

산화스트레스에 의한 치밀이음부 zonular occludens-1 발현의 변화

손동섭¹, 이희상, 김대진, 최형택, 이금정, 조혜진, 김석중,
이종찬, 정윤희, 김성수, 이원복, 김경용
중앙대학교 의과대학 해부학교실, ¹홍부외과학교실

간추림 : 중추신경계속에서 미세환경의 항상성은 뇌의 정상적인 활동에 필수적이며, 혈액뇌장벽에 의해 유지된다. 치밀이음부의 zonular occludens-1 (ZO-1)은 혈액뇌장벽에서 내피세포 이온과의 용질장벽으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 활성산소종으로 인한 혈액뇌장벽의 기능이상은 치밀이음부의 기능부전에 기인한다. 이 연구에서는 소의 뇌 미세혈관내피세포의 일차배양을 통해 H₂O₂에 의해 일어나는 세포간 물질투과도의 변화와 치밀이음부 복합체를 형성하는 ZO-1의 변화를 알아보고자 하였다. 전기저항으로 측정된 혈액뇌장벽 투과도는 H₂O₂의 농도(0.01, 0.1, 1.0 mM)와 노출시간에 비례하여 증가하였다. 또한 H₂O₂ 1 mM 이하 및 4시간 내에서 세포생존율에 변화는 없었다. H₂O₂에 의해 치밀이음부에서 ZO-1이 불규칙하게 소실되었으나 ZO-1의 단백질 양에는 변화가 없었다. 요약하면 H₂O₂는 혈액뇌장벽에서 세포간 투과도를 증가시키며, 이는 ZO-1의 단백질의 분포의 변화에 밀접한 관계가 있다고 할 수 있다.

찾아보기 낱말 : 산화스트레스, 혈액뇌관문, 치밀이음부, ZO-1

서 론

혈액뇌장벽 (blood-brain barrier, BBB)을 통한 물질이동의 조절기능은 내피세포 사이에 있는 치밀이음부 (tight junction)를 형성하는 단백질들의 양 및 구조적 통합성과 밀접한 관계가 있다 (Bolton 등 1998, Mark와 Davis 2002).

뇌의 항상성과 낮은 물질투과도를 유지하는 치밀이음부는 두 개의 integral protein (occludin과 claudin-1), membrane-associated guanylate kinase (MAGUK family) 인 zonula occluden-1 (ZO-1), ZO-2과 ZO-3, cingulin, 그리고 7H6 등으로 형성된다 (Furuse 등 1998, Mitic과 Anderson 1998, Martin-Padura 등 1998). 이 치밀이음부복합체는 세포골격

*이 논문은 2004학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임

교신저자: 김경용 (중앙대학교 의과대학 해부학교실)

전자우편: skull@cau.ac.kr

인 actin 에 연결된다 (Mark와 Davis 2002). 포피와는 달리 내피세포의 치밀이음부는 다양한 요소에 매우 민감하다 (Kniesel과 Wolburg 2000).

치밀이음부의 기능을 조절하는 신호전달체계는 G-proteins, serine, threonine, 그리고 tyrosine kinase, extra 및 세포내 calcium level, cAMP level, protease, 그리고 TNF alpha 등을 포함한다. 이들 신호전달체계는 혈액뇌장벽을 특징짓는 세포골격을 조절한다 (Kniesel과 Wolburg 2000). HUVEC을 이용한 실험에서 H₂O₂ 투여시 extracellularly regulated kinase (ERK1/ERK2)를 통한 신호전달경로로 용질투과성이 증가하며, 이는 또한 occludin 의 변화에 의한다 (Kevil 등 2000).

허혈성 뇌질환을 일으키는 손상으로 인해 부종과 BBB의 투과기능에 장애가 생길 뿐만 아니라 신경세포와 아교세포들이 손상을 입으며, 더욱이 저산소기에 손상이 일어나면 산소에서 기원한 free radical 이 최소한 재관류시에 일어나는 손상의 한 원인일

수도 있다(Horikawa 등 2001). BBB를 통한 용질의 동양의 유지와 조절기능은 내피세포 사이에 있는 치밀이음부 단백질들의 양과 구조적 통합성과 밀접한 관계가 있다(Mark와 Davis, 2002).

