometry. To measure DNA contents of individual cells, BAECs incubated for 48h under normoxia/normal glucose and hypoxia/hypoglycemia with or without ofloxacin (10μg/ml), cells were stained with PI, and the number of sub-diploid cells were countered by using FACSscan flow cytometry (A). Apoptotic sub-diploid cell numbers were quantitated and depicted on the graph (B).

을 억제함으로써 저산소 및 저포도당 상태에 기인한 혈관내피세포의 세포사멸현상을 억제함을 확인하였다.

5) Hypoxia에 의한 Bcl-2와 Bax의 발현의 변화

Ofloxacin의 저산소 및 저포도당 상태에 기인한 세포사멸 억제효과에 대한 작용기전을 연구하기 위하여 세포사멸의 주요 조절인자 중 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2와 세포사멸 유도 단백질인 Bax의 발현을 immunoblot analysis를 통해 조사하였다. 정상적인 조건에서 48시간 동안 배양된 BAECs에서의 Bcl-2 단백질 발현에 비하여 저산소 및 저포도당 상태에서의 Bcl-2 단백질의 발현은 현저히 감소하였으나, ofloxacin을 처리시 정상상태와 같은 수준으로 그 발현이 증가됨을 관찰하였다. 한편 Bax의 발현에는 변화가 없었다(Fig. 6A).

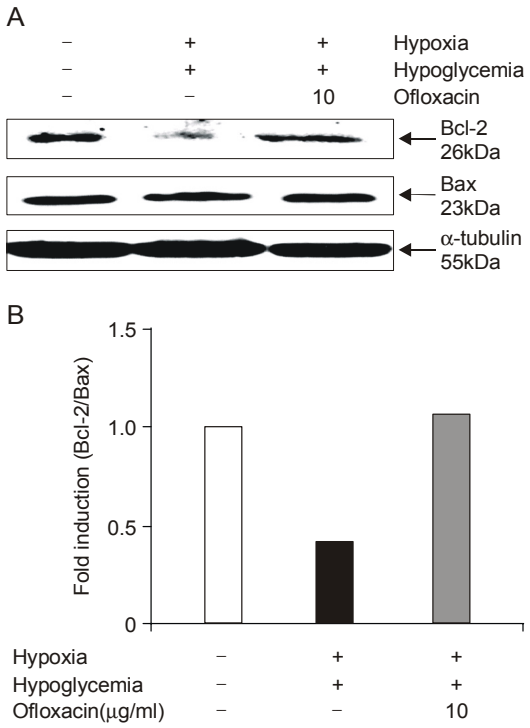

Fig. 6. Effects of ofloxacin on Bcl-2 and Bax expressions under hypoxia/ hypoglycemia. BAECs were exposed to hypoxia/ hypoglycemia for 48h. Bcl-2 and Bax protein were detected by immunoblot analysis using specific antibodies. α-tubulin was used for an internal control (A). Data represents the induction fold of Bcl-2/Bax after normalization with α-tubulin band. The band intensity analyzed using densitometer (B).

이상의 결과를 세포의 생존여부에 결정적 요인으로 알려진 Bcl-2와 Bax의 발현 비율로 나타내었을 때, 저산소 및 저포도당 조건에서는 정상 상태의 Bcl-2/Bax비율에 대해 2.5배정도 감소함을 보여주었으나, ofloxacin을 처리한 경우, 정상상태와 동등한 수준(1.1배)으로 Bcl-2/Bax비율이 증가함을 보였다(Fig. 6B). 이러한 결과는 ofloxacin이 세포사멸 억제단백질인 Bcl-2의 발현을 증가시켜 저산소 및 저포도당에 기인한 혈관내피세포의 세포사멸을 억제하는 것을 보여준다.

