

## 폐 상피세포에서 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로에 의한 염증매개 사이토카인의 발현

서울대학교 의과대학 내과학교실, 서울대학교병원 임상의학연구소, 서울대학교 의학연구원 폐 연구소

박계영\*, 이승희, 황보 빈, 임재준, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규

= Abstract =

### Pro-inflammatory Cytokine Expression Through NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B Pathway in Lung Epithelial Cells

Gye Young Park, M.D. \*, Seung Hee Lee, M.Sc., Bin Hwangbo, M.D.,  
Jae-Joon Yim, M.D., Choon-Taek Lee, M.D., Young Whan Kim, M.D.,  
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.

*Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine,  
Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Lung Institute,  
Medical Research Center, Seoul National University*

**Background :** The importance of pro-inflammatory cytokines, especially tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), have been extensively documented in the generation of inflammatory lung disease. Lung epithelial cells are also actively involved in initiating and maintaining inflammation by producing pro-inflammatory mediators. Understanding the mechanism of pro-inflammatory cytokine expression in lung epithelial cells is crucial to the development of new therapeutic modalities for inflammatory lung disease. Transcription of most pro-inflammatory cytokines is dependent on the activation of NF- $\kappa$ B. However, the relationship between pro-inflammatory cytokine expression and NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway in lung epithelial cells is not clear.

**Methods :** BEAS-2B, A549, NCI-H157, NCI-H719 cells were stimulated with IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  at various times, and then IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expressions were assayed by Northern blot analysis. IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$ -

---

\*현주소는 가천의과대학교 내과학교실

Address for correspondence :

Chul-Gyu Yoo, M.D., Ph. D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University Hospital

28 Yongun-dong Chongno-gu, Seoul, 110-744, Korea.

Phone : +82-2-760-3760 Fax : +82-2-762-9662 E-mail : cgyoo@snu.ac.kr

induced NF- $\kappa$ B activation was assessed by the nuclear translocation of p65 NF- $\kappa$ B subunit. The degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  stimulation was assayed by Western blot analysis. The phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  was evaluated by Western blot analysis after pre-treating cells with proteasome inhibitor followed by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  stimulation. The basal level of IKK $\alpha$  expression was evaluated by Western blot analysis.

**Results :** I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  was rapidly degraded after 5 minutes of incubation with IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  in BEAS-2B, A549, and NCI-H157 cells. The activation of NF- $\kappa$ B and the induction of IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression were observed by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  stimulation in these cells. In contrast, neither the changes in NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway nor IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression was induced by IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  stimulation in NCI-H719 cells. IL-1 $\beta$ - and TNF- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B phosphorylation was observed in BEAS-2B, A549, and NCI-H157 cells, but not in NCI-H719 cells. The basal level of IKK $\alpha$  expression was not different between cells.

**Conclusion :** NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway plays an important role in the expression of pro-inflammatory cytokine in most lung epithelial cells. The absence of the effect on NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B pathway in NCI-H719 cells seems to be due to the defect in the intracellular signal transduction pathway upstream to IKK. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 332-342)

**Key words :** NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , Lung epithelial cells, Pro-inflammatory cytokine.

## 서 론

인체의 중요한 방어 기전인 염증 반응은 대개 정도의 조직 손상을 동반하지만 과도한 염증은 영구적인 조직 손상을 초래한다. 염증반응에 의한 조직손상의 기전은 염증매개 사이토카인에 의한 것으로 알려져 있는데 대부분의 염증성 질환은 염증매개 사이토카인의 생산이 적절하게 조절되지 못하고 과도하게 발현되어 발생하는 병적인 상태의 조직 손상에 기인하는 것으로 이해되고 있다. 급성 폐손상 등의 염증성 폐질환에서 호중구, 폐포 대식세포, 림프구, 단핵구 등에서 생산되는 염증매개 사이토카인의 중요한 역할은 잘 알려져 있다<sup>1</sup>. 즉 외부 자극에 의해 염증 세포에서 생산되는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 다른 염증 세포에서 interleukin, protease, oxidant, prostagandins, leukotrienes 등 염증매개성 물질의 생산을 증가시키고 국소 염증 부위로 분비된 염증매개성 물질은 다시 여러 세포에 작용하여 염증매개성 물질의 생산을 증가시키는 일종의 cytokine network를 이루면서 염증이 증폭되고 그 결과로 조직 손상이 야기된다.

염증매개 사이토카인의 발현은 유전자의 전사에 의해 조절되는데, 대부분의 염증매개 사이토카인 유전자의 5' 위치에는  $\kappa$ B binding motif가 존재하여 NF- $\kappa$ B 전사인자에 의해 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. 즉, NF- $\kappa$ B 경로가 염증매개 사이토카인의 발현에서 공통 경로(converging pathway)로 이해되고 있다<sup>2-4</sup>.