위에서 제시된 여러 연구결과를 바탕으로 볼 때, 내피세포에서 치밀이음부의 역할은 매우 중요하며, 다양한 환경에서 이것을 구성하는 단백질들의 변화가 일어나는 것이 밝혀지고 있다. 그러므로 혈액뇌장벽의 내피세포에서 치밀이음부를 구성하는 주요 단백질 중의 하나인 ZO-1도 여러 조건에서 기능 또는 분포의 변화가 있을 것으로 생각된다.

이 연구에서는 소의 뇌에서 배양된 혈액뇌장벽의 내피세포에서 활성산소의 일종인 H₂O₂에 의해 일어나는 치밀이음부의 기능 및 ZO-1 단백질의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 소의 뇌 미세혈관 내피세포의 분리와 배양

도살장에서 갓 도살한 신선한 소의 뇌를 구입하여 ice-cold MEM (pH 7.4)에 넣어 실험실로 운반하여 뇌수막과 뇌표면의 미세한 혈관들을 제거한 후, 대뇌겉질만을 실험재료로 삼았다. 무균장치내에서 뇌겉질을 1~2 mm³의 크기로 세절한 후, 뇌 겉질에 dispase와 collagenase/dispase를 넣어 5시간 배양하고, 50% percoll을 이용하여 최종적으로 혈액뇌장벽을 구성하는 미세혈관 내피세포(bovine brain microvessel endothelial cells, BBMECs)를 분리하였다(Audus와 Borchardt 1987). 실험목적에 따라 cover glass, 12 well plate 또는 Transwell (Corning)에 내피세포를 배양하였다. 배양액은 3일째 바꾸어 주고, 이후로는 이틀마다 바꿔 주었다. 실험일에 H₂O₂ 10 μM, 100 μM, 1 mM, 5 mM을 투여하였다. 각 실험은 3 회를 각각 실시하였다.

2. Transelectrical resistance (TER)의 관찰

혈액뇌장벽의 기능을 나타내는 이온의 투과도를 측정하기 위해 H₂O₂ 투여 후 한 시간 간격으로 두

시간 동안 EVOM (World Precision) 으로 TER를 측정하였다.

3. 세포생존률

H₂O₂로 처리한 후의 BBMECs의 생존률은 AlamarBlue assay (Serotec)를 이용하여 확인하였다. H₂O₂로 30분간 처리하고 10% AlamarBlue를 포함한 changing media로 바꿔준 후 4시간 동안 배양하면서 세포생존률을 측정하였다. Spectra MAX 340 (Molecular Devices)를 이용하여 570 nm에서 측정한 absorbance에서 Background absorbance (600 nm 에서 측정) 빼었으며 생존률은 대조군 대비 %로 표현하였다(n=3).

4. 공초점 레이저 주사현미경 관찰

Slide chamber (Nunk)에서 배양한 내피세포는 3% paraformaldehyde (0.1 M PBS, 4°C)로 고정하고 면역형광현미경 관찰을 위해 일차항체는 rabbit polyclonal anti-ZO-1 antibody를 사용하였다. 대조군에서는 일차항체 대신 PBS를 사용하였다. 이차항체는 FITC conjugated goat anti-rabbit antibody (Zymed)를 사용하였다. Slide chamber (Nunk)에서 배양한 내피세포는 3% paraformaldehyde (0.01 M PBS)나 70% ethanol에 10분간 고정하였고 PBS로 세척하고 0.1% Triton X-100 (PBS)으로 세포막의 이동성을 증대시켰다. Bovine serum albumin (BSA, 0.5 g/mL)으로 10분간 blocking한 후 일차항체 (10 μg/mL)로 4°C에서 12시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBS로 세척하고 FITC가 붙은 이차항체로 1시간 반응시키고 PBS로 세척한 후 50% glycerol을 세포 위에 몇 방울 떨어뜨리고 공초점 레이저 주사현미경 (Zeiss, LSM-510 meta)으로 관찰하였다.

5. Western blot

배양된 세포는 0.01 M PBS (0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 4°C)로 세척한 후, Complete mini protease inhibitor (Boehringer Mannheim)를 넣은 lysis buffer (Triton/deoxycholate/SDS buffer, 0.2%

SDS, 100 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 0.5% deoxycholic acid, 2 mM EDTA, 10 mM HEPES pH 7.5, 10 mM NaFl, 1 mM NaVO₄, 1 mM benzamide, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 넣어 15분간 4°C에서 처리하였다. 이후 cell scraper 모아 shaking 한 후 (1시간, 4°C), 원심분리하여 (10,000 g) 상층액과 pellet을 분리하여 -70°C에서 보관하였다.

