

Angiostatin Works as Immune Modulatory Molecules via Inhibition of Neutrophil Activation and Migration

So-Youn Woo*

Department of Microbiology, School of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Angiostatin is derived from enzymatic degradation of plasminogen and it has endogenous anti-angiogenic properties. Although tumor cells, macrophages, platelets, and neutrophils generate high amount of angiostatin, its expression is increased in inflammatory conditions. Moreover, angiostatin binds to integrin $\alpha_v\beta_3$, ATP synthase, and angiomin, which expressed on neutrophils. Activated neutrophils are essential to innate immune response, but also cause tissue damage through production of reactive oxygen species (ROS) and increase lifespan. In this article, it suggests several mechanism of angiostatin as immune regulator for neutrophils in inflammatory conditions; complex with integrin $\alpha_v\beta_3$ and F_1F_0 ATP synthase on lipid raft, attenuate polarization, and ROS production. These data provide possible exploit of double-edged role of neutrophils in acute inflammatory pathologies to preserve beneficial effect and minimize tissue damage.

Key Words: Angiostatin, Neutrophil, Integrin $\alpha_v\beta_3$, Lipid raft, and apoptosis

복막염이나 폐렴, 패혈증, 혹은 무균성 손상(sterile injury)의 조건에서 일어나는 급성 염증반응의 초반에 가장 먼저 일어나는 선천면역반응은 활성화된 중성구가 손상부위로 화학주성인자를 따라 이동하는 것이다 (1). 활성화된 중성구는 감염체에 대항하여 방어기전을 시작하며, 또한 세포자멸사를 유도하는 것 대신에 세포생존시간이 증가하게 된다. 지속적인 중성구의 활성화는 결국 이차적인 괴사를 유도하고 그 결과 활성 산소종이 유리되어 그 자체가 다시 중성구의 기능에 영향을 미쳐 (2) 주변조직의 손상과 기관의 기능 상실이 일어나게 된다 (3). 이러한 중성구의 이동과 활성화를 조절하는 기전은 세포수준 혹은 분자수준의 단계에서 이루어지며, 다양한 각도의 연구를 통해 중성구의 이동 및 활성기전을 밝혀 각 단계에 관여하는 분자와 그 역할을 규명하고, 중성구에 의한 면역반응을 조절할 수 있는 새로운 항염증물질을 발굴하는 것이 가능하다.

활성화된 중성구가 염증부위로 이동하기 위해서는 화학주성인자에 의한 자극에 의해 위족이 생기고 방향성을 가지고 움직이는 것으로 시작한다 (4). 즉 선단부(leading edge)가 뻗어 나가기 위해서는 필라멘트 형태의 액틴분자가 모여야 하고, 또 화학 주성인자가 G 단백질결합수용체와 결합하여 $\beta\gamma$ 단위체를 통해 소형 G 단백질인 Rho, Rac, cdc42에게 신호를 전달해야 한다. 이들 Rho 패밀리에 속하는 GTP-결합 소형 G 단백을 경유하여 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 탈인산화효소 등이 활성화된다 (5). 또한 내독소(lipopolysaccharide, LPS) 자극으로 p38 MAPK의 활성이 일어나고 (6) 이 과정 동안에 hsp27의 인산화를 통해 미세관(microtubule) 복합체가 불안정해지고 그 결과 위족이 형성되어 중성구의 모양이 변한다 (7, 8). 중성구의 세포 내 세포골격을 이루는 성분은 중성구 표면의 인테그린이나 셀렉틴과 같은 유착분자와 면밀하게 연결되어 있다 (9, 10). 즉, 중성구 표면에는 칼슘의존

Received: January 7, 2014/ Revised: January 10, 2014/ Accepted: January 13, 2014

*Corresponding author: So-Youn Woo. Department of Microbiology, School of Medicine, Ewha Womans University, 911-1 Mok-Dong, Yang-Chun-Gu, Seoul 158-710, Korea.

