A549 폐 상피세포에서 합토글로빈에 의한 염증반응 조절

김남훈 · 이명재 · 김인숙*

가톨릭대학교 의과대학 자연과학교실 화학과

Received March 6, 2006 / Accepted March 29, 2006

Inflammatory Regulation by Haptoglobin in A549 Cells. Nam-Hoon Kim, Myung-Jae Lee and In-Sook Kim*. *Department of Natural Science, Chemistry Section, College of Medicine, The Catholic University of Korea* – Haptoglobin (Hp) is an acute phase protein, and its plasma level increases consistently in response to inflammation. To investigate the biological role of Hp in lung epithelial cells, the gene expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inflammatory cytokines were analyzed using human Hp gene-transfected A549 cells. Western blot analysis showed that COX-2 expression was markedly increased in Hp DNA-transfected cells (stable transfection and transient transfection) compared with that in vehicle DNA-transfected cells. When the Hp-expressing cells were treated with 1 μg/ml of LPS or 100 U/ml of IL-1β for 24 hr, the COX-2 expression was synergistically up-regulated. ACP-based PCR data demonstrated the Hp decreased SPARC expression, but increased IL-4 and S100AI expressions. These findings suggest that the Hp acts as a pro-inflammatory mediator in lung inflammation.

Key words – Haptoglobin, cyclooxygenase-2, SPARC, IL-4, A549 cell line

합토글로빈(haptoglobin; Hp)은 간에서 합성되어 혈액 내로 분비되는 혈장 당단백질로서, 감염이나 조직손상 등의 염증 반응 시에 혈중 농도가 급격히 증가하는 급성기반응단백질(acute phase protein)이다[1,4]. Hp의 생리적 기능으로는 Hp이 헤모글로빈과 비가역적으로 강하게 결합하는 성질에 기초하여 항산화제로서의 역할이 제시되고 있다. 즉, 헤모글로빈에 의한 지질 과산화를 Hp이 헤모글로빈과의 결합을 통해서 방지함으로써 용혈성의 외상시에 발생할 수 있는 세포 손상을 최소화한다는 것이다[14,15]. 또한 Hp은 면역 활성물질에 의해 유도되는 호중구 및 림프구의 활성을 저해할 뿐만 아니라 단핵구나 호중구에 흡수되어 저장되며 tumor necrosis factor-α (TNF)에 의해 세포 밖으로 유리되는 등 면역반응에도 관여한다고 보고된 바 있다[3,17,22].

최근의 연구들은 Hp이 혈관신생인자(angiogenic factor) 및 세포이동인자(cell migration factor)로서의 기능을 수행한다고 보고하였다. 즉, 전신성 혈관염(systemic vasculitis)을 가진 환자의 혈청으로부터 혈관생성 활성을 가진 단백질을 분리한 결과 Hp으로 확인되었을 뿐만 아니라 혈류변화 후 동맥에서 Hp 유전자 발현이 관찰됨을 밝혔다[5,6]. 이러한 사실들은 Hp이 신생혈관 형성이나 동맥의 재구성에 관여함을 의미하며 암의 전이과정이나 조직손상 후의 치유 과정에 Hp이 중요하게 작용할 가능성을 제시하고 있다.

Hp의 생합성은 주로 간에서 이루어진다고 알려져 있지만 최근 연구들은 간세포이외의 세포(extrahepatic cells)에서도 Hp이 발현됨을 보고하였는데 악성종양이나 섬유화 질환을 가진 폐 상피세포, 폐포 대식세포, 혈관손상시의 동맥 외막 섬유아세포 및 분화된 지방세포에서도 Hp이 발현된다고 하였다[8,20,24]. 또한 본 연구팀은 all-*trans* retinoic acid (ATRA)로 자극된 호중구나 단구세포 또는 뇌 허혈 모델의 신경성상교세포(astrocytes)에서도 Hp이 발현됨을 발견하여 각각 보고한 바 있다[10,16]. 이러한 결과들은 Hp이 다양한 자극에 의해 특이 세포에서 합성되어 국소적으로 새로운 기능을 수행할 가능성을 시사하지만 아직까지 extrahepatic cells에서 발현되는 Hp의 생리적 기능은 확실하지 않다.