MicroBCA kit (Pierce)를 이용하여 단백질의 농도를 정량하고 10% SDS polyacrylamide gel로 전기영동 (4 g protein/lane)을 하였다. 젤은 PVDF membrane에 전기이적한 후, blocking solution (5% milk, TBST)에서 한 시간 처리하였다. Rabbit polyclonal anti-ZO-1 antibody (1: 5000)로 1시간 반응시킨 후 TBST로 5분간 3번 세척하였다. HRP conjugated goat anti-rabbit IgG antibody로 1시간 반응시킨 후, 다시 TBST로 5분간 3번 세척하였다. ECL plus kit (Amersham)로 반응시킨 후, enhanced chemilucence method (ECL plus, Amersham)를 이용해 반응시켰다. Intelligent Box II (Fugifilm)와 LAS-1000 Lite image analysis software (Fugifilm)에서 PVDF membrane을 관찰하였다. 밴드의 optical density는 Image Gauge 4.0 (Fugifilm)으로 측정하였다 (n=3). 결과는 대조군

대비 %로 나타내었다

6. 통계처리

자료는 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계처리는 Student's t test로 유의성을 검정하였으며 유의수준은 5%로 하였다.

결 과

1. TER 관찰

H₂O₂에 의한 전기저항의 변화를 BBMEC 단층배양에서 측정하였다 (Fig. 1). 두 시간동안 대조군은 TER 값이 의미있는 변화를 보이지 않았다. H₂O₂를 투여한 실험군에서는 TER이 농도에 따라서, 그리고 시간의 경과에 따라서 유의하게 감소하는 양상을 보였다. 이 결과로 보아 H₂O₂의 농도가 높을수록, 그리고 노출시간이 길수록 내피세포의 투과성이 증가하는 것을 알 수 있었다.

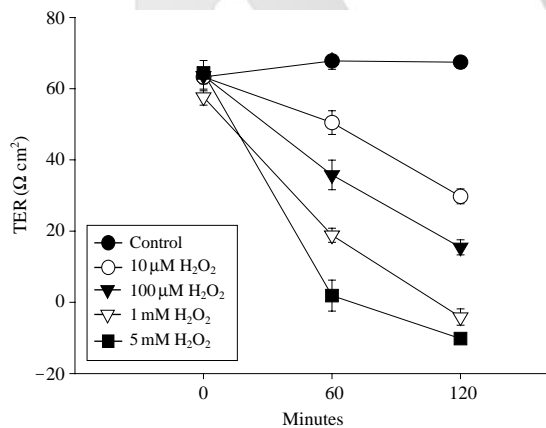


Fig. 1. H₂O₂ mediated transendothelial electrical resistance (TER, Ω cm²). Treatment of 5 mM H₂O₂ showed and significant decrease in TER. Compared with control level, lower doses of H₂O₂, 10 μM, 100 μM and 1 mM showed gradual decrease with dose and time dependent manner. The data values are represented as mean ± SD from n = 3 in each group. *: p < 0.05.

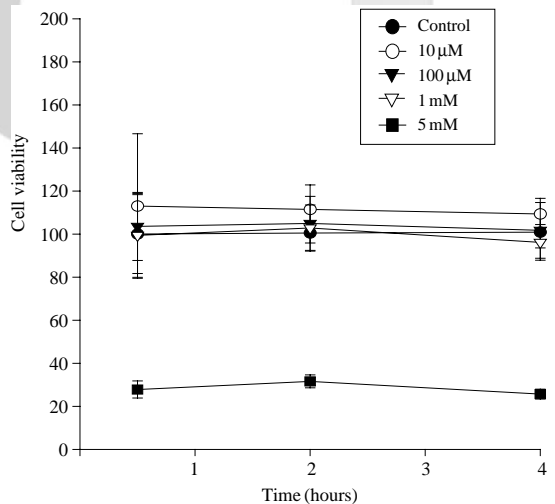


Fig. 2. Percentage of viability of BBMECs after H₂O₂ treatment assessed using AlamarBlue assay. Treatment of 5 mM H₂O₂ showed significant decrease in viability. Compared with control level, lower doses of H₂O₂, 10 μM, 100 μM and 1 mM, did not affect the cell viability. The data values are represented as mean ± SD from n = 3 in each group. *: p < 0.05.

