

메산지움 세포에서 Lipopolysaccharide에 의해 유도되는 Chemokine 유전자 발현

고신대학교 복음병원 내과, 계명대학교 의과대학 면역학교실*

임 학 · 윤수정* · 박종욱*

〈요 약〉

본 연구에서는 Lipopolysaccharide(LPS)에 의한 신장 손상기전으로서 LPS에 의해 신장에서 유도되는 chemokine을 규명하고, 이들의 역할 및 발현경로를 조사하였으며, chemokine의 발현을 차단할 수 있는 약제를 조사하였다.

LPS를 마우스 복강에 투여한 후 신장을 수거하여 α -chemokine 유전자 발현을 조사한 결과 interferon gamma(IFN- γ) inducible protein 10(IP-10) 및 monokine induced by IFN- γ (MIG)의 유전자 발현이 유도되었으며, MIG 및 IP-10의 발현을 최대로 유발하는 LPS의 용량은 마우스 체중 g당 $1\mu\text{g}$ 으로 나타났다. LPS에 의한 chemokine 발현에 있어서 신장의 메산지움 세포의 역할을 알아보기 위하여 메산지움 세포를 시험관내에서 배양한 뒤 LPS, IFN- γ 및 tumor necrosis factor- α 로 자극하고 chemokine의 유전자를 발현을 조사한 결과 LPS 자극에 의해 IP-10의 유전자 발현이 증가되었으며 IFN- γ 에 의해 IP-10 및 MIG의 유전자 발현이 증가되었다. LPS에 의해 메산지움 세포에서 발현된 chemokine은 마우스 비장세포의 chemotaxis를 유발할 수 있어 LPS에 의한 chemokine 발현 유도는 신장의 염증반응을 진행시키는 한 요소가 된다고 생각된다. LPS에 의한 chemokine 발현을 억제시키기 위하여 LPS를 처리한 메산지움 세포에 cycloheximide, cyclosporin A, sodium salicylate(SS), wortmanin(WM), piperazin(PZ) 등을 처리한 뒤 IP-10유전자 발현을 조사한 결과 SS, WM 및 PZ에 의해 IP-10의 발현이 억제됨을 관찰하였으며, SS의 차단효과는 마우스 생체내 즉, LPS를 처리한 마우스의 신장에서도 나타남을 관찰하였다. 이상의 결과로 보아 LPS에 의한 MIG 및 IP-10의 발현은 신장염증반응을 일으키는 중요한 요인이 될 수 있으며, 향후 chemokine 발현이 유발되는 기전과 항염증제 등의 신장보호 효과에 대한 연구가 필요하다고 생각한다.

서 론

그람음성 세균에 의한 septic shock의 주원인 물질은 그람음성 세균의 외막에 있는 lipopolysaccharide (LPS)이다¹⁾. LPS는 여러 종류의 세포를 강하게 자극하여 사이토카인을 분비시키며^{2,3)}, 증가된 혈청 내 염증 유발성 사이토카인은 LPS에 의한 신체손상을 매

개한다⁴⁻⁷⁾. 신장의 경우 LPS는 신장의 혈행역학장애를 유발하며, interleukin(IL)-1, IL-6, TNF- α 등의 사이토카인을 분비시키고⁸⁻¹²⁾, IL-8, MCP-1 등의 chemokine을 분비하여 면역세포의 화학주성을 유발한다^{13,14)}. 또 LPS는 메산지움 세포에 많은 양의 nitric oxide 분비를 유발시키며, 메산지움 세포와 tubular epithelial 세포에 Fas 발현을 증가시킴으로서 직간접적으로 신장손상을 초래한다^{15,16)}. 본 연구에서는 LPS에 의한 신장손상 기전으로서 LPS가 신장에서 유도하는 chemokine을 조사하였다.

LPS가 신장에 손상을 주는 것은 알려진 사실이며,

책임저자: 박종욱 대구광역시 중구 동산동 194

계명대학교 의과대학 면역학교실

Tel: 053)250-7796, Fax:

