

내독소로 전처치한 쥐 폐포상피에서 HSP70 유도가 추가 내독소 자극에 따른 IL-6 생성능 및 세포생존도에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

이정미, 김진숙, 김영균, 김승준, 이숙영, 권순석, 박성학

Effects of Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction after Lipopolysaccharide Exposure on the IL-6 Production and the Cell Viability after Subsequent Lipopolysaccharide Challenge in Murine Alveolar Epithelial Cells

Jung Mi Lee, Jin Sook Kim, Young Kyoan Kim, M.D., Seung Joon Kim, M.D., Sook Young Lee, M.D., Soon Seog Kwon, M.D., Sung Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background and Aims : Pre-induction of heat shock protein 70 (HSP70) is known to effectively attenuate the lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in lung tissue. However, it is unclear if HSP70 induction after LPS exposure attenuates the subsequent LPS-induced inflammatory response in alveolar epithelial cells. This study examined the effects of HSP70 induction after LPS exposure on the IL-6 production and the cell viability after a subsequent LPS challenge in murine alveolar epithelial cells, and investigated whether or not HSP70 itself may be involved in those effects.

Methods : Murine alveolar epithelial cells were cultured and divided into two groups; the Non-Pre-LPS group without a LPS pre-treatment and the Pre-LPS group with a LPS pre-treatment. Each group was subdivided into the following four subgroups: subgroup C (control), subgroup Q (quercetin), subgroup HSP70 (HSP70 induction), and subgroup HSP70-Inh (HSP70 inhibition). HSP70 expression, which was induced by sodium arsenite and inhibited by quercetin, was analyzed by western blot analysis. The IL-6 levels in the culture supernatant were measured by ELISA, and the cell viability was measured using a simplified MTT assay.

Results : The IL-6 levels were lower in subgroup HSP70 than in subgroup C ($P<0.01$), and were higher in subgroup HSP70-Inh than in subgroup HSP70 in both the Non-Pre-LPS and Pre-LPS groups ($P<0.05$, $P<0.01$). The cell viability tended to decrease in the Pre-LPS group compared with the Non-Pre-LPS group. While the cell viability was higher in subgroups Q, HSP70, and HSP70-Inh than in subgroup C in the Non-Pre-LPS group ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$), there was no difference in cell viability among the subgroups in the Pre-LPS group.

Conclusion : HSP70 induction after a LPS pre-treatment in murine alveolar epithelial cells inhibits the subsequent LPS-induced IL-6 production without affecting the cell viability, and HSP70 by itself may play an important role in this process. (*Tuberc Respir Dis 2005; 58: 375-384*)

Key words : Acute lung injury, Lipopolysaccharides, Heat shock

서 론

급성 폐손상(acute lung injury, ALI)은 여러 원인에 의해 발생할 수 있지만 호흡기감염이 가장 흔한 원인으로 알려져 있으며, 특히 그람음성 세균으로부터

분비되는 내독소(lipopolysaccharide, LPS)는 호중구에 대한 화학주성을 나타내어 폐조직 내 호중구 침윤을 일으키고 결과적으로 심각한 LPS 유도 ALI를 유발한다. 이와 같은 LPS 유도 ALI는 조기에 적절한 치료가 되지 않을 경우, 폐포상피세포 방어벽의 손상 정도에 따라 예후가 극히 불량한 급성호흡부전증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)으로 이행될 수 있다¹. LPS 유도 ALI가 ARDS로 이행되는 기전에는 LPS 유도 염증반응에 상응하는 체내 방어기전의 불균형이 결정적인 역할을 하는 것으로 추측되고 있는데, 이와 같은 체내 방어기전을 수행하는 물질로는 항단백효소, 항산화물질, 항염증 시토카인(IL-10,

Address for correspondence : **Sung Hak Park, M.D.**
Department of Internal Medicine, Kangnam St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-Dong, Seocho-Gu, Seoul, 137-040, Korea
Phone : 02-590-1563 Fax : 02-596-2158
E-mail : cmcpsh@catholic.ac.kr
Received : Dec. 20. 2004
Accepted : Feb. 23. 2005

IL-1 receptor antagonist 등) 및 열충격단백(heat shock protein, HSP) 등이 있다.

열충격단백들은 일시적인 열충격이나 sodium arsenite (SA), 저산소증, 대사성 스트레스 등에 의해 유도되며², 그 중에서도 분자량이 70 kDa인 HSP70이 가장 대표적이다. 다양한 LPS 유도 ALI 실험모델에서 SA 처치로 미리 HSP70을 유도하고 일정시간이 경과한 후에 LPS를 투여하면 폐조직세포로부터 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 전구염증 시토카인 분비 및 기타 LPS 유도 염증반응들이 현저하게 억제되는 것으로 알려져 있다³⁻⁵. 하지만 실제 임상에서는 LPS 유도 ALI가 발생하기 전에 미리 HSP70을 유도하는 경우는 없기 때문에 이와 같은 연구결과들을 임상에 적용하는데 어려움이 따른다. 따라서 HSP70 유도를 실제 임상에 적용하기 위해서는 세포 또는 동물들을 LPS로 미리 전처리 한 후에 HSP70 유도를 시도하고 일정시간이 경과하여 추가로 LPS 자극을 하였을 때에도 LPS 유도 염증 반응이 효과적으로 억제되는 지를 관찰하는 연구가 선행되어야 한다. 이에 본 연구에서는 쥐의 폐포상피 세포를 LPS로 미리 전처리한 후 HSP70 유도를 시도 하였을 때 일정시간이 경과한 후 추가 LPS 자극에 따른 IL-6 생성능과 세포생존도에 어떤 영향을 미치는 지와 그 이전에 HSP70 자체가 관여하는지를 관찰하였다.