Phone: +82-2-2650-5737, Fax: +82-2-2653-8891, e-mail: soyounwoo@ewha.ac.kr

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

적인 세포이동이 일어날 때에 발현되고 또 재활용되는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 분자가 있는데 최근 이 인테그린이 내독소에 의한 폐 염증 모델에서 중성구의 이동에 관여한다는 것이 알려졌다 (11~14). 따라서 중성구의 이동은 세포표면의 유착분자와 세포골격 재배열의 상호작용을 통해 일어난다는 것이다.

안지오스타틴(angiotatin)은 플라스미노젠(plasminogen)의 순차적인 단백용해 효소의 작용에 의해 얻어지는 것으로 사람의 몸속에 존재하는 내인적인 산물이다. 안지오스타틴을 대량으로 생산하는 세포는 종양세포와 큰포식세포, 혈소판, 그리고 중성구가 있다 (15~18). 안지오스타틴은 어노이키스(anoikis)와 세포자멸사를 유도한다(19). 그리고 F_1F_0 ATP 합성효소 (20), hsp27 (21), annexin II (22), $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 (23), 안지오모틴(angiomotin) (24)과 같은 여러 단백질의 상호작용을 통해 혈관내피세포나 상피세포의 이동을 억제한다고 알려졌다. 흥미롭게도 급성 호흡기 증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS) 환자의 기관지세척액에서 다량의 안지오스타틴이 검출되었고 (25, 26), 폐혈증 환자의 폐조직을 면역화학염색한 결과에서는 혈관내피세포에 주로 국한되어 존재한다는 것을 알게 되었다 (14). 안지오스타틴은 생체 외 실험에서 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1, CCL2), formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), interleukin-8 (IL-8, CXCL8), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2, CXCL2), tissue plasminogen activator (TPA), growth regulated oncogene-alpha (Gro- α , CXCL1)에 대한 단백질과 중성구의 화학주성이동을 억제하였고 (27), 마우스의 복막염 모델을 사용한 실험에서는 말초혈액의 백혈구의 이동과 혈관생성을 억제하며, 종양괴사인자에 의한 NF- κ B와 tissue factor의 증가도 억제하는 것을 확인하였다 (28). 안지오스타틴의 Kringle 1-4 (K1-4) 조각이나 1-3 (K1-3) 조각이 특히 세포이동을 억제하는 것으로 관찰되었고 (27), 플라스미노젠 Kringle 5 (K5)의 경우는 그와 반대로 종양관련 중성구의 모집이 증가하는 것이 알려졌다 (29).

급성 염증에 관여하는 주요한 세포인 중성구는 그 표면에 안지오스타틴과 결합할 수 있는 β_3 인테그린이 있고 또한 F_1F_0 ATP 합성효소를 가지고 있다. 따라서 안지오스타틴이 중성구의 활성화와 이동을 억제한다는 기전에 대한 실험 결과를 기술하고자 한다 (30).

1. 안지오스타틴은 활성화된 중성구의 lipid raft를 통해

세포 내로 이동한다.

이 실험을 위해서는 안지오스타틴에 대한 항체를 사용하여 관찰하는 방법이 있지만, 현재 사용할 수 있는 안지오스타틴에 대한 항체는 플라스미노젠과 안지오스타틴 유사 단백질에 모두 결합하기 때문에, 그 대신 안지오텐신에 형광물질인 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 부착한 후, 세포의 어느 부위로 이동하는지를 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 fMLP를 처리하여 활성화된 중성구에서만 FITC-안지오스타틴이 관찰되었고, lipid raft의 형성을 억제하는 1 mM의 β methyl cyclodextrin (MCD)를 전처리한 경우에는 안지오스타틴이 활성화된 중성구에 결합하지 않았다.

