

비소세포 폐암세포에서 Uteroglobin의 면역 조절 기능에 대한 연구*

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐 연구소

윤정민, 임재준, 유철규, 이춘택, 한성구, 심영수, 김영환

The Role of Uteroglobin in the Immunomodulation of Nonsmall Cell Lung Cancer Cells

Jung Min Yoon, Jae-Jun Lim, Chul-Gyu Yoo, Choon-Taek Lee, Sung Koo Han, Young-Soo Shim, Young Whan Kim

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine and Lung Institute of Medical Research Center, Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Immunotherapy for cancer has not been successful because of several obstacles in tumor and its environment. Inappropriate secretions of cytokines and growth factors by tumors cause substantial changes in the immune responses against tumors, affording the tumors some degree of protection from immune attack. Uteroglobin (UG, Clara cell secretory protein) has been known to have anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-cancer activities. However, in lung cancer cells, UG expression is decreased. This study investigated the role of UG in the immunomodulation of lung cancer.

Methods : The UG protein was overexpressed by Adenovirus(Ad)-UG transduction in non-small cell lung cancer cell lines. The concentration of Prostaglandin E₂ (PGE₂) was measured by Enzyme Immunoassay (EIA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from whole blood were prepared with Ficoll. PBMC were cultured in RPMI 1640, supernatant of A549, or A549 with UG or NS-398. Concentration of Th 1 type and Th 2 type cytokines from PBMC were measured by ELISA.

Results : UG suppressed PGE₂, Cyclooxygenase-2 (COX-2) product. Both Th1 type such as Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) and Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Th2 type cytokines such as IL-10 and Tumor growth factor- β (TGF- β) were increased when PBMC were cultured with supernatant of non small lung cancer cells. UG and COX-2 inhibitor, NS-398 induced normal immune response of PBMC. Although Th 1 type cytokines were increased, Th 2 type cytokines were reduced by UG.

Conclusion : UG suppressed PGE₂, COX-2 product. Supernatant of NSCLC induced imbalance of immune response of PBMC. However, UG reversed this imbalance. These results suggest that UG may be used in the development of immunotherapy for lung cancer. (*Tuberc Respir Dis* 2004; 57:336-344)

Key words : Uteroglobin, Lung cancer, PBMC.

서 론

암의 발생은 세포 성장 조절 기능의 이상에서 초래되지만 또한 발생된 암에 대하여 면역 반응이 제대로 작동하지 못하는 것도 기여하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 폐암에 대한 거의 대부분의 면역 치료는 실

패하였는데, 이는 폐암 자체에 존재하는 면역 억제 기전을 극복하지 못한다에 기인하는 것으로 판단된다.

이것은 암세포가 숙주의 면역 반응에 변화를 일으키는 물질을 분비하기 때문이다^{1,2}. 특히, cytokines나 growth factors의 부적당한 분비는 물론, 암세포 성장 물질의 분비를 촉진한다. IL-2와 IFN- γ 같은 Th1 type cytokines 생성량의 변화는 림프구의 기능을 손상시킨다는 연구가 보고 되었다³⁻⁵.

최근 대장암의 발암과정에서 COX-2가 과발현되는 것이 밝혀지고 COX-2 억제제로 암의 진행을 억제할 수 있다는 것이 증명된 후, 여러 종류의 암에서 COX-2에 대한 연구가 활발해지고 있다. 폐암의 경우에도 비소세포폐암 조직의 약 30%에서 COX-2가 발현됨이 보고되었고, 특히 선암의 경우에는 41%에서

*본 연구는 2003년 서울대학교 병원 기금연구비 (04-2003-043-0) 지원에 의해 이루어진 것임.

Address for correspondence : **Young Whan Kim, M.D.**

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine,
Department of Internal Medicine, Seoul National
University Hospital 28 Yongon-dong, Chongno-Gu,
Seoul, 110-744, Korea

Phone : +82-2-760-2856 Fax : +82-2-762-9662

E-mail : ywkim@snu.ac.kr

Received : Jul. 28. 2004.

Accepted : Aug. 31. 2004.

발현되며⁶, RAS 유전자의 돌연변이와도 관련이 있음이 보고되었다⁷. 또한 COX-2는 Metalloproteinase-2 (MMP-2) 와 MMP-9의 발현을 증가시키는 것이 밝혀졌으며⁸, COX-2가 PGE₂ 발현을 통하여 Epidermal growth factor receptor (EGFR)를 활성화시키는 것이 보고되었다⁹.

비소세포폐암에서 COX-2의 과발현은 세포사멸에 대한 내성 증가, 혈관신생의 증가, 암 조직의 침범과 전이의 증가, 그리고 숙주 면역 기능의 저하를 초래한다고 밝혀졌다.