방 법

1. 폐포상피세포 배양

한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받은 쥐의

제2형 폐포상피 세포주인 L2 세포를 L-glutamine(300 mg/L), 10% FBS(JRH Biosciences, Lenexa, KS), 15mM HEPES(GIBCO, Carlsbad, CA), sodium bicarbonate(2000 mg/L, GIBCO) 및 항생제(penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml, GIBCO)가 첨가된 RPMI 1640(GIBCO) 배지로 75T flask에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 세포생존도 측정을 위해서는 96-well culture plate에 well당 1×10^4 세포를, HSP70 발현과 IL-6 생성능 측정을 위해서는 6-well culture plate에 well당 2.5×10^5 세포를 각각 분주하여 밤새 배양한 후에 사용하였다. 모든 실험에는 계대배양 3회에서 8회 사이의 세포들만 사용하였다.

2. 실험군 및 시료준비

우선 실험군을 Table 1에서와 같이 크게 LPS 비치군(Non-Pre-LPS군)과 LPS 전처리군(Pre-LPS군)으로 구분한 후, 각 군을 다시 대조군(C군), quercetin 군(Q군), HSP70유도군(HSP70군), HSP70억제군(HSP70-Inh군)으로 세분하였다. 마지막에 추가 LPS 처치를 한 후에 배양상층액은 수거하여 IL-6 측정을 위해 -70°C 에 보관하고, 세포는 단백분해효소 억제제(leupeptin, aprotinin, phenylmethanesulfonyl fluoride, Roche Applied science, Mannheim, Germany)가 포함된 RIPA 용액 200 μ l를 첨가하여 용해시킨 후 Dismembrator(Sorinifier 250, Branson, Danbury, CT)로 초음파처리 하여 HSP70 발현 측정을 위해 -20°C 에 보관하였다. LPS(E. Coli serotype 0127-B8, Sigma-Aldrich Co., ST. LOUIS, MO)의 농도는 1 μ g/ml, 처치시간은 4시간으로 하였다.

Table 1. Experimental protocol

Main group	Pre-Tx	Sub-group	Conditioning	Recovery	Post-Tx
Non-Pre-LPS	CM 4hr	C	CM 6hr + CM 2hr	CM 18hr	LPS 4hr
		Q	Q 6hr + CM 2hr		
		HSP70	CM 6hr + SA 2hr		
		HSP70-Inh	Q 6hr + SA 2hr		
Pre-LPS	LPS 4hr	C	CM 6hr + CM 2hr	CM 18hr	LPS 4hr
		Q	Q 6hr + CM 2hr		
		HSP70	CM 6hr + SA 2hr		
		HSP70-Inh	Q 6hr + SA 2hr		

LPS: lipopolysaccharide, Tx: treatment, CM: culture medium, C: control, Q: quercetin, HSP70: HSP70 induction, HSP70-Inh: HSP70 inhibition, SA: sodium arsenite

3. 세포생존도 측정

96-well plate에 배양된 L2 세포를 정해진 조건대로 처리하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 보다 단순화시킨 Cell Counting Kit-8(Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan)을 이용하여 제품설명서대로 조작한 후 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 실험군의 세포생존도는 대조군 흡광도에 대한 상대적인 백분율(% of control)로 환산하여 표시하였다.

4. HSP70 유도³

HSP70 유도는 sodium arsenite(SA, Sigma-Aldrich)로 하였는데, 우선 96-well plate에 배양된 L2 세포를 다양한 농도(25, 50, 75, 100 μ M)의 SA로 2시간 처리하여 24시간 후 세포생존도를 측정함으로써 세포생존도에 영향을 미치지 않는 SA 농도를 확인하였다. 이와 같이 확인된 SA 농도로 6-well plate에 배양된 L2 세포를 2시간 처리하여 24시간 후 HSP70 발현을 확인함으로써 세포생존도에 영향을 미치지 않으면서 충분한 HSP70 발현을 유도하는 SA의 최종 적정농도를 결정하였다. 마지막으로 6-well plate에 배양된 L2 세포를 최종 적정농도의 SA로 2시간 처리한 후 시간별(0, 2, 6, 8, 12, 18, 24, 48 h)로 검체를 수거하여 HSP70 발현이 최대로 유도되는 시간을 결정하였다.

5. HSP70 발현의 측정

HSP70 발현은 western blot으로 측정하였다. 요약하면 Coomassie plus protein assay reagent(Pierce, Rockford, IL)로 각 검체의 단백농도를 미리 측정한 후, 8% 겔(gel)에 lane당 각 검체 50 μ g씩을 분주하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하고, 겔을 수거하여 PVDF membrane(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)으로 단백질을 이동시켰다. 그 다음 PVDF membrane을 수거하여 10% skim milk(Difco, Sparks, MD)로 15분간 처리하여 비 특이결합을 차단

시킨 뒤, 1:5000으로 희석된 rabbit anti-human HSP70 항체(SPA-812, Stressgen, Victoria, Canada)를 일차 항체로 1시간 반응시키고, 1:5000로 희석된 goat anti-rabbit IgG-HRP(Jackson, West Grove, PA)를 이차 항체로 다시 30분간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence(ECL, Amersham Pharmacia)를 이용하여 필름(Amersham Pharmacia)에 감광시켜 HSP70 발현을 관찰하였다. 현상된 밴드의 강도를 densitometer로 측정하였고 각 밴드의 양적 변화는 positive control의 대한 상대적인 백분율(% of control)로 환산하여 서로 비교하였다.