2. 안지오스타틴은 fMLP에 의해 활성화된 중성구에서 극성화된 위쪽의 형성을 억제하고 β_3 인테그린의 분포를 변화시킨다.

활성화된 중성구는 화학주성인자에 의해 염증부위로 이동하며, 이렇게 세포의 이동방향에서 나타나는 선단부에서의 세포골격 형성에 안지오스타틴이 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 액틴의 중합을 억제하는 cytochalasin D를 처리하거나 혹은 안지오스타틴을 처리하면 fMLP에 의해 활성화된 중성구에서 선단부의 형성이 관찰되지 않으며, 동시에 선단부에 중점적으로 분포하는 β_3 인테그린의 분포에도 영향을 미친다. 추가적으로 안지오스타틴이 인테그린과 결합하여 액틴의 중합을 억제하는지를 확인하기 위해 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린에 대한 차단항체를 사용하였으나, 그 결과로 액틴의 중합이 억제되는 것은 아니었다.

3. 안지오스타틴은 fMLP에 의해 활성화된 중성구에서 미세관 복합체를 안정시킨다.

활성화된 중성구에서는 미세관 복합체가 불안정해지는 것으로 알려져 있다. 그러나 안지오스타틴을 처리하면 반대로 활성화된 중성구에서의 α -tubulin이 안정화되는 결과를 얻었다. 즉, 인산화된 hsp27 단백질과 안지오모틴은 안지오스타틴과 상호작용한다는 이전의 결과와 비교해 볼 때 안지오스타틴을 처리한 활성화된 중성구에서 인산화된 hsp27의 양은 감소하고, tubulin의 안정화, 그리고 안지오모틴의 양 등을 감소시켜 중성구의 이동에 영향을 미치는 것으로 보인다.

4. 면역침전법을 통해 안지오스타틴은 β_3 인테그린,

ATP 합성효소의 β 소단위, 그리고 lipid raft에 분포하는 단백질 flotillin-1과 결합한다는 것을 확인하였다.

5. 안지오타틴은 미토콘드리아의 활성을 억제하고 ROS의 생산을 억제한다.