NF- $\kappa$ B는 면역기능, 염증반응, 혈관 내피세포의 활성화, 세포성장 등에 관여하는 전사인자로서 거의 모든 세포에 존재한다. NF- $\kappa$ B는 구조상 같은 계열(Rel family)에 속한 단백질 heterodimer나 혹은 homodimer형태로 존재하는 데 가장 대표적인 것이 p50과 p65의 heterodimer 형태이다. 기저상태에서 I $\kappa$ B와 결합하여 세포질 내에 비활성화 상태로 존재하는 NF- $\kappa$ B는 바이러스 감염, 내독소, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등의 염증매개 사이토카인에 의해 활성화된다. 즉, 외부 자극에 의해 I $\kappa$ B가 분해되면 세포질에 존재하던 NF- $\kappa$ B가 핵 속으로 이동되어 여러 유전자의  $\kappa$ B element (GGGAATTCCC)에 결합하여 그 유전자의 전사를 가져온다<sup>5-8</sup>. 이런 경로를 통해 전사가 활성화

되는 대표적인 염증매개 물질로는 TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, lymphotoxin, GM-CSF,  $\beta$ -IFN, adhesion molecule 등을 들 수 있다<sup>2-5</sup>.

폐 상피세포에서 염증매개 사이토카인의 분비와 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로의 관련성에 관한 연구는 부족한 실정이며 폐 상피세포주에 따라 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로의 조절기전에 차이가 있는가에 대해서도 잘 알려져 있지 않은 상태이다. 본 연구에서는 폐 상피세포에서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화와 염증매개 사이토카인 발현의 연관성을 관찰하고 폐 상피세포에 따른 차이 유무를 평가하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포주

본 연구에는 정상 폐 상피세포주인 BEAS-2B세포와 폐암세포주인 A549, NCI-H157, NCI-H719를 사용하였다. BEAS-2B 세포주는 KGM media, 폐암세포주는 10% 우태혈청, 페니실린 30 mg/ml, 스트렙토마이신 50 mg/ml이 첨가된 RPMI-1640배지를 각각 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 2. 연구재료 및 시약

본 실험에 사용한 Recombinant human TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고, proteasome inhibitor로 사용한 MG132는 Peptide Institute, Inc.(Osaka, Japan)에서 구매하여 사용하였다. Rabbit의 polyclonal anti-human I $\kappa$ B $\alpha$ , polyclonal anti-human p65 antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase를 붙인 goat anti-rabbit secondary antibody는 Promega (Madison WI, USA)에서 rhodamine isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG

antibody는 Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA)에서 각각 구입하였다.

### 3. 세포질과 핵 단백질의 분리추출

세포를 PBS로 2번 씻은 후 4°C의 cytoplasmic extraction buffer (CEB, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)에 5분간 노출시켰다. 세포를 얼음 위에서 0.4% NP-40/CEB/protease inhibitor (10 mM aprotinin, 1 mM leupeptin, 1 mM bestatin, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) 혼합용액으로 5분간 세포질을 분해시켰다. 세포를 rubber policeman으로 조심스럽게 긁어 모은 다음, 2500rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 (세포질 단백)을 즉시 얼려서 저장하였고, 핵을 protease inhibitor가 들어간 CEB로 세척하였다. Nuclear extraction buffer (NEB, 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 0.4 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 25% glycerol and the protease inhibitor cocktails)에 pellet을 풀어서 10분간 얼음 위에서 처리한 후 2500rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액인 핵 단백을 즉시 얼려서 보관하였다. 단백 농도는 bicinchoninic acid method (Pierce)를 이용하여 측정하였다.

### 4. Western 분석법

세포 내의 총단백을 Whole lysis buffer (0.1% Nonidet P40, 5mM EDTA, 50mM Tris, pH 7.5~8.0, 250 mM NaCl, 50mM NaF)로 추출한 후 단백 농도를 측정하였다. 30mg의 단백을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 Nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 PBS로 희석한 5% skim-milk로 1시간 동안 비특이 결합을 차단하였다. 5% skim-milk에 1:1000으로 희석한 rabbit polyclonal anti-p65 antibody나 rabbit polyclonal anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody를 membrane과 실온에서 밤새

반응시킨 후 PBS로 15분씩 3번 세척하였다. Membrane을 5% skim-milk에 1:2000으로 희석한 goat-anti-rabbit HRP-coated antibody로 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 15분씩 3번 세척하였고 ECL kit를 이용해 발색시켰다.

## 5. Northern 분석법

TRIzol Reagent (Amersham, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 75% ethanol로 세척하고 공기 중에서 건조시켜서 20ml의 diethylpropylcarbonate (DEPC) 처리한 증류수에 녹여서 보관하였다. 동량의 RNA (10 mg/lane)를 1.0% agarose/2% formaldehyde gel에 전기영동하여 Nylon membrane (Amersham, USA)에 blotting하였다. Human TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 cDNA는 random priming kit (Stratagene)를 이용하여 [ $^{32}$ P]dCTP (Amersham, Bedford, MA) 방사능 동위 원소를 붙였다. Hybridization은 hybridization buffer에서 2시간 prehybridization시행한 뒤 radiolabeled cDNA probe ( $1 \times 10^6$  cpm/ml final concentration)를 첨가한 뒤 overnight hybridization을 하였다. 다음날, 50~55 $^{\circ}$ C에서 세척한 뒤 X-ray film(Eastman Kodak Co, Rochester, NY)를 이용하여 70 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 보관한 뒤 현상하였다.