6. HSP70 억제⁶

HSP70 억제는 quercetin(Sigma-Aldrich)으로 하였는데, quercetin은 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich)에 녹여 사용하였으며, 최종 실험에 사용된 quercetin 용액의 DMSO 함량은 0.05% 이었다. 우선 96-well plate에 배양된 L2 세포를 다양한 농도의 quercetin(100, 150, 200 μ M)으로 6시간 전처리한 다음, SA로 2시간 처리하고 18시간 후 세포생존도를 측정함으로써 세포생존도에 영향을 미치지 않는 quercetin 농도를 확인하였다. 이와 같이 확인된 quercetin 농도로 6-well plate에 배양된 L2 세포를 6시간 전처리한 다음 SA로 2시간 처리하고 18시간 후 HSP70 발현을 확인함으로써 세포생존도에 영향을 미치지 않으면서 HSP70을 효과적으로 억제하는 quercetin의 최종 적정농도를 결정하였다.

7. IL-6 생성능 측정

배양상층액 내의 IL-6 농도는 ELISA kit(Biosource Corp, Camarillo, CA)를 이용하여 제조사의 지시된 방법대로 측정하였으며, kit의 최저 측정한계는 8 pg/ml 이었다.

8. 통계

모든 변수는 평균 \pm 표준오차로 나타냈다. 각 변수

간의 통계적 검정은 SPSS 프로그램의 independent sample T-test를 이용하였고, P 값이 0.05 미만인 경우를 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1. HSP70 유도에 필요한 SA 적정농도

(1) SA 농도별 세포생존도

L2 세포를 25, 50, 75, 100 μM 의 SA 농도로 2시간 처리하여 24시간 후, 대조군에 대한 상대적인 세포생존도(%)를 관찰한 결과, 75, 100 μM 의 SA 농도에서 세포생존도가 유의하게 감소하였다(73.7 ± 3.0 , 59 ± 4.1 , $P < 0.01$, Figure 1).

(2) SA 농도별 및 SA 처리 후 시간별 HSP70 발현

L2 세포를 세포생존도에 영향을 미치지 않는 25, 50 μM 의 SA 농도로 2시간 처리하여 24시간 후 HSP70 발현에 대한 western blot을 시행한 결과, 25 μM 보다 50 μM 의 SA 농도에서 HSP70 발현이 현저히 증가하였으며 (Figure 2A), 50 μM 의 SA 농도로 2시간 처리

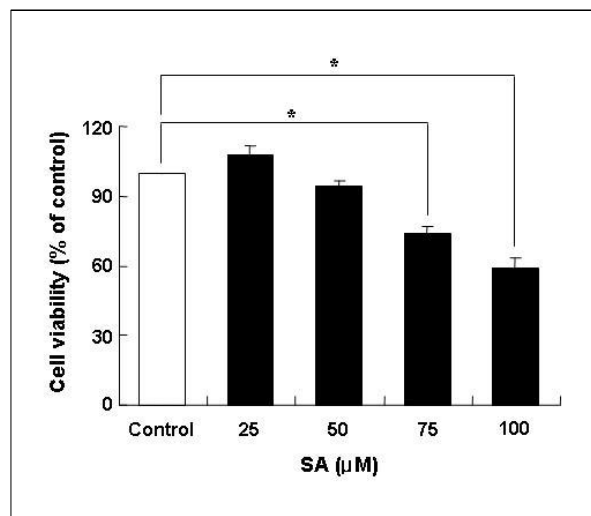


Figure 1. Effects of sodium arsenite on the viability of L2 cells.

The cell viability of L2 cells treated with various SA concentrations for 2h followed by a recovery period of 24h was measured. The data is representative of three separate and independent experiments and is expressed as a Mean \pm SEM. SA: sodium arsenite, Control: untreated cells.

* $P < 0.01$ vs. control

한 후 HSP70이 최대로 발현되는 시간은 18시간 이었다(Figure 2B).