E-mail: j303nih@dsmc.or.kr

그 기전은 LPS의 직접작용과 LPS에 의해 활성화된 면역세포에 의한 간접손상을 들 수 있다. LPS가 세포에 직접 작용하기 위해서는 LPS binding protein (LBP)와 CD14이 필요하다. LPS는 LBP와 결합한 뒤 면역세포 표면에 있는 CD14에 부착하여 이들을 활성화시킨다. 그러나 CD14는 면역세포 외에도 존재하며 또 수용성 CD14이 혈청 내에 존재하기 때문에 면역세포뿐만 아니라 비면역세포, 즉 조직상피세포나 실질세포 등에도 작용할 수 있다. 최근에 신장에서도 LBP와 CD14이 표현되고 있다고 보고됨에 따라 LPS는 신장세포에 직접 작용할 수 있을 것으로 생각된다¹⁷⁻¹⁹⁾. 또 LPS는 신장에 직접 영향을 끼칠 뿐만 아니라 면역세포를 활성화시킴이 이들이 신장에 침착됨으로서 신장손상이 초래될 수 있다. 사구체 신염(glomerulonephritis)시 사구체 구조의 파괴와 기능의 소실에는 탐식세포 등의 염증세포가 중요한 역할을 한다. 탐식세포는 주요 면역작용세포의 하나로서 collagenase나 elastase 등의 단백분해효소, interleukin(IL)-1, thromboxane A2, leukotrienes, platelet activating factor 및 oxygen radical 등의 물질을 산생하여 사구체세포를 증식시키고, 기저막을 손상시켜 여과기능에 이상을 유발함으로써 proteinuria를 초래하며 혈관수축에 의한 glomerular filtration 등을 초래한다^{8, 20-24)}. 따라서 혈액 내 탐식세포의 활성화와 이들의 신장내 침윤은 LPS에 의한 신손상의 원인이 될 수 있다.

면역세포의 조직내 침윤을 유발하는 요소로는 chemokine과 세포부착물질을 들 수 있다. Chemokine은 chemotaxis를 유발하는 사이토카인으로서 아미노산서열의 특징에 따라 -CXC- 구조를 가지는 α -chemokine과 -CC- 구조를 가지는 β -chemokine으로 나눌 수 있으며 α -chemokine은 다시 ELR-CXC-와 nonELR-CXC-chemokine으로 분류된다²⁵⁾. 조직에서 이러한 chemokine이 발현되면 T 세포 및 탐식세포 등 각종 면역세포의 조직침윤이 초래되고 그 결과로 염증반응이 유발되므로 chemokine의 발현은 조직염증반응을 나타내는 지표가 될 수 있다. 신장세포 중 LPS의 직접자극 또는 사이토카인에 의해 활성화되어 chemokine을 발현할 수 있는 세포로는 우선 메산지움 세포를 들 수 있다. 메산지움 세포는 조직 탐식세포이기 때문에 활성화되면 세포독성물질, nitric oxide, 사이토카인 등을 분비하여 조직손상과 염증반

응을 유발하는 역할을 한다. 또 메산지움 세포는 chemokine을 분비하여 면역세포를 불러모으고 이들을 활성화시킴으로서 염증반응을 초래하는 중추적인 역할을 한다고 생각한다^{13, 14)}.

본 연구에서는 LPS에 의해 신장 및 메산지움 세포에서 분비되는 chemokine을 조사하고, 발현된 chemokine의 역할 및 항염증제 등이 LPS에 의한 chemokine유도를 차단할 수 있는지를 조사하였다.

대상 및 방법

1. LPS 및 cytokine 처리

LPS의 생체내 효과실험에서는 LPS를 마우스 체중 g당 0.01, 0.1, 1 및 10 μ g을 마우스(n=5) 복강에 주사하였다. LPS 주사 후 시간별로 우측 신장을 수거한 뒤 각 군별로 신장 절반을 pooling하여 -70°C에 냉동보존하였다. 세포배양실험에서는 LPS를 1 μ g/ml, IFN- γ 를 200U/ml, TNF- α 를 50ng/ml 농도로 사용하였다.

2. 메산지움 세포 분리 및 배양

정상 ICR 마우스의 양측 신장을 제거하여 멸균한 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척하였다. 신장을 가위로 작은 조각으로 만든 뒤 멸균된 mesh (106 μ m)에 두고 멸균봉으로 조직을 조심스럽게 눌러 분쇄하였다. 하부에 모인 조직 분쇄액을 mesh(75 μ m)로 걸러 사구체와 tubule 구조들을 걸러 내었으며, mesh위에 모인 사구체 등을 수거하여 20% fetal bovine serum이 첨가된 RPMI 1,640 배지(20% FBS-RPMI)에 부유시킨 후 이들을 배양접시에 넣어 5% CO₂ 배양기에서 3-5일간 배양하였다. 현미경으로 사구체를 관찰하여 사구체는 부착되고 tubule 구조는 부착되지 않은 것을 확인한 뒤 세포배양 접시를 부드럽게 흔들어 상층을 제거하고 다시 20% FBS-RPMI 배지를 넣어 5일간 배양하였으며 배지를 교체한 뒤 다시 5일간 더 배양하였다. 배양접시에 부착된 세포를 trypsin을 처리하여 떼어낸 뒤 원심(1,200rpm, 5분)하여 상층을 제거하고 세포 pellet을 D-valine(50mM, Sigma)이 함유된 20% FBS-RPMI 배지에 부유시켜 5% CO₂ 배양기에서 3-5일간 배양하였으며 상기한 D-valine이 첨가된 배지로 세포를 2회 더 계대 배양함으로써 배양세포에서 fibroblast를 제거하였다. 최종