## 결 과

### 1. 외부 자극에 의한 염증매개 사이토카인의 발현

외부 자극에 의한 염증매개 사이토카인 mRNA 발현을 평가하기 위하여 세포를 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  (각각 5ng/ml)로 자극하고 1, 2, 4, 8시간이 경과한 후 RNA를 추출하여 염증매개 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-8 mRNA 발현을 Northern 분석법으로 평가하였

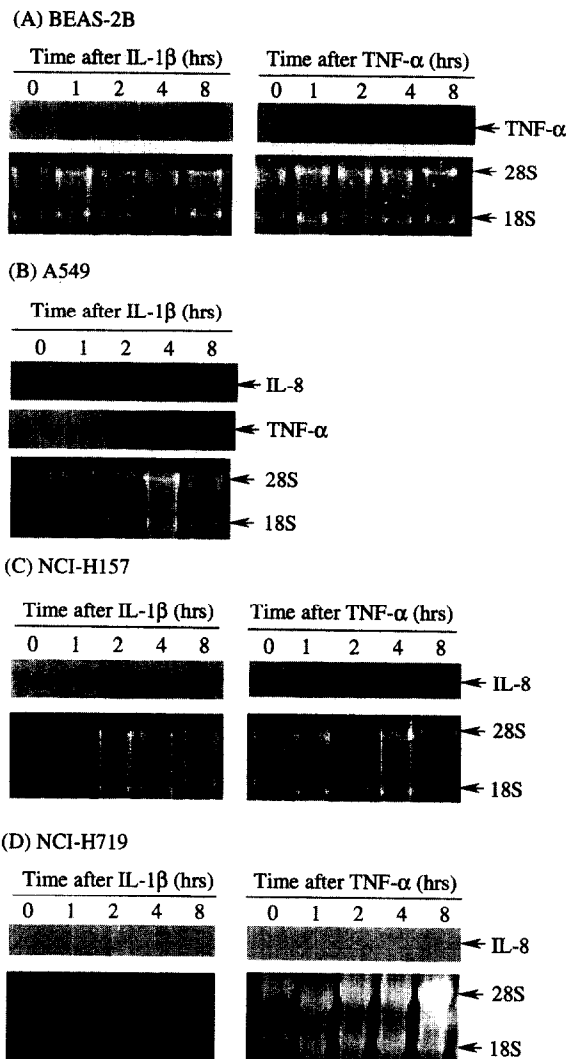


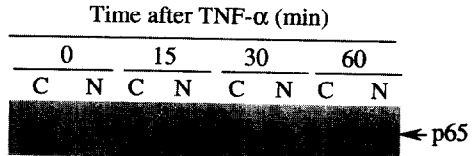
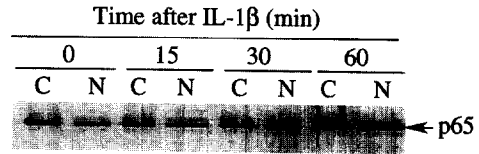
Fig. 1. Expressions of pro-inflammatory cytokines genes in lung epithelial cells. (A) BEAS-2B, (B) A549, (C) NCI-H157, and (D) NCI-H719 cells were stimulated with IL-1 $\beta$  (5ng/ml) or TNF- $\alpha$  (5ng/ml) for 0, 1, 4, 8 hours. Total cellular RNA was extracted using TRIZOL reagent. IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expressions were assayed by Northern blot analysis

다. BEAS-2B 세포에서는 IL-1 $\beta$  자극 후 1시간부터 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 증가하기 시작하여 8시간까지 지속되었고 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-8 mRNA의 발현은 1시간 후 부터 증가하기 시작해 4시간 후에 최대 발현을 보였고 8시간 후에는 기저 상태로 감소하는 양상을 보였다(Fig. 1A). A549 세포에서 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8과 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현은 1시간 후 부터 증가하기 시작하였고 4시간에 정점을 이루었다가 8시간 후에는 감소하는 양상을 보였다(Fig. 1B). NCI-H157세포에서도 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  자극에 의한 IL-8과 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 증가하였다(Fig. 1C). 그러나, NCI-H719세포에서는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  자극 후 8시간까지 IL-8 mRNA 발현의 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 1D).

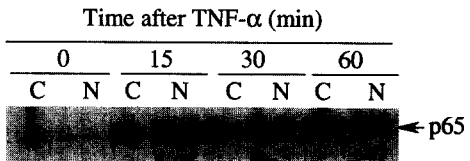
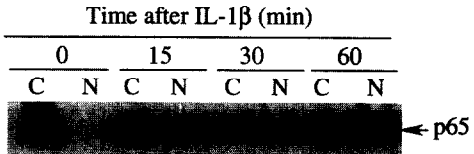
## 2. 외부 자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화