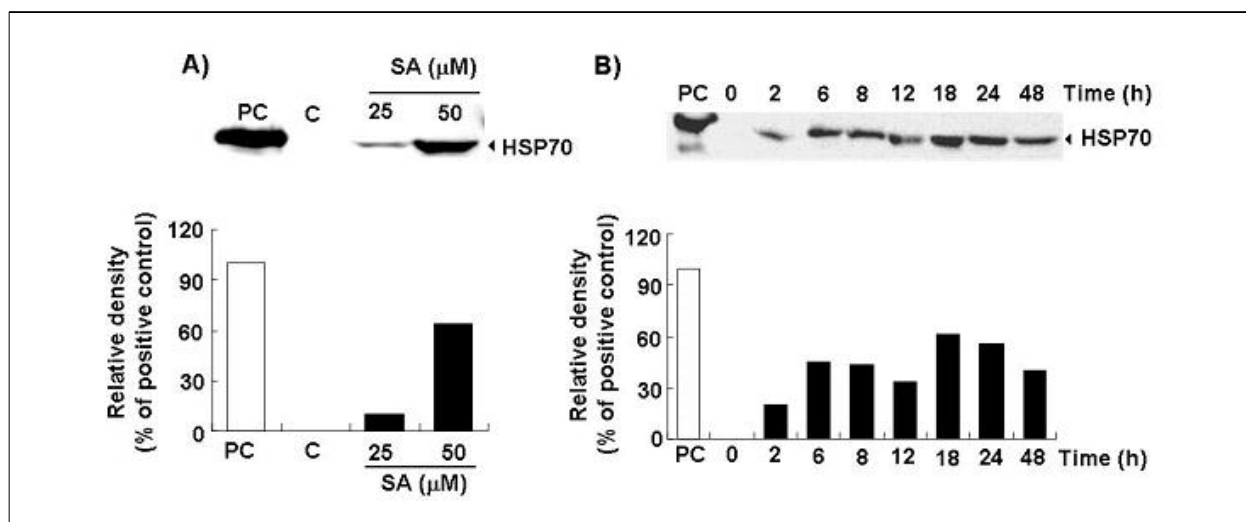


Figure 2. SA-induced HSP70 expression from L2 cells.

(A) SA dose response for HSP70 induction. Western blot analysis for HSP70 expression was performed on L2 cells treated with 25 or 50 μM of SA for 2h followed by recovery for 24h. C: control, untreated cells. (B) Time course of SA-induced HSP70 expression. Western blot analysis for HSP70 expression was performed on L2 cells treated with 50 μM of SA for 2h followed by a predetermined recovery period. The data is representative of three separate and independent experiments. PC: positive control for recombinant human HSP70

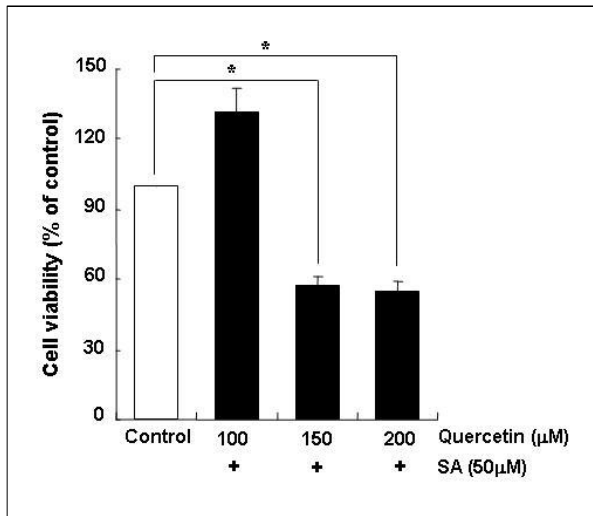


Figure 3. Effects of quercetin on the cell viability of L2 cells.

The cell viability of L2 cells treated with various concentrations of quercetin for 6h followed by SA treatment for 2h with a recovery period of 18h was determined. The data is representative of three separate and independent experiments and is expressed as a Mean \pm SEM. Control: untreated cells. * P <0.01 vs. control

2. HSP70 억제에 필요한 quercetin 적정농도

(1) Quercetin 농도별 세포생존도

L2 세포를 100, 150, 200 μ M의 quercetin 농도로 6 시간 전처치한 다음 SA로 2시간 처치하고 18시간 후, 대조군에 대한 상대적인 세포생존도(%)를 관찰한 결과 150 및 200 μ M의 quercetin 농도에서 세포생존도가 유의하게 감소하였다 (57 ± 4.1 , 55.1 ± 3.8 , P <0.01, Figure 3).

(2) Quercetin에 의한 HSP70 억제

L2 세포를 세포생존도에 영향을 미치지 않는 100 μ M의 quercetin 농도로 6시간 전처치한 다음 SA로 2시간 처치하고 18시간 후, HSP70 발현에 대한 western blot을 시행한 결과, quercetin 전처치를 하지 않은 대조군에 비해 HSP70 발현이 현저하게 억제되었다 (Figure 4).

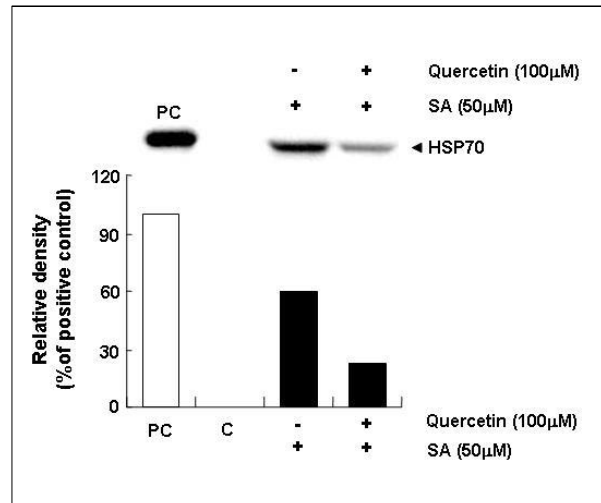


Figure 4. Effects of quercetin on the SA-induced HSP70 expression from L2 cells. Western blot analysis for HSP70 expression was performed on L2 cells treated with or without 100 μ M quercetin for 6h followed by a treatment with 50 μ M SA for 2h with a recovery period of 18h. The data is representative of three separate and independent experiments. C: control, untreated cells

3. LPS 전처치가 HSP70 유도 혹은 HSP70 억제에 미치는 영향

LPS 전처치는 SA에 의한 HSP70 유도 및 quercetin에 의한 HSP70 억제에 영향을 미치지 않았으며, LPS 전처치 여부에 상관없이 C군 및 Q군에서는 HSP70 발현이 관찰되지 않았다(Figure 5).