비소세포폐암에서 COX-2에 의하여 생성되는 PGE₂는 면역세포인 림프구와 대식구에서 IL-10의 합성을 자극한다고 밝혀졌으며, IL-10은 이미 잘 알려진 면역 억제 물질이다. COX-2는 또한 dendritic cell의 기능도 저하시킨다¹⁰. 따라서 COX-2를 억제함으로써 숙주의 면역 기능을 어느 정도 회복할 수 있음이 밝혀졌다.

Uteroglobin (UG)은 자궁, 폐, 유선, 전립선 등 여러 장기의 점막상피세포에서 분비되는 스테로이드에 의하여 유발될 수 있는 많은 작용을 하는 단백질이다¹¹. UG은 또한 혈액과 뇨에서 검출되는데 이 단백질은 발견되는 장기에 따라 많은 이름으로 불리워지고 있다. 폐의 경우 Clara cell에서 발견되어 Clara Cell 분비 단백질 (CCSP)라고 불려진다¹². 이 단백질은 cytokine과 같이 다양한 기능을 가지고 있는데 강력한 면역조절의 항염증, 항화학주성, 항혈전증의 활성을 보인다^{13,14}. 최근에는 여러 종류의 세포에서 이 UG과 결합하는 수용체로 생각되는 190kDa와 49kDa 크기의 UG-binding 단백질이 존재함이 밝혀져 UG에 대한 관심이 고조되고 있다.

사람의 UG (hUG) 유전자는 11q12.2-13.1에 위치하며 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있으며 진화하는 동안 구조상 보존되어 있는 유전자이다. 흥미로운 사실은 이 부위 염색체의 재배열이나 삭제가 암의 발생과 연관이 있으며 자궁 암세포인 HeLa 세포에 염색체 11번을 주입하면 이 세포의 암성이 저하됨이 보고되어 있다¹⁵. 그리고 최근의 보고에 의하면 자궁, 폐, 유선, 전립선 등 여러 장기의 점막 상피 세포에서는 매우 높게 발현되지만 이러한 세포에서 유래한 선암의 조직이나 세포주에서는 그 발현이 매우 저하되어 있거나 발현이 전혀 되지 않는 것으로 알려졌다.

또한 토끼의 폐세포를 simian virus 40로 불멸화 시키면 UG 유전자의 발현이 중단된다고 하며, UG-knockout 쥐의 경우 악성 종양의 발생률이 매우 높다고 한다. 결과적으로 UG 유전자의 발현 저하가 많은 암세포들이 가지고 있는 하나의 특징이라고 할 수 있다. 본 연구자들은 UG가 폐암 세포주의 성장을 억제시키는 효과를 증명한 바 있다³⁵.

UG이 처음 발견된 곳은 자궁이며 태아가 발생할 때 어머니로부터의 이식거부반응을 억제하는 면역 억제 기능이 있음이 밝혀졌으며, secreted phospholipase A₂ (sPLA₂) 억제 작용을 통한 항염증 작용이 잘 알려져 있고, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 억제 등의 anti-cytokine 효과도 알려져 있다. 그러나 폐암에서 UG이 숙주의 면역 기능에 미치는 영향에 대해서는 아직 알려지지 않은 바 없다¹⁶.

최근에 본 연구자들은 폐암 세포주에 Ad-UG을 주입한 결과, 염증 작용 및 암의 전이 작용에 주요 역할을 하는 COX-2의 발현이 감소됨을 관찰하였다. 따라서 UG이 COX-2의 과발현으로 나타나는 숙주의 면역 기능 저하에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각하며 실험을 진행하였다.

본 연구에서는 비소세포폐암세포주에 Ad-UG을 넣어 UG의 발현을 유도한 후 세포 배양 상층액이 비소세포폐암환자의 면역 세포에 어떠한 영향을 주는지 조사하였다.

대상 및 방법

1. 세포 배양

비소세포 폐암세포주인 A549 세포를 37°C, 5 % CO₂ 조건하에서 10 % fetal bovine serum(FBS), penicillin(60 μ g/ml), streptomycin(100 μ g/ml)이 첨가된 RPMI 1640 배지에 배양하였다.

2. UG 발현 유도 및 NS-398 처리

UG이 발현되지 않는 폐암 세포주인 A549를 1 \times 10⁶/ml로 플레이트에 준비한 후 한 플레이트의 세포

를 떼어, 살아있는 세포의 수를 측정하였다. COX-2 억제제로 알려진 NS-398 (Cayman Biochemical Co., MI, USA) 10 μ M 혹은 NS-398의 양성 대조군인 DMSO를 첨가하고 2일간 배양하였다. Ad-UG의 양성 대조군인 Ad-null 혹은 Ad-UG의 용액을 (20 MOI 혹은 100 MOI) RPMI 1640 배지와 섞어서 플레이트에 넣고 37°C에서 1시간 감염시켰다. PBS로 세척한 후 FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 넣고 2일간 추가 배양하였다.