Fig. 1. Isolation and culture of mesangial cell. Glomeruli were isolated by filtration through mesh(106mm and 75mm), and mesangial cell were purified and cultured from glomeruli in 20% FBS-RPMI media or 20% FBS-RPMI containing D-valine.

적으로 D-valine이 첨가된 배지를 제거하고 20% FBS-RPMI를 넣어 계대 배양하면서 LPS자극 실험 등에 사용하였다(Fig. 1).

3. 역전사증합효소연쇄반응

배양세포의 경우 세포를 PBS 3회 세척한 뒤 상층액을 제거하고, 여기에 1.5ml RNAzolB 용액을 넣어 cell scraper로 혼합하여 세포를 녹였으며, 신장조직의 경우 2ml의 RNAzolB를 첨가한 후 조직분쇄기를 이용하여 조직을 분쇄하고 분쇄된 조직액으로부터 total RNA를 추출하였다. 세포 및 조직이 용해된 RNAzolB용액에 1/10량의 chloroform을 첨가하여 진탕 혼합한 후 12,000rpm으로 15분간 원심하여 단백질을 침전시키고 RNA를 분리하였으며, 분리된 상층의 RNA용액을 조심스럽게 수거하여 1.5ml 시험관에 옮겼다. RNA 용액에 동량의 100% isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 -20℃에 16시간 이상 보관하여 RNA를 침전시켰다. RNA-isopropanol 혼합액을 12,000rpm으로 원심하여 RNA pellet을 만든 뒤 상층을 제거하였으며, 여기에 ice-cold 70% ethanol을 1ml 첨가하여 RNA pellet을 세척한 뒤 원심하여 상층의 ethanol 용액을 완전히 제거하고 RNA pellet을 DEPC-DW에 녹인 후 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 농도와 순도를 측정하고 이를 역전사증합효소반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)에

사용하였다.

Total RNA 용액을 70℃ 수조에 10분간 두어 RNA를 denaturation시킨 뒤 ice에 보존하였다. 먼저 5X RT buffer 2μl, 10mM dATP 0.25μl, 10mM dGTP 0.25μl, 10mM dTTP 0.25μl, 10mM dCTP 0.25μl, MMLV reverse transcriptase(200U/μl) 0.25μl, RNase inhibitor(28U/μl) 0.25μl, 50μM oligo dT primer 0.5μl, DEPC-DW 4μl를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들었다. 여기에 ice에 보존한 total RNA용액(1μg/μl)을 2μl 첨가한 뒤 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 실온에 10분간 두었다. 이 시험관을 PCR machine(Cetus 480, Perkin Elmer Co)에 넣어 42℃에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였으며, 역전사반응물을 DW로 1:1 희석한 뒤 PCR에 이용하였다. PCR은 먼저 10X PCR buffer 3μl, 25mM MgCl₂ 1.8μl, 10mM dATP 0.3μl, 10mM dGTP 0.3μl, 10mM dTTP 0.3μl, 10mM dCTP 0.3μl, 50μM sense 및 anti-sense primer 0.25μl, Taq polymerase(5U/μl, Promega Co.) 0.25μl를 혼합하고 여기에 DW를 넣어 최종 용액량이 25μl되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 반응물을 5μl 넣고 혼합한 뒤 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 PCR machine(Cetus 480, Perkin Elmer Co)에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. 먼저 94℃에서 5분간 가열한 후 94℃ 30초, 57℃ 45초, 72℃ 45초를 1 cycle로 하여 18-35 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72℃에서 5분간 처치하여 PCR을 완료하였다. 1% agarose gel에 PCR 산물을 점종하고 전기영동한 뒤 UV transilluminator를 이용하여 증폭된 DNA band를 관찰하였다. RT-PCR에 사용한 각 primer의 염기서열은 Table 1에 정리하였다.