본 연구에서는, Hp을 과발현시킨 인간 폐암상피세포주인 A549 세포를 사용하여 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현과 염증반응에 관여하는 여러 가지 cytokine들의 발현이 어떻게 조절되는지를 조사함으로써 폐암세포에서의 Hp 기능을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양

인간 폐암 상피세포주인 A549는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였다. 세포배양액으로는 RPMI 1640 (Sigma, St, Louis, Mo)에 10% fetal bovine serum (FBS)(Hyclone, Logan, UT)과 100 μg/ml streptomycin (Gibco, Grand Island, NY)을 첨가하여 사용하였다. 세포가 80~90% confluence가 되면 trypsin-EDTA (Gibco)를 처리하여 계대배양 하였으며, 세포는 37℃ incubator (5%, CO_2)에서 배양하였다. COX-2의 발현 양상을 조사하기위해 세포를 12 well 배양판에 $5x10^5$개로 심었으며, IL-1β (300 U/ml) 또는 LPS (1 μg/ml)로 24시간 동안 자극하였다.

*Corresponding author
Tel : +82-2-590-1269, Fax : +82-2-592-7068
E-mail : ikim@catholic.ac.kr

Transfection

A549 세포를 12 well 배양판에 $2.5x10^5$ 개로 심고 세포가 배양판에 붙어서 안정된 후, 배양액을 혈청과 항생제가 들어있지 않은 RPMI 1640 배양액으로 교체해주었다. Opti-MEM 배양액을 사용하여 PCR3.1 vector DNA 또는 Hp 유전자를 함유한 vector DNA를 각각 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)과 1:2의 비율로 섞고 상온에서 20분간 둔 다음 세포에 가했다. 6시간 후 항생제가 포함되어 있지 않은 새 RPMI 배양액으로 갈아준 다음, transient transfection 실험인 경우에는 48시간 동안 계속해서 배양하였다. Stable transfection 실험을 위해서는 G418 (1 μg/ml)을 가하여 selection 하였다.

Western blot

세포를 PBS로 2회 세척한 후, 추출완충액(2.5 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 μg/ml aprotinin, 5 μg/ml leupeptin)을 사용하여 세포를 용해시켰다. 원심분리(12,000 rpm, 20분)를 통해 상층액을 취하고 단백질 농도를 결정한 후, 각 시료마다 동일한 양의 단백질을 사용하여 12% SDS - polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 전기영동된 gel을 nitrocellulose membrane에 옮긴 다음 1차 항체인 anti-COX-2 또는 anti-haptoglobin antibody와 각각 반응시키고 membrane을 tris-tween buffered saline(TTBS)으로 세척한 후 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체와 반응시켰다. 목적 단백질의 발현은 ECL 용액(Amersham Biosciences)을 사용하여 확인하였다.

RNA추출 및 역전사중합효소 연쇄반응 (Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

RNA는 RNAzol B solution (Tel-test, Friendswood, TX)을 사용하여 분리하고 diethyl pyrocarbonate (Sigma)를 처리한 증류수에 녹여 -70℃에서 보관하였다. cDNA 합성은 RNA 3 μg, dNTPs, 1 μM dT-ACP1, RNase inhibitor 및 moloney murin leukemia virus 역전사 효소를 포함하는 반응액(20 μl)에서 90분 동안 42℃에서 진행하였다. 여러 가지 cytokines의 발현은 GeneFishing™ DEG kit (Seegene, Seoul, Korea)를 사용하여 ACP-based PCR방법으로 확인하였다[12].