3. Western blot 분석

배양된 세포에 Ad-UG 혹은 NS-398을 처리하고 추가 배양 후, whole lysis buffer(0.1 % NP-40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris(pH 7.5~8.0), 250 mM NaCl, 50 mM NaF)를 이용하여 총세포 단백질을 추출하였다. 30 μ g의 세포 단백질을 10 % SDS-polyacrylamide 겔에서 전기영동 시켰다. 겔 상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, 이 membrane을 blocking solution(5% skim milk in 1×PBS/Tween 20)으로 1시간 동안 block시킨 후 rabbit polyclonal anti-UG 항체, 혹은 goat monoclonal anti- β -actin 항체를 1:1000으로 첨가하여 12시간 동안 반응시켰다. 세척 후 이차 항체를 1:2000으로 첨가하여 반응 시킨 후 면역 신호의 검출은 ECL Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하였다.

4. 폐암 세포의 PGE₂ 분비능 측정

UG의 발현을 유도 혹은 COX-2 억제제인 NS-398을 농도별로 처리 후 배양한 폐암 세포의 상층액을 회수하였다. TNF- α (5ng/ml)로 1시간 자극한 것을 양성 대조군으로 사용하였다. EIA kit를(Cayman Biochemical Co., CA, USA) 이용하여 회수한 상층액의 PGE₂의 농도를 효소 면역 측정법으로 측정하였다.

5. 조건별 세포 배양 상층액

음성 대조군인 RPMI 1640 배지, A549를 배양한 상

층액, A549를 배양 후 NS-398의 양성 대조군인 DMSO 또는 NS-398 10 μ M 처리한 상층액 혹은 Ad-UG의 양성 대조군인 Ad-null 또는 Ad-UG를 첨가한 A549의 배양 상층액을 회수하였다. 추후 실험을 위해 각 상층액을 -70°C에 보관하였다.

6. PBMC 분리 및 배양

헤파린 처리된 주사기로 뽑은 혈액을 Ficoll-Hystopaque(Sigma Diagnostics, Inc., MO, USA) 동일 양 위에 얹었다. 30분간 400×g로 원심 분리 후 중간 층의 buffy coat를 회수하였다. 세척 후 1×10⁶/ml의 PBMC를 37°C에서 4시간 배양하였다. 조건별 세포 배양 상층액을 각 세포들에 첨가하고 2일간 추가 배양하였다.

7. 면역 세포에서의 cytokines 분비능 측정

PBMC가 분비하는 cytokines 양을 측정하기 위하여, 배양 상층액을 회수하였다. ELISA kit를 (R&D Systems, Inc., MN, USA) 이용하여 IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10 및 TGF- β 의 농도를 효소 면역 측정법으로 결정하였다.

8. 통계 분석

각 cytokines의 대조 그룹과 비교 그룹 차이는 SPSS for Windows Release 11.0 프로그램의 paired t-test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 폐암세포주에서 Ad를 이용한 UG 발현 유도

폐암 세포주인 A549와 NCI-H157에서 UG이 발현되지 않는 것을 Western blot으로 확인하였다. Ad에 UG을 클로닝하여 얻은 vector를 폐암 세포주에 1시간 감염시키고, 발현 여부를 Western blot으로 조사하였다. 정상인의 기관지 내시경 중에 얻은 BAL fluid를

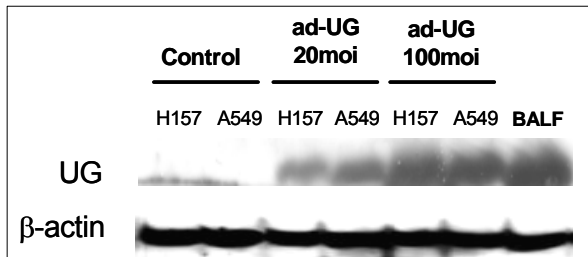


Figure. 1. Production of UG protein from Ad-UG. Transduced cell-UG was detected in cell lysates by the Western blot analysis. This shows that the transformed cells synthesized UG. The expression level in the cells transduced with 100 MOI of Ad-UG were larger than that in cells transduced with 20 MOI of Ad-UG, which indicates that the amount of induced expression was proportional to the transduced viral burden. Western blot analysis in the bronchioloalveolar lavage (BAL) fluids obtained in a normal person during a bronchoscopy examination showed that UG was constitutively synthesized and secreted at a high level in the normal bronchial epithelium.