2. H₂O₂와 세포의 생존률

H₂O₂에 의한 TER의 감소가 BBMECs의 기능변화에 의한 것인지 또는 세포사멸에 의한 것인지를 확인하기 AlamarBlue assay를 하여 세포생존률을

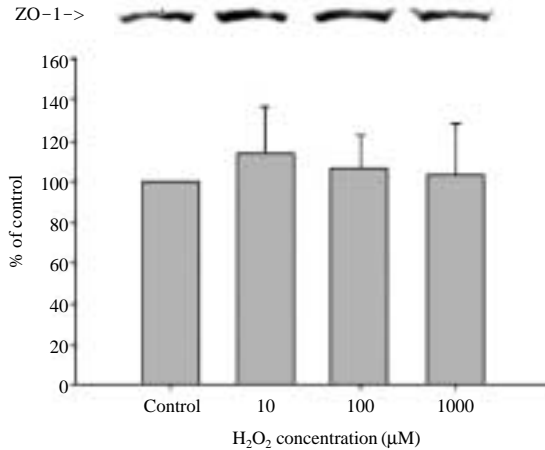


Fig. 3. Effect of H₂O₂ on ZO-1 protein levels when treated with H₂O₂ of 10 μM, 100 μM and 1 mM. Western blot analysis showed the steady-state level of ZO-1. Densitometry analysis of blots showed no statistical differences. The data values are represented as mean ±SD from n=3 in each group. *: p < 0.05.

확인하였다. H₂O₂의 농도가 1 mM 이하일 때에는 세포의 생존률이 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 그러나 5 mM의 농도로 처리했을 경우 세포의 생존률은 대조군의 약 30% 정도로 크게 감소하여 있었다. 이 결과를 바탕으로 다음에 진행되는 실험에서는 H₂O₂의 농도를 1 mM 이하를 사용하였다.

3. ZO-1의 Western blot

10 μM, 100 μM 그리고 1 mM H₂O₂에서 ZO-1 단백질의 변화를 immunoblotting으로 관찰하였으나, ZO-1 (220 kD) 단백질은 H₂O₂에 의해 특이한 변화가 없었다(Fig. 3).

4. 공초점 레이저 주사현미경 관찰

BBMECs 단층 배양에서 H₂O₂에 의한 ZO-1의 분포의 변화를 면역형광염색을 통해 관찰하였다(Fig. 4). 대조군에서 ZO-1은 내피세포의 주변부위, 즉 내피세포들이 인접하여 형성한 치밀이음부에서 연속적인 선으로 나타났다(Fig. 4a). 1 mM H₂O₂로 30 분간 처리한 후에는 ZO-1의 분포에 급격한 변화가 나타났다. 대조군에서 관찰되던 연속적인 선의 중간중간이 단절되어 ZO-1이 감소되어 있었다(Fig. 4b).

