

흰쥐에서 *Escherichia coli*로 유도된 부고환염에 대한 Cobalt-Protoporphyrin의 항염증 효과

The Anti-inflammatory Effect of Cobalt-Protoporphyrin for Rats with Epididymitis Induced by *Escherichia coli* Infection

Ill Young Seo, Chan Sang Jeong, Joung Sik Rim

From the Departments of Urology, Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea

Purpose: Heme oxygenase-1 (HO-1), an inducible heat shock protein, catalyzes the heme to iron, biliverdin and carbon monoxide. It also has an inhibitory effect on necrosis and inflammation. Cobalt (III)-protoporphyrin IX (CoPP) is known to be a HO-1 inducer. Our intension was to find whether CoPP has an anti-inflammatory effect through the induction of HO-1 in rats with epididymitis.

Materials and Methods: Thirty two Sprague-Dawley male rats (age: 8-12 weeks, weight: 200-250gm) were selected for the experiments. Anesthesia was performed with an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (140mg/kg). Four rats were taken and used as a control group. Epididymitis was induced in 28 rats by an injection of *E. coli* (1×10^5 /ml) to the epididymis. In the first step, groups of 4 rats were sacrificed serially after 4, 12, 48, and 72 hours for Hematoxylin & Eosin (H&E) staining and Western blot for inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2. In the second step, groups of 4 rats were injected with either dimethyl sulphoxide (DMSO) 7 μ l, DMSO 7 μ l with 50mg/ml CoPP or DMSO 7 μ l with 100mg/ml CoPP. They were then sacrificed 72 hours later for H&E staining and Western blot for iNOS and COX-2.

Results: In the first step, increased inflammation was evident from the H&E staining over time. From the Western blots, iNOS expression was detected after 48 hours and COX-2 was after 12 hours. In the second step, decreased inflammation was evident from the H&E staining, and the expressions of iNOS and COX-2 were suppressed in the CoPP treated group.

Conclusions: CoPP can reduce the inflammation of epididymis in rats, and the mechanism may be related with HO-1. (Korean J Urol 2006;47: 656-660)

Key Words: Cobalt protoporphyrin, Epididymitis, Heme oxygenase

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 6 호 2006

원광대학교 의과대학 비뇨기과학교실

서일영 · 정찬상 · 임정식

접수일자 : 2006년 2월 1일
채택일자 : 2006년 4월 18일

교신저자: 서일영
원광대학교병원 비뇨기과
전북 익산시 신용동 344-2
☎ 570-711
TEL: 063-850-1333
FAX: 063-842-1455
E-mail: seraph@
wonkwang.ac.kr

서 론

Heme oxygenase-1 (HO-1)은 heat shock protein 32라고도 불리며, heme를 biliverdin, Fe²⁺ (free iron), 일산화탄소 (CO)로 분화시키는 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다.^{1,2} HO-1은 활성산소의 자극뿐만 아니라 저산소증, 고산소증, 허혈, 자

외선, 열, 중금속, 세포활성화 물질, 질산화산소 등의 자극에 대한 반응으로 그 생성이 증가된다. 그러나 여러 자극에 의해 HO-1가 생성되는 기전에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지 않다.² 한편, 임상적으로는 허혈과 재관류, 염증, 장기 이식 후 거부반응, 조직의 고사 등의 경우에 HO-1의 농도가 증가된다.^{3,4}

HO-1에 의해서 생성된 heme의 대사산물 중 CO는 tumor

necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β 혹은 macrophage inflammatory protein-1 α 등의 염증유발 사이토카인들의 발현을 억제시키는 동시에 항염 사이토카인 IL-10의 발현은 증가시켜 항염증, 세포보호, 항증식 기능을 하는 것으로 알려져 있다.⁵ Biliverdin은 biliverdin reductase에 의해 곧바로 bilirubin으로 환원되어 세포 내 신호전달 물질로 작용하여 보체와 림프구의 기능을 억제함으로써 활성산소의 손상으로부터 세포를 보호한다.⁵ Free iron은 세포 내 철로 재사용되며 이것에 노출된 세포는 세포보호 단백질인 ferritin 분자를 발현하여 세포의 독성물질에 대한 저항성을 증가시키며 또한 혈소판 응집을 억제하고 항염증 작용을 한다고 알려져 있다.⁶ 따라서 산소 자극 등에 의해 유도된 HO-1은 항염증작용 및 항괴사작용을 하게 된다.