결 과

폐상피세포에서 Hp에 의한 COX-2 발현 증가

Hp은 주로 간에서 합성되어 혈액내로 유리된다고 알려져 있으나 최근 연구들은 폐상피세포 또는 지방세포, 단핵구 및 신경성상세포에서도 특이 자극에 의해 Hp이 발현됨을 보고하였다[8,10,16,20,24]. 이러한 사실은 특정세포에서 합성되는 Hp이 합성된 부위에서 국소적으로 작용할 가능성을 시사한다. 본 연구에서는 폐에서 합성되는 Hp이 염증반응에 어떤 영향을 주는지를 조사하고자 폐암상피세포주인 A549 세포에 Hp을 과발현시키고 COX-2의 발현을 측정하였다.

Stable transfection된 세포에서 Hp이 잘 발현되고 있음을 확인한 후, COX-2의 발현을 측정한 결과, Hp의 과발현에 의해 COX-2 합성이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). Stable 세포를 만드는 과정 중에 나타나는 비특이적 현상이 아님을 증명하기 위하여 transient transfection 실험을 수행하였다. 그 결과, Hp이 발현되는 세포에서 COX-2 발현이 유도됨을 재확인하였다(Fig. 1B).

COX-2 발현에 대한 LPS 또는 IL-1β와 Hp과의 협동적 작용

LPS와 IL-1β는 다양한 염증매개 물질들을 증가시켜 염증반응을 유도하는 대표적인 물질이다. 폐상피세포의 COX-2

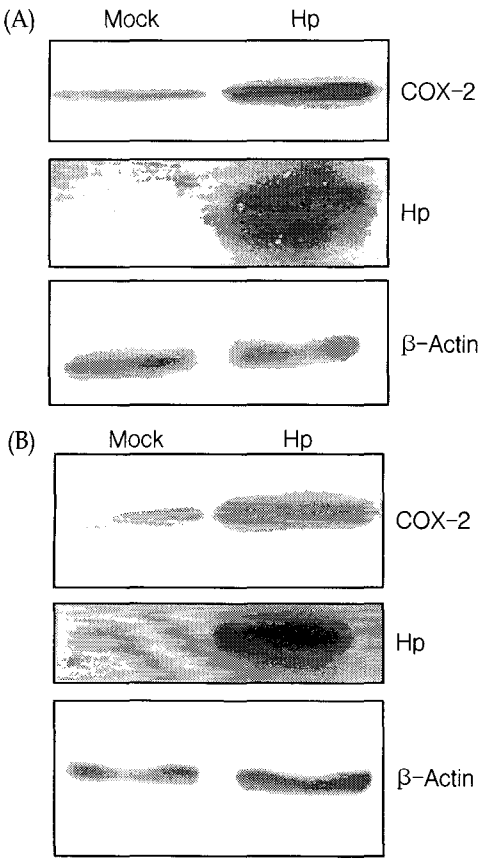

Fig. 1. Up-regulation of COX-2 gene expression by Hp. A549 cells (2×10^5) were stably(A) and transiently(B) transfected by human Hp gene. Then, the cell lysates(80 μg of protein) were analyzed by Western blot analysis with an anti-COX-2 antibody(upper panel), an anti-Hp antibody(middle panel), or an anti-β-actin antibody(bottom panel).

발현에 이러한 염증유도제와 Hp이 협동적으로 작용하는지를 조사하기 위하여, Hp을 과발현하는 A549 세포에 IL-1β 또는 LPS를 각각 24시간 동안 처치한 후 COX-2 발현을 측정하였다. Fig. 2에서 보는바와 같이 IL-1β 또는 LPS 자극에 의한 COX-2 발현이 Hp이 발현되지 않는 세포에 비해 Hp이 발현되는 세포에서 더욱 증가하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 Hp이 다른 염증매개 물질들과 협동적으로 작용하여 염증반응을 상승시킬 수 있음을 의미한다.