외부 자극에 의한 염증매개 사이토카인의 발현과 NF- $\kappa$ B의 활성화와의 관련성을 평가하기 위하여 세포를 IL-1 $\beta$  또는 TNF- $\alpha$ 로 자극하고 15, 30, 60, 120분이 경과한 후 세포질 단백질과 핵 단백을 각각 추출하여 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p65에 대한 Western 분석법을 시행하였다. BEAS-2B와 A549세포에서 기저 상태에서는 핵 단백 추출에서 소량의 p65 단백질의 발현만이 관찰되었다. IL-1 $\beta$  또는 TNF- $\alpha$  자극 15분 후부터 핵 단백 내 p65 단백질의 발현이 증가하였고 이는 60분까지 지속되었다(Fig. 2A, B). NCI-H719 세포에서는 IL-1 $\beta$ 로 자극 후 120분까지 핵과 세포질의 p65단백 발현이 대조군과 차이를 보이지 않아 IL-1 $\beta$  자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화가 관찰되지 않았고 TNF- $\alpha$  자극으로는 60분이 경과한 후에 p65가 핵으로 이동되는 것이 관찰되었다(Fig. 2C). 외부 자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화가 세포내 NF- $\kappa$ B의 발현 증가에 의한 가능성을 배제하기 위하여 세포를 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 로 자극하고 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120분이 경과한 후 세포 총 단백을 추출하여 p65에 대한 Western blot을 시행하였다. BEAS-2B 세포

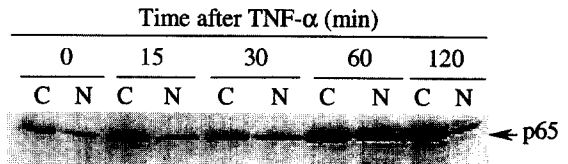
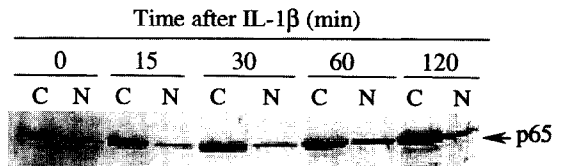
### A) BEAS-2B



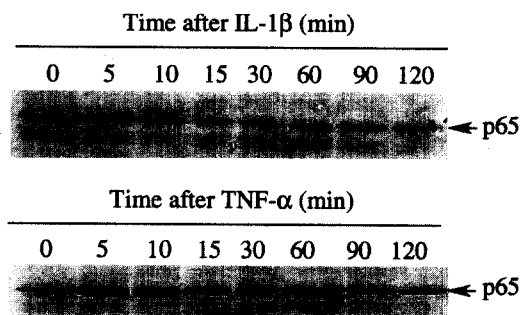
### B) A549



### C) NCI-H719



**Fig. 2.** Time-dependent activation of NF- $\kappa$ B in lung epithelial cells. (A) BEAS-2B, (B) A549, and (C) NCI-H719 cells were stimulated with IL-1 $\beta$  (5ng/ml) or TNF- $\alpha$  (5ng/ml) for the indicated times. Equal amounts of nuclear and cytoplasmic protein extracts (30 mg each) were subjected to SDS-PAGE, and transferred proteins were analyzed by Western blot analysis for the presence of the p65 subunits of NF- $\kappa$ B. C : cytoplasmic extracts, N : nuclear extracts.



**Fig. 3.** Total cellular level of NF- $\kappa$ B expression in lung epithelial cells. BEAS-2B cells were stimulated with IL-1 $\beta$  (5ng/ml) or TNF- $\alpha$  (5ng/ml) for the indicated times. Equal amounts of total cellular extracts (30 mg each) were subjected to SDS-PAGE, and the expressions of the p65 subunits of NF- $\kappa$ B were analyzed by Western blot analysis.

에서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극하고 2시간까지 세포 내 총 p65단백의 발현은 일정하게 유지되었다(Fig. 3).

이상의 결과는 폐 상피세포에서 외부자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화로 염증매개 사이토카인이 발현됨을 시사하는 소견이다.

### 3. NF- $\kappa$ B의 활성화와 I $\kappa$ B 분해와의 관련성

세포주에 따른 NF- $\kappa$ B의 활성화의 차이와 I $\kappa$ B 조절과의 관련성을 규명하기 위하여 IL-1 $\beta$  또는 TNF- $\alpha$ 로 자극 후 시간에 따른 I $\kappa$ B $\alpha$  및 I $\kappa$ B $\beta$ 의 분해 양상을 Western blot으로 평가하였다. BEAS-2B, NCI-H157, A549세포에서는 IL-1 $\beta$  또는 TNF- $\alpha$  자극하고 5분 후부터 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 분해되기 시작해서 30분 후에는 완전히 분해되었으며 60분 후부터 재합성된 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 관찰되었다(Fig. 4A, B, C). NCI-H719세포에서는 IL-1 $\beta$  자극 후 90분까지 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 관찰되지 않았고 TNF- $\alpha$  자극으로는 60분 후에 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현이 약간 감소되는 양상을 보였다(Fig. 4D). 세포주에 따른 외부 자극에 의한 I $\kappa$ B $\beta$ 의 분해도 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 같은 차이를 보였는데, NCI-H157 세포에서

는 TNF- $\alpha$ 로 자극하고 15분 후부터 I $\kappa$ B $\beta$ 의 발현이 감소하기 시작해 30분에 가장 낮은 발현을 보였고 60분 후부터는 재합성되는 양상을 보였다(Fig. 4C). NCI-H719세포에서는 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 같이 IL-1 $\beta$  자극 후 90분까지 I $\kappa$ B $\beta$ 가 분해되지 않았다(Fig. 4D). 이 결과는 폐 상피세포주에서 외부자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화는 I $\kappa$ B의 분해에 의존함을 시사하는 소견이다.