양성 대조군으로 사용하였다. A549와 NCI-H157 모두 15.8kDa의 UG 발현이 유도되었으며, 이것은 MOI 값이 높을수록, UG의 발현도가 높았다. (그림 1)

2. UG가 폐암 세포의 PGE₂ 분비능에 미치는 영향

면역 억제에 중요한 역할을 하는 PGE₂의 분비량 변화를 UG가 유도하는지 알아보기 위해, 폐암 세포 배양 상층액을 회수하여 EIA를 시행하였다. COX-2 억제제인 NS-398을 처리하여 COX-2의 생성물인 PGE₂의 분비가 감소하는 것을 확인하였다. 이것은 NS-398 농도에 비례하여 줄어들었다. Ad를 감염시켰을 때 세포주가 분비하는 PGE₂ 농도가 일정한 결과를 보이지 않았다. 따라서 TNF-α로 자극을 하여 PGE₂의 분비를 과유도하였다. TNF-α 자극으로 증가된 PGE₂의 양은 양성 대조군인 Ad만을 감염시킨 것에 비해, UG이 발현되는 세포주에서 감소하였다. Ad를 이용하여 UG을 20 MOI 감염시켰을 때에 비하여 100 MOI 처리하였을 때 PGE₂의 양의 감소가 큰 경향을 보였다. 이것은 A549와 NCI-H157 세포주 모두 같은 양상을 나타내었다. 모든 실험은 3번 반복하였다. (그림 2)

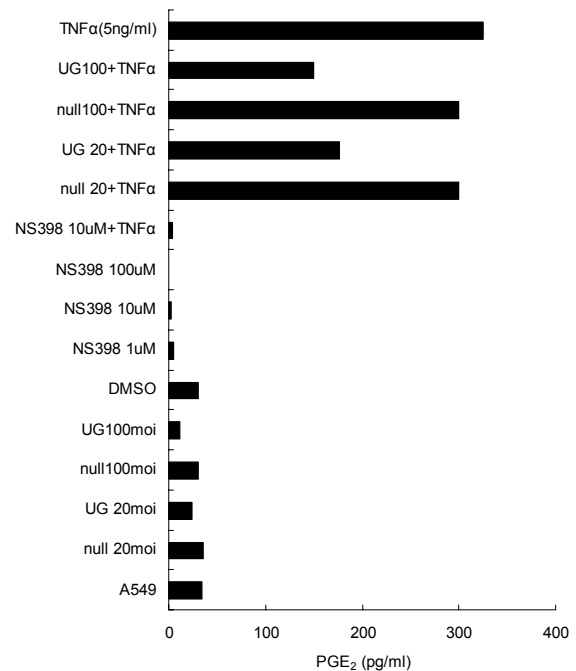


Figure. 2. UG inhibited PGE₂ synthesis and release. - The amount of PGE₂ released into the supernatant of lung cancer cells was determined using an enzyme immunoassay according to the manufacturer's protocol. TNF-α stimulation caused an increase in PGE₂ production. NS-398, a COX-2 inhibitor, reduced the PGE₂ production level in a dose-dependent manner. NS=NS398, N=null and U=UG.

3. 폐암 세포 배양 상층액이 면역 세포에 미치는 영향

폐암 세포 배양 상층액이 면역 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 면역 세포가 분비하는 cytokines에 대한 ELISA를 시행하였다. 각 sample의 cytokines basal level의 차이가 커서 실제 농도를 기입하는 것에는 어려움이 있었다. 따라서 음성 대조군인 RPMI 1640 배지만으로 배양한 면역 세포가 분비하는 cytokines 농도를 1로 정하고, 다른 실험군의 cytokines 농도를 비교하였다. 음성 대조군이 분비하는 cytokines 농도에 비해, 폐암 세포 A549 배양 배지로 키운 면역 세포 cytokines의 분비량이 증가하였다. 이것은 Th1 type cytokines인 IL-2 (그림 3, 1.35배, P<0.004) 와 TNF-α (그림 5, 1.3배, P<0.05)는 물론, Th2 type cytokines으로 알려진 IL-10 (그림 6, 1.48

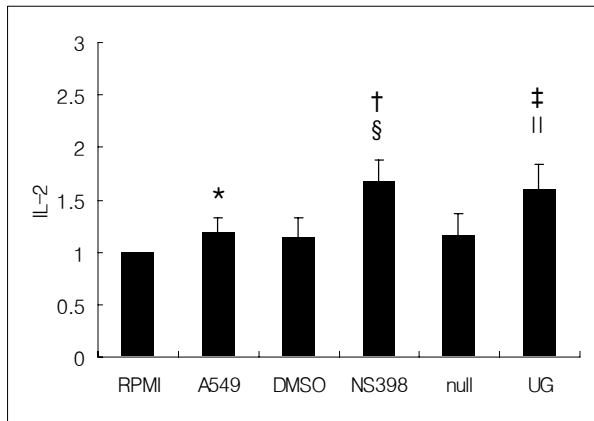


Figure. 3. Mean production of interleukin (IL)-2 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with or without NS-398 or UG. -Data represent PBMC cultured in normal media (RPMI 1640) or tumor supernatant (A549) with or without COX-2 inhibitor (NS398) or UG (uteroglobin). * $P<0.004$, RPMI vs. A549; † $P<0.002$, DMSO vs. NS398; ‡ $P<0.005$, null vs. UG; § $P<0.002$, A549 vs. NS398; || $P<0.004$, A549 vs. UG.