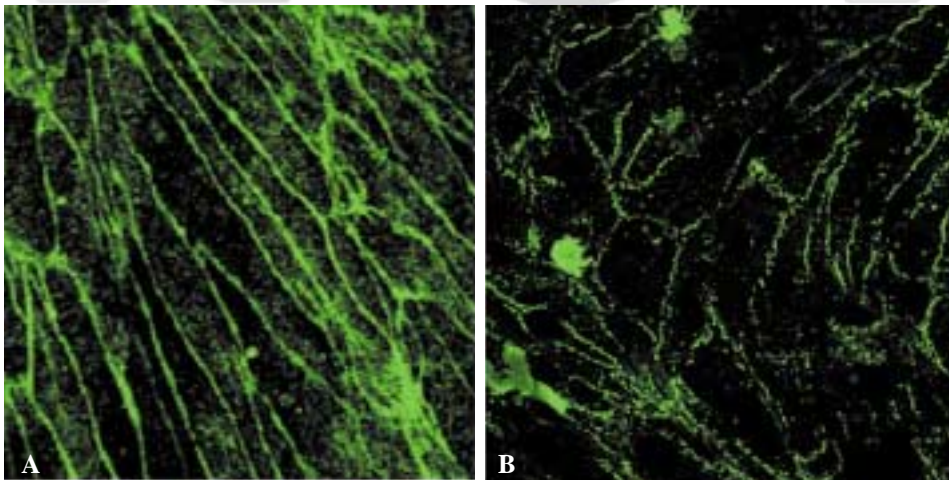


Fig. 4. Immunofluorescence showing ZO-1 localization in bovine brain microvessel endothelial cells. 4a showed control staining for ZO-1. 4b exhibits intermittent loss of ZO-1 at tight junctions after 30-min exposure of 1 mM H₂O₂.

고 찰

뇌는 신체의 다른 부위와는 다른 매우 잘 조절된 환경 속에 놓여 있으며 이것은 혈액뇌장벽의 일정한 조절기능에 의해 유지된다(Bottaro 등 1986). 모세혈관의 내피세포가 혈액뇌장벽의 근간을 형성하는 중요한 요소로서 이러한 기능의 중요한 부분은 내피세포 사이에 형성되는 치밀이음부에 의해 유지된다(Bradbury 1993, Huber 등 2001). 따라서 이온과 용질이 혈액으로부터 뇌로 이동하는 것은 혈액뇌장벽의 선택적 기능에 의해 제한된다(Rubin과 Staddon 1999).

신체의 내피세포 뿐만 아니라 혈액뇌장벽을 구성하는 내피세포에서 장벽으로서의 기능과 치밀이음부와 연관된 단백질들의 구성에 관한 정확한 분자생물학적 기전을 아직 밝혀지지 않고 있다. 허혈 및 재관류 그리고 백혈구를 매개로 한 염증은 H_2O_2 형성과 미세혈관의 투과성의 변화를 수반한다(Parks 등 1984, Chaudhuri 2000, Horikawa 등 2001).

본 실험의 결과 H_2O_2 에 의해 TER가 용량의존적으로 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 세포를 H_2O_2 에 노출시켜 산화스트레스를 유도하는 것은 잘 알려진 방법으로, 높은 농도(250~1000 μM)에서는 내피세포에 손상이 초래되지만(Shimizu 등 1994), 적은 농도(121 μM)에서는 섬유아세포의 증식이 유도되며(Burdon 등 1990), 내피세포에서는 혈관형성이 유도되는 것으로(Yasuda 등 1999, Maulik과 Das 2002) 알려져 있다. 본 실험에서는 낮은 농도(10 μM , 100 μM) 및 높은 농도(1 mM, 5 mM)에서 모두 TER가 감소하는 것으로 나타났으며, H_2O_2 에 의한 TER의 감소는 투과성의 증가와 밀접하게 관계되어 있어서 in vivo나 in vitro에서 용질투과성이 증가하는 것으로 여겨진다(Lum 등 1992, Siflinger-Birnboim 등 1996, Kevil 등 2001). 이러한 보고들 중에서 oxidant를 매개로 하여 투과성이 증가하는 몇몇 신호전달체계가 밝혀져 있으나 molecular target은 대부분 밝혀져 있지 않다.

H_2O_2 에 의한 TER의 감소가 BBMECs의 기능변화에 의한 것인지 또는 세포사멸에 의한 것인지를

알아보기 위하여 세포생존률을 확인하였다. H_2O_2 의 농도가 1 mM 이하일 때에는 세포의 생존률은 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으나, 5 mM의 농도로 처리했을 경우 세포의 생존률은 대조군의 약 30% 정도로 크게 감소하였다. 이 결과를 바탕으로 1 mM H_2O_2 의 농도에서는 나타나는 투과성의 변화는 세포사멸과는 관계없는 기능의 변화로 간주할 수 있었다.

H_2O_2 에 의해 내피세포에서 투과성이 증가하는 때에는 내피세포 사이에 간격이 형성되고 actin이나 cadherin과 같은 단백질이 소실되기 때문인 것으로 알려져 있다(Carbajal과 Schaeffer 1998, Kevil 등 1998). 또한 현재까지 H_2O_2 가 직접적 ZO-1에 영향을 끼치는지는 알려져 있지 않다.