염증매개 cytokines 발현에 미치는 Hp의 영향

Hp이 염증반응 매개에 중요하게 작용하는 COX-2 발현을 상승조절하였기 때문에 다른 종류의 염증매개 cytokine들의 발현은 Hp에 의해 어떻게 조절되는지를 조사하였다. 다양한 cytokine들의 유전자 발현을 RT-PCR 방법으로 측정한 결과, Hp이 과발현되는 세포에서 SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein)의 발현이 현저히 저해되는 반면에 IL-4 및 S100A1 유전자 발현은 약간 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 그외의 cytokine들의 발현에는 거의 변화가 없었다.

고 찰

Hp은 주로 간에서 합성된다고 알려져 왔지만 Yang들은 악성종양이나 섬유화 질환을 가진 폐상피세포나 폐포 대식세포에서도 Hp이 발현됨을 보고하였다[24]. 하지만 폐세포에서 합성되는 Hp의 기능은 아직까지 잘 모르기 때문에 본 연구에서는 Hp을 과발현시킨 폐상피세포를 사용하여 염증반응에서의 Hp의 역할을 규명하고자 하였다. A549 세포를 Hp 유전자로 transfection시킨 결과, COX-2의 발현이 증가하였으며, Hp에 의한 COX-2 발현 증가는 LPS 또는 IL-1β 자극에 의해 협동적으로 증가함을 알 수 있었다(Fig. 1 & 2). 또

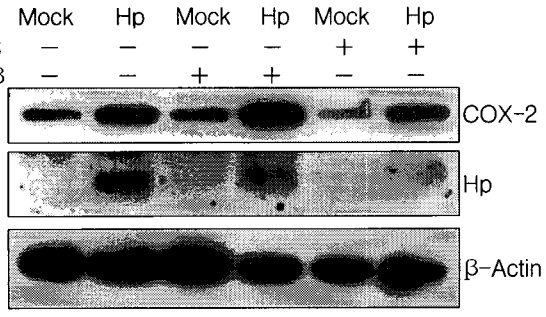

Fig. 2. The combinational effects of Hp and LPS or IL-1β on COX-2 gene expression. Hp-transfected A549 cells were stimulated with IL-1β(300U/ml) or LPS(1μg/μl) for 24h. Then, the cell lysates were analyzed by Westen blot with an anti-COX-2 antibody(upper panel), an anti-Hp antibody(middle panel), or an anti-β-actin antibody(bottom panel).

한 Hp은 pro-inflammatory cytokine인 IL-4와 S100의 발현을 증가시켰을 뿐만 아니라 항염증반응에 관여하는 SPARC 발현을 현저히 감소시켰다(Fig. 3). 이러한 결과들은 Hp이 A549 세포에서 염증반응을 활성화시킴을 시사한다.

COX-2는 프로스타글란딘(prostaglandin) 합성에 관여하는 중요한 효소로서 항상 발현되고 있는 COX-1과는 다르게 여러 가지 염증 매개제들에 의해 발현이 유도된다. 최근 연구들[13,23]에 의하면 COX-2의 기능은 염증매개 뿐만 아니라 세포성장이나 혈관신생 등에도 중요하게 작용한다고 밝혀졌다. Hp도 혈관신생인자 및 cell migration factor로 작용함이 보고된 바 있다. 이러한 결과들과 본 연구결과를 종합하여, Hp이 COX-2 발현을 상승시켜 혈관신생의 기전에 관여할 가능성을 제시할 수 있으며 이러한 기전은 암의 전이과정이나 조직손상 후의 치유 과정에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

Frohlander들은 Hp이 골아세포(osteoblasts)에서 프로스타글란딘 E_2 합성을 증가시켜 염증을 항진시킬 것으로 보고한[9] 반면 다른 연구자들은 sheep vesicular gland의 세포질을 사용한 in vitro 실험에서 Hp이 프로스타글란딘 합성 저해제로 작용한다고 하였다[2,11]. 이와 같이 프로스타글란딘 합성에 미치는 Hp의 영향은 아직까지 확실하지 않으며 서로 상반되게 보고되고 있다. 이것은 실험조건과 사용한 세포가 상이함에 따른 결과인것 같다. 본 연구에서 사용한 폐상피세포에서는 Hp에 의해 COX-2발현이 증가하였지만 염증 유발에 관여하는 프로스타글란딘들의 합성이 동시에 증가할 것인지에 대한 후속실험이 요구된다.