4. Chemotaxis assay

정상 마우스의 spleen을 떼어낸 뒤 PBS에 세포부유액을 만들었다. 세포부유액을 실온에 5분 방치한 뒤 상층을 50ml tube로 옮기고 여기에 ficoll-hypaque solution을 세포부유액 하부에 넣은 뒤 원심분리(2,500rpm, 30분)하여 단핵구 층을 수거하였다. 단핵구를 PBS로 3차례 세척한 뒤 serum free RPMI 1640(sf-RPMI)배지에 1×10⁶cell/ml 농도로 부유시킨

후 chemotaxis assay에 사용하였다.

배양중인 메산지움 세포에 LPS를 $1\mu\text{g/ml}$ 되게 첨가한 후 6시간 배양하였다. 배양상층을 제거한 뒤 serum free RPMI 1640(sf-RPMI) 배지로 2번 배양 접시를 세척한 후 배양접시에 이 배지를 10ml 첨가하여 72시간 배양하였다. 배양상층을 수거하여 원심 후 상층을 여과 멸균한 뒤 신선한 sf-RPMI 배지와 1:1로 혼합하여 conditioned medium(CM)을 만들고 이것을 chemotaxis assay에 사용하였다. 대조군은 LPS를 처리하지 않은 메산지움 세포를 sf-RPMI에서 동일한 시간 동안 배양한 것을 사용하였다. 구멍 직경이 $5\mu\text{m}$ 인 Transwell의 상부 well에 sf-RPMI를 $200\mu\text{l}$ 첨가하여 10분 둔 뒤 배지를 모두 제거하였다. 하부 well에는 상기한 CM 또는 fresh media들을 $600\mu\text{l}$ 씩 넣고 상부 well에는 splenocyte를 $100\mu\text{l}$ 넣은 뒤 37°C CO_2 incubator에서 3시간 30분 방치하였다. 상부 well을 제거한 후 하부 well로 이동한 단핵구의 수를 hemocytometer를 이용하여 측정하였으며, 실험군 당 3 wells에 이동한 세포수의 평균수를 fresh media로 이동한 세포수로 나누어 % migration을 구하였다.

5. 면역억제제, 항염증제, 신호전달차단제의 LPS 작용 차단효과

LPS의 작용 차단효과를 검사하기 위한 실험으로서 메산지움 세포를 배양한 후 LPS($1\mu\text{g/ml}$)로 자극하였으며 여기에 cyclohexamide(CHX, $2\mu\text{g/ml}$), cyclosporin A(CsA, $3\mu\text{g/ml}$) sodium salicylate(SS,

5mM), wortmanin(WM, 10ng/ml) 및 piperazine(PZ, $20\mu\text{M}$)을 첨가하여 6시간 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후 세포를 RNAzolB 용액에 녹여 상기한 방법과 같이 RT-PCR을 실시하였다.

SS가 마우스 신장에서 LPS의 chemokine 유도성을 차단할 수 있는지를 알아보기 위하여, 먼저 마우스($n=5$) 복강에 LPS($1\mu\text{g/g}$ of body weight)를 주사하였으며, 주사 직후 및 4시간 후에 체중 g 당 $60\mu\text{g}$ 의 SS를 경구투여 하였다.

결 과

1. LPS의 복강 내 투여가 마우스 신장의 chemokine 유전자 발현에 미치는 영향

마우스 g 당 LPS를 $1\mu\text{g}$ 씩 복강 주사한 후 2시간, 6시간 및 24시간 때 신장을 수거하여 RT-PCR법으로 MIG, IP-10, SDF-1 α 의 유전자 발현을 측정하였다(Fig. 2). LPS를 주사 후 2시간 때는 IP-10이 증가하였으며, 6시간 때는 MIG 유전자 발현이 증가되었으나, SDF-1 α 의 유전자 발현은 나타나지 않았다. LPS를 마우스 복강에 다양한 농도로 주사한 후 4시간 때 신장을 수거하여 MIG 및 IP-10의 유전자 발현을 조사한 결과 마우스 체중 g 당 LPS를 $1\mu\text{g}$ 주사한 경우에 MIG 및 IP-10의 발현이 가장 현저하였다(Fig. 3).

Table 1. Primer Sequence Used for RT-PCR

Name	Type*	Sequence
G3PDH	S	GCCACCCAGAAGACTGTGGATGGC
	AS	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC
MIG	S	GATCAAACCTGCCTAGATCC
	AS	GGCTGTGTAGAACACAGAGT
IP-10	S	ACCATGAACCAAGTGCTGCCGTC
	AS	GCTTCACTCCAGTTAAGGAGCCCT
SDF-1 α	S	CTCTTGCTGTCCAGCTCT
	AS	GGGCTGTTGTGCTTACTTGT
IL-12	S	GACATGTGGAATGGCGTCTC
	AS	CCAACCAAGCAGAAGACAGC
IL-18	S	GAACAATGGCTGCCATGTCAGAA
	AS	CTAACTTTGATGTAAGTTAGTGAG

* S, sense primer; AS, antisense primer

Time(hrs) after LPS injection

Fig. 2. LPS-induced chemokine gene expression in mouse kidney. Mice($n=5$) were treated with LPS ($1\mu\text{g/ml}$) intraperitoneally and kidney was harvested at 2, 6 and 24hr after LPS injection for gene expression analysis by RT-PCR.