이러한 배경을 근거로 본 실험에서는 H_2O_2 를 투여할 경우에 치밀이음부의 단백질인 ZO-1의 분포의 변화를 면역형광염색을 통해 관찰하였다. 혈액뇌장벽 내피세포에서 치밀이음부와 연관된 ZO-1은 H_2O_2 에 의해 세포사이에서 감소되어 있었다. 그 양상은 정상적으로 세포사이에 나타나는 형태가 H_2O_2 에 의해 그 연속성이 파괴되어 있었다. HUVEC에서도 이와 유사한 양상으로 ZO-1의 분포의 변화가 나타난다(Kevil 등 2000).

면역형광염색의 결과를 근거로 보면, ZO-1은 H_2O_2 에 의해 치밀이음부에서 부분적으로 사라졌으며, 이 단백질이 사라진 세포사이는 바로 치밀이음부가 소실된 부위에 일치하는 것으로 생각된다. 그러므로 이 부위의 세포사이에 간격이 형성되고, 이 틈으로 용질의 자유로운 이동이 일어나 TER가 감소하고 또한 투과성이 증가하는 것으로 생각할 수 있다.

면역형광염색에서 H_2O_2 에 의해 치밀이음부와 관계된 ZO-1은 세포 접촉 부위에서 사라졌지만 western blot을 한 결과 ZO-1의 총양에는 유의한 변화가 없었다. ZO-1은 occludin에 직접 이어져 있으며 또한 actin에 연결된다(Fanning 등 1998, Itoh 등 1999). H_2O_2 에 의해 occludin과 ZO-1의 결합이 감소되기 때문에(Kevil 등 2000), ZO-1이 원래의 장소에서 세포속으로 유입되면서 다른 장소로 이동하는 것으로 생각된다(Kevil 등 1998, 2000). 그러나

세포질 내에서 ZO-1의 면역반응이 증가되지 않는 것으로 보아 ZO-1이 세포질 속에서 세포막을 따라 전반적으로 넓게 확산되면서 퍼져나가는 것을 배제할 수 없다.

본 실험에서 얻은 결과로 볼 때, H₂O₂에 의해 ZO-1의 분포에 변화가 일어나며, 이와 연관되어 전기저항이 감소하여 이온투과성이 증가한다. 그러나 이는 ZO-1의 소실에 의한 것이 아니며, ZO-1이 세포질 속에서 위치의 이동에 의한 것으로 생각된다. ZO-1은 세포막에 인접한 부위에 한정되어 있으며 단지 H₂O₂에 의해 세포막 근처에서 재분포가 일어나 혈액뇌장벽 기능이 조절된다고 할 수 있다.

H₂O₂를 포함한 활성산소종은 혈관 내피세포에서 MAP kinase 통해 각종 kinase와 전사인자를 조절하여 단백질합성과 redox-sensitive gene에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 세포에 대한 다양한 스트레스는 MAPK 활성의 변화를 유발하며, 이 변화는 MAPK family member나 세포유형에 따라 다르다. 그러므로 앞으로 혈액뇌장벽 내피세포가 스트레스에 대해 MAPK 신호전달기전, 활성산소종에 반응하는 신호전달체계, 그리고 활성산소종의 직접적인 표적 분자를 밝혀내야 할 것이다. 최종적으로는 혈액뇌장벽에서 활성산소종에 의해 조절되는 내피세포의 기능을 밝혀 혈관이 관련된 뇌질환에 대한 치료적 전략을 세워야 할 것이다.