염증 반응에서는 항염증 또는 염증유발에 관여하는 cytokine들의 조절이 중요하다. 따라서 염증 반응에 관여하는 여러 종류의 cytokine 발현이 Hp에 의해 어떻게 조절되는지를 확인한 결과, IL-4와 S100A1 발현이 약간 증가함을 알 수 있었다 (Fig.3). IL-4는 다양한 타입의 세포에서 생성되어 T림프구의 분화에 관여한다고 알려져 있는데, 천식과 같은 만성적 기도염증 질환에서 Th1의 기능을 감소시켜 염증반응 활성에 관여한다[21]. 또한 S100은 칼슘 결합 단백질로서 Ca^{2+}의 항상성 뿐만 아니라, 염증반응 조절에서도 다양한 작용을 한다. 염증반응 시, 호중구나 활성화된 대식세포 또는 내피세포 등에서 발현되어 Ca^{2+} 의존하에 아라키돈산을 다른 세포로 운반하여 염증유발에 관여하며[18], TNF-α나 IL-1β의 발현을 촉진하기도 한다[7]. 반면, SPARC 발현은 Hp에 의해 현저히 저해됨을 관찰하였다. Osteonectin으로 알려져 있는 SPARC는 칼슘결합 당단백질로서 주로 상처치료나 뼈의 형성 및 분화와 같은 조직 재구성시에 발현되는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 염증반응을 완화시키는 항염증적인 기능도 가지고 있다고 보고되었다. 즉, SPARC 결핍 형질전환 마우스에서는 호중구나 백혈구의 침윤이 상승하여 상처의 염증반응이 활성화되었다[19].