여러 자극에 의하지 않고 약물로 HO-1을 유도하여 그 임상적 적용 여부에 대한 시도가 있어 왔는데 비노기과 영역에서 그 적용 여부에 대해 연구하고자 저자는 쥐에게 *E. coli*를 주입하여 부고환염을 유도한 후, HO-1 생성을 유도하는 물질인 cobalt (III)-protoporphyrin IX (CoPP)를 투여함으로써 HO-1이 쥐의 부고환에서 항염증작용을 할 수 있음을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

실험에 사용된 동물은 원광대학교 동물 사육장에서 분양 받은 생후 8-12주된 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 32마리 (체중 250-290gm)를 사용하였다.

2. 부고환염 유발

Ketalar[®] (ketamine hydrochloride) 140mg/kg와 생리식염수 3ml를 혼합하여 이 중 2ml (8mg)를 복강 내에 주사하여 실험 동물을 마취시켰다.

쥐의 부고환에 *E. coli*를 주입하기 위해 -70°C의 액화질소에 보관된 *E. coli* (ATCC #25922)를 McConkey 배지에서 배양한 후, 다시 tryptic soy brush (TSB) 배지에 세균을 접종하여 37°C에서 20시간 배양하였다. 원하는 농도를 얻기 위해 phosphate buffered saline (PBS)에 *E. coli* 1x10⁵/ml가 되게 부유시켰으며, 이 세균부유액을 실험동물에 사용하였다. 쥐의 좌측 음낭 피부를 절개한 후 부고환을 노출시켜, *E. coli* 1x10⁵/ml가 포함된 세균현탁액 0.3ml를 부고환의 두부에 주사하여 부고환염을 유발하였다. 주입 후엔 부고환을 원 위치에 환원시킨 후 봉합하였다.

3. 조직의 적출

*E. coli*를 주사하지 않은 4마리를 대조군으로 설정하였다. 제 1단계 실험으로, 16마리의 쥐에게 부고환염을 유발시킨 후 4시간, 12시간, 48시간, 72시간째에 4마리씩 쥐의 부고환을 절제하였다. 제2단계 실험으로, 12마리의 쥐에게 부고환염을 유발시킨 후 dimethyl sulfoxide (DMSO) 7 μ l, DMSO 7 μ l에 용해시킨 CoPP 50mg/ml, DMSO 7 μ l에 용해시킨 CoPP 100mg/ml를 각각 4마리의 쥐의 부고환에 주입하였다. 약물 주입 후 72시간째에 부고환 조직을 절제하였다.

절제된 조직 중 Hematoxyline & Eosin (H&E) 염색을 위한 표본은 10%의 포르말린용액에 넣어 냉장 보관하였다. Inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 대한 Western blot 분석에 이용할 표본은 -20°C에 냉동 보관하였다.

4. H&E 염색

부고환염을 조직학적으로 관찰하기 위하여 H&E 염색을 하였으며, 제작된 조직 슬라이드를 광학 현미경으로 400배까지 관찰하였다.

5. Western blot 분석

염증반응의 정도를 관찰하기 위해서 iNOS와 COX-2에 대한 Western blot 분석을 실시하였다. 쥐의 부고환 조직에 lysis 완충용액을 첨가한 후 4°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 미세원침관에서 최대속도로 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 원침 후에 Bradford 방법을 이용하여 595nm에서의 흡광도로 목적 단백질의 양을 확인하였다. 동량의 단백질을 10-12% polyacrylamide gel로 전기영동한 후, hybond nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Ealinghamshire, UK)으로 이동시켰다 (45V, 2hr). 단백질이 흡착된 막을 5% 탈지분유로 차단한 다음 목적하는 일차 항체를 표지하였다. 일차 항체가 표지된 곳에 이차 항체로 다시 표지하여 항원-항체-항체 복합체 형성을 통한 단백질의 발현 여부를 판정한다. 일차 항체로 iNOS, COX-2 및 β -actin을 사용하였다. iNOS 및 COX-2의 발현 정도를 정량화하기 위해서 Densitometer (Media cybernetics, USA)로 띠의 강도를 측정하였으며 β -actin의 강도에 대한 비를 구하여 상대적으로 정량화하였다.

