

Adiponectin에 의한 IL-2 증가 자연살해세포 독성의 조절

숙명여자대학교 이과대학 생명과학과 분자세포 생물학실험실

김근영 · 양 영

IL-2-enhanced NK Cell Cytotoxicity is Regulated by Adiponectin from Hypothalamo-pituitary-adrenal Axis

Keunyoung Kim and Young Yang

Department of Life Science, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: The Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) axis is an important regulator for the body's stress response. As a primary stress responsive system, HPA-axis secretes various neurotransmitters, hormones, and cytokines, which regulates the immune system. Natural killer (NK) cell which is plays an important role in the innate immune response, is specially decreased their numbers and loose cytolytic activity in response to stress. However, the effect of HPA-axis secreted proteins on NK cell activity has not been defined. Herein, we studied the effect of adrenal secreted adiponectin on NK cell cytotoxicity. Adiponectin which is well-known metabolic control protein, plays important roles in various diseases, including hypertension, cardiovascular diseases, inflammatory disorders, and cancer. **Methods:** Signal sequence trap was used to find stress novel secretory protein from HPA-axis. Selected adiponectin was treated mouse mature primary NK cells and then examined the effect of adiponectin to NK cell cytotoxicity and cytokine expression level. **Results:** We found that adiponectin which is secreted from adrenal gland, suppress IL-2 induced NK cell cytotoxicity. And also investigated cytolytic cytokines are suppressed by adiponectin. **Conclusion:** These data suggest that adiponectin inhibites NK cell cytotoxicity via suppression of cytotoxicity related target gene. (*Immune Network* 2006;6(1):6-12)

Key Words: Adiponectin, HPA-axis, natural killer cell

서 론

스트레스는 고혈압, 뇌졸중, 당뇨병, 위장장애 등과 더불어 autoimmune disease 등과 같은 다양한 질병의 원인으로, 우리 몸의 면역 체계를 약화시켜 외부 자극에 대한 적절한 방어 기작을 일으키지 못하게 한다(1). 이러한 면역 체계 조절능력의 상실은 Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) axis의 조절 기작과 관련되는데, HPA axis는 다양한 자극에 대하여 각기 다른 신경 전달 물질과 호르몬, 그리고 사이토카인을 분비하여 우리 몸의 항상

성을 유지하기 때문이다. 스트레스가 오면 뇌의 시상하부가 제일 먼저 인식하여 스트레스 반응의 조절 인자인 corticotrophin-releasing hormone (CRH)가 분비되고 뇌하수체로 하여금 ACTH를 분비시킨다. 분비된 ACTH는 다시 adrenal gland에 작용하여 glucocorticoid의 분비를 촉진시키는데, glucocorticoid는 면역 억제제로 작용하기 때문에 스트레스에 의해 발현이 증가된 경우 우리 몸은 외부 자극에 대한 적절한 면역 작용을 유도하지 못하게 되고 결국 질병에 걸리게 되는 것이다(2). 스트레스에 따른 HPA axis의 과도한 활성화는 다양한 면역 세포 중 자연살해세포나 T세포에 작용하여 면역 능력을 감소시키기 때문에 알츠하이머병이나 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경 질환을 유도할 뿐만 아니라 암세포의 발생과 전이에도 영향을 미친다고 보고되어 있다(3). 특히 자연살해세포는 다른 세포와 비교하여 환경이나 스트레스에 민감하다고 알려져 있는데, 스트레스를 받은 경우 혈액 내의

책임저자 : 양 영, 숙명여자대학교 생명과학과
☎ 140-742, 서울시 용산구 청과동 2가 53-12
Tel: 02-710-9590, Fax: 02-2077-7322
E-mail: yyang@sookmyung.ac.kr

