[UCI]I804:24011-200000232719

2006 년 8월

박사학위논문

NIH3T3 세포주에서 LPS자극에 의한 분비백혈구단백분해효소 억제제(SLPI)와 성장인자들의 발현

조선대학교대학원

치 의 학 과

이 상 화

NIH3T3 세포주에서 LPS자극에 의한 분비백혈구단백분해효소 억제제(SLPI)와 성장인자들의 발현

Expression of the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and growth factors by LPS stimulation in NIH3T3 cells

2006년 8월 일

조선대학교대학원

치 의 학 과

이 상 화

NIH3T3 세포주에서 LPS자극에 의한 분비백혈구단백분해효소 억제제(SLPI)와 성장인자들의 발현

지도교수 장 현 선

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2006년 6월 일

조선대학교대학원

치 의 학 과

이 상 화

이상화의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 인

위원 단국대학교 교수 임성빈 인

위원 조선대학교 교수 인

위원 조선대학교 교수 인

위원 조선대학교 교수 인

2006년 6월 일

조선대학교 대학원

목　　차

ABSTRACT ····· iv

Ⅰ. 서　론 ····· 1

Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 3
1. 세포주와 세포배양 ····· 3
2. 역전사중합효소반응과 실시간역전사중합효소반응 ····· 3
3. 항체제조 ····· 5
4. 면역학적 단백질 검출법 ····· 5
5. 면역침강법 ····· 7
6. 광학현미경 및 주사전자현미경적 관찰 ····· 7

Ⅲ. 실험결과 ····· 9
1. LPS 자극을 준 NIH3T3 세포에서 SLPI와 성장인자들의 mRNA 발현 ····· 9
2. LPS 자극을 준 NIH3T3 세포의 세포질과 배양액에서 SLPI 단백질 발현 ····· 9
3. LPS 자극에 따른 NIH3T3 세포의 형태학적 변화 ····· 10

Ⅳ. 총괄 및 고안 ····· 11

Ⅴ. 결　론 ····· 15

참고문헌 ····· 16
사진부도 설명 ····· 20

표 목 차

Table 1. The summary of PCR primer sequences, annealing temperatures and amplification cycles ····· 5

도 목 차

Fig. 1. Nucleotide sequence of the mSLPI cDNA ····· 4

Fig. 2. Amino acid sequence of mSLPI ····· 6

Fig. 3. RT-PCR assay of the SLPI and growth factors mRNA ····· 22

Fig. 4. SLPI protein levels in NIH3T3 cells by LPS treatment ····· 24

Fig. 5. Observation of morphology in NIH3T3 cells stimulation with LPS ····· 25

Fig. 6. Diagram of the conclusions ····· 26

ABSTRACT

Expression of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) and Growth Factors by LPS Stimulation in NIH3T3 Cells

Lee, Sang-Hwa
Advisor : Prof. Jang, Hyun-Seon, D.D.S., M.S.D., Ph.D.
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) involves tissue protection against the destructive action of neutrophil elastase at the site of inflammation. Several studies on new functions of SLPI have demonstrated that SLPI may play a primary role in innate immunity than protease inhibitor. To identify the function of SLPI by lipopolysaccharide (LPS) stimulation in the embryonic fibroblast (NIH3T3) cells, we studied the expression of SLPI compared to other growth factors involving the LPS treatment. To address this, we performed the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blots for the detection of mRNA and protein expression of the SLPI and some growth factors such as VEGF, bFGF, and PDGF-BB after LPS stimulation. NIH3T3 cells were exposed 100 ng/ml *Escherichia coli* LPS for 30min, 60min, 90min, 24h, and 48h, respectively. The result of RT-PCR showed that SLPI and VEGF mRNA was expressed

strongly in NIH3T3 without related to LPS stimulation. mRNA of bFGF was weakly expressed such as the expression of the control. PDGF mRNA expression gradually increased follows at time course. However, SLPI protein level was increased in lysates and culture medium by LPS stimulation. Phase contrast microscopic and scanning electron microscopic observation showed that the increased cell number and cytoplasmic enlargement of the NIH3T3 cells. Therefore, it suggests that the LPS upregulates SLPI expression in NIH3T3 cells. Moreover, secreted SLPI may stimulate cell proliferation and migration.