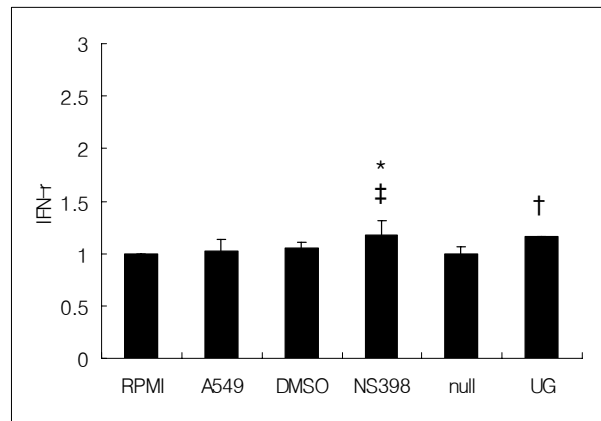


Figure. 4. Mean production of interferon (IFN)- γ by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with or without NS-398 or UG. -Data represent PBMC cultured in normal media (RPMI 1640) or tumor supernatant (A549) with or without COX-2 inhibitor (NS398) or UG (uteroglobin). * $P<0.05$, DMSO vs. NS398; † $P<0.05$, null vs. UG; ‡ $P<0.04$, A549 vs. NS398.

배, $P<0.04$)에서도 증가하는 양상을 보였다. 모든 실험은 3번 반복하였다.

4. UG 발현이 유도된 폐암 세포 배양 상층액이 면역 세포에 미치는 영향

정상적인 면역 체계 반응을 방해하는 PGE_2 의 분비를 저해하는 COX-2 저해제인 NS-398 혹은 UG을 처리 하였을 때, 면역 세포가 분비하는 cytokines의 변화 양상을 ELISA를 이용하여 살펴 보았다. 음성 대조군인 RPMI 1640 배지만으로 배양한 면역 세포가 분비하는 cytokines 농도를 1로 정하고, 다른 실험군의 cytokines 농도를 비교하였다. 폐암 세포주 A549 배양 시 NS-398에 대한 양성 대조군으로는 DMSO를 처리 하였고, Ad-UG의 양성 대조군은 Ad-null을 이용하였다. UG 발현 유도한 A549 세포 배양 상층액 이용 시 면역 세포가 분비하는 IL-2의 농도는 대조군에 비해 증가하였다. (그림 3, 1.55배, $P<0.002$) 이것은 NS-398을 처리한 A549 세포 배양 상층액에서 같은 양상을 보였다. (그림 3, 1.7배, $P<0.005$) IL-2에 비하여 변화량은 작았으나, IFN- γ 역시 UG (그림 4, 1.2배, $P<0.05$) 과 NS-398 (그림 4, 1.25배, $P<0.05$) 처리 시 모두 증가하였다. TNF- α 는 IL-2와 IFN- γ 에 비

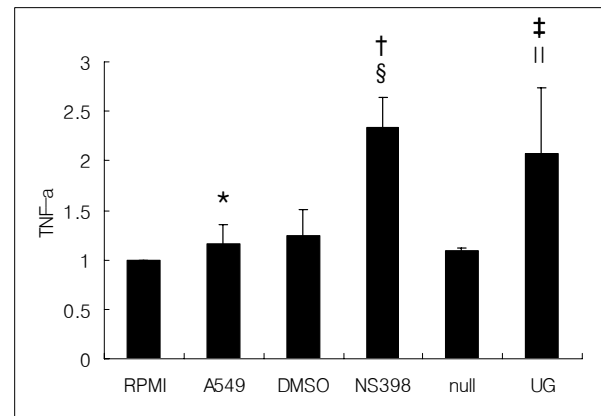


Figure. 5. Mean production of tumor necrosis factor (TNF)- α by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with or without NS-398 or UG. -Data represent PBMC cultured in normal media (RPMI 1640) or tumor supernatant (A549) with or without COX-2 inhibitor (NS398) or UG (uteroglobin). * $P<0.05$, RPMI vs. A549; † $P<0.01$, DMSO vs. NS398; ‡ $P<0.03$, null vs. UG; § $P<0.01$, A549 vs. NS398; || $P<0.02$, A549 vs. UG.