고 찰

최근 허혈에 의한 뇌 및 심장에서의 조직 및 세포의 손상에 대한 기전과 그 치료에 관한 연구가 세계적으로 활발하게 진행되고 있다. 특히 혈관내피세포는 혈관의 내층을 형성함으로써 허혈에 의하여 직접적으로 손상이 발생하는 부위로 허혈성 질병의 치료에 있어 주요한 관심이 되고 있으며, 이러한 허혈에 의한 조직 및 세포의 손상에 대한 다양한 치료 물질들이 개발되고 있다. 최근 tPA (tissue Plasminogen Activator)와 아스피린 등이 허혈성 질병 치료제로 개발되었으나, 이러한 물질들은 주로 혈전에 의해 막힌 혈류를 뚫어주는 혈전용해제로써 작용한다.[18,19] 그러나 허혈로 인해 발생하는 조직 및 세포의 손상을 직접적으로 억제하여 치료할 수 있는 물질의 개발에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 그러므로 본 연구에서는 플루오르퀴놀론계 항생제인 ofloxacin이 저산소 및 저포도당 상태와 같은 *in vitro* 허혈모델에서 혈관내피세포의 세포사멸현상을 직접적으로 억제함을 증명하여 허혈에 기인한 발병에 대한 치료제로써의 가능성을 제시하고자 하였다.

본 연구 결과 ofloxacin이 저산소 및 저포도당 상태에서 혈관내피세포의 생존율을 증가시킴을 확인하였으며(Fig. 2A), 저산소 및 저포도당과 같은 스트레스로부터 혈관내피세포의 형태를 정상적으로 유지시킴을 확인하였다(Fig. 2B). 또한 ofloxacin의 혈관내피세포의 사멸현상에 대한 억제효과를 조사하기 위해 DNA fragmentation assay와 DAPI 염색을 통한 핵 관찰, FACSscan flow cytometry를 통한 apoptotic sub-diploid cell의 함량을 조사하였다(Fig. 3, 4, 5). 이러한 실험 결과를 통해서 ofloxacin이 저산소 및 저포도당에 의한 혈관내피세포의 DNA fragment, 핵의 응집현상과 절편현상, apoptotic sub-diploid cell의 정도를 감소시킴으로써, 세포사멸현상을 억제시킴을 확인하였다.

지금까지 저산소 및 저포도당과 같은 허혈로 인한 세포사멸에 대한 작용기전은 자세히 알려져 있지 않다. 그러나 최근 허혈 조건에서 인간의 혈관내피세포가 NFκB를 통해 Bcl-2의 발현이 감소되어 세포사멸현상이 유발됨이 보고되었다.[20] 또한, Bcl-2를 세포 내 과다발현 시켰을 때 세포사멸이 억제되며,[21,22] Bcl-2가 미토콘드리아의 기능손상을 억제하여 세포사멸을 차단하는 것으로 보고되었다.[23,24] 이러한 보고들은 Bcl-2가 세포사멸억

제에 관여하는 주요한 인자임을 시사해 주는 것으로, 본 연구에서는 Bcl-2와 Bax 단백질의 발현을 조사함으로써 ofloxacin의 작용 기전을 규명하고자 하였다. ofloxacin은 세포사멸 억제단백질인 Bcl-2의 발현을 증가시켜 저산소 및 저포도당에 의한 혈관내피세포의 세포사멸현상을 차단시킴을 확인하였다(Fig. 6). 이는 ofloxacin이 저산소 및 저포도당 상태에서 발생한 세포내 미토콘드리아의 기능손상을 Bcl-2 발현을 통해 억제시킴으로써 미토콘드리아의 원활한 기능을 가능케 하여 세포의 생존을 유지할 수 있게 하는 것으로 사료된다. 이에 관련된 ofloxacin에 의한 세포사멸 억제의 분자적 기작에 대해서는 보다 연구되어야 할 것이다.

결론적으로 본 연구에서는 허혈로 인해 발생하는 혈관내피세포의 세포사멸현상에 대한 ofloxacin의 억제 효과를 확인하였으며, ofloxacin의 효과는 허혈로 인해 발생하는 허혈성 뇌 질환과 심혈관계 질환 등과 같은 질병에 대한 새로운 약물로써의 개발 가능성을 제시하였다고 사료된다.