### 4. I $\kappa$ B $\alpha$ 분해와 I $\kappa$ B $\alpha$ 인산화와의 관련성

I $\kappa$ B $\alpha$ 가 분해되려면 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화가 선행되어야 하기 때문에 다음 단계로 세포에 따른 I $\kappa$ B $\alpha$  분해 양상의 차이가 외부 자극에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화의 차이에 기인하는지를 평가하였다. Proteasome 억제제인 MG132로 전처리하여 인산화된 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 억제 한 상태에서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 로 자극하여 인산화 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 세포내 축적시킨 후 Western blot을 시행하였다. BEAS-2B, A549, NCI-H157세포에서는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 비인산화 I $\kappa$ B $\alpha$ 에 비해 이동이 감소된 인산화 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 관찰되었지만(Fig. 5A, B, C), NCI-H157 세포에서는 인산화 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 관찰되지 않았다(Fig. 5D). 이 결과는 폐 상피세포에 따른 I $\kappa$ B $\alpha$  분해 양상의 차이가 외부 자극에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화의 차이에 기인함을 시사하는 소견이다.

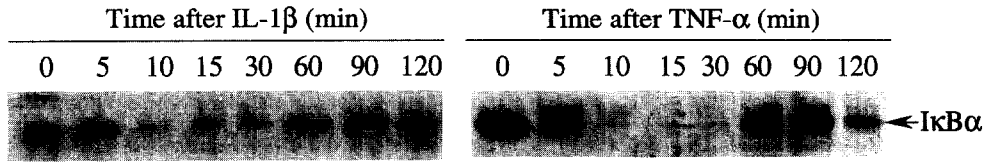
### 5. 기저상태 IKK $\alpha$ 의 정량적 분석

외부 자극에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화는 I $\kappa$ B kinase에 의한 것으로 알려져 있다. 폐 상피세포의 종류에 따른 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화 유무가 I $\kappa$ B kinase의 발현에 의한 것인지를 관찰하기 위하여 BEAS-2B, A549, NCI-H157, NCI-H719 세포에서 기저상태의 IKK $\alpha$  발현을 Western blot으로 평가하였다. 모든 세포에서 기저상태의 IKK $\alpha$  발현에는 차이가 없었다(Fig. 6).

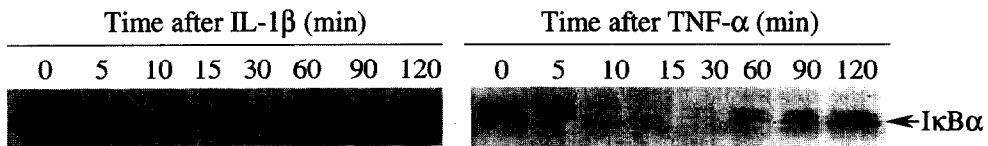
## 고 찰

폐 상피세포는 염증 세포에서 생산되는 사이토카인에

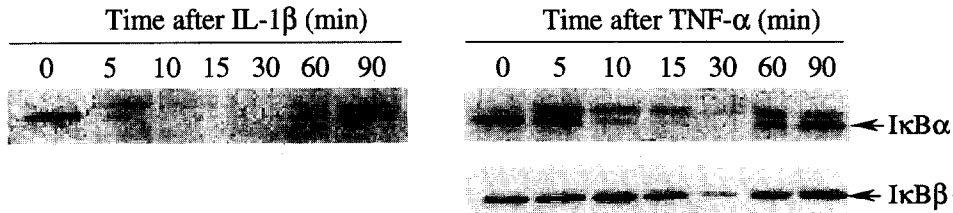
A) BEAS-2B



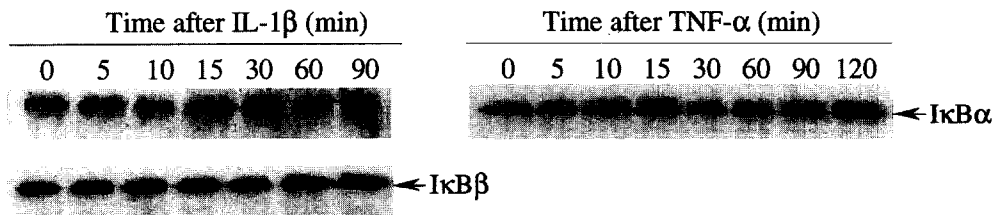
B) A549



C) NCI-H157



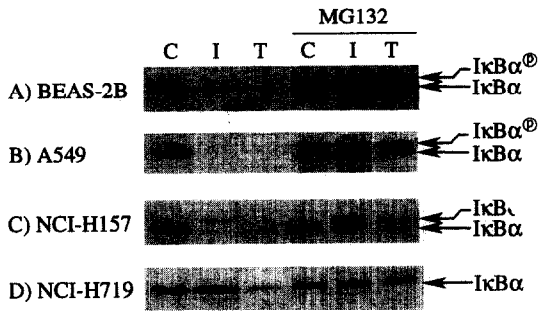
D) NCI-H719



**Fig. 4.** Time-dependent degradation of  $\text{IkB}\alpha$  and  $\text{IkB}\beta$  in lung epithelial cells. (A) BEAS-2B, (B) A549, and (C) NCI-H719 cells were stimulated with IL-1 $\beta$  (5ng/ml) or TNF- $\alpha$  (5ng/ml) for the indicated times. Equal amounts of total cellular extracts (30 mg each) were subjected to Western blot analysis for  $\text{IkB}\alpha$  and  $\text{IkB}\beta$ .