본 연구는 숙명여자대학교 2005년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

자연살해세포 수가 감소되어 여러 가지 질병에 대한 위험이 더욱 커진다고 한다(4). 그러나 아직까지 스트레스에 의해 활성화된 HPA axis로부터 분비되는 단백질에 대한 연구와 분비된 단백질이 면역세포에 미치는 영향에 대해서는 거의 연구된 바가 없다. 그러므로 스트레스에 의해 일차적 반응을 하는 HPA-axis에서 분비되는 단백질의 규명과 면역세포에 대한 기능 연구는 스트레스로 인해 발생하는 다양한 질병 치료에 중요한 것으로 여겨지나 현재까지 연구된 바가 거의 없다(5,6). 따라서 우리는 HPA-axis에서 발현되어 면역세포에 영향을 미치는 새로운 단백질을 탐색하고자 rat의 복강에 염증 반응 유도물질인 LPS를 주입한 후 Hypothalamic-Pituitary-Adrenal gland (HPA) 각각의 조직으로부터 전체 분비 단백질 탐색을 위한 library를 제작하였다. 각각의 library는 분비 단백질만을 특이적으로 선별할 수 있는 signal sequence trap 방법을 사용하여 각 조직에서 분비하고 있는 전체 단백질의 cDNA 단편을 얻을 수 있었다. Signal sequence trap은 signal sequence가 포함되어 있는 pMX-SST 벡터를 사용하여 분비 단백질만을 특이적으로 선별할 수 있는 방법으로, 전체 클론 중 분비 단백질을 인식하고 있는 클론만을 선별할 수 있는 장점이 있다. 그 중 우리는 adrenal gland로부터 분비되며 anti-inflammatory 기능을 한다고 보고되어 있는 adiponectin이 자연살해세포의 활성화에 주는 영향을 조사하였다. Adiponectin은 1996년 Maeda 등에 의해 주로 지방 조직에서 TNF- α , IL-6, VEGF 등과 같이 혈액으로 분비되어 우리 몸의 신진대사를 조절하는 adipokine으로 처음 알려졌으며 Acrp30, GBP28, 그리고 AdipoQ 등으로도 알려져 있다(7,8). 보고에 따르면 adiponectin은 근육조직에서 free fatty acid를 산화시키고 hepatic insulin 활성을 증가시킬 뿐만 아니라, lipid의 축적을 감소시키는 등 글루코오스와 지방 대사 조절에 중요한 기능을 하고 있으며, 정상인에 비하여 비만인 경우 그 발현이 현저히 감소되어 있기 때문에 비만 당뇨병 치료로서 그 중요성이 대두되고 있다. Adiponectin은 물질대사 뿐만 아니라 최근에는 anti-inflammatory, anti-atherosclerotic, anti-angiogenic과 같은 면역 조절 기능이 보고됨에 따라 IL-6, TNF- α 등과 더불어 면역체계에도 중요한 역할을 하는 adipokine으로 여겨지고 있다(9-11). 특히 adiponectin은 IL-6의 발현을 감소시키고 IL-10의 발현을 증가시킴으로써 면역세포의 pro-inflammatory cytokine 생성을 억제하는 anti-inflammatory 기능함과 동시에 myelomonocytic progenitors의 증식과 macrophage의 대식 작용을 감소시킨다고 보고되어 있다(12-16).

재료 및 방법

Signal sequence trap을 통한 유전자 발굴. Rat의 복강에 2.5 mg/kg의 LPS와 대조군으로 PBS를 주입한 지 4시간

후 rat으로부터 hypothalamus, adrenal gland, pituitary 조직을 각각 분리하였다. FastTrack[®] Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 각 조직으로부터 Poly (A)⁺-enriched RNA를 추출한 후, 각각의 mRNA는 SuperScript Choice System (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA)을 이용하여 signal sequence trap library로 제작하였다. 250 ng의 무작위 시작 단편을 사용하여 first strand cDNA, 그리고 second strand cDNA를 합성한 후, BstXI adapters (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 부착하여 단편 크기에 따른 분리 분획을 수행하였다. 크기에 따라 분획된 cDNA는 pMX-SST 벡터에 삽입한 후 증폭하여 BOSC293 세포를 사용하여 retrovirus에 도입시켰다. Signal sequence trap library가 도입된 retrovirus는 10 ng/ml의 IL-3가 포함된 RPMI 배지에서만 유지되는 Ba/F3 세포에 형질 도입하여 12개의 96-well plate에 균일하게 나누어 넣고 배양하여 IL-3가 없는 조건에서도 살아남는 단일 clone을 선별하였다. 선별된 Ba/F3 clone으로부터 genomic DNA를 추출한 후 SST시작 단편(정방향: ggg ggt ggc cca tcc tct a, 역방향: cgc gca gct gta aac ggt ag)을 이용하여 두 단계(98°C 2초, 68°C 2분) 중합 반응을 30회 반복함으로써 삽입된 cDNA 단편을 증폭시켰다. 얻어진 cDNA 단편은 BLAST 프로그램을 통하여 염기 서열을 분석하였다.