결 론

본 연구에서는 ofloxacin이 저산소 및 저포도당에 의한 혈관내피세포의 사멸현상을 저해함을 DNA fragmentation과 DAPI 염색법, PI 염색 후 FACSscan flow cytometry 분석을 통하여 확인하였다. 실제로 ofloxacin 처리는 저산소 및 저포도당 조건에서 세포사멸 억제단백질인 Bcl-2의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 결과로 볼 때, ofloxacin이 Bcl-2 단백질의 발현을 조절하여 허혈로 인한 혈관내피세포의 사멸을 억제시키며 이는 뇌졸중과 같은 허혈성 뇌 질환 뿐 아니라, 심근경색, 동맥경화 등 심혈관계 질환의 치료에 사용되어질 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 과학기술부 국가지정연구실 사업지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1) Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
2) Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354.
3) Kirshenbaum LA, Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 1997; 96: 1580-1585.
4) Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
5) Saikumar P, Dong Z, Weinberg FM, Venkatachalam MA. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 1998; 17: 3341-3349.
6) Reed FC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, Aime-Sempe C, Bodrug S, Kitada S, Hanada M. BCL-2 family proteins: Regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996; 60: 23-32.
7) VG Sharov, HN Sabbah, H Shimoyama, AV Goussev, M Lesch, S Goldstein. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Path* 1996; 148: 141-149.
8) Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of Ischemia/Reperfusion Injury in Rats by a Caspase Inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 276-281.
9) PW Hochachka, LT Buck, CJ Doll, SC Land. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9493-9498.
10) Tretyakov AV, Farber HW. Endothelial cell tolerance to hypoxia. *J Clin Invest* 1995; 95: 738-744.
11) Jonathan C Choy, David J Granville, David WC Hunt, Burce M McManus. Endothelial cell apoptosis: biochemiacal characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1673-1690.
12) Tihomir Stefanec. Endothelial Apoptosis. *Chest* 2000; 117: 841-854.
13) Yoko K, Michiyuki K. Characterization of fluoroquinolone-induced achillies tendon toxicity in rats: comparison of toxicities of 10 fluoroquinolones and effects of anti-inflammatory compounds. *J Antimicrob Chemother* 1997; 41: 2389-2393.
14) Meier CR, Derby LE, Jick SS, Vasilakis C, Jick H. Antibiotics and risk of subsequent first-time acute

myocardial infarction. *J Am Med Assoc* 1999; 281: 427-431.

15) Herings RM, Leufkens HG, Vandenbroucke JP. Acute myocardial infarction and prior antibiotic use. *J Am Med Assoc* 2000; 284: 2998-2999.

16) Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S, Bian J, Guo L, Farrell LA, Hersch SM, Hobbs W, Vonsattel JP, Cha JH, Friedlander RM. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 2000; 6: 797-801.

17) Park JH, Okayama N, Gute D, Krsmanovic A, Battarbee H, Alexander JS. Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton. *Am J Physiol* 1999; 277: C1066-1074.

18) Flavin MP, Zhao G. Tissue plasminogen activator protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation injury. *J Neurosci Res* 2001; 63: 388-394.

19) Gum PA, Thamilarasan M, Watanabe J, Blackstone EH, Lauer MS. Aspirin use and all-cause mortality among patients being evaluated for known or suspected coronary artery disease: A propensity analysis. *J Am Med Assoc* 2001; 286: 1187-1194.

20) Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, Yamamoto K, Higaki J, Yasufumi K, Ogihara T. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation. *Circulation Res* 2000; 86(9): 974-981.

21) Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S, Matsushita H, Nakagami H, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 2001; 37: 1341-1348.

22) Devarajan P, De Leon M, Talasazan F, Schoenfeld AR, Davidowitz EJ, Burk RD. The von Hippel-Lindau Gene Product Inhibits Renal Cell Apoptosis via Bcl-2-dependent Pathways. *J Biol Chem* 2001; 276: 40599-40605.

23) Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1455-1459.

24) Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 1996; 13: 21-29.