4. LPS 전처치, HSP70 유도 혹은 HSP70 억제가 세포생존도에 미치는 영향

각 실험군의 세포생존도를 Non-Pre-LPS군의 C군에 대한 상대적인 백분율로 환산하였을 때, Non-Pre-LPS군에서는 Q군, HSP70군, HSP70-Inh군 모두가 C군에 비해 세포생존도가 유의하게 증가하였지만 (100 vs 108.8 ± 1.8 , 120.7 ± 2.5 , 122.3 ± 4.5 , P <0.05, P <0.05, P <0.01), Pre-LPS군에서는 C군과 Q군의 세포생존도가 유의하게 감소하였으며(100 vs 58.2 ± 4.3 ,

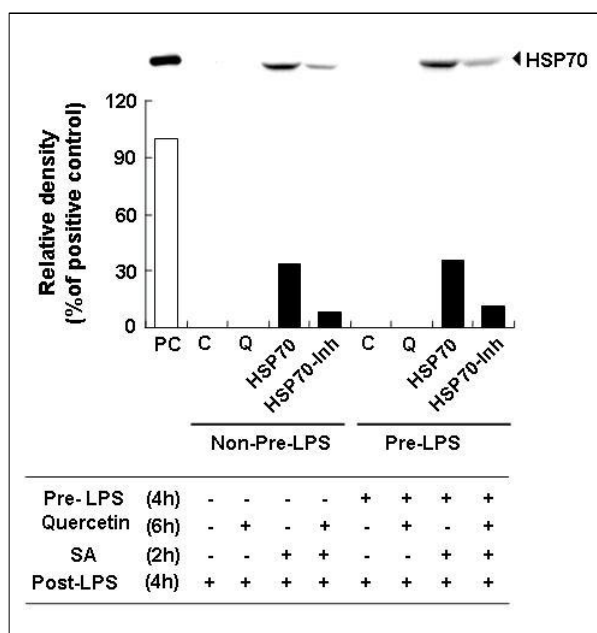


Figure 5. Effects of LPS pre-treatment on HSP70 induction or the inhibition of HSP70 expression of L2 cells after a subsequent LPS challenge.

Western blot analysis was performed on L2 cells treated using the experimental protocol described in the figure (Pre-LPS and Post-LPS: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Quercetin: 100 μM , SA: 50 μM). The data is representative of three separate and independent experiments. QC: quercetin control, HSP70-Inh: inhibition of HSP70 induction

68.9 \pm 6.1, $P<0.05$), HSP70군과 HSP70-Inh군에서도 통계적으로 유의하지는 않았지만 세포생존도가 감소하는 경향을 보였다(80.3 \pm 8.5, 79 \pm 6.6, $P>0.05$). 하지만 Pre-LPS군의 각 실험군 간에는 세포생존도에 차이를 보이지 않았다(Figure 6).

5. LPS 전처리 후 HSP70 유도 및 HSP70 억제제 추가 LPS 자극에 의한 IL-6 생성능에 미치는 영향

추가 LPS 자극에 의한 IL-6 생성능(pg/mL)은 Non-Pre-LPS군에서는 C군에 비해 Q군 및 HSP70군 모두가 유의하게 감소한 반면(147.1 \pm 11.8 vs 91.3 \pm 4.6, 54.4 \pm 3.5, $P<0.01$), Pre-LPS군에서는 C군에 비해 HSP70군만 유의하게 감소하였고, Q군은 차이가 없었다(123.7 \pm 6.1 vs 73.5 \pm 2.6, 124.8 \pm 7.6, $P<0.01$, $P>0.05$). 또한 Non-Pre-LPS군과 Pre-LPS군 모두에서 HSP70군에 비해 HSP70-Inh군의 IL-6 생성능이 유의하게 높

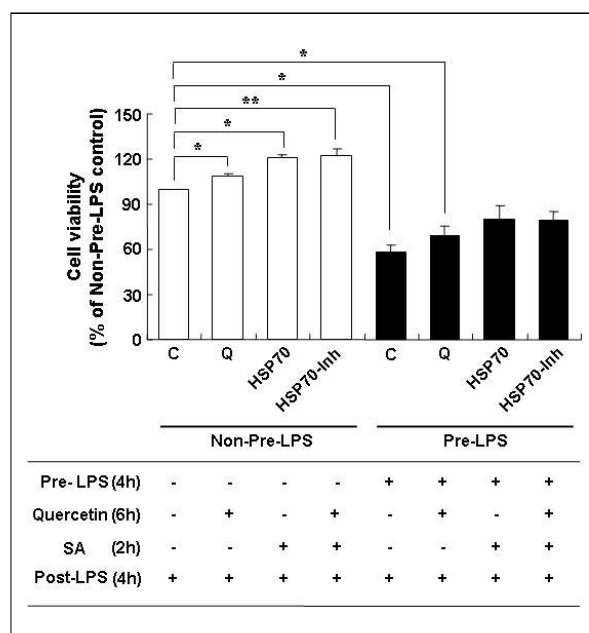


Figure 6. Effects of a LPS pre-treatment, HSP70 induction or inhibition of HSP70 induction on the cell viability of L2 cells after a subsequent LPS challenge. The cell viability was measured on L2 cells treated using the experimental protocol described in the figure (Pre-LPS and Post-LPS: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Quercetin: 100 μM , SA: 50 μM). The data is representative of three separate and independent experiments and is expressed as a Mean \pm SEM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$

았다(54.4 \pm 3.5 vs 68.1 \pm 2.9, 73.5 \pm 2.6 vs 113.4 \pm 4.3, $P<0.05$, $P<0.01$, Figure 7).