Northern blot 분석법. Rat으로부터 hypothalamus, adrenal gland, pituitary 조직을 분리한 후 RNazolB (TEL-TEST Inc)를 이용하여 각 조직으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 중 20 ug을 아가로스 젤에서 전기 영동한 후, 나일론 막(Gene Screen Plus, NEN Life Science Products, Boston, MA)에 흡착시킨다. Adiponectin 유전자 절편에 [³²P] dCTP를 사용하여 방사능 표지를 한 후 이 막과 함께 65°C ExpressHyb 용액(Clonetech, Palo Alto, CA)에서 18 h 동안 반응시켜 방사능 표지된 adiponectin 유전자를 특이적으로 부착시킨 후 washing buffer (2XSSC, 0.2% SDS)를 사용하여 3회 이상 세척하여 비 특이적인 결합을 제거해 주었다. 이 막을 X-ray film에 감광시켜 각 조직에서 adiponectin의 특이적 발현을 확인하였다.

Primary mature 자연살해세포 분리. C57Bl/6 생쥐로부터 성숙한 자연살해세포를 분리하기 위하여 자연살해세포 cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)를 사용하였다. 생쥐의 비장을 분리하여 적혈구 세포를 제거한 후 BSA-PBS완충액(0.5% BSA, 0.2 mM EDTA in PBS)에 세포를 잘 풀어 자연살해세포 biotin-antibody cocktail (CD4, CD5, CD8a, CD19, Ly-6G and Ter-119)과 10분간 4°C에서 반응시켰다. 부가적인 세척 과정 없이 monoclonal anti-biotin antibody가 부착된 microbeads를 넣어 주고 15분간 4°C에서 반응시킨 후 BSA-PBS완충액을 사용하여 두 번 세척하였다. Microbeads가 부착된 세포는 magnetic cell sorter (MACS) column (CS⁺, Miltenyi

Biotec)를 통과시켜 column을 통과하여 나오는 자연살해세포만을 분리하였다. 분리된 자연살해세포는 goat anti-mouse 자연살해세포 1.1-FITC로 표지한 후 flow cytometry를 사용하여 그 순도를 측정하였다.

자연살해세포의 활성 측정. 생쥐의 자연살해세포의 활성을 측정하기 위하여 분리한 primary 자연살해세포에 100 U/ml의 IL-2를 단독 혹은 30 ug/ml의 adiponectin과 함께 24시간 동안 처리한 후 PBS로 두 번 헹구어 준비하였다. 표적세포로는 YAC-1세포를 Cr^{51} 으로 1시간 동안 표지하여 96 well U-bottom plates에 1×10^4 cells/well로 넣어준 후 준비한 자연살해세포를 5 : 1, 2.5 : 1, 1 : 1로 넣어 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 자연살해세포에 의해 YAC-1 세포가 살해되면서 배지로 방출된 ^{51}Cr 의 방사능을 γ -측정기로 측정하고, 다음 공식에 대입하여 수치로 나타내었다. Cr^{51} 의 특정 방출량(%)=[(실험적 방출량-자연적 방출량)/(최대 방출량-자연적 방출량)] \times 100.

RT-PCR. RNAzolB (TEL-TEST, Inc)를 사용하여 세포 전체 RNA분리한 후 그 중 5 μ g을 M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 이용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA로 제작하였다. 제작된 cDNA를 주형으로 하여 원하는 유전자를 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 조건으로 증합효소 반응을 통하여 증폭하였다. 각각의 시작 단편은 다음과 같이 제작하였다. Fas Ligand (sense, atgcacacagcatcatc; antisense, cgggggaggtagctgctg), Trail (sense, caagagcagcgtgtcgtg; antisense, ccgtgagttaactccagtt), IFN- γ (sense, cagctctgcatcgttttggg; antisense, tcgaacacgcatctgactcc), Granzyme B (sense, gaggtgctgtggcttc; antisense, gactttggtgcaggctcg), Perforin (sense, cgactggaaggctggg; antisense, cctcgtttgtcctgagcc).

결 과

HPA axis에서 LPS에 의해 유도되는 유전자 탐색. 스트레스와 같은 외부 자극은 brain의 Hypothalamus에서 pituitary, adrenal gland로 이어지는 HPA axis에 작용하여 다양한 단백질의 분비를 촉진하여 우리 몸의 면역 체계를 조절한다. 또한 면역 세포들도 IL-1, TNF- α , IL-6 등과 같은 pro-inflammatory cytokine 사이토카인들을 분비하여 HPA axis 호르몬 분비를 조절하기 때문에 HPA axis와 면역 세포의 상호 작용은 우리 몸의 항상성 유지와 면역체계에 중요한 역할을 하고 있는 것이다. 특히 HPA axis에서 분비되는 물질의 상당수가 면역세포에 작용하여 anti-inflammatory 기능을 수행하므로 우리는 HPA axis에서 염증반응 인자인 LPS에 의해 발현이 조절되어 면역세포의 활성을 조절하는 새로운 분비 단백질을 탐색하고자 signal sequence trap을 사용하였다. 우선 Rat에 2.5 mg/kg의 LPS를 4 h 동안 복강에 투여한 후 hypothal-