Fig. 3. LPS-induced chemokine gene expression in mouse kidney. Mice(n=5) were treated with LPS intraperitoneally and kidney was harvested 4hr after LPS injection for gene expression analysis by RT-PCR.

Fig. 5. Effect of culture medium(CM) of mesangial cells stimulated with LPS on the chemotaxis of mouse splenocyte. Culture supernatant from mesangial cell(Control-CM), mesangial cell stimulated with LPS (LPS-CM), and medium control were used for splenocyte chemotaxis assay. % increase of cell migration=cell no in control CM or LPS-CM/cell no in medium control.

Fig. 4. Effect of LPS, IFN- γ , TNF- α on chemokine gene expression of mesangial cells. Mesangial cells were treated with LPS (1 μ g/ml), IFN- γ (200u/ml), TNF- α (50ng/ml) for 6 or 24hr. Gene expression was evaluated by RT-PCR.

2. LPS, IFN- γ 및 TNF- α 가 메산지움 세포의 chemokine 유전자 발현에 미치는 영향

마우스 메산지움 세포를 배양한 후 배양배지에 LPS(1 μ g/ml), IFN- γ (200U/ml) 및 TNF- α (50ng/ml)를 첨가하여 6시간 및 24시간 배양한 후 세포를 수거하여 RT-PCR을 실시한 결과(Fig. 4), LPS를 처리한 경우 IP-10의 발현이 매우 현저히 증가하였으며 MIG는 대조군에 비해 다소 증가하였으나 SDF-1 α 의 발현은 증가되지 않았다. IFN- γ 를 처리한 경우에는 IP-10과 MIG가 둘(959) 다 매우 강하게 발현되었으며, TNF를 처리한 경우에는 MIG와 IP-10의 발현이 대조군에 비해 다소 증가하였으나 IFN- γ 나

Fig. 6. Effect of CHX, CsA, SS, WM and PZ on the LPS-induced IP-10 gene expression in mesangial cell and kidney. Mesangial cells stimulated with LPS(1 μ g/ml) were cultured in media containing CHX, SS, CAS, WM or PZ for 6hr and cells were harvested for RT-PCR(A). Mice (n=5) injected with LPS(1 μ g/g of body weight, ip) was treated with SS(60 μ g/g of body weight) orally 0 and 4hr after LPS injection. Kidney was harvested 6hr after LPS injection for RT-PCR(B).

LPS를 처리한 경우보다는 미약하였다.

2. LPS로 자극한 메산지움 세포배양상층액의 chemotaxis 유도효과

마우스 메산지움 세포에 LPS(1 μ g/ml)를 첨가하여

6시간 배양한 후 세포를 세척하고 혈청이 없는 RPMI 배지를 넣어 72시간 배양한 후 이 배지(CM)를 수거하여 chemotaxis assay를 실시하였다. CM 내로 chemotaxis에 의해 이동한 세포수를 fresh media내로 이동한 세포수로 나누어 백분율을 구한 결과 LPS를 처치 않은 대조군(105%)에 비해 LPS를 처치한 군(165%)에서 마우스 비장세포의 이동이 더 많았다 (Fig. 5).

3. 면역억제제, 단백질합성억제제 및 항염증제 등이 LPS에 의한 chemokine 유전자 발현에 미치는 영향

배양한 메산지움 세포에 LPS(1 µg/ml)를 넣어 자극한 후 CHX(2 µg/ml), CsA(3 µg/ml), SS(5mM), WM(10ng/ml) 및 PZ(20 µM)를 첨가하여 배양하였으며, 6시간 후에 세포를 수거하여 RT-PCR을 실시하였다. 앞의 결과와 마찬가지로 LPS를 처치한 군에서 IP-10 유전자 발현이 증가되었다. LPS로 자극한 군 중 CHX 및 CsA를 처치한 군에서는 LPS에 의해 유도된 IP-10 유전자 발현이 억제되지 않았으나, SS, WM 및 PZ를 처치한 군에서는 IP-10 유전자 발현이 억제되었다(Fig. 6). SS의 마우스 생체 내 효과를 알아보기 위하여 마우스 복강에 LPS(1 µg/g of body weight)를 주사한 후 SS(60 µg/g of body weight)를 LPS 주사 직후 및 4시간 뒤에 경구투여하고 6시간 후에 신장을 수거하여 RT-PCR을 실시하였다. 대조군에 비해 LPS를 처치한 군에서는 IP-10의 유전자 발현이 증가되었으나, LPS로 자극한 후 SS를 경구 투여한 군에서는 IP-10의 발현이 차단되었다(Fig. 6).