해 변화가 큰 양상을 보였다. UG (그림 5, 2.05배, $P<0.03$) 과 NS-398 (그림 5, 2.35배, $P<0.01$) 모두 A549만을 이용한 것에 비해 분비량이 증가하였다. 즉, A549 배양 상층액에서 증가한 Th1 type cytokines의 양은 폐암 세포주의 PGE_2 분비를 억제하는 UG 혹은 NS-398을 처리 하였을 때 더욱 증가하였다. IL-10과 TGF- β 의 분비량을 측정하여 Th2 type cytokines의

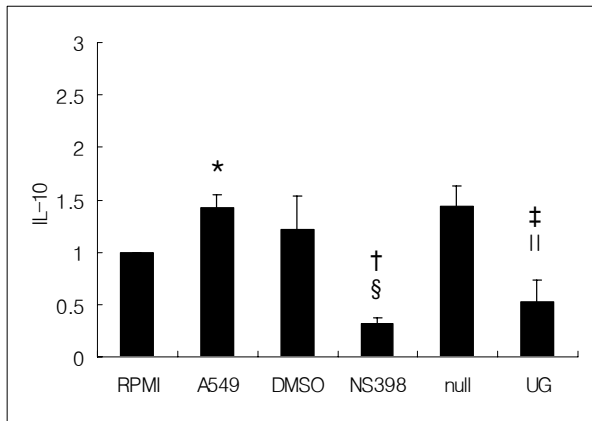


Figure 6. Mean production of interleukin (IL) - 10 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with or without NS-398 or UG. -Data represent PBMC cultured in normal media (RPMI 1640) or tumor supernatant (A549) with or without COX-2 inhibitor (NS398) or UG (uteroglobin). *P<0.04, RPMI vs. A549; †P<0.001, DMSO vs. NS398; ‡P<0.02, null vs. UG; §P<0.001, A549 vs. NS398; ||P<0.002, A549 vs. UG.

변화 양상을 조사하였다. 면역 세포에서 분비하는 IL-10은 UG (그림 6, 0.55배, P<0.02) 혹은 NS-398 (그림 6, 0.3배, P<0.001) 을 처리한 폐암 세포주 배양에서 감소하였다. 이것은 미처리 A549 세포주 배양 상층액 뿐만 아니라, 음성 대조군인 RPMI 1640 배지로 키운 것에 비해서도 매우 감소하였다. IL-10에 비해 변화량이 크지는 않았지만, TGF- β 역시 UG (그림 7, 0.9배, P<0.01) 혹은 NS-398 (그림 7, 0.7배, P<0.001) 처리시 모두 음성 대조군에 비해 면역 세포의 분비량이 감소하였다.

고 찰

암이 발생하고, 전이되는 과정에는 높은 농도의 prostaglandin이 크게 관여하는 것으로 알려져 있다. Prostaglandin은 세포의 성장을 조절함으로써, 암의 성장을 촉진시키고¹⁷, 세포사멸을 억제시키며¹⁸, 혈관 형성을 증가시킨다¹⁹. 또한, Prostaglandin은 암세포의 정상적인 면역 반응을 방해한다²⁰. 암에서 Prostaglandin의 농도가 증가하는 것은 COX-2 활성이 증가하기 때문으로 밝혀진 상태이다. COX-2 억제제는 전 임상 모델과 임상 시험에서 PGE₂를 분비를 줄이는 것에 많이 이용된다²¹⁻²². 본 연구자들은 Ad를 이용하여

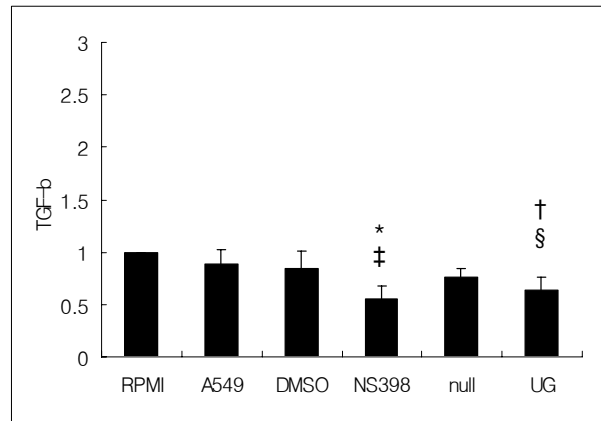


Figure 7. Mean production of tumor growth factor (TGF) - β by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with or without NS-398 or UG. -Data represent PBMC cultured in normal media (RPMI 1640) or tumor supernatant (A549) with or without COX-2 inhibitor (NS398) or UG (uteroglobin). *P<0.001, DMSO vs. NS398; †P<0.01, null vs. UG; ‡P<0.001, A549 vs. NS398; §P<0.005, A549 vs. UG.

폐암 세포주의 UG의 발현을 유도하면, COX-2의 발현이 현저하게 줄어드는 것을 확인한 바 있다. 본 연구에서 폐암 세포주가 분비하는 PGE₂의 농도가 UG에 의해 감소하는 것을 관찰하였다. 이 결과는 uteroglobin이 COX-2의 활성을 억제함으로써, 효소 산물인 PGE₂의 분비량을 억제시킨 것으로 사료된다. 대표적인 COX-2 억제제인 NS-398을 양성 대조군으로 처리하였으며, 예상대로 PGE₂의 농도가 NS-398의 농도에 비례하여 줄어드는 것을 보았다.