Table I. List of genes containing signal sequence from Hypothalamus

NM_012946	Rattus norvegicus Extracellular matrix protein 2 (Ecm2)
J00705	Rat apolipoprotein E
NM_011777	Rattus norvegicus Apolipoprotein D stroke related
X16957	Rat mRNA for the cysteine proteinase inhibitor cystatin C.
J04488	Rat prostaglandin D synthetase
NM_007467	Mus musculus amyloid beta (A4) precursor
NM_012811	Rattus norvegicus O-acetyltransferase Milk fat globule membrane protein (Mfge8)
AF245040	Rat Dickoff-3
X02002	Rat thy-1 gene for cell-surface glycoprotein
NM_012656	Rattus norvegicus Secreted acidic cysteine-rich glycoprotein (osteonectin) (Sparc)
BF467571	Hypothetical protein
A1098147	Mus musculus dystroglycan 1 (DAG1) gene similar to rattus norvegicus protocadherin-3 (pcdh3) mRNA
L43592	
NM_001555	Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 1 (IGSF1)
AJ240083	Rattus norvegicus mRNA for PICK1
L12155	Mus musculus IgK (R15) chain mRNA
NM_014287	Homo sapiens pM5 protein (PM5)
U73184	Rattus norvegicus N-syndecan mRNA
M74223	Rat VGF mRNA
NM_012495	Rattus norvegicus Aldolase A
AJ278999	Mus musculus mRNA for testican-2 protein

amus, adrenal gland, pituitary로부터 cDNA SST library 제작하였고, Phoenix cells을 이용하여 retroviral library로 제작하였다. 얻어진 retroviral library는 IL-3에 의존적인 Ba/F3세포에 감염시켜 IL-3 없이도 살아남는 클론을 선별한 후 그 클론들로부터 삽입된 cDNA를 추출하였고 증합효소 연쇄반응으로 증폭시킨 후 염기 서열 분석을 분석하였다. BLAST 프로그램 분석결과 hypothalamus로부터 20개(Table I), pituitary로부터 23개(Table II) 그리고 adrenal gland로부터 20개의 서로 다른 클론을 얻을 수 있었다(Table III). 각각의 얻어진 클론들은 rat의 복강에 LPS를 주입한 지 4시간 후에 발현하고 있는 전체 단백질 군으로 SST방법 특성상 대조군과 비교하여 발현의 증감을 비교할 수는 없으나 염증 유발인자 주입 시에 발현하고 있는 단백질이기 때문에 면역세포의 활성에 영향을 미칠 것으로 여겨지며 각각의 단백질 기능에 대한 연구는 HPA-axis에 의해 조절되는 면역 작용연구에 중요한 것으로 여겨진다.

조직에서의 adiponectin의 발현. SST trap실험 수행 결과 adrenal gland에서 adipose tissue 특이적으로 분비된다고 보고되어 있는 adiponectin이 분비되고 있음을 확인하

Table II. List of genes containing signal sequence from pituitary gland

NM_013151	Rattus norvegicus Plasminogen activator
V01237	Rat growth hormone
X06564	Rat mRNA for 140-kD NCAM polypeptide
AJ278348	Homo sapiens mRNA for pregnancy-associated plasma protein-E
NM_008895	Mus musculus pro-opiomelanocortin-alpha (Pomc1)
NM_011421	Mus musculus sphingomyelin phosphodiesterase 1
MN_009868	Mus musculus cadherin 5 (Cdh5)
X13618	Rat mRNA for secretogranin II
XM_001453	Homo sapiens Kelch motif containing protein
BC013575	Homo sapiens, Similar to plasminogen activator, urokinase
NM_006816	Homo sapiens endoplasmic reticulum glycoprotein (GP36B)
NM_0126526	Rattus norvegicus Chromogranin B
X78949	R.norvegicus mRNA for prolyl 4-hydroxylase alpha subunit
XM_045993	Homo sapiens granulin (GRN)
M14050	Rat immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP)
NM_021655	Rattus norvegicus chromogranin A precursor
D84336	Rattus norvegicus preadipocyte factor 1 mRNA
NM_021663	Rattus norvegicus NEFA precursor (Nucb2)
AY008283	Homo sapiens porimin mRNA
AY029066	Homo sapiens Humanin (HN1) mRNA
XM_045137	Homo sapiens prosaposin
BC010859	Protein disulfide isomerase
XM_032282	Serine protease inhibitor, Kunitz type, 2