Key Words: Secretory leukocyte protease inhibitor, growth factor, NIH3T3, lipopolysaccharide

Ⅰ. 서 론

그람 음성균의 세포벽에 있는 박테리아성지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)는 대부분의 포유류 세포를 자극한다. LPS에 대한 대식세포의 분비 반응은 개체를 보호하기 위한 것이지만, 이러한 반응이 급속하게 진행될 경우에는 오히려 개체에 심각한 손상을 초래한다[9]. 섬유모세포(fibroblast)는 몸 전체의 결합조직에 분포하며 I형이나 III형 아교질(collagen)을 포함하는 다양한 세포 외 기질을 분비한다. 감염이나 상처에 의한 조직 손상 시 섬유모세포는 손상 조직의 근처에서 증식을 하고 상처 부위로 이동해 들어간다.

섬유모세포는 조직 손상이나 LPS에 의한 자극 시 다양한 종류의 프로사이토카인(pro-cytokine) 및 성장 인자들을 분비하고, 손상된 조직의 회복을 위해 많은 양의 아교질을 생산 한다[2, 11]. 암세포, 각질형성세포, 섬유모세포 및 대식세포 등을 포함한 다양한 포유류 세포들도 저산소증(hypoxia) 및 염증반응과 같은 비정상적인 세포주변 환경에서 성장인자나 사이토카인을 분비한다[8]. 이러한 상황에서 분비되는 대표적인 성장인자들로는 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유모세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF) 그리고 혈소판유래 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF) 등이 잘 알려있다[14, 22, 24].

분비백혈구단백분해효소억제제(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI) 는 11.7-kDa 크기의 cystein-rich 단백질로서, 침샘(salivary gland)과 정장(seminal plasma) 및 자궁경부(cervical), 비강(nasal) 그리고 기관지(bronchial) 점액층에 있는 상피세포에서 분비되는 것으로 알려져 있다[6, 9]. SLPI의 단백질 구조는 N말단부터 C말단부위까지 신호펩타이드(signal peptide) 부분과 분비펩타이드(secreted peptide) 부분으로 구성되어 있으며, 분비펩타이드의 앞쪽은 항

세균(anti-bacterial) 및 항염증(anti-inflammatory)관련 도메인(domain)이 위치하고, 뒤쪽부위에는 단백질분해효소억제(protease inhibitor) 도메인이 있다. SLPI는 또한 LPS에 의해 자극된 대식세포에서도 분비되고 LPS에 의해 활성화된 염증반응 관련 신호인자 들에 대한 길항 작용을 한다고 밝혀졌다[1, 6, 17]. 또한 SLPI 는 시험관(*in vitro*)과 생체(*in vivo*)에서 상처 치유와 세포의 증식을 촉진하고 HIV 바이러스 및 박테리아 감염을 억제하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다[12]. 그리고 최근에는 SLPI가 암세포 전이의 원인이 되는 인자중의 하나라는 연구결과도 있다[16].

치주조직의 염증의 대부분은 구강내 세균에 의해 점진적으로 진행되며, 과도한 염증반응은 치주조직의 재생을 저해하는 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다[15]. 따라서 염증반응을 단시간에 제어할 수 있는 생물학적 관련 물질의 발현과 기능의 규명은 치주염증을 포함하는 질환에서 필수적이라 볼 수 있다.

이에 본 연구는 결합조직 내에 가장 많이 존재하는 세포인 섬유모세포를 이용하여 프로사이토카인으로서 작용할 것으로 생각되는 SLPI와 몇 가지 성장인자가 세균성물질에 반응하여 발현하는지를 규명하고, 또한 그 기능을 유추하고자 하였다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 세포주와 배양

NIH3T3 세포(mouse embryonic fibroblast)는 2 × 10^5 수로 60mm 배양접시에 각각 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum, 100-units/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 0.25mg/ml amphotericin B 그리고 1X Non-Essential Amino Acids Solution (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 사용하였고, 37 ℃ 가 유지된 5 % CO_2 배양기에서 세포를 배양하였다.

2. 역전사중합효소반응*(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)*과 실시간역전사중합효소반응*(Real-Time PCR)*

NIH3T3 세포는 ml 당 100ng의 LPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 30분, 60분, 90분, 24시간 그리고 48시간 동안 각각 노출하였다. 그리고 Tri Zol® reagent (MRC Inc., Montgomery Rd, CIN, USA)를 이용하여 각각으로부터 총 RNA를 추출하였다. Superscript one-step reverse transcriptase (Invitrogen, USA)는 추출한 총 RNA 로부터 cDNA를 합성하기 위해 사용되었고, Ex Taq polymerase (TaKaRa Korea, Seoul, KOR)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 모든 PCR 반응에서 초기 변성 온도와 마지막 신장 온도는 각각 94 ℃ 5분과 72 ℃ 5분으로 하였다. 각 유전자의 forward 와 reverse 프라이머의 결