고 찰

LPS 유도 염증반응에서 IL-6의 역할에 대해서는 항염증작용을 한다는 보고들^{7,8}과 강력한 호중구 화학주성인자로 작용하여 오히려 염증반응을 증대시킨다는 보고들이^{9,10} 있어 아직 논란이 되고 있다. 한편 폐포상피세포는 LPS 유도 염증반응의 주된 표적세포(target cells)이기도 하지만 IL-6을 분비하는 작동세포(effector cells)로도 작용하기 때문에 LPS 유도 ALI의 병태생리에 매우 중요한 비중을 차지하고 있다¹¹. 이와 같은 이유로 본 연구에서는 쥐의 제2형 폐포상피세포인 L2 세포를 실험대상으로 하였으며, 주된 관찰 항목을 IL-6 생성능과 세포생존도로 정하였다.

HSP들은 molecular chaperone으로서 세포가 스트

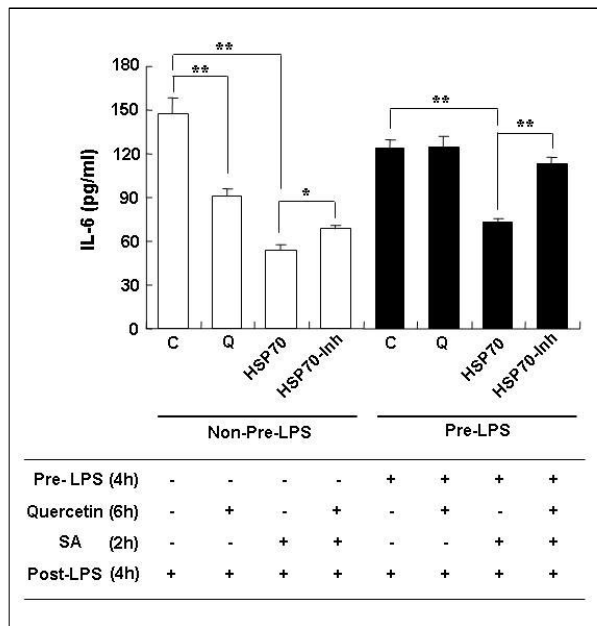


Figure 7. Effects of LPS pre-treatment, HSP70 induction or the inhibition of HSP70 induction on IL-6 production of L2 cells after a subsequent LPS challenge. The IL-6 levels were measured from the culture supernatant of L2 cells treated with the experimental protocol described in the figure using ELISA (Pre-LPS and Post-LPS: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Quercetin: 100 μM , SA: 50 μM). The data is representative of three separate and independent experiments and is expressed as a Mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

레스를 받는 동안 세포의 생존을 향상시키는 역할을 하며, 이 중에서도 HSP70이 가장 중요하고 특징적인 chaperone으로 알려져 있다^{12,13}. 최근까지 다양한 시험관내 혹은 동물실험으로부터 HSP70 유도가 LPS 유도 염증반응을 효과적으로 완화시킨다는 연구결과들이 꾸준히 보고되고 있지만, 아직 그러한 연구결과들이 실제 임상에 적용되지는 못하고 있는데, 그 이유는 대부분의 연구들이 세포나 동물들에게 LPS 투여 전^{3,14,15} 또는 LPS 투여 직후에¹⁶ HSP70 유도를 시도하였기 때문이다. 하지만 실제 임상에서 환자가 LPS에 노출되기 전이나 LPS에 노출된 직후에 HSP70 유도를 시도하는 경우는 거의 있을 수가 없다. 따라서 HSP70 유도를 실제 임상에 적용하기 위해서는 세포나 동물들을 LPS로 미리 전처리 하거나 LPS에 지속적으로 노출시킨 상태에서 HSP70 유도를 시도하여 일정시간이 경과한 후에 추가로 LPS 자극을 하였을 때 LPS 유도 염증반응에 어떤 변화가 나타나는지를

관찰하는 연구가 선행되어야 한다. 이에 본 연구에서는 L2 세포를 LPS로 4시간 미리 전처리한 후에 HSP70 유도를 시도하고 18시간 후에 같은 농도의 LPS로 다시 자극하였을 때 LPS 유도 IL-6 생성능 및 세포생존도가 대조군과 어떤 차이를 보이는지를 관찰하였다. 그 결과 L2 세포에서 HSP70 유도를 하였을 때 LPS 전처리 여부에 상관없이 LPS 유도 IL-6 생성능은 현저히 억제되고, 세포생존도는 LPS 전처리를 하지 않은 경우에는 증가한 반면, LPS 전처리를 한 경우에는 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 연구의 결과는 폐포상피세포가 LPS에 상당시간 노출된 후에 HSP70 유도를 시도하더라도 세포생존도에는 영향을 미치지 않으면서 LPS 유도 IL-6 생성능을 효과적으로 완화시킬 수 있음을 시사한다.