Dubinett 등은 PGE₂가 Th1/Th2 cytokines의 균형을 방해하는 것을 밝힌 바 있다²⁹⁻³¹. 이에 기초하여 본 연구에서는 비소세포폐암주가 분비하는 물질이, PBMC 기능에 어떠한 영향을 끼치는지 살펴 보고자 하였다. 또한, UG의 PBMC에 대한 작용을 관찰하였다.

림프구는 암의 면역 반응에 있어 중요한 역할을 한다. 특히 type 1 림프구는 IL-2, IFN- γ 등을 분비함으로써 세포의 면역력을 촉진시킨다. 그에 비해, type 2 림프구는 IL-4, IL-10 등을 생산함으로써 세포의 면역 반응을 억제시킨다^{32,33}. 비소세포폐암주는 IL-10을 다량 분비한다는 것이 알려져 있다³². Dendritic cell을 암세포 배양액으로 키우면, Th 2 type의 cytokines를 과다하게 분비한다¹⁰. 암은 직접적으로 면역 반응을 억제한다기 보다는, 면역 억제 물질의 분비를 촉진하여

여 염증 세포를 유도한다²⁶⁻²⁸. Stapleton 등은 신장암 세포주의 배양액이 PBMC의 Th 2 type의 cytokines의 분비를 촉진시켰지만, IFN- γ , IL-2와 IL-12의 분비량은 측정할 수 없었다고 보고한 바 있다³⁴. 그러나 본 연구에서는 대표적인 비소세포폐암주인 A549의 배양액으로 PBMC를 키운 결과, IL-10과 TGF- β 등의 Th 2 type의 cytokines뿐만 아니라, IL-2, TNF- α 와 IFN- γ 등의 Th 1 type의 cytokines 분비량 역시 증가하였다. 이것은 비소세포폐암주 배양액이 PBMC의 면역 반응을 비정상적으로 유도하기 때문으로 사료된다. 특히, 비소세포폐암주 배양액이 다량 함유하고 있는 Prostaglandin의 영향으로 사료되며 이것은 이전 연구들의 결과와 같은 양상을 보인다.

UG과 COX-2 억제제인 NS-398을 처리한 비소세포폐암주의 배양액은 PBMC의 면역 반응을 정상적으로 유도하였다. 즉, IL-2, TNF- α 와 IFN- γ 등의 Th 1 type의 cytokines 분비량은 더 증가하였고, IL-10과 TGF- β 등의 Th 2 type의 cytokines는 대조군보다 분비량이 현저히 감소하였다. 이것은 UG이 암의 면역 반응을 강화시키기 때문으로 사료된다. 이 면역 반응은 UG이 비소세포폐암주 배양액이 다량 함유하고 있는 Prostaglandin을 억제하는 기전을 통한 이차적 효과라고 사료된다. 이러한 결과로 UG이 면역 조절 기능이 있음을 확인할 수 있었다. 이것은 UG이 폐암 면역 치료법에 있어 응용될 가능성을 보이는 것으로 기대된다.

요 약

연구배경 :

폐암에 대한 거의 대부분의 면역 치료는 실패하였는데, 이는 폐암 자체에 존재하는 면역 억제 기전을 극복하지 못한데 기인하는 것으로 판단된다. Uteroglobin (UG, CCSP)은 항염증 등의 활성을 보인다.

방 법 :

A549에 Ad-UG을 처리하고, 상층액의 PGE₂ 농도를 측정하였다. RPMI 1640, A549 배양액과 UG 혹은 COX-2 억제제인 NS-398을 처리 후 얻은 폐암세포주 상층액으로 PBMC를 배양 후 Th 1 type cytokines과

Th 2 type cytokines 의 농도를 측정하였다.

결 과 :

PGE₂는 UG이 발현되는 세포주에서 감소하였다. 폐암 세포 배양 배지로 키운 면역 세포의 cytokines가 증가하는 양상을 보였으나, UG등을 처리한 비소세포폐암주의 배양액은 PBMC의 면역 반응을 정상적으로 유도하였다.

결 론 :

비소세포폐암주 배양액은 PBMC의 면역 반응을 비정상적으로 유도하지만, UG은 PGE₂의 분비를 억제함으로써, PBMC의 면역 반응을 강화시킨다.