고 찰

Chemokine은 chemotaxis를 유발하는 사이토카인으로서 조직에서 이러한 chemokine이 발현되면 T 세포 및 탐식세포 등 각종 면역세포의 조직침윤이 초래되고 그 결과로 염증반응이 유발되므로 chemokine의 발현은 조직염증반응을 나타내는 지표가 될 수 있다. 본 연구에서는 LPS에 의한 신장 손상의 기전으로서 LPS에 의해 신장에서 유도되는 chemokine을 조사하였다.

LPS에 의해 신장 및 메산지움 세포에서 발현될 수 있는 사이토카인 및 chemokine으로는 MCP-1¹⁴⁾,

IL-6¹¹⁾, IL-8¹³⁾, TNF- α ^{11, 12)}, IL-1 β ¹⁰⁾, IP-10²⁷⁾ 등이 알려져 있다. 본 연구에서는 LPS에 의해 유도될 수 있는 alpha-chemokine을 조사한 결과 신장에서 MIG 및 IP-10이 증가함을 알 수 있었다. 신장세포중 메산지움 세포가 이 chemokine들의 source가 될 수 있다고 생각되어 먼저 메산지움 세포를 분리 배양하였으며, 일차 배양된 세포를 LPS로 자극한 후 chemokine 발현성을 RT-PCR법으로 조사한 결과 IP-10이 강하게 유도되며 MIG는 IP-10보다는 발현 강도가 약하나 대조군보다는 발현이 증가되어 있음을 관찰하였다. MIG와 IP-10은 주로 탐식세포에서 발현되는 chemokine으로서 탐식세포를 IFN- γ 로 자극할 때 이들의 발현이 유도되는 것으로 알려지고 있다. MIG와 IP-10은 T 세포 chemotaxis, neovascularization의 억제 및 마우스 tumor의 성장을 억제시키는 chemokine으로 알려져 있다²⁸⁻³²⁾.

Chemokine을 생성하는 신장세포로는 우선 메산지움 세포를 들 수가 있다. 메산지움 세포는 조직 탐식세포로서 LPS 자극에 의해 IP-10²⁷⁾, MCP-1¹⁴⁾, 및 IL-8¹³⁾ 등을 분비한다고 보고되고 있다. 본 실험의 결과에서는 LPS 자극에 의해 신장에서는 MIG와 IP-10의 발현이 강하게 나타났으나 메산지움 세포에서는 IP-10이 강하게 유도되었다. 그러나 IFN- γ 로 메산지움 세포를 자극한 경우에 IP-10은 물론 MIG도 동시에 강하게 발현이 되었으므로 메산지움 세포가 MIG를 발현할 수 있는 능력은 가지고 있음을 알 수 있다. LPS가 신장에 작용하여 MIG를 강하게 발현시킨 이유는 첫째 신장에 메산지움 세포 이외에 LPS에 반응하여 MIG를 생성하는 세포가 있을 수가 있으며 둘째는 LPS에 의해 유도되는 cytokine-chemokine cascade 즉 LPS처치에 의해 유발된 IFN- γ 에 의해 2차적으로 MIG 및 IP-10이 발현되었을 가능성이 있다고 생각한다.

LPS로 자극한 메산지움 세포의 배양상층액을 수거하여 chemotaxis assay를 실시한 바 대조군에 비해 LPS를 처치한 군에서 이동세포수가 많음을 알 수 있었다. 배양 상층액에는 MIG와 IP-10 이외에도 다른 chemokine도 들어있을 수가 있으며, LPS 처치에 의해 마우스의 신장 및 메산지움 세포에서 분비되는 MIG와 IP-10 등의 chemokine들은 T 세포 등의 chemotaxis를 유발시켜 염증반응을 촉진시키는 역할을

한다고 생각한다.