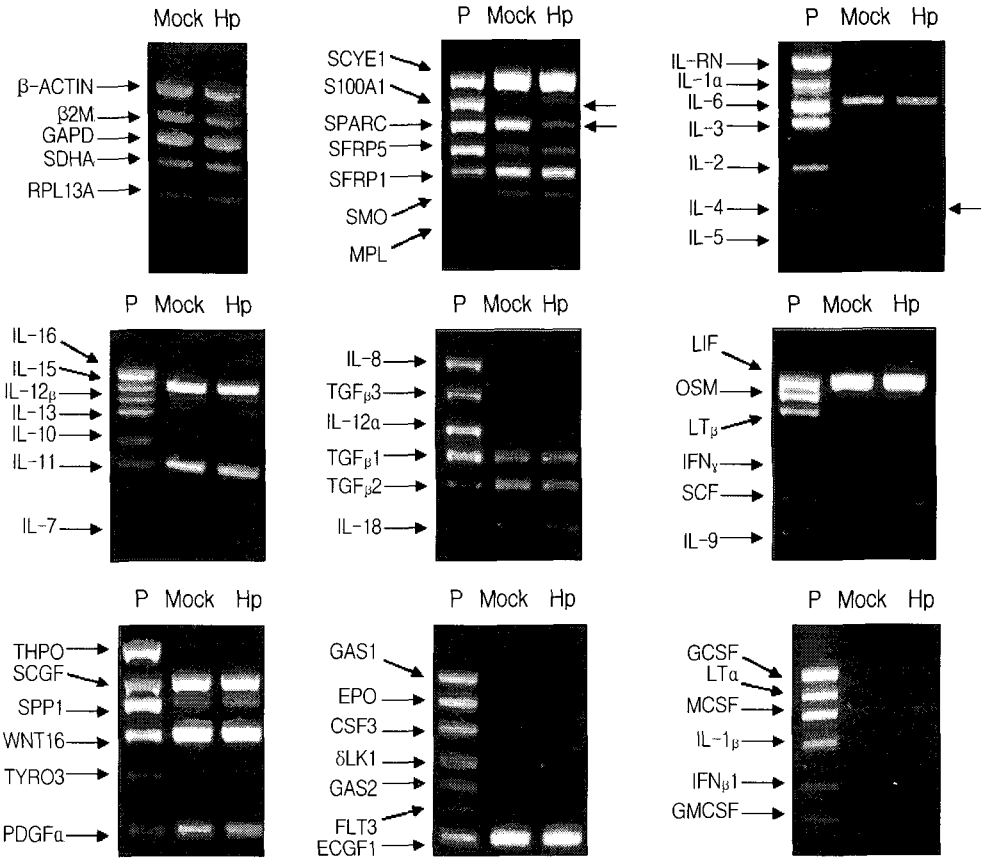

Fig. 3. The effect of Hp on inflammatory cytokines. Total RNAs were prepared from vehicle DNA-transfected cells(Mock) and Hp DNA-transfected cells(Hp), and cDNA were synthesized using 3 μg of RNAs. ACP-based PCR was performed using GeneFishing DEG kit(Seegene, korea). P means positive control for various cytokines.

본 연구에서는 Hp이 COX-2 및 염증매개 cytokine들의 발현에 미치는 영향을 조사함으로써 폐상피세포에서 Hp이 염증유발을 촉진시킴을 밝혔다. 이 같은 결과는 폐의 염증시에 국소적으로 발현이 증가하는 Hp의 병리적 기능을 이해하는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

요 약

합토글로빈(Hp)은 조직손상이나 감염 등의 염증시에 혈중 농도가 증가하는 급성기반응단백질로서 주로 간에서 생합성되지만 염증을 동반한 폐에서도 발현됨이 보고되었다. 폐에서 합성되는 Hp이 염증반응에 어떤 영향을 주는지를 조사하고자, Hp을 과발현하는 폐상피세포를 사용하여 COX-2 및 염증관련 cytokine들의 발현을 조사하였다. Stable transfection 또는 transient transfection된 A549 세포에서 Hp이 잘 발현되고 있음을 확인한 후 COX-2의 발현을 측정한 결과, Hp의 과발현에 의해 COX-2 합성이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 Hp을 과발현하는 A549 세포에 LPS (1 μg/ml) 또는 IL-1β (100 U/ml)를 각각 24시간 동안 처치하였을 때, Hp에 의한 COX-2 발현 증가는 LPS 또는 IL-1β 자극에 의해 협동적으로 증가하였다. ACP-based PCR 방법으로 염증관련 cytokine들의 발현을 측정한 결과, Hp에 의해 SPARC의 발현이 현저히 저하되는 반면에 IL-4 및 S100A1 유전자 발현은 약간 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 폐상피세포에서 Hp이 염증반응을 활성화시키는 기전으로 작용함을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2003년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2003-041-E00044).

참 고 문 헌

1. Baumann, H. and J. Gauldie. 1994. The acute phase response. *Immunol.Today* **15**, 74-80.
2. Beisembaeva RU, Mursagalieva AT, Dzhumalieva LM, Shaikenov TE, Mevkh AT. 1990. Identification of hapto-

globin as an endogenous inhibitor of prostaglandin H synthase in the cytosol fraction of primary cells from sheep vesicular glands. *FEBS Lett.* **269**, 125-7.