Table III. List of genes containing signal sequence from adrenal gland

U37222	Mus musculus 30kDa adipocyte complement related protein, Adiponectin
J00705	Rat apolipoprotein E
NM_012526	Rattus norvegicus Chromogranin B
MN_012649	Rattus norvegicus Ryudocan/syndecan 4
AF027865	Mus musculus Major Histocompatibility complex gene
AF068786	Rattus norvegicus JF/MCP-1 mRNA
NM_017125	Rattus norvegicus Cd63 antigen
AB001251	Rattus norvegicus mRNA for scavenger receptor class B type I
U73525	Rattus norvegicus thioredoxin mRNA
X73230	M.musculus mRNA for arylsulfatase A
L10336	Rattus rattus guanine nucleotide-releasing protein (mss4)
NM_013121	Rattus norvegicus Insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2)
AF225896	Homo sapiens tensin mRNA
U56853	Rattus norvegicus 21-hydroxylase mRNA
XM_003473	Homo sapiens toll-like receptor 3 (TLR3)
NM_007961	Mus musculus ets variant gene 6 (TEL oncogene)
NM_022298	Rattus norvegicus alpha-tubulin (Tuba1),
AF132045	Rattus norvegicus foocen-m2 mRNA Transmembrane
AF188530	Homo sapiens ubiquitous tetratricopeptide containing protein RoXaN mRNA
XM_007684	Homo sapiens lymphoid blast crisis oncogene (LBC)

였다. 따라서 우리는 발굴된 adiponectin이 LPS에 의해 변화하는 발현 양상을 확인하기 위하여 LPS를 시간별로 rat의 복강에 처리한 후 hypothalamus, adrenal gland, pituitary에서 시간에 따른 adiponectin의 발현양상을 살펴 보았다. 그 결과 adiponectin은 HPA-axis 중에서 adrenal에서 특이적으로 발현하고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었으며 LPS를 투여한 지 2시간 후부터 그 발현이 감소하여 6시간째에는 현저히 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

Adiponectin이 자연살해세포 활성화에 미치는 영향: Adiponectin의 anti-inflammatory 기능이 보고됨에 따라 우리는 adiponectin이 innate immune system에 끼치는 영향을 알아보기 위하여 자연살해세포에 adiponectin을 처리하였다. 자연살해세포는 IL-2에 의해 활성화되어 다양한 사이토카인을 분비함으로써 세포 독성을 증가시키는데, 이때 adiponectin이 IL-2에 의한 세포 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 IL-2와 함께 처리한 후 자연살해세포의 활성도를 확인하였다. Mouse spleen으로부터 분리한 mature 자연살해세포에 IL-2 단독 혹은 0.3 ug/ml의 adiponectin을

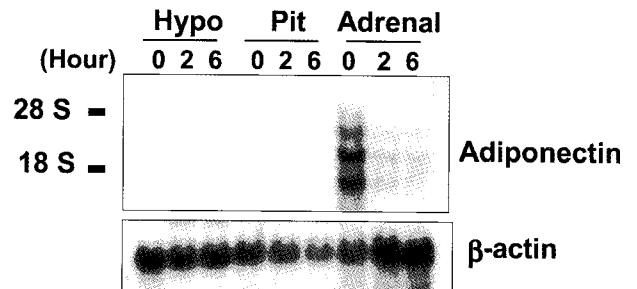


Figure 1. Effect of LPS on the adiponectin gene expression in adrenal gland. 2.5 mg/kg LPS were injected into rats peritoneal cavity with PBS control. After 2 h and 6 h, hypothalamus, pituitary and adrenal gland tissue were surgically isolated from each of rats and then 20 ug of total RNA was prepared. Northern blot analysis was performed using a cDNA fragment of rat adiponectin probe labeled with [³²P] dCTP. Lower panel is shown beta-actin control.