합 온도와 증폭 수 그리고 생산된 유전자의 크기는 표1에 각각 나타냈다. SLPI 프라이머는 전체 SLPI 유전자 서열 중 신호펩타이드 부위와 3'의 비 해독 부위를 포함시켜 제작하였다 (Fig. 1). PCR 반응 후 생산물은 ethidium bromide (EtBr)가 첨가된 1.5% 아가로스 겔에 전기영동 후 UV를 조사하여 확인하였다. 전기 영동을 통한 PCR 생산물의 양은 시각화된 밴드의 밀도를 통해 정량 하였다. 각 밴드의 밀도 측정은 Science lab Image Gauge (FUJI FILM, JAP) 프로그램을 이용하여 수행하였다.

```
  1 gcttctgtcattttcagctctcaggtggttactctgatggcctcatggtcctgcctgaaa
 61 cagaaagtctgccacctacttctgtagcagcaagactcctgttctgtggctaagcttcct
121 gcctgtgcaagagccacagggaggggccaaatgcatgccactggggccacgcctcctggt
181 aaagacataaatagtgatcctcgggactggtcatcagagctcccctgccttcaccATGAA
  2                                                          M  K
241 GTCCTGCGGCCTTTTACCTTTCACGGTGCTCCTTGCTCTGGGGATCCTGGCACCCTGGAC
 22  S  C  G  L  L  P  F  T  V  L  L  A  L  G  I  L  A  P  W  t
301 TGTGGAAGGAGGCAAAAATGATGCTATCAAAATCGGAGCCTGCCCTGCTAAAAAGCCTGC
 42  V  E  G  G  K  N  D  A  I  K  I  G  A  C  P  A  K  K  P  A
361 CCAGTGCCTTAAGCTTGAGAAGCCACAATGCCGTACTGACTGGGAGTGCCCGGGAAAGCA
 62  Q  C  L  K  L  E  K  P  Q  C  R  T  D  W  E  C  P  G  K  Q
421 GAGGTGCTGCCAAGATGCTTGCGGTTCCAAGTGCGTGAATCCTGTTCCCATTCGCAAACC
 82  R  C  C  Q  D  A  C  G  S  K  C  V  N  P  V  P  I  R  K  P
481 AGTGTGGAGGAAGCCTGGGAGGTGCGTCAAAACTCAGGCAAGATGTATGATGCTTAACCC
102  V  W  R  K  P  G  R  C  V  K  T  Q  A  R  C  M  M  L  N  P
541 TCCCAATGTCTGCCAGAGGGACGGGCAGTGTGACGGCAAATACAAGTGCTGTGAGGGTAT
122  P  N  V  C  Q  R  D  G  Q  C  D  G  K  Y  K  C  C  E  G  I
601 ATGTGGGAAAGTCTGCCTGCCCCCGATGTGAGcctgatccctgacattggcgccggctct
131  C  G  K  V  C  L  P  P  M  *
661 ggactcgtgctcggtgtgctctggaaactacttccctgctcccaggcgtccctgctccgg
721 gttccatggctcccggctccctgtatcccaggcttggatcctgtggaccagggttactgt
781 tttaccactaacatctcctttggctcagcattcaccgatctttagggaaatgctgttgg
841 agagcaaataaataaacgcattcatttctctatgcaaaaaaaaaaaaaaa aaaa
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the mSLPI cDNA is shown, with the amino acid sequence of the predicted translation product listed below the nucleotide sequence. An asterisk indicates the position of the stop codon. Numbers in plainface refer to the nucleotide sequence, and boldface numbers refer to the amino acid sequence.

Table1. The summary of PCR primer sequences, annealing temperatures and amplification cycles

Gene	5’ Forward	3’ Reverse	Temp (℃)	Cycles	Size
mSLPI	5’-CGGAATTCCAGAGCTCCCCTGCCTTC-3’	5’-GCTCTAGACATAGAGAAATGAATGCGTTT-3’	63	30	676bp