6. 통계학적 분석

자료 분석은 SPSS (ver. 12.0)을 이용하였으며 각 군 간의 측정치 비교는 Mann-Whitney U test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 부고환염을 유발한 후 조직학적 변화 및 iNOS와 COX-2의 발현

제1단계 실험결과로, 쥐의 부고환에 염증을 유발한 후 4, 12, 48시간째에 부고환을 적출하여 얻은 조직은 대조군과 비교하여 시간이 경과할수록 부고환 내부와 섬유 간질내로 다수의 호중구 침윤이 관찰되고 혈관의 울혈이 발견되어 염증의 정도가 심화되고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

iNOS와 COX-2의 발현을 이용하여 조직의 염증 정도를 알기 위해 Western blot을 시행하였다. COX-2 발현은 4시간째부터 증가하기 시작하였으며, 12시간째에 현저히 증가하였다. iNOS 발현은 염증 유발 직후엔 거의 나타나지 않다가 48시간째에 발현이 현저히 증가되었으며 72시간째부터 대

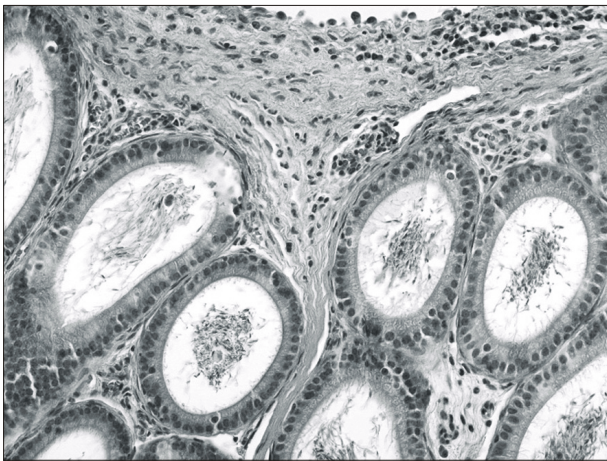


Fig. 1. Microscopic finding of epididymis. The epididymal duct is surrounded by infiltrated neutrophils and congested vessels 72 hours after an injection of *E. coli* to the epididymis (H&E stain, $\times 100$).

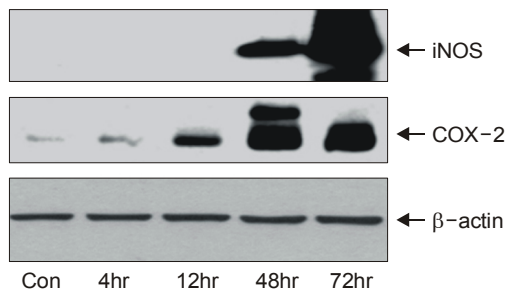


Fig. 2. Western blot analysis of epididymal tissue. The expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 increases after an injection of *E. coli* to the epididymis.

조군에 비해 염증 정도가 심화됨을 알 수 있었다 (Fig. 2).

2. CoPP 투여 후 조직학적 변화 및 iNOS와 COX-2의 발현

제2단계 실험에서, 부고환에 CoPP 50mg/ml와 100mg/ml를 각각 주사하여 수상 후 72시간째에 조직 절편을 취한 후 H&E 염색을 하였다. 조직학적 검사에서 호중구의 침윤 감소와 대식 세포의 출현이 관찰되어 염증 반응이 호전됨을 확인할 수 있었다. 그러나 CoPP 50mg/ml를 투여한 군과 CoPP 100mg/ml를 투여한 군에서 염증의 호전 정도를 구별하기는 힘들었다.

iNOS 발현은 감염 후 72시간째에 가장 현저하게 증가되었으며 ($p < 0.05$), CoPP를 투여한 군에서는 CoPP의 농도에 비례하여 발현 정도가 감소하였다. 특히 CoPP 100mg/ml를 투여한 경우에는 대조군과 비슷한 정도로 iNOS가 발현되었으며, 감염 후 72시간째의 iNOS 발현과 DMSO만을 투여한 양성대조군의 iNOS 발현에 비해 통계적으로 유의있게 감소하였다 ($p < 0.05$).