24시간 동안 같이 처리한 후 표적 세포인 YAC-1에 대한 세포 활성을 측정하였다. 그 결과 IL-2에 의해 증가된 자연살해세포 활성이 adiponectin과 함께 처리한 경우 감소됨

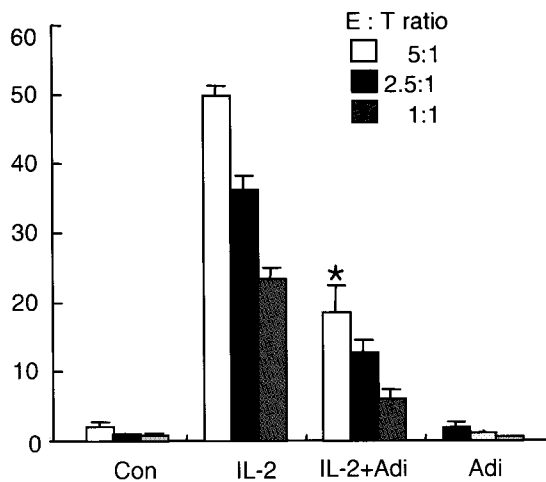


Figure 2. Effects of adiponectin on IL-2 activated NK cell cytotoxicity. Freshly isolated mouse primary NK cells were treated with 100 U/ml of IL-2 for 24 h in the presence or absence of 30 μ g/ml adiponectin, and then cells were washed two times with PBS. The prepared NK cells were placed in a 96-well round bottom plate wells in triplicate with 51 Cr-labeled YAC-1 lymphoma cells (1×10^4 cells/well) at different E : T ratio from 1 : 1 to 5 : 1. After 4 h, cytolytic activity against YAC-1 target cells was measured using γ counting. All values are represented as the \pm S.E.M of triplicates. * $p < 0.01$, compared to the IL-2 treated sample.

을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Adiponectin에 의해 조절되는 자연살해세포의 cytokine 생성: 자연살해세포는 암세포에 대한 선천적 면역 기작에 관여되어 있을 뿐만 아니라 면역 반응의 초기에 활성화되어 inflammation에도 중요하게 작용 하고 있다. 이러한 자연살해세포의 활성화는 크게 granzyme/perforin 경로를 통한 표적 세포 괴사작용과 IFN- γ /Fas ligand, TRAIL 경로를 통한 표적 세포의 세포자살 유도 기작으로 나뉜다. 따라서 우리는 자연살해세포의 활성화에 중요한 위의 두 가지 경로에 미치는 adiponectin의 영향을 알아보기 위하여 Mouse spleen으로부터 분리한 mature 자연살해세포에 IL-2 단독 혹은 0.3 μ g/ml의 adiponectin을 함께 처리한 후 전체 RNA를 추출하고 RT-PCR 분석법을 이용하여 각각의 발현을 확인하였다. 그 결과 IL-2 처리에 의해 표적세포의 자연 살해를 유도하는 IFN- γ , Fas ligand 그리고 Trail의 발현이 adiponectin에 의해 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 세포괴사를 일으키는 granzyme/perforin의 발현 또한 0.3 μ g/ml의 adiponectin에 의해 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

고 찰

스트레스는 면역 세포의 활성을 감소시켜 우리 몸의 면역력을 저하시킴과 더불어 암세포의 전이를 촉진시키는 인자로 알려져 있기 때문에 현대인들이 가지는 질병



Figure 3. Effect of adiponectin on cytotoxicity related gene expression in IL-2-activated NK cells. Purified mouse NK cells were stimulated with adiponectin in the presence or absence of 100 U/ml of IL-2 for 18 h. Total RNAs (5 μ g) were subjected to RT-PCR for cytolytic cytokine IFN- γ , granzyme B and perforin and apoptosis inducing gene Fas ligand, trail. The β -actin was used as a control. Electrophoresis was performed on 1 % agarose gel. Lane 1, no treatment; lane 2, 100 U/ml of IL-2 treatment; and lane 3, 100 U/ml of IL-2 treatment with 30 μ g/ml adiponectin; lane 4, 30 μ g/ml adiponectin treatment.

의 주요한 원인으로 작용한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 외부자극에 대한 일차 반응 기관인 뇌에서 스트레스에 따라 변화하는 새로운 분비 호르몬을 탐색하였고, 선별된 분비 단백질 중 adrenal gland에서 발현되는 adiponectin이 면역 세포에 미치는 영향을 알아보았다.

보고에 따르면 HPA-axis로부터 분비되어 면역세포의 기작에 미치는 대부분의 단백질이 염증반응에 관여하는 단백질이므로 우리는 염증반응 유도 물질인 LPS를 주입한 후 HPA-axis로부터 분비되는 단백질을 탐색하였다. LPS에 의해서 유도되는 다양한 단백질을 확인하기 위하여 rat의 복강에 LPS를 주입하고 4시간 후 HPA-axis 각각의 조직으로부터 분비되는 다양한 분비 단백질을 확인하였다(Table I~III). 그 중 adrenal gland로부터 특이적으로 발현되는 adiponectin을 확인할 수 있었으며, 그 발현이 LPS에 의해 시간에 따라 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). Adiponectin은 지방조직에서 혈액으로 분비되는 분비 단백질로 글루코코르티코이드와 지방대사에 주로 관여하고 있으며, 비만인의 경우 정상인에 비하여 그 발현이 현저히 감소되어 있기 때문에 비만 당뇨 치료제의 타겟 단백질로서 그 중요성이 보고되었다. 비만인의 경우에는 지방 조직이 늘어남에 따라 IL-1, IL-6, TNF- α 등과 같은 pro-inflammatory 사이토카인의 분비가 증가되어 있기 때문에 만성적인 inflammation 상태가 되게 된다.