HSP70 유도 후에 나타나는 LPS 유도 염증반응의 억제기전에 HSP70 자체가 관여하는 지에 대해서는 아직 논란이 되고 있지만^{17,18}, 본 연구에서 LPS 전처리 여부와는 무관하게 L2세포에서 SA로 HSP70 유도를 시도하면 대조군에 비해 LPS 유도 IL-6 생성능이 유의하게 감소하였고, quercetin으로 HSP70 유도를 억제하면 HSP70 유도 시에 비해 LPS 유도 IL-6 생성능이 유의하게 다시 증가하였던 것으로 보아, HSP70 자체가 L2 세포의 LPS 유도 IL-6 생성능 조절에 관여하는 것으로 추측된다. 한편 Hershtko 등은¹⁰ 사람의 장 상피세포에서 SA 자체가 IL-1 β 유도 IL-6 생성능을 억제시키는 효과를 지닌다고 보고한 바 있다.

HSP70이 LPS 유도 염증반응을 억제하는 기전에 대해서는 아직 연구 중에 있으나 현재까지는 전구염증 시토카인 분비 억제, 세포자멸사(apoptosis) 억제¹⁹, 유도산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 억제²⁰, inhibitory protein of nuclear factor-kappa B (I- κ B)의 안정화를 통한 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)의 핵 전위(nuclear translocation) 억제²¹ 등이 알려져 있다. 본 연구의 결과는 이 중에서 HSP70이 LPS 유도 전구염증 시토카인 분비를 억제한다는 기전에 중요한 역할을 한다는 가설을 뒷받침하는 소견으로 생각된다.

그리고 본 연구에서 LPS 전처리를 받은 L2 세포들은 LPS 전처리를 받지 않은 세포들에 비해 추가 LPS

자극 후에 세포생존도가 전반적으로 감소하는 양상을 보였는데, 이는 LPS 자극에 미리 노출된 폐포상피세포는 추가 LPS 자극에 의해 더욱 쉽게 손상을 받을 수 있음을 의미하는 소견으로 생각된다. 한편 HSP70 유도에 흔히 사용되는 SA는 그 자체가 세포독성작용을 지니는 것으로 알려져 있으나²², 본 연구에서는 세포생존도에 영향을 미치지 않으면서 충분한 HSP70 발현을 유도할 수 있는 SA의 적정농도를 미리 결정하여 사용하였기 때문에 SA의 세포독성작용이 실험결과에 어떤 영향을 미쳤을 가능성은 거의 없을 것으로 생각된다. 실제로 본 실험에서 LPS 전처치를 받지 않은 L2 세포에서는 SA로 처리한 HSP70 유도군이 대조군에 비해 LPS 자극 후의 세포생존도가 오히려 증가하였으며, LPS 전처치를 받은 L2세포에서도 SA 처리에 의한 HSP70 유도가 추가 LPS 자극 후의 세포생존도에 영향을 미치지 않았다.

또한 본 연구에서 HSP70을 억제하기 위해 사용한 quercetin은 일종의 flavonoid로서 HSP70 합성 억제 기능²³ 외에도 항산화 및 항염증 작용을 하는 것으로 알려져 있다²⁴. 하지만 본 연구를 통하여 L2 세포에 quercetin을 고농도로 투여하면 그 자체에 의한 세포독성작용이 나타날 수도 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 관찰된 또 한 가지 흥미로운 결과는 LPS 전처치를 받지 않은 L2 세포에 적정농도의 quercetin을 투여하면 LPS 자극 후 IL-6 생성능을 유의하게 억제하는 효과가 있었으나, LPS 전처치를 받은 L2 세포의 경우에는 그러한 효과가 뚜렷하지 않았다는 것이다. 이와 관련하여 Manjeet 와 Ghosh는²⁵ 본 연구결과와 유사하게 쥐의 대식세포에서 LPS만 처리한 군에 비해서 LPS와 동시에 quercetin을 투여한 군이나 quercetin으로 미리 처리한 후 LPS를 투여한 군 모두에서 LPS 유도 TNF- α 생성능이 유의하게 감소한 반면, LPS로 전처치한 후 quercetin을 투여한 군에서는 그러한 현상이 나타나지 않았다고 보고한 바 있다. 따라서 정확한 기전은 아직 알 수 없지만 세포를 LPS로 미리 전처치하면 quercetin에 의한 HSP70 합성 억제 기능은 억제되지 않지만 항염증기능이 약화되는 것으로 추측된다.

결론적으로 본 연구를 통하여 쥐폐포상피세포에서

LPS 전처치 후에 HSP-70 유도를 하면 세포생존도에 영향을 미치지 않으면서 추가 LPS 자극에 따른 IL-6 생성능이 억제되며, 이와 같은 현상이 나타나는 기전에는 HSP70 자체가 중요한 역할을 하고 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 연구결과는 향후 임상에서 HSP70 유도를 LPS 유도 ALI의 새로운 치료전략으로 개발하기 위한 기초자료로 응용될 수 있을 것으로 추측된다.

요 약

목 적 :

폐포상피세포의 LPS 전처치 여부에 따라 HSP70 유도가 추가 LPS 자극에 의한 IL-6 생성능 및 세포생존도에 미치는 영향과 그 기전에 HSP70이 관여하는지를 관찰하였다.

방 법 :

쥐의 폐포상피세포를 배양하여 LPS 전처치군과 비처치군으로 분류한 후, 각 군을 다시 대조군, quercetin 단독투여군, HSP70 유도군, HSP70 억제군으로 나누어 추가 LPS 자극 후에 HSP70 발현, IL-6 생성능 및 세포생존도를 관찰하였다. HSP70 유도에는 sodium arsenite(SA)를, HSP70 억제에는 quercetin을 사용하였으며, HSP70 발현은 western blot으로, IL-6 생성능은 ELISA로 측정하였다. 세포생존도는 단순화한 MTT 측정법으로 관찰하였다.