COX-2 발현도 감염 후 72시간째에 가장 현저하게 증가되어 대조군과 유의있는 차이를 보였으며 ($p < 0.05$), CoPP를

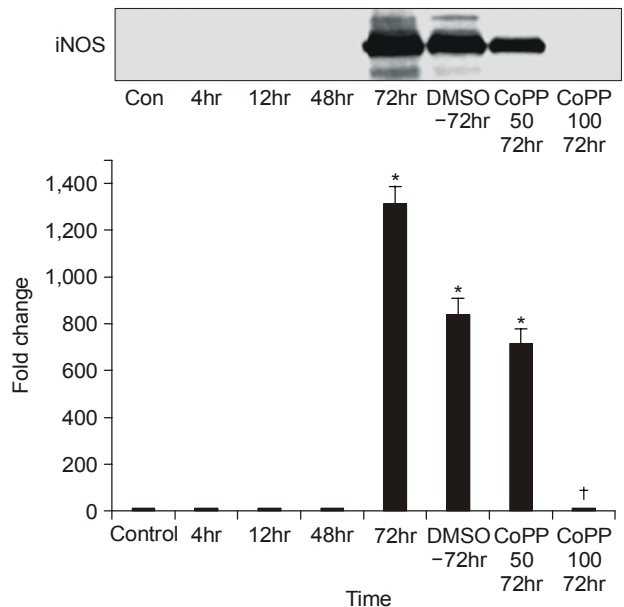


Fig. 3. Western blot analysis of epididymal tissue after the induction of inflammation and application of cobalt (III)-protoporphyrin IX (CoPP). The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increase for up to 72 hours after an injection of *E. coli*, but decreases after the application of CoPP (CoPP 50: CoPP 50mg/ml+dimethyl sulphoxide (DMSO) 7 μ l, CoPP 100: CoPP 100mg/ml+DMSO 7 μ l). *: significantly different from the control at $p < 0.05$, †: significantly different from corresponding values at 72 hours and 72 hours after an injection of DMSO at $p < 0.05$.

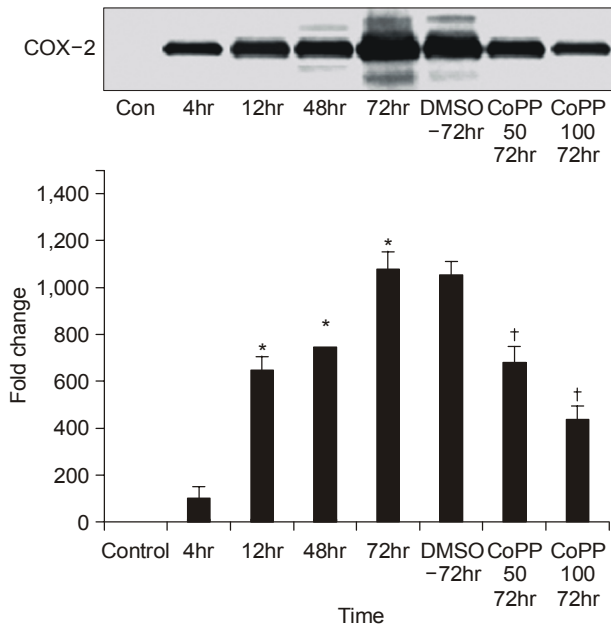


Fig. 4. Western blot analysis of epididymal tissue after the induction of inflammation and application of cobalt (III)-protoporphyrin IX (CoPP). The expression of cyclooxygenase (COX)-2 increase after an injection of *E. coli*, and decreases after the application of CoPP (CoPP 50: CoPP 50mg/ml+dimethyl sulphoxide (DMSO) 7 μ l, CoPP 100: CoPP 100mg/ml+DMSO 7 μ l). *: significantly different from the control at $p < 0.05$, †: significantly different from corresponding values at 72 hours and 72 hours after an injection of DMSO at $p < 0.05$.

투여한 군에서는 CoPP의 농도에 비례하여 발현 정도가 감소하였다. CoPP 50mg/ml를 투여한 경우의 COX-2의 발현은 감염 후 72시간째와 72시간째에 DMSO만을 투여한 양성대조군과 비교할 때 통계적으로 유의있게 감소하였으며, CoPP 100mg/ml를 투여한 경우엔 더욱더 유의있는 차이를 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 3, 4).