LPS는 상기한 바와 같이 직접작용 또는 chemokine을 발현시켜 신장에 다양한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 본 연구에서는 LPS의 chemokine 유도성을 차단하는 방법을 알아보기 위하여 단백질합성차단제인 CHX, 면역억제제인 CsA, 항염증제인 SS 및 신호전달억제제인 WM과 PZ를 LPS로 자극 받은 배상지움 세포에 처리하고 IP-10 유전자 발현성을 분석하였다. CHX 및 CsA는 LPS에 의한 IP-10 유전자 발현을 차단할 수 없었으나, SS, WM 및 PZ는 IP-10 유전자 발현을 차단하였으며, SS는 LPS를 주사한 마우스 신장에서도 LPS의 작용을 차단할 수 있었다. LPS로 자극 받은 탐식세포에서 IL-1, IL-6, granulocyte/macrophage colony stimulating factor, TNF- α , MCP-1 및 nitric oxide synthase 산생이 증가되는 것은 nuclear factor- κ B(NF- κ B)가 활성화되어 상기한 유전자들의 전사를 촉진시키기 때문으로 보고되고 있으며, SS는 항 염증작용과 더불어 NF- κ B의 활성화를 차단할 수 있는 것으로 보고되고 있다^{33, 34)}. 따라서 본 실험에서 SS가 LPS처치에 의한 IP-10의 발현을 차단한 현상도 이러한 SS의 NF- κ B 활성화 차단작용 때문인 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합할 때 LPS는 신장에 MIG 및 IP-10의 발현을 유발시키며 이러한 chemokine의 발현은 면역세포의 소집을 초래하여 신장염증반응을 일으키는 중요한 요인이 될 수 있다고 생각한다. 향후 LPS의 cytokine-chemokine cascade 유발성과 LPS에 의한 신장손상에 있어서 항염증제 및 면역억제제 등의 신장보호효과에 대한 상세한 연구가 필요하다고 생각한다.

= Abstract =

LPS-induced Chemokine Gene Expression in Mesangial Cell

Hark Rim, M.D., Soo-Jung Yoon, M.D.* and Jong-Wook Park, M.D.*

Department of Internal Medicine,
Kosin University Gospel Hospital,

Department of Immunology*,

School of Medicine, Keimyung University

This study was designed to investigate the molecular mechanism of chemokine induction by lipopoly-

saccharide(LPS) of *E. coli*. Chemokine gene expression was evaluated by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) assay using RNAs isolated either from kidneys of LPS-injected mice or from the mesangial cells stimulated with LPS, IFN- γ or TNF- α . LPS was shown to induce interferon gamma(IFN- γ) inducible protein 10 (IP-10) and monokine induced by interferon gamma (MIG) in kidney. IP-10 gene expression was induced by LPS and IFN- γ , but MIG gene expression was induced by IFN- γ in mesangial cell. Chemokines induced by LPS increased splenocyte migration. Sodium salicylate, wortmanin and piperazine blocked LPS mediated chemokine induction suggesting the activation of nuclear factor- κ B pathway.

It is concluded from this study that mesangial cells are the target of LPS in the renal failure resulting from the systemic infections. LPS induces chemokines directly and/or indirectly in the mesangial cells, and these chemokines may associated with renal inflammation.

Key Words : Mesangial cells, Lipopolysaccharide, Chemokine, Cytokine

참 고 문 헌

- 1) Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner J-D, Cohen J : Septic shock : Pathogenesis. *Lancet* 338:732-36, 1991
- 2) Ohmori Y, Hamilton TA : A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. *Biochem Biophys Res Commun* 168:1261-1267, 1990
- 3) Tannenbaum CS, Koerner TJ, Jansen MM, Hamilton TA : Characterization of lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression. *J Immunol* 140:3640-3645, 1988
- 4) Kobayasi M, Fitz L, Ryan M, Hewix RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, and Trinchieri G : Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor(NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170:827-845, 1989
- 5) Heremans H, Van Damme J, Dillen C, Dijkmans R, and Billiau A : Interferon γ , a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced shwartzman-like shock reactions in mice. *J Exp Med* 171:1853-1869, 1990
- 6) Yoshimoto T, Nakanishi K, Hirose, Hiroishi K, Okamura H, Takemoto Y, Kanamaru A, Hada T,