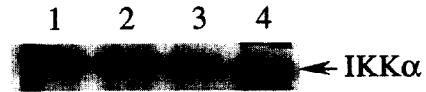
의해 손상되는 염증 반응에서 피동적인 세포로 이해되었으나 최근의 기관지 천식, 만성 기관지염, 기관지확장증 등 염증성 기도질환을 대상으로 시행된 연구에 의하면 폐 상피세포는 피동적으로 외부환경으로부터 숙주를 물리적으로 방어하는 방어벽 기능 뿐 만 아니

라 적극적으로 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>9-11</sup>. 폐 상피세포는 염증세포에서 분비되는 사이토카인에 의해 interleukin, chemokines, colony stimulating factors와 growth factor 등을 생산 및 분비함으로써 국소 염증 부위에서의 사이토카인 network



**Fig. 5.** Phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  in lung epithelial cells. (A) BEAS-2B, (B) A549, (C) NCI-H157, and (D) NCI-H719 cells were incubated with or without proteasome inhibitor, MG132 for an hour, and then stimulated with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  for 30 minutes. Western blot analysis for I $\kappa$ B $\alpha$  was carried out with whole cell extracts using rabbit polyclonal anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody. C : control, I:IL-1 $\beta$ , T:TNF- $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>P</sup>: phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$ .

에 중요한 역할을 한다. 즉, 폐 상피세포에서 분비된 사이토카인은 염증세포를 국소 염증 부위로 동원하고 활성화시키며, 염증세포의 생존율을 증가시켜 염증반응을 증폭시키는 역할을 한다. 폐 상피세포는 바이러스나 세균의 생산물, 또는 해독가스, 감각된 화학물질 등에 의해 직접 사이토카인을 분비하여 염증 반응을 일으키기도 한다. 폐 상피 세포는 염증 반응의 조장뿐만 아니라 soluble TNF- $\alpha$  receptor 등을 기도 미세 환경으로 유리시켜 염증반응을 완화시키는 기능도 가지고 있다. 따라서, 폐 상피세포와 사이토카인의 상호작용은 염증성 폐질환을 이해하는 데 있어 매우 중요한 과정이다<sup>9-11</sup>. 본 연구에서는 BEAS-2B, A549, NCI-H157, NCI-H719 등의 폐 상피세포에서 외부 자극에 의한 염증매개 사이토카인의 발현 양상을 평가하였다. BEAS-2B, A549, NCI-H157세포에서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 cytokine network에서 근위 (proximal) 사이토카인으로 작용하는 TNF- $\alpha$ 와 IL-8의 발현이 증가되어 염증성 호흡기질환에서 폐 상피세포의 능동적 역할을 시사하고 있다. 대부분의 염



**Fig. 6.** Expression of IKK $\alpha$  at basal states in lung epithelial cells. Total cellular extract from A549 (lane 1), NCI-H157 (lane 2), NCI-H719 (lane 3), and BEAS-2B (lane 4) cells were subjected to Western blot analysis for IKK $\alpha$ .

증매개 사이토카인의 발현은 NF- $\kappa$ B 전사인자에 의존하는 것으로 알려져 있어 다음 단계로 폐 상피세포에서 외부 자극에 의한 염증매개 사이토카인의 발현유도와 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로와의 연관성을 평가하였다. 본 연구에서는 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p65의 핵내 발현을 NF- $\kappa$ B 활성화의 지표로 사용하였는데, 이는 NF- $\kappa$ B DNA binding activity와 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>12</sup>. BEAS-2B, A549, NCI-H157세포에서 외부 자극 후 15분이 경과한 후부터 핵내의 p65 발현이 증가하기 시작해 60분까지 지속되었다. 이는 폐 상피세포에서 외부 자극에 의한 염증매개 사이토카인의 발현과 NF- $\kappa$ B 활성화와의 연관성을 시사하는 소견이다. NCI-H719 세포에서는 외부 자극으로 염증매개 사이토카인의 발현이 유도되지 않았는데 NF- $\kappa$ B의 활성화도 관찰되지 않아 폐 상피세포에서 염증매개 사이토카인의 발현이 NF- $\kappa$ B의 활성화에 기인함을 뒷받침해 주고 있다. NF- $\kappa$ B의 활성화가 세포내 총 NF- $\kappa$ B의 발현 증가에 의한 가능성을 평가하기 위하여 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 로 자극하고 시간 경과에 따른 세포내 p65의 발현을 관찰하였는데 BEAS-2B 세포에서 외부 자극 후 120분까지 세포내 총 p65의 발현은 증가하지 않았고 일정하게 유지되었다. 이는 폐 상피세포에서 외부 자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화가 세포내 총 NF- $\kappa$ B의 발현 증가보다 세포질에서 핵으로 이동되어 이루어짐을 시사하는 소견이다.