활성화된 중성구는 염증부위로 이동하는 것뿐 아니라,

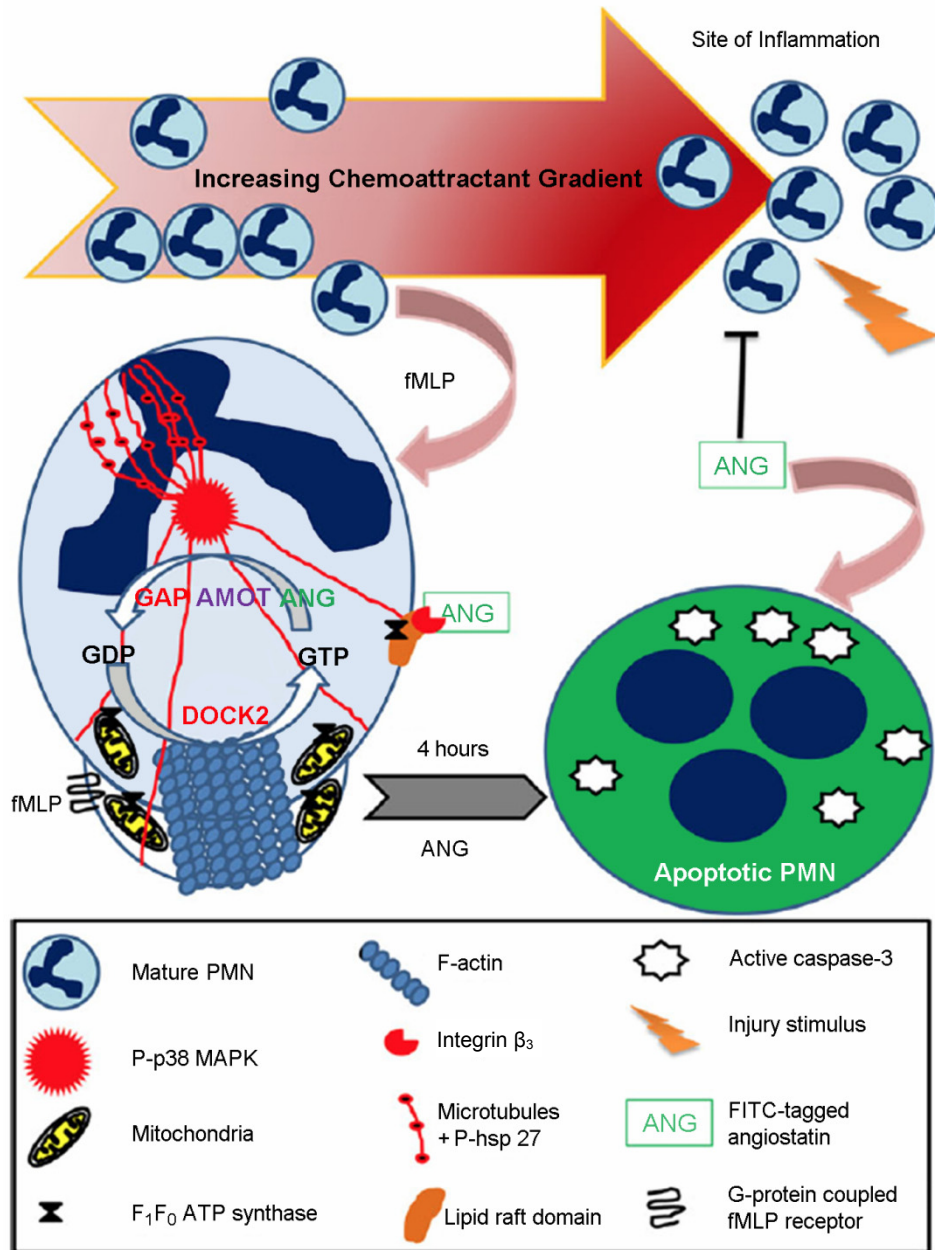


Figure 1. Schematic diagram for mechanism of action of angiostatin (ANG) in acute inflammation (30). ANG inhibits neutrophil adhesion as well as trans-endothelial migration in an acute inflammation setting by inhibiting the leading edge actin dynamics. Angiostatin is endocytosed in activated neutrophils via lipid raft domains, which express integrin $\alpha_v\beta_3$ as well as F₁F₀ ATP synthase. It can be hypothesized that ANG binds to a GTPase activating protein (GAP) associated angiomin (AMOT) that inhibits guanosine triphosphate (GTP) recycling required for F-actin aggregation at the leading edge, thereby inhibiting neutrophil chemotaxis. Decrease of the mitochondrial ATP synthesis via inhibition of F₁F₀ ATP synthase leads to mitochondrial redox inhibition and reduction in ROS production and ultimately induces apoptosis, as evidenced through the presence of apoptotic nuclear bodies (depicted in blue) after 4 hours of angiostatin incubation with LPS (30).

세균에 대한 살균작용을 담당하여 ROS를 생산하는 활성화된 미토콘드리아를 갖는다. 즉, ROS를 생산하는 미토콘드리아에서는 환원되어 붉게 나타나는 mitotracker 염색약을 사용하여 fMLP 혹은 LPS를 처리한 중성구에서 미토콘드리아를 염색하고, 안지오스타틴을 처리하여 비교하면 ROS를 생성하는 미토콘드리아의 양이 감소한 것을 관찰할 수 있고, 또한 안지오스타틴을 처리하면 LPS를 주어진 활성화된 중성구에서 F_1F_0 ATP 합성효소의 양이 감소하는 것을 관찰할 수 있다. ROS의 양을 측정하는 다른 방법으로 carboxyl-H2 DCFDA 염색을 시행하면 역시 안지오스타틴에 의해, 활성화된 중성구에서 ROS의 생산이 증가하지 않는 것을 확인할 수 있다.