고 찰

Heme은 인간의 모든 세포 내에서 8개의 서로 다른 효소에 의해 생성되며 heme과 관련된 효소반응은 대부분 미토콘드리아 내에서 일어나며 일부는 세포질에서 그 반응이 일어난다. Heme의 합성은 대부분 골수의 조혈모세포와 간세포에서 이루어지며 cyclooxygenase, cytochrome P450, nitric oxide synthase 등의 효소 반응에 필수불가결한 인자이고 heme oxygenase (HO)에 의해 분해된다.^{7,8}

HO는 3가지의 이소체가 있는데 이 중 HO-1은 비장, 간 등에 존재하여 활성산소 자극, 저산소증, 자외선, cytokine, heavy metal, heat shock, endotoxin, heme, nitric oxide 등에 의

해 유도됨으로써 heme의 분화, 항산화 작용 및 항염증작용 등을 수행하는 것으로 알려져 있다.² HO-2는 뇌, 망막, 폐, 간, 신장, 고환 등의 대부분의 장기에 존재하며 부신의 glucocorticoid나 opiate 등에 의해 유도되어 heme 분화, 혈관 긴장도유지, 신경 전달 등의 역할을 수행 하지만 CoPP에 의해 영향을 받지 않는다고 알려져 있다.⁹ 정상적인 상태에서는 HO-1은 대부분 나타나지 않을 정도이나 HO-2는 본질적으로 내재되어 있다. HO-3는 뇌, 신장, 간, 심장, 고환, 비장 등에서 발견되나 heme을 분화시키는 능력은 매우 낮다고 보고되었다.^{10,11}

Heme이 HO-1에 의해 biliverdin, CO, Fe^{2+} 로 분화된다는 것은 Tenhunen 등¹²이 최초로 보고한 이후 많은 연구가 시행되었으며 그 결과 HO-1의 대사산물이 여러 생화학적 과정을 조절한다는 것이 알려져 있다.

Heme의 대사산물 중 CO는 혈관확장기능, 신경전달물질 기능, guanylate cyclase의 자극제로 기능하여 cGMP의 형성을 촉진하며 혈관평활근의 K^+ channel의 자극제이고 endothelin-1, PDGF의 억제 역할을 한다.⁸ 또한 CO는 혈소판 응집을 방해하고 TNF- α , IL-1 β , macrophage inflammatory protein-1 β 등과 같은 proinflammatory cytokine의 분비를 억제시켜 항염증 작용을 한다.¹³ Biliverdin은 biliverdin reductase에 의해 빠르게 bilirubin으로 전환되며 peroxy radical을 제거하고 lipid peroxidation을 억제함으로써 허혈성심질환, 활성산소에 의한 세포 손상이 있는 경우에 세포를 보호하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다.^{5,14} Fe^{2+} 는 활성산소 자극에 대해 세포를 보호할 수 있는데 소포체에서 Fe^{2+} 가 세포내 철단백질인 ferritin으로 변환되어 이 물질은 Halter-Weiss, Fenton 반응에서 활성산소종의 형성을 촉진함으로써 항세포고사작용에 관여하는 것으로 여겨지고 있다.^{5,13,15} 또한 최근에는 NF- κ B 활성화로 인한 세포 보호의 기전이 알려졌다.¹⁶

염증 반응의 주된 목적은 염증 원인을 제거하고 손상된 조직을 복구하는 것으로 이때 leukocyte-adhesion cascade는 중요하게 작용한다.⁵ 예를 들어 leukocyte-adhesion cascade는 selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) 등이 관여하는 일련의 과정이며 용혈, 허혈 및 재관류, 혈중, 출혈, 근육 손상 등의 횡문근융해증이 발생할 수 있는 상황에서 heme이 다량 생성되는데 이로 인해 pro-inflammatory adhesion molecule의 분비를 자극한다. 이때 HO-1이 분비되어 heme을 biliverdin, CO, Fe^{2+} 로 분화시키면 일련의 항염증 작용을 일으키는 것이다. CoPP를 이용하여 HO-1의 발현을 유도할 수 있는데, Sass 등¹⁷의 보고에 의하면 CoPP에 의해 발현된 HO-1에 의해 IL-10, INF- γ , TNF- α 등의 작용이 억제되어 항염증작용