참 고 문 헌

- Audus KL, Borchardt RT : Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for blood-brain barrier. *Ann NY Acad Sci* 507 : 9-18, 1987.
- Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH : Loss of tight junction proteins occludin and zonular occludens-1 from cerebral vasculature endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 86 : 1245-1257, 1998.
- Bottaro D, Shepro D, Hechtman HH : Heterogeneity of intimal and microvessel endothelial cell barriers in vitro. *Microvasc Res* 32 : 389-398, 1986.
- Bradbury MWB : The blood-brain barrier. *Exp Physiol* 78 : 453-472, 1993.
- Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C : Oxidative stress and tumor cell proliferation. *Free Radic Res Comm* 11 : 6576, 1990.
- Carbajal JM, Schaeffer RC : H₂O₂ and genistein differentially modulate protein tyrosine phosphorylation, endothelial morphology, and monolayer barrier function. *Biochem Biophys Res Commun* 249 : 461-466, 1998.
- Chaudhuri JD : Blood brain barrier and infection. *Med Sci Monit* 6 : 1213-1222, 2000.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM : The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273 : 29745-29753, 1998.
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S : Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147 : 891-903, 1999.
- Horikawa N, Kuribayashi Y, Itoh N, Nishioka M, Matsui K, Kawamura N, Ohashi N : Na⁺/H⁺ exchange inhibitor SM-20220 improves endothelial dysfunction induced by ischemia-reperfusion. *Jpn J Pharmacol* 85 : 271-277, 2001.
- Huber JD, Egleton RD, Davis TP : Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *TREND Neurosci* 24 : 719-725, 2001.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S : Direct binding of three tight junction protein-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3 with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147 : 1351-1363, 1999.
- Kevil CG, Ohno N, Gute DC, Okayama N, Robinson SA, Cheney E, Alexander JS : Role of cadherin internalization in H₂O₂ mediated endothelial permeability. *Free Radical Biol Med* 24 : 1015-1022, 1998.
- Kevil C, Oshima T, Alexander B, Coe LL, Alexander JS : H₂O₂-mediated permeability : role of MAPK and occludin. *Am J Physiol* 279 : C21-C30, 2000.
- Kevil C, Okayama N, Alexander J : H₂O₂ mediated permeability II : importance of tyrosine phosphatase and kinase activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 281 : C1940-C1947, 2001.
- Kniesel U, Wolburg H : The tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20 : 57-76, 2000.
- Lum H, Roebuck KA : Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol* 280 : C719-C741, 2001.
- Mark KS, Davis TP : Cerebral microvascular changes in per-

- meability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 282 : H1485-H1494, 2002.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P : Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulate monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142 : 117-127, 1998.
- Maulik N, Das DK : Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med* 33 : 1047-1060, 2002.
- Mitic LL, Anderson JM : Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60 : 121-142, 1998.
- Parks DA, Shah AK, Granger DN : Oxygen radicals : effect on intestinal vascular permeability. *Am J Physiol* 247 : G167-G170, 1984.
- Rubin LL, Staddon JM : The cell biology of the blood-brain barrier. *Ann Rev Neurosci* 22 : 11-18, 1999.
- Shimizu S, Nomoto M, Yamamoto T, Momose K : Reduction by NG-nitro-L-arginine of H₂O₂-induced endothelial cell injury. *Br J Pharmacol* 113 : 564-568, 1994.
- Siflinger-Birnboim A, Goligorsky MS, Vecchino PJD, Malik AB : Involvement of Ca²⁺ in the H₂O₂-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol* 270 : L973-L978, 1996.
- Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, Naito S, Ohtsuru A, Yamamoto T : Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci* 64 : 249-258, 1999.

K C I

Abstract

**Oxidative Stress Induced-Expression Changes of
Zonular Occludens-1 in Tight Junction**

Dongsuep Sohn¹, Heesang Lee, Dajin Kim, Hyunhtaek Choi, Kumjeong Lee, Hyejin Cho,
Sukjoong Kim, Jongchan Lee, Yoonhee Jeong, Sungsu Kim, Wonbok Lee, Kyungyong Kim

Department of Anatomy, Thoracic & ¹Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University,

The homeostasis of microenvironment in central nervous system, essential for normal function, is maintained by blood-brain barrier (BBB). ZO-1 in tight junctions (TJs) plays an important role in maintaining BBB endothelial ion and solute barriers. Malfunction of BBB by reactive oxygen species has been attributed to disruption of TJs. This study examined H₂O₂ effects on paracellular permeability and changes in TJ protein ZO-1 using primary culture of bovine brain microvessel endothelial cells.

The BBB permeability, measured as TER, increased in a dose- and time-dependent manner when treated with H₂O₂ (0.01, 0.1, 1.0 mM). Cytotoxicity test revealed that H₂O₂ did not cause cell death below 1 mM H₂O₂ within 4 hr. H₂O₂ caused intermittent disruption and loss of ZO-1 at tight junctions, but ZO-1 maintained steady state levels of expression. In conclusion, we report that H₂O₂ induces increased paracellular permeability of BBB that is accompanied with alterations in localization of ZO-1.

Key words : Oxidative stress, Blood-brain barrier, Tight junction, ZO-1