mVEGF	5’-GTGGACATCTTCCAGGAGTA-3’	5’-ATCTGCAAGTACGTTCGTTT-3’	60	35	382bp
mPDGF-BB	5’-CTCTTGACTCCAAGAACCTG-3’	5’-AATCCATCAGAGAAGGTGTG-3’	48	33	582bp
mbFGF	5’-GGCTTCTTCCTGCGCATCCA-3’	5’-GCTCTTAGCAGACATTGGAAGA-3’	53	35	354bp
mGAPDH	5’-CCATGGAGAAGGCTGGG-3’	5’-CAAAGATGTCATGGATGACC-3’	55	35	199bp

또한 NIH3T3 세포에 LPS 자극을 준 후, SLPI mRNA의 발현 양상을 정량적으로 분석하기 위하여 real-time PCR 을 수행하였다. 총 RNA 는 TRI reagent를 사용하여 추출하였고, RNA 양은 UV spectrophotometer (Amershamphamacia, UK)를 이용, 샘플당 1mg으로 정량 하여 사용하였다. Real-time PCR을 위한 프라이머 서열은 각각 forward : 5’-GCCCGGGAAAGCAGAGGTG-3’, reverse : 5’-ACATTGGGAGGGTTAAGCATCATACAT-3’ 로 제작하였다. 정량 후 총 RNA는 500ng 의oligo-dT (Invitrogen, Carlsbad, CA)와 Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-Time PCR 반응 조건은 95 ℃ 15분, 95 ℃ 15초, 60 ℃ 15초, 72 ℃ 15초이고 반응 횟수는 40회로서 ExicyclerTM (Bioneer, KOR)을 이용하여 수행 하였다. 반응 동안 나타나는 형광 값을 알아보기 위해 반응액 에는 1× 농도로 SybrGreen (Bioneer, KOR)을 첨가하였으며, 총 반응 양은 20 ml로 조절하였다.

3. 항체제조

EGGKNDAIKIGAC 펩타이드는 생쥐 SLPI (mSLPI) 단백질의 폴리펩타이드

부분 에서 선택하였다(box in Fig. 2). 선택한 SLPI 펩타이드는자동 펩타이드 합성기에 의해서 제조 되었다(Takara, Inc., KOR). 합성한 SLPI 펩타이드항체 용액은 항체 제작을 위해 토끼의 림프절에 주입해 첫 번째 면역 반응을 일으켰고, 3주 후에 두 번째 면역 반응을 수행 하였으며 10일 후, 세 번째 면역 반응을 거치고 난 뒤 20일 후에, 친화성 크로마토그래피 방법을 이용하여 생성된 SLPI 항체를 정제하였다.

NH2- **Signal Peptides Region(1-25)** **Secreted Peptides Region**

MKSCGLLPFTVLLALGILAPWTVEGGKNDAIKIGACPAKKPAQC
LKLEKPQCRTDWECPGKQRCCQDACGSKCVNPVPIRKPVWRKPGRCV
KTQARCMMLNP PNVCQRDGQCDGKYKCCEGICGKVCLPPM
-COOH

Fig. 2. Rabbit polyclonal antibody generated from pepteide in box against the mSLPI peptide sequences.

4. 면역학적 단백질 검출법(Western blotting)

세포질 내에 있는 SLPI 단백질 발현을 분석하기 위하여 면역학적 단백질 검출법 방법을 사용하였다. 세포는 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-Cl (pH 7.4), 2 mM Na3VO4, 2 mM Na4P2O7, 50 mM NaF, 2 mM EDTA (pH 7.4) 그리고 단백질분해효소 억제제인 leupeptin과 aprotinin을 첨가한 NP-40 용해완충액(lysis buffer)을 이용하여 총 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 30 mg씩 각각 같은 양을 정량 하여 실험에 사용 하였고 SDS 15 %-polyacrylamide 겔을 이용 전기영동을 통해 단백질을 분리해 냈다. 분리한 단백질은 nitrocellulose 막으로 이동 시킨 후, 5% skim milk를 이용하여 blocking 시켰고, anti-rabbit SLPI 항체(1 : 500)를 넣고 다음날까지 반응시켰다. 다음으로 세척 후 HRP (horseradish-peroxidase)가 붙어있는 goat-anti-rabbit 2차 항체(1 : 10,000,

SantaCruz Biotchnology, USA)를 처리하고 ECL (Amershamphamacia, UK) 을 이용하여 발색 시킨 후 현상하였다. 현상 후 나타난 단백질 밴드는 Science lab Image Gauge (FUJI FILM, JAP) 프로그램을 이용, 각 밴드의 밀도를 측정하여 정량하였다.

5. 면역침강법 *(Immunoprecipitation)*