이 나타난다고 하였다. CoPP를 주사하면 효소의 활성이 2배 상승하는 데 8-16시간, 6배 상승하는 데 48시간이 소요된다.⁵ HO-1은 적은 용량일 때는 세포 보호의 기능을 하지만 고용량일 때는 bilirubin, Fe²⁺를 생성하여 산화 및 염증의 전구 단계 역할을 하여 세포에 유해한 작용을 한다.^{5,18} 따라서 HO는 활성화된 염증세포의 유입을 제한할 정도의 농도에서만 손상당한 조직의 고사 및 괴사를 개선시킬 수 있을 것으로 생각한다.¹⁹

저자의 연구에서는 부고환에 균주를 주사한 후 시간에 비례하여 조직 검사와 Western blot 분석결과에서 부고환염이 진행됨을 확인할 수 있었다. 그러나 부고환염 유도 과정에서 절개 혹은 주사에 의한 부고환 손상도 iNOS와 COX-2의 발현을 유발할 수도 있는데, 모의 수술을 실시하지는 않았으나 조직검사에서 혈관과열 등 명확한 부고환손상의 소견은 없었다. CoPP를 주사한 후에는 농도에 비례하여 부고환 염증이 호전되었고 iNOS와 COX-2의 발현이 감소하였다. 따라서 쥐의 부고환에 CoPP를 주사하여 HO-1의 분비를 유도하면 CoPP의 농도에 비례하여 염증이 호전될 수 있을 것이다.

결 론

저자는 쥐에게 *E. coli*를 주입하여 부고환염을 유발하여 염증의 발현 정도를 관찰하였고, 부고환염에 대한 치료 방법으로 CoPP를 주사하여 농도에 의존적으로 항염증효과가 있음을 iNOS 및 COX-2의 발현을 통해서 확인하였다. 이 과정에서 CoPP에 의해 유도된 HO-1의 발현이 항염증 작용을 나타내는 것으로 추정할 수 있다. 향후 CoPP와 HO-1의 연관성에 대한 추가적인 연구가 필요하고, 적절한 항염증 작용을 할 수 있는 CoPP의 농도와 치료에 필요한 시간에 대한 연구도 요구된다. 이에 대한 충분한 실험과 경험이 축적된다면 임상에서 부고환염 치료법 중 하나로 시도할 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Torti PM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002;99:3505-16
2. Montellano PR. The mechanism of heme oxygenase. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4:221-7
3. Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 1991;51:974-8
4. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54
5. Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 2002;8:240-6
6. Brasile L, Buelow R, Stubenitsky BM, Kootstra G. Induction of heme oxygenase-1 in kidneys during ex vivo warm perfusion. *Transplantation* 2003;76:1145-9
7. Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharm Rev* 2003;55:551-71
8. Choi BM, Pae HO, Jeong YR, Oh GS, Jun CD, Kim BR, et al. Overexpression of heme oxygenase (HO-1) renders Jurkat T cells resistant to fas-mediated apoptosis: involvement of iron released by HO-1. *Free Radical Biol Med* 2004;36:858-71
9. Weber CM, Eke BC, Maines MD. Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. *J Neurochem* 1994;63:953-62
10. McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997;247:725-32
11. Siow RC, Sato H, Mann GE. Heme oxygenase carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res* 1999;41:385-94
12. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad USA* 1968;61:748-55
13. McCarter SD, Akyea TG, Lu X, Bihari A, Scott JR, Badhwar A, et al. Endogenous heme oxygenase induction is a critical mechanism attenuating apoptosis and restoring microvascular perfusion following limb ischemia/reperfusion. *Surgery* 2004;136:67-75
14. Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett* 1994;349:197-200
15. Choi BM, Pae HO, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide-mediated cytoprotection of hepatocytes from glucose deprivation-induced cytotoxicity: involvement of heme oxygenase-1. *Hepatology* 2003;37:810-23
16. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 2001;98:1802-11
17. Sass G, Soares MC, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann WH, Eschenhagen T, et al. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 2003;38:909-18
18. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999;85:663-71
19. Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 1999;13:1800-9