NF- $\kappa$ B가 세포질에서 핵으로 이동되기 위해서는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 선행되어야 하는 것으로 알려져 있다.



본 연구에서는 외부 자극으로 NF- $\kappa$ B가 활성화되고 염증매개 사이토카인의 발현이 증가하는 BEAS-2B, A549, NCI-H157 세포에서 5분 후부터 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 시작되어 30분 후에는 완전히 분해되었고 60분 후부터 재생된 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 다시 발현되는 양상을 보였다. 이러한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해 양상은 다른 세포에서 시행한 기존의 연구와 일치되는 결과이다<sup>13-18</sup>. I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 시간적으로 가장 빨리 관찰되고, 그 후에 NF- $\kappa$ B의 활성화와 염증매개 사이토카인의 발현이 유도되는 것으로 보아 폐 상피세포에서 NF- $\kappa$ B활성화에 따른 염증매개 사이토카인 발현에는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 선행하는 것으로 판단된다. 외부 자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화와 염증매개 사이토카인의 발현이 유도되지 않는 NCI-H719세포에서는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 로 자극하고 2시간 후까지 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 관찰되지 않았다. 이것 또한 NF- $\kappa$ B활성화에 따른 염증매개 사이토카인의 발현에 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 필수적임을 시사하는 소견이다.

다른 폐 상피세포와 달리 NCI-H157세포에서 외부 자극에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해, NF- $\kappa$ B의 활성화 및 염증매개 사이토카인의 발현이 관찰되지 않는 것은 폐 상피세포에 따라 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로의 조절에 차이가 있음을 시사하는 소견이다. 본 연구에서는 폐 상피세포의 종류에 따른 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로의 조절 차이가 외부 자극에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화 과정에 의한 것인지를 평가하기 위하여 proteasome inhibitor인 MG132로 인산화된 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 억제한 상태에서 IL-1 $\beta$ 나 TNF- $\alpha$ 로 자극하여 인산화 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 존재 유무를 관찰하였다. BEAS-2B, A549, NCI-H157 세포에서는 외부 자극으로 인산화 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 관찰되었지만 NCI-H157 세포에서는 인산화 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 관찰되지 않았다. 따라서 폐 상피세포주에 따른 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ 의 조절 차이는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화에 관여하는 세포내 신호전달 과정의 차이에 의한 가능성을 생각할 수 있다.

IL-1 $\beta$ 의 세포내 신호전달체계는 IL-1R accessory protein과 IL-1R-associated kinase (IRAK)를 통해 TRAF-6로 전달되고<sup>19-20</sup> TNF- $\alpha$ 는 TNF receptor-associated factor 2(TRAF-2)와 recep-

tor-interacting protein (RIP)을 경유하게 된다<sup>21-22</sup>. 이 두 경로는 궁극적으로 NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK)을 활성화시키고 활성화된 NIK은 I $\kappa$ B kinase (IKK)를 활성화시켜 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 가져온다<sup>23</sup>. 폐 상피세포에 따른 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  조절 차이는 세포 표면의 TNF- $\alpha$ 나 IL-1 $\beta$ 의 수용체부터 IKK까지의 세포내 신호전달과정중 어느 곳의 차이에 의해서도 가능하다. 본 연구에서는 IKK 효소의 발현 차이에 기인하는 지를 평가하기 위하여 기저 상태에서 IKK $\alpha$  단백 발현을 관찰하였는데 세포주 간의 차이는 발견할 수 없었다. 그러나, 본 연구의 결과로 IKK 활성화도의 차이에 의한 가능성은 배제할 수 없지만 폐 상피세포에 따른 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  조절 차이는 IKK보다 상위단계의 차이에 의한 것으로 생각된다. 폐 상피세포에 따른 신호전달체계 차이의 기전은 확실치는 않지만 각 세포의 유래에 따른 차이일 가능성을 생각할 수 있다. 즉, A549 세포는 선암, NCI-H157 세포는 편평상피세포암, BEAS-2B 세포는 정상 기관지 상피세포, NCI-H719세포는 소세포 폐암에서 각각 유래한 세포주로서<sup>24</sup> 세포의 기원에 따른 차이일 가능성이 있다.

결론적으로 대부분의 폐 상피세포에서 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로는 염증매개 사이토카인 발현에 매우 중요한 역할을 하고, 일부 세포에서는 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로 조절의 차이를 보이는데 이는 IKK보다 상위 단계의 세포내 신호전달체계의 이상에 기인하는 것으로 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

염증매개 사이토카인은 염증성 폐질환의 중요한 매개 물질이다. 폐 상피세포는 염증세포에서 분비되는 사이토카인에 의해 interleukin, chemokines, colony stimulating factors와 growth factor등을 생산 및 분비함으로써 국소 염증 부위에서의 사이토카인 network에 중요한 역할을 한다. 따라서 폐 상피세포에서 염증매개 사이토카인의 발현 기전에 대한 이해는 염증성 폐질환의 기전규명과 이에 기초한 새로운 치료법의 개발에 중요할 것으로 생각된다. 대부분의 사이토카인

은 NF- $\kappa$ B 전사인자에 의해 발현되는데 폐 상피세포에서 염증매개 사이토카인의 발현과 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로와의 관련성에 관한 연구는 부족한 실정이다.