Adiponectin은 이러한 inflammation 싸이토카인의 발현을 억제시키는 anti-inflammatory기능을 하고 있는데 비만의 경우 이러한 adiponectin의 발현이 현저히 감소되어 있어 결국 만성적 inflammation은 더욱 심화되고 다양한 합병증과 autoimmune 질병 더 나아가 암의 발생과 전이가 더 쉽게 일어날 수 있다고 추측된다. Adiponectin은 anti-inflammatory기능뿐만 아니라, 최근에는 myelomonocyte와 macrophage와 같은 선천성 면역세포에 작용하여 그 증식과 활성을 억제시키는 면역 억제인자로서도 그 기능이 보고되어 있다. 따라서 우리는 스트레스와 같은 외부 자극에 민감하게 작용하며, 암 발생과 전이에도 중요한 역할을 하는 자연살해세포에 adiponectin이 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 자연살해세포는 IL-2, IL-12, IL-15 등에 의해 활성화되어 타겟 세포를 제거하므로 자연살해세포의 활성화에 adiponectin이 미치는 영향을 조사 하기 위하여 생쥐로부터 분리한 자연살해세포에 IL-2와 함께 adiponectin을 처리하였다. 그 결과 IL-2에 의해 증가된 자연살해세포의 활성이 adiponectin을 함께 처리한 경우 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). IL-2에 의해 활성화된 자연살해세포는 cytolytic 싸이토카인인 granzyme/perforin과 세포의 자연살해를 유도하는 IFN- γ /Fas ligand, Trail의 발현을 증가시킴으로써 타겟 세포를 제거하게 되는데, IFN- γ /Fas ligand, Trail은 타겟 세포에 작용하여 세포의 자연살해를 유도하고 granzyme/perforin은 타겟 세포의 막을 파괴하여 세포의 괴사를 유도하게 되는 것이다. 그러므로 우리는 adiponectin의 자연살해세포의 IFN- γ /Fas ligand, Trail과 granzyme/perforin의 발현에 영향을 주는지 알아보기 위하여 adiponectin을 처리한 후 각각의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 IL-2에 의해 증가한 싸이토카인들의 발현이 adiponectin에 의해 감소함을 확인할 수 있었다. 이러한 자연살해세포의 활성 감소는 후천적 면역 기작인 T세포와 B세포의 활성화까지 영향을 끼쳐 우리 몸의 면역력을 약화시키는 중요한 요인으로 작용하게 되는 것이다. Adiponectin은 IL-2에 의해 증가된 자연살해세포의 활성을 감소시키고 싸이토카인의 분비를 억제시키지만, 비활성상태의 자연살해세포에 adiponectin만을 단독 처리한 경우에는 그 활성에 영향을 주지 못함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 adiponectin은 IL-2에 의해 유도되는 자연살해세포의 활성화 신호전달 체계에 억제자로 작용할 것으로 여겨진다. IL-2가 자연살해세포를 활성화시키는 기작에는 NF- κ B가 중요한 역할을 하는데 NF- κ B는 앞서 언급한 세포독성을 증가시키는 다양한 싸이토카인의 발현을 증가시키는 중요한 요소이기 때문에 adiponectin에 의한 신호전달 경로가 NF- κ B의 활성화에 미치는 기작에 대한 연구가 필수적이다. Adiponectin은 AMPK 경로를 활성화시킴으로써 그 기능을 하는데, 보고에 따르면 endothelial