- Tamura T, Kakishita E, and Higashino K: High serum IL-6 level reflects susceptible status of the host to endotoxin and IL-1/tumor necrosis factor. *J Immunol* 148:3596-3603, 1992
- 7) Dinarello CA, Gelfand JA, and Wolff SM: Anti-cytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA* 269:1829-1835, 1993
- 8) Lovett DH, Bursten SL, Gerns D, Bessler W, Resch K, Ryan JL: Activation of glomerular mesangial cells by gram-negative bacterial cell wall components. *Am J Pathol* 133:472-484, 1988
- 9) Bougeois N, Reuse C, Boeynaems JM, Staroukine M, and Vanherweghem JL: Effects of endotoxin on hemodynamics of isolated dog kidney. *Adv Exp Med Biol* 212:81-85, 1987
- 10) Xia Y, Feng L, Yoshimura T, Wilson CB: LPS-induced MCP-1, IL-1 β , and TNF- α mRNA expression in isolated erythrocyte-perfused rat kidney. *Am J Physiol* 264:774-780, 1993
- 11) Pirotzky E, delattre RM, Hellegouarch A, Lonchampt MO, Aarden L, Braquet P, Galanaud P: Interleukin-6 production by tumor necrosis factor and lipopolysaccharide-stimulated rat renal cells. *Clin Immunol Immunopathol* 56:271-279, 1990
- 12) Baud L, Oudinet JP, Bens M, Noe L, Peraldi MN, Rondeau E, Etienne J, Ardaillou R: Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int* 35:1111-1118, 1989
- 13) Kusner DJ, Luebbbers EL, Nowinski RJ, Konieczkowski M, King CH, Sedor JR: Cytokine- and LPS-induced synthesis of interleukin-8 from human mesangial cells. *Kidney Int* 39:1240-1248, 1991
- 14) Lee SK, Park JY, Chung SJ, Yang WS, Kim SB, Park SK, Park JS: Chemokines, osteopontin, ICAM-1 gene expression in cultured rat mesangial cells. *J Korean Med Sci* 13:165-170, 1998
- 15) Shultz PJ, Tayeh MA, Marletta MA, Raji L: Synthesis and action of nitric oxide in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 261:600-606, 1991
- 16) Ortiz-Arduan A, Danoff TM, Kalluri R, Gonzalez-Cuadrado S, Karp SL, Elkon K, Egido J, Neilson EG: Regulation of Fas and Fas ligand expression in cultured murine renal cells and in the kidney during endotoxemia. *Am J Physiol* 271:1193-1201, 1996
- 17) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide(LPS) and LPS Binding Protein. *Science* 249:1431-1433, 1990
- 18) Mathison J, Wolfson E, Steinemann S, Tobias P, Ulevitch R: Lipopolysaccharide(LPS) recognition in macrophages. *J Clin Invest* 92:2053-2059, 1993
- 19) Wang SC, Klein RD, Wahl WL, Alarcon WH, Garg RJ, Remick DG, Su GL: Tissue coexpression of LBP and CD14 mRNA in a mouse model of sepsis. *J Surg Res* 76:67-73, 1998
- 20) Shah SV, Baricos WH, Basci A: Degredation of human glomerular basement membrane by stimulated neutrophils: Activation of a metalloproteinase/s by reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest* 79:25-31, 1987
- 21) Nathan CF: Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79:319-326, 1987
- 22) Couser WG: Mediation of immune glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 1:13-29, 1990
- 23) Schlondorff D, Mori T: Contributions of mesangial cells to glomerular immune functions. *Klin Wochenschrift* 68:1138-1144, 1990
- 24) Schreiner GF: The role of macrophage in glomerular injury. *Semin Nephrol* 11:268-275, 1991
- 25) Yaub DD, Oppenheim JJ: Chemokines, inflammation and the immune system. *Therapeutic Immunology* 1:229-246, 1994
- 26) Iwano M, Dohi K, Hirata E, Horii Y, Shiiki H, Ishikawa H: Induction of interleukin 6 synthesis in mouse glomeruli and cultured mesangial cells. *Nephron* 62:58-65, 1992
- 27) Gomez-Chiarri M, Hamilton TA, Egido J, Emancipator SN: Expression of IP-10, a Lipopolysaccharide- and Interferon- γ -Inducible Protein, in Murine Mesangial Cells in Culture. *Am J Pathol* 142:433-439, 1993
- 28) Farber JM: Mig and IP-10 CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukocyte Biol* 61:246-257, 1997
- 29) Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM Human, Mig chemokine: Biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 182:1301-1314, 1995
- 30) Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ: Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J*

Exp Med 177:1809-1814, 1993

- 31) Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G: Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 182:155-162, 1995
- 32) Arenberg DA, Kunkel SC, Palverini PJ, Morris SB, Bardick MD, Glass MC, Taub DT, Ian-nettoni MD, Whyte RI, Strieter RM: Interferon- γ -inducible protein 10(IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer(NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med* 184:981-992, 1996
- 33) Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179, 1994
- 34) Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano PF: Neuroprotection of aspirine and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science* 274:1383-1385, 1996