#### 방 법 :

BEAS-2B, A549, NCI-H157, NCI-H719 세포에서 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-8과 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현 양상을 평가하였고 이들의 발현과 관찰하였고 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로와의 관련성을 평가하기 위하여 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 I $\kappa$ B $\beta$ 의 분해 양상을 관찰하였다. 폐 상피세포의 종류에 따른 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로 조절의 기전을 규명하고자 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화와 기저상태에서 IKK $\alpha$ 의 발현을 평가하였다.

#### 결 과 :

BEAS-2B, A549, NCI-H157 세포에서는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 I $\kappa$ B $\beta$ 가 분해되었고 NF- $\kappa$ B의 활성화가 관찰되었으며 IL-8과 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 유도되었다. NCI-H719 세포에서는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 I $\kappa$ B 분해에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화 및 염증매개 사이토카인의 발현이 관찰되지 않았다. BEAS-2B, A549, NCI-H157 세포에서는 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  자극으로 I $\kappa$ B의 인산화가 관찰되었지만 NCI-H719 세포에서는 관찰되지 않았다. 기저상태의 IKK $\alpha$  발현은 세포간에 차이가 관찰되지 않았다.

#### 결 론 :

대부분의 폐 상피세포에서 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로는 염증매개 사이토카인 발현에 매우 중요한 역할을 하고, 일부 세포에서는 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로 조절의 차이를 보이는데 이는 IKK보다 상위 단계의 세포내 신호전달체계의 이상에 기인하는 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Murray JF, Nadel JA. Textbook of Respiratory Medicine. 2<sup>nd</sup> ed. W.B. Saunders Company;1994. P.478-83.
2. Thanos D, Maniatis T. NF $\kappa$ B ; A lesson in family values. Cell 1995;80:529-35.
3. Baeuerle PA, Baltimore D. I $\kappa$ B ; a specific inhibitor of the NF $\kappa$ B transcriptional factor. Science 1988;242:540-9.
4. Baeuerle PA, Baltimore D. NF $\kappa$ B ; Ten Years After. Cell 1996;87:13-21.
5. Chen Z, Parent L, Maniatis T. Site-specific phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by a novel ubiquitin-dependent kinase activity. Cell 1996;84:853-61.
6. Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Stimulation-dependent I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation marks the NF $\kappa$ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:10599-607.
7. Finco TS, Baldwin AS. Mechanistic Aspects of NF $\kappa$ B regulation ; The emerging role of phosphorylation and proteolysis. Immunity 1995;3:263-9.
8. Brockman JA, Scherer DC, McKinsey TA, Hall SM, Qi X, Lee WY, et al. Coupling of a signal response domain in I $\kappa$ B to multiple pathway for NF $\kappa$ B activation. Mol Cell Biol 1995;15:2809-15.
9. Levine SJ. Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. J Investigative Medicine 1995;43(3):241-9.
10. Raeburn D, Webber SE. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. Eur Respir J 1994;7(12):2226-33.
11. Takizawa H. Airway epithelial cells as regulators of airway inflammation. Int J Mol Med 1998;1(2):367-78.
12. Yoo CG, Lee S, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I $\kappa$ B $\alpha$  through preventing I $\kappa$ B kinase activation in respiratory epithelial cells. J Immunol 2000;164:

- 5416-23.
13. Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci AS. NF- $\kappa$ B potently up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection. *J Immunology* 1997;158:3483-90.
  14. Tanaka C, Kamata H, Takeshita H, Yagisawa H, Hirata H. Redox regulation of LPS-induced IL-8 gene expression mediated by NF- $\kappa$ B and AP-1 in human astrocytoma U373 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:568-75.
  15. Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsbury JR, Cogswell JP, Baldwin AS, et al. NF- $\kappa$ B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13859-65.
  16. Qiu HF, Zhang Y, Jllmer T, Stern DM, Waldher R, Saeger H, et al. Role of NF B in the the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 1997;100:972-985.
  17. Blackwell TS, Holden EP, Blackwell TR, DeLarco JE, Christman JW. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mediates neutrophilic alveolitis in rats : association with nuclear factor kappa B activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:464-70.
  18. Schwartz MD, Moore EE, Moore FA, Shenkar R, Moine P, Haenel JB, Abraham E. NF- $\kappa$ B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1996;24:1285-90.
  19. Hsu H, Shu H-B, Pan M-B, Goeddel DV. TRADD-TRAF-2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor I signal transduction pathways. *Cell* 1996;84:299-308.
  20. Hsu H, Huang J, Shu H-B, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 1996;4:387-96.
  21. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin -1. *Nature* 1996;383:443-6.
  22. Cao Z., Henzel WJ, Gao X. IRAK : a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 1996;271:1128-31.
  23. Manning A, Rao A. IKK-1 and IKK-2 ; Cytokine-Activated I $\kappa$ B Kinases Essential for NF- $\kappa$ B Activation. *Science* 1997;278: 860-9.
  24. ATCC Website <http://www.atcc.org>
-