3. Berkova, N., Gilbert, C., Goupil, S., Yan, J., Korobko, V. and Naccache, P. H. 1999. TNF-induced haptoglobin release from human neutrophils: Pivotal role of the TNF p55 receptor. *J. Immunol.* **162**, 6226-6232.
4. Bowman, B. H. 1993. Haptoglobin. In Hepatic Plasma Protein (Bowman, B. H., Ed.) Academic Press, San Diego, CA. **149**.
5. Cid, M. C., Grant, D. S., Hoffman, G. G., Auerbach, R., Fauci, A. S. and Kleinman, H. K. 1993. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J. Clin. Invest.* **91**, 977.
6. De Kleijn DP, Smeets MB, Kemmeren PP, Lim SK, Van Middelaar BJ, Velema E, Schoneveld A, Pasterkamp G, Borst C. 2002. Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring. *FASEB J.* **16**, 1123-1125.
7. Dirk Foell and Johannes Roth. 2004. Proinflammtory S100 Proteins in Arthritis and Autoimmune Disease. *Arthritis & Rheumatism* **50**, 3762-3771.
8. do Nascimento CO, Hunter L, Trayhurn P. 2004. Regulation of haptoglobin gene expression in 3T3-L1 adipocytes by cytokine, catecholamins, and PPARgamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 702-8
9. Frohlander N, Ljunggren O, Lerner UH. 1991. Haptoglobin synergistically potentiates bradykinin and thrombin induce prostaglandin biosynthesis in related osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 343-51.
10. In-Sook Kim, Il-Ha Lee, Jeong-Hwa Lee and Soo-Young Lee. 2001. Induction of haptoglobin by all-trans retinoic acid in THP-1 human monocytic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 738-742.
11. Jue DM, Shim BS, Kang YS. 1983. Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. *Mol. Cell. Biochem.* **51**, 141-7
12. Kim, Y. J., C. I. Kwak, Y. Y. Gu, I. T. Hwang, and J. Y. Chun. 2004. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques* **36**, 424-426,428, 430.
13. Langenbach, R., Loftin, C.D., Lee, C. and Tiano, H. 1999. Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **889**, 52-61.
14. Lim, Y.K., Jenner, A., Ali, A.B., Wang, Y., Hsu, S.I-H., Chong, S.M., Baumman, H., Halliwell, B. and Lim, S.-K. 2000. Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Kidney International* **58**, 1033-1044.
15. Miller, Y.I., Altamentova, S.M. and Shaklai, N. 1997. Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: Antioxidant role of haptoglobin. *Biochemistry* **36**, 12189-12198.
16. Mun-Yong Lee, Seong Yun Kim, Jeong-Sun Choi, Il-Ha Lee, Yun-Sik Choi, Jong Youl Jin, Seon-Joo Park, Ki-Wug Sung, Myung-Hoon Chun and In-Sook Kim 2002. Upregulation of haptoglobin in reactive astrocytes after transient forebrain ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow & Metab.* **22**, 1176-1180.
17. Oh, S. K., Pavlotsky, N. and Tauber, A. I. 1990. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J. Leuko. Biol.* **47**, 142-148.
18. Rosario Donato. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 637-668.
19. Sangaletti S, Gioiosa L, Guiducci C, Rotta G, Rescigno M, Stoppacciaro A, Chiodoni C, Colombo MP. 2005. Accelerated dendritic cell migration and T-cell priming in SPARC-deficient mice. *J. Cell Sci.* **118**, 3685-3694.
20. Smeet MB, Sluijter JPG, Donners MMPC, Velema E, Heeneman S, Pasterkamp G, Kleijn DVP. 2003. Increased arterial expression of a glycosylated haptoglobin isoform after balloon dilation. *Cardiovasc. Res.* **58**, 689-695
21. Stanciu LA, Roberte K, Papadopoulos NG, Cho SH, Holgate ST, Coyle AJ, Johnston SL. 2005. IL-4 increases type 2, but not type 1, cytokine production in CD8+ Tcells from mild atopic asthmatics. *Respir. Res.* **6**, 67.
22. Wagner, L., Gessl, A., parzer, S. B., Base, W., Waldhaeusl, W. and Pasternack, M. S. 1996. Haptoglobin phenotyping by newly developed monoclonal antibodies: Demonstration of haptoglobin uptake into peripheral blood neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* **156**, 1989-1996.
23. Williams, C.S., Mann, M. and DuBois, R.N. 1999. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* **18**, 52-61.
24. Yang F, Ghio AJ, Herbert DC, Weaker FJ, Walter CA, Coalson JJ. 2000. Pulmonary expression of the human haptoglobin gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23(3)**, 277-82.