참 고 문 헌

1. Evans R. Macrophage requirement for growth of a murine fibrosarcoma. *Br J Cancer* 1978;37:1086-9.
2. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:4625-9.
3. Del Prete G, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th 1 clones is limited by their cytolytic capacity. *J Exp Med* 1991;174:809-13.
4. Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunerwald P. et al Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta 1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 1998; 77:7-12.
5. Ren Z, Pang G, Clancy R. Gastric carcinoma: T cell response and vascularity. Shift of the gastric T-cell response in gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:142-8.
6. Hasturk S, Kemp B, Kalapurakal SK, Kurie JM, Hong WK, Lee JS. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2002;94: 1023-31.
7. Blaine SA, Wick M, Dessev C, Nemenoff RA. Induction of cPLA2 in lung epithelial cells and non-small cell lung cancer is mediated by Sp1 and c-Jun. *J Biol Chem*. 2001;276:42737-43.
8. Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, Bosca L, Martin-Sanz P. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology*. 2001;33:

- 860-7.
9. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med.* 2002;8:289-93.
10. Sharma S, Stolina M, Yang SC, Baratelli F, Lin JF, Dubinett SM. et al. Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res.* 2003;9:961-8.
11. Peri A, Cordella-Miele E, Miele L, Mukherjee AB. Tissue-specific expression of the gene coding for human Clara cell 10-kD protein, a phospholipase A2-inhibitory protein. *J Clin Invest* 1993;92:2099-109.
12. Mukherjee AB, Kundu GC and Mantile-Selvaggi G. Suan CJ Mandal AK Chaltopadhyay s, et al. Uteroglobin: a novel cytokine? *Cell Mol. Life Sci.* 1999;55:771-87.
13. Miele L, Cordella-Miele E, Mukherjee AB. Uteroglobin: structure, molecular biology, and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor *Endocr Rev.* 1987;8:474-90.
14. Levin SW, Butler JD, Schumacher UK, Wingman PD, Mukherjee AB. Uteroglobin inhibits phospholipase A2 activity. *Life Sci.* 1986;38:1813-9.
15. Zhang Z, Zimonjic DB, Popescu NC, Wang N, Geruard DS, Stone EM, et al. Human uteroglobin gene: structure, subchromosomal localization, and polymorphism. *DNA Cell Biol.* 1997;16:73-83.
16. Mukherjee AB, Ulane RE, Agrawal AK. Role of uteroglobin and transglutaminase in masking the antigenicity of implanting rabbit embryos. *Am J Reprod Immunol.* 1982;2:135-41.
17. Sheng H, Shao J, Morrow J D, Beauchamp R D, DuBois R N, Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58:362 - 6.
18. Tsujii M, DuBois R N, Alterations in cellular Adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995;83:493 - 501.
19. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois R N, Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998;93:705 - 16.
20. Plescia O J, Smith A H, Grinwich K, Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1975; 72:1848 - 51.
21. Lala P K, Elkashab M, Kerbel R S, Parhar R S. Cure of human melanoma lung metastases in nude mice with chronic indomethacin therapy combined with multiple rounds of IL-2: Characteristics of killer cells generated *in situ*. *Int Immunol.* 1990; 2:1149-58.
22. Mertens W C, Bramwell V H, Banerjee D, Gwardry-Sridhar F, Lala P K, et al. Sustained indomethacin and ranitidine with intermittent continuous infusion Interleukin-2 in advanced malignant melanoma: a phase II study. *Clin Oncol R coll Radiol* 1993;5:107-13.
23. Smith D R, Kunkel SL, Burdick MD, Wuke CA, Owinger MB, Whyte RI, et al. Strieter. Production of Interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am J Pathol.* 1994;145:18-25.
24. Lee, P., M. Huang, J. Wang, S. Sharma and S. M. Dubinett. TGF- β specific antisense phosphorothioate oligonucleotides abrogate lung tumor-associated immunosuppression. *J. Immunol.* 1994;152:3222-30.
25. Funahashi A, Harland RW, LeFever A. Association of increased prostaglandin E2 content in bronchoalveolar lavage fluid and intrathoracic malignancy. *Chest.* 1994;106:166-72.
26. Alleva DG, Burger CJ, Elgert KD. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *J Immunol.* 1994; 153:1674-86.
27. Young MR, Wright MA, Matthews JP, Malik I, Prechel M. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide. *J Immunol.* 1996;156:1916-22.
28. Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol.* 1995;154: 3383-90.
29. Huang M, Sharma S., Mao J., T. And Dubinett S. M. Non-swallow cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J Immunol.* 1996;157:5512-20.
30. van der Pouw Kraan TC, Boeijs LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med.* 1995;181:775-9.
31. Strassmann G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med.* 1994;180:2365-70.

32. Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res.* 1995;55:3847-53.
 33. Yamamura M, Modlin RL, Ohmen JD, Moy RL. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest.* 1993;91:1005-10.
 34. Smyth GP, Stapleton PP, Barden CB, Mestre JR, Freeman TA, Duff MD, et al. Renal cell carcinoma induces prostaglandin E2 and T-helper type 2 cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *Ann Surg Oncol.* 2003; 10:455-62.
 35. Lee JC, Park KH, Han SJ, Yoo CG, Lee CT, Han SK, et al. Inhibitory effect of Ad- uteroglobin transduction on the growth of lung cancer cell lines. *Cancer Gene Therapy.* 2003;10:287-93.
-