6. 안지오스타틴은 활성화된 중성구에서 p38 MAPK와 p44/42 MAPK를 억제하며 또한 세포자멸사를 유도한다. 즉, 중성구의 LPS의 처리 전 혹은 후에 안지오스타틴을 처리하면 활성화된 caspase-3의 양이 증가한다.

7. 안지오스타틴은 TNF- α 로 활성화된 마우스에서의 고환올림근(cremaster muscle)으로의 중성구 부착이나 혈관 내피세포를 통한 염증부위로의 이동을 억제한다.

안지오스타틴이 중성구의 이동에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 생체 내 현미경을 사용하여 마우스 모세관 이 후세정맥 내에서 백혈구가 구르는 정도, 속도, 부착 정도와 혈관 밖으로 이동하는 백혈구의 수를 TNF- α 만 준 실험군(0.05 μ g/mice)과 비교하면 안지오스타틴을 처리한 경우(260 μ g/mice)가 백혈구가 혈관 내에서 구르는 정도나 혈관 밖으로 이동하는 백혈구의 수가 적은 것을 알 수 있었다. 또한 염증조직으로 이동한 중성구를 추적하기 위해 myeloperoxidase를 염색하여 조직으로의 중성구 침윤 정도를 비교하여 보면 안지오스타틴을 사용한 경우에 염증조직으로 이동하는 중성구의 수가 상대적으로 적은 것을 확인하였다.

Conclusion

이러한 결과를 종합하여 보면 안지오스타틴은 lipid raft에 존재하는 flotillin-1이나, $\alpha_v\beta_3$ 인테그린, F_1F_0 ATP 합성효소와 상호작용하며, 중성구의 polarization을 억제하고 MAPK의 활성화, 미토콘드리아의 활성화, ROS의 생성 등을 동시에 억제한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 또한 활

성화된 중성구의 caspase-3을 증가시켜 세포자멸사를 증가시키는 것을 알 수 있었다. 염증을 유도한 생체 모델에서도 안지오스타틴을 처리한 경우 염증조직으로 중성구의 유입이 감소하는 것을 보여 주었다. 이러한 결과는 호중구가 가지고 있는 염증에서의 두 종류의 상반된 역할인 방어역할인 선천면역반응 이외에 활성화의 결과 일어나는 조직 손상의 유도임을 고려할 때에 중성구의 조직 손상과 관련한 항염증 조절인자를 발굴하여 염증성질환에서의 조직의 손상을 최소화 할 수 있을 것으로 기대한다.

REFERENCES

- 1) Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 2012;30:459-89.
- 2) Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007;42:153-64.
- 3) Witko-Sarsat V. Apoptosis, cell death and inflammation. *J Innate Immun* 2010;2:201-3.
- 4) Insall RH. Understanding eukaryotic chemotaxis: a pseudopod-centred view. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:453-8.
- 5) Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:1619-38.
- 6) Khan AI, Heit B, Andonegui G, Colarusso P, Kubers P. Lipopolysaccharide: a p38 MAPK-dependent disrupter of neutrophil chemotaxis. *Microcirculation* 2005;12:421-32.
- 7) Hino M, Kurogi K, Okubo MA, Murata-Hori M, Hosoya H. Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:164-9.
- 8) Jog NR, Jala VR, Ward RA, Rane MJ, Haribabu B, McLeish KR. Heat shock protein 27 regulates neutrophil chemotaxis and exocytosis through two independent mechanisms. *J Immunol* 2007;178:2421-8.
- 9) Barreiro O, de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev* 2007;218:147-64.
- 10) Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7:678-89.