결 과 :

세포 생존도에 영향을 미치지 않으면서 충분한 HSP70 발현을 유도하는 SA 농도는 50 μ M, HSP70 발현을 억제하는 quercetin 농도는 100 μ M이었다. LPS 전처치 여부에 상관없이 HSP70 유도군은 대조군에 비해 추가 LPS 자극에 의한 IL-6 생성능이 현저히 감소하였으며, HSP70 억제군은 HSP70 유도군에 비해 추가 LPS 자극에 의한 IL-6 생성능이 유의하게 다시 증가하였다. 세포생존도는 LPS 비처치군에서는 각 실험군이 대조군에 비해 유의하게 증가하였지만, LPS 전처치군에서는 각 군 간에 차이가 없었다.

결 론 :

이와 같은 결과는 쥐폐포상피세포에서 LPS 전처치

후에 HSP70 유도를 하면 세포생존도에는 영향을 미치지 않으면서 추가 LPS 자극에 따른 IL-6 생성능이 억제되며, 이러한 현상이 나타나는 기전에는 HSP70 자체가 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

감사의 글

본 논문이 나오기까지 지켜봐 주시고 많은 조언을 아끼지 않으신 박성학 지도 교수님과 늘 세심한 배려와 가르침으로 지속적인 관심과 조언을 해주신 김영균 선생님, 권순석 선생님, 따뜻하게 배려해주시고 정신적인 힘이 되어주신 이숙영 선생님, 김승준 선생님께도 감사드리고 언제나 옆에서 힘이 되어준 김진숙 연구원에게도 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 1977;116:589-615.
- Levinson W, Oppermann H, Jackson J. Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1980;606:170-80.
- Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS. Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF- α posttranslational regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(6 Pt 1):1843-50.
- Klosterhalfen B, Hauptmann S, Offner FA, Amotaki B, Tons C, Winkeltau G, et al. Induction of heat shock protein 70 by reduces cytokine liberation, apoptosis, and mortality rate in a rat model of LD100 endotoxemia. *Shock* 1997;7:254-62.
- LoCicero J 3rd, Xu X, Zhang L. Heat shock protein suppresses the senescent lung cytokine response to acute endotoxemia. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1150-3.
- Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Nakamori Y, Noborio M, et al. Enhanced expression of heat shock proteins in activated polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis. *J Trauma* 2001;51:1104-9.
- Barton BE, Shortall J, Jackson JV. Interleukins 6 and 11 protect mice from mortality in a staphylococcal enterotoxin-induced toxic shock model. *Infect Immun* 1996;64:714-8.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-20.
- Flohe S, Dominguez FE, Ackermann M, Hirsch T, Borgermann J, Schade FU. Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF- α , IL-6, IL-10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine* 1999;11:796-804.
- Hershko DD, Robb BW, Hungness ES, Luo G, Guo X, Hasselgren PO. Arsenite inhibits interleukin-6 production in human intestinal epithelial cells by down-regulating nuclear factor- κ B activity. *Clin Sci (Lond)* 2002;103:381-90.
- Riedemann NC, Guo RF, Sarma VJ, Laudes LJ, Huber-Lang M, Warner RL, et al. Expression and function of the C5a Receptor in rat alveolar epithelial cells. *J Immunol* 2002;168:1919-25.
- Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986;55:1151-91.
- Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 1993;27:437-96.
- Villar J, Ribeiro SP, Mullen JB, Kuliszewski M, Post M, Slutsky AS. Induction of heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med* 1994;22:914-21.
- Koh Y, Lim CM, Kim MJ, Shim TS, Lee SD, Kim WS, et al. Heat shock response decrease LPS-induced acute lung injury in rats. *Respirology* 1999;4:325-30.
- Timothy A. Pritts, Quan Wang, Xiaoyan sun, David R. Ficsher, Eric S. Hungness, et al. The stress response decreases NF- κ B activation in liver of endotoxemic mice. *Shock* 2002;18:33-7.
- Roussel RR, Barchowsky A. Arsenic inhibits NF- κ B-mediated gene transcription by blocking IkappaB kinase activity and IkappaB α phosphorylation and degradation. *Arch Biochem Biophys* 2000;377:204-12.
- Chakravorty D, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Mu MM, Yoshida T, et al. The inhibitory action of sodium arsenite on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 267.4 macrophage cells: a role of Raf-1 in lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 2001;166:2011-7.
- Wong HR, Ryan M, Wispe JR. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking Ik-B degradation and

- NF- κ B nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:257-63.
20. de Vera ME, Kim YM, Wong HR, Wang Q, Billiar TR, Geller DA. Heat shock response inhibits cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in rat hepatocytes. *Hepatology* 1996;24:1238-45.
 21. 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 κ B α through preventing I κ B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol* 2000;164:5416-23.
 22. Goyer RA: Toxic effects of metals. In: *Toxicology: The basic science of poisons*. Third Edition. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J (Eds). New York, Macmillan Publishing, 1986;582-600.
 23. Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K, et al. Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol Cell Biol* 1992;12:3490-8.
 24. Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY, et al. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem* 2003;243:153-60.
 25. Manjeet K R, Ghosh B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1999;21:435-43.
-