세포에서 AMPK 경로를 활성화시키면 NF- κ B의 활성이 억제된다고 한다. 그러나 AMPK가 NF- κ B의 활성화에 어떤 경로를 통하여 영향을 주는지에 대한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 자연살해세포에서의 AMPK 경로와 NF- κ B조절 기작에 대한 연구는 전체 면역 세포의 활성화 조절 기작을 이해하는 데 중요한 연구가 될 것이다. IL-2와 같은 자연살해세포 활성화 싸이토카인은 IL-12 그리고 IL-15 등과 더불어 수지상 세포로부터 분비되어 나오는데, 수지상 세포는 감염이 있을 때 가장 먼저 감염 부위로 이동하여 병원체를 공격하는 세포이다. 따라서 감염초기에 수지상 세포로부터 나오는 다양한 싸이토카인의 분비와 자연살해세포로의 작용 기작에 adiponectin이 미치는 영향 또한 선천성 면역 기작의 조절에 중요한 연구가 될 것이다. 특히 수지상세포로부터 주요하게 분비되는 싸이토카인 중 IL-15가 NK 세포를 활성화시키는데 주요한 역할을 하므로 IL-15에 자연살해세포 활성화에 adiponectin이 미치는 영향 또한 중요한 연구가 될 것이다. 결론적으로 우리는 여기서 HPA-axis를 통하여 스트레스에 의해 발현이 변화하는 다양한 분비 단백질을 발굴하였으며, 그 중 adrenal gland에서 특이적으로 분비되는 adiponectin이 자연살해세포의 활성화에 미치는 영향을 살펴보았다 그 결과 adiponectin은 자연살해세포 활성화를 억제함으로써 면역 기작의 negative 조절자로 기능함을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier JL: NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 17;29-35, 2005
2. Shibasaki T, Hotta M, Sugihara H, Wakabayashi I: Brain vasopressin is involved in stress-induced suppression of immune function in the rat. *Brain Res* 808;84-92, 1998
3. Pedersen WA, McCullers D, Culmsee C, Haughey NJ, Herman JP, Mattson MP: Corticotropin-releasing hormone protects neurons against insults relevant to the pathogenesis of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 8;492-503, 2001
4. Roe SY, McGowan EM, Rothwell NJ: Evidence for the involvement of corticotropin-releasing hormone in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 10;553-559, 1998
5. Aguilera G, Rabadan-Diehl C, Nikodemova M: Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone receptors. *Peptides* 22; 769-774, 2001
6. Sennello JA, Fayad R, Morris AM, Eckel RH, Asilmaz E, Montez J, Friedman JM, Dinarello CA, Fantuzzi G: Regulation of T cell-mediated hepatic inflammation by adiponectin and leptin. *Endocrinology* 146;2157-2164, 2005
7. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA: The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiological Endocrinol Metab* 280;E827-E847, 2001
8. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated

- protein kinase. *Nat Med* 8;1288-1295, 2002
9. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103; 1057-1063, 2001
 10. Russell JH, Ley TJ: Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20;323-370, 2002
 11. Najib S, Sanchez-Margalet V: Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. *Cell. Immunol* 220;143-149, 2002
 12. Dielen FM van, Veer C van't, Schols AM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW: Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25;1759-1766, 2001
 13. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257;79-83, 1999
 14. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8;1288- 1295, 2002
 15. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y, Matsuzawa Y: Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 96;1723-1732, 2000
 16. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102;1296-1301, 2000
 17. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 109;2046-2049, 2004
 18. Cacicedo JM, Yagihashi N, Keaney JF Jr, Ruderman NB, Ido Y: AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kappaB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys Res Commun* 324;1204-1209, 2004
 19. Jyothi MD, Khar A: Interleukin-2-induced nitric oxide synthase and nuclear factor-kappaB activity in activated natural killer cells and the production of interferon-gamma. *Scand J Immunol* 52;148-155, 2000
 20. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17;189-220, 1999
 21. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L: 2002. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 3;6-8, 1999
 22. Seaman WE: Natural killer cells and natural killer T cells. *Arthritis Rheum* 43;1204-1217, 2000
 23. Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC: 1994. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol Lett* 41; 241-247, 2000
 24. Rasmussen LB, Kiens B, Pedersen BK, Richter EA: Effect of diet and plasma fatty acid composition on immune status in elderly men. *Am J Clin Nutr* 59;572-577, 1994
 25. Yin W, Mu J, Birnbaum MJ: Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis In 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 278;43074-43080, 2003
 26. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME: Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 316; 924-929, 2004
 27. Tian Z, Sun R, Wei H, Gao B: Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 298;297-302, 2002
 28. Pickup JC, Crook MA: Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41; 1241-1248, 1998
 29. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB: Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *Jama* 282;2131-2135, 1999
 30. Lindsay RS, Krakoff J, Hanson RL, Bennett PH, Knowler WC: Gamma globulin levels predict type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Diabetes* 50;1598-1603, 2001
 31. Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R: Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8; 347-354, 2005
 32. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbeli NK M, Andre M, Casteilla L, Penicaud L: Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 579;3487-3492, 2005