- 11) Lawson MA, Maxfield FR. Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 1995;377:75-9.
- 12) Moon C, Han JR, Park HJ, Hah JS, Kang JL. Synthetic RGDS peptide attenuates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting integrin signaled MAP kinase pathways. *Respir Res* 2009;10:18.
- 13) Rainger GE, Buckley CD, Simmons DL, Nash GB. Neutrophils sense flow-generated stress and direct their migration through alphaVbeta3-integrin. *Am J Physiol* 1999;276:H858-64.
- 14) Singh B, Janardhan KS, Kanthan R. Expression of angiostatin, integrin alphavbeta3, and vitronectin in human lungs in sepsis. *Exp Lung Res* 2005;31:771-82.
- 15) Jurasz P, Santos-Martinez MJ, Radomska A, Radomski MW. Generation of platelet angiostatin mediated by urokinase plasminogen activator: effects on angiogenesis. *J Thromb Haemost* 2006;4:1095-106.
- 16) O'Mahony CA, Seidel A, Albo D, Chang H, Tuszynski GP, Berger DH. Angiostatin generation by human pancreatic cancer. *J Surg Res* 1998;77:55-8.
- 17) Scapini P, Nesi L, Morini M, Tanghetti E, Belleri M, Noonan D, *et al.* Generation of biologically active angiostatin kringle 1-3 by activated human neutrophils. *J Immunol* 2002;168:5798-804.
- 18) Westphal JR, Van't Hullenaar R, Geurts-Moespot A, Sweep FC, Verheijen JH, Bussemakers MM, *et al.* Angiostatin generation by human tumor cell lines: involvement of plasminogen activators. *Int J Cancer* 2000;86:760-7.
- 19) Wahl ML, Kenan DJ, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *J Cell Biochem* 2005;96:242-61.
- 20) Lee TY, Muschal S, Pravda EA, Folkman J, Abdollahi A, Javaherian K. Angiostatin regulates the expression of anti-angiogenic and proapoptotic pathways via targeted inhibition of mitochondrial proteins. *Blood* 2009;114:1987-98.
- 21) Dudani AK, Mehic J, Martyres A. Plasminogen and angiostatin interact with heat shock proteins. *Mol Cell Biochem* 2007;300:197-205.
- 22) Sharma MR, Rothman V, Tuszynski GP, Sharma MC. Antibody-directed targeting of angiostatin's receptor annexin II inhibits Lewis Lung Carcinoma tumor growth via blocking of plasminogen activation: possible biochemical mechanism of angiostatin's action. *Exp Mol Pathol* 2006;81:136-45.
- 23) Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:39562-8.
- 24) Troyanovsky B, Levchenko T, Månsson G, Matvijenko O, Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol* 2001;152:1247-54.
- 25) Hamacher J, Lucas R, Lijnen HR, Buschke S, Dunant Y, Wendel A, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:651-6.
- 26) Luca R, Lijnen HR, Suffredini AF, Pepper MS, Steinberg KP, Martin TR, *et al.* Increased angiostatin levels in bronchoalveolar lavage fluids from ARDS patients and from human volunteers after lung instillation of endotoxin. *Thromb Haemost* 2002;87:966-71.
- 27) Benelli R, Morini M, Carrozzino F, Ferrari N, Minghelli S, Santi L, *et al.* Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J* 2002;16:267-9.
- 28) Chavakis T, Athanasopoulos A, Rhee JS, Orlova V, Schmidt-Wöhl T, Bierhaus A, *et al.* Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment. *Blood* 2005;105:1036-43.
- 29) Perri SR, Martineau D, Francois M, Lejeune L, Bisson L, Durocher Y, *et al.* Plasminogen Kringle 5 blocks tumor progression by antiangiogenic and proinflammatory pathways. *Mol Cancer Ther* 2007;6:441-9.
- 30) Aulakh GK, Balachandran Y, Liu L, Singh B. Angiostatin inhibits activation and migration of neutrophils. *Cell Tissue Res* 2013;1-22.