LPS 처리 후 분비된 SLPI 단백질의 양을 알아보기 위하여 면역침강 방법이 사용되었다. Protein G agarose bead 들을 phosphate buffered saline (PBS)으로 3번 세척 후 500 ml의 배양액과 섞어 주었다. 1시간 동안 반응 후 SLPI 항체를 넣고 다음날까지 4 ℃에서 반응시켰다. 반응 후 단백질-bead-항체결합체 (immunoprecipate)는 PBS를 이용 세척하고 10,000 x g 에서 5분간 원심분리를 수행하였다. 이러한 단백질-bead-항체결합체에 SDS-PAGE용 sample buffer을 첨가한 후 5분간 끓여 주었다. 이후 과정은 western blotting 방법을 이용하였다.

6. 광학현미경 및 주사전자현미경적 관찰

LPS 자극에 각각 30분, 60분, 90분, 24시간, 48시간씩 노출된 NIH3T3 세포의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 위상차 현미경(Olympus, JPN)을 이용하여 관찰 하였다. 또한 LPS 처리 후 세포의 미세 구조를 관찰하기 위하여, 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 방법을 이용하였다. 주사전자현미경 관찰을 위하여 LPS 처리 후 NIH3T3 세포는 PBS에 희석한 2.5 % glutaraldehyde에 1차 고정 후 osmium tetraoxide (OsO_4)를 이용하여 2차 고정

을 수행하였다. 그 후 고정된 세포를 PBS로 세 번 세척하고 70%, 80%, 90%, 95% 그리고 마지막으로 100% 에탄올을 순차적으로 처리해 주면서 수분을 완전히 제거하였다. 그 다음 hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma)을 첨가하여 시료를 완전하게 건조시켰다. 준비된 시료들은 금입자 증착기로 표면을 처리한 후, 주사전자현미경(Hitach, H4700, Japan)을 이용, 15 Kv에서 관찰하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. LPS 자극을 준 *NIH3T3* 세포에서 *SLPI*와 성장인자들의 *mRNA* 발현

SLPI 와 VEGF mRNA 는 LPS 처리와 시간에 상관없이 강한 발현 양상을 보였다. PDGF 발현은 대조군에 비해 60분대에서 미약하지만 서서히 증가하기 시작했고 그 이후로는 일정한 발현 양상을 보였다. bFGF의 경우 24시간 까지 일정한 발현 양상을 보이다가 48시간에서 대조군에 비해 발현 양이 조금 감소하였으나 큰 차이를 나타내지는 않았다(Fig. 3A, B). LPS 자극을 준 NIH3T3 세포에서 SLPI, VEGF 그리고 bFGF 의 일정한 발현 양상은 이들이 LPS 자극에 의해 mRNA 수준에서는 영향을 받지 않음을 보여준다. SLPI mRNA의 정량을 측정한 Real-time PCR 결과는 RT-PCR 결과와는 다르게 90분대에서 다소 증가하였다(Fig. 3C). GAPDH의 일정한 발현 양상은 PCR 반응 시 같은 양의 cDNA 주형이 사용되었다는 것을 표시한다.

2. LPS 자극을 준 *NIH3T3* 세포의 세포질과 배양액에서 *SLPI* 단백질 발현

NIH3T3 세포에서 LPS 자극에 따른 SLPI 단백질의 발현 양상을 알아보기 위하여 세포질 용해액과 세포 배양액을 이용하여 western blotting 실험을 수행하였다. 실험 결과, 세포질 용해액에서는 SLPI 단백질이 60분에서 대조군에 비해 약 0.5 배 증가하였고 24시간과 48시간 에서는 각각 대조군에 비해 1.8배와 3.9배

로 증가 하였다. 세포 배양액에서 SLPI의 양은 세포질에서 나타난 경향과 일치하였는데 이는 SLPI 단백질이 발현 후 배양액 내로 분비되었음을 보여준다(Fig 4. A, B). 이러한 실험 결과 SLPI 단백질의 발현 유도는 NIH3T3 세포에서 LPS 자극에 의해 서서히 증가되는 것을 알 수 있었다.

3. LPS 자극에 따른 *NIH3T3* 세포의 형태학적 변화

LPS 자극에 따른 세포의 형태학적인 변화를 관찰하기 위하여 위상차 현미경을 이용한 결과 대조군과 실험군 세포간의 형태학적인 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 5A ① - ⑥). 그러나 LPS 처리 후 60분부터 NIH3T3 세포 수가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5A ③). LPS에 의해 자극된 NIH3T3 세포의 미세구조적인 변화의 유무를 알아보기 위하여 주사전자현미경 관찰을 수행하였다. LPS를 처리하지 않은 대조군 세포는 방추형의 전형적인 섬유모세포 모양을 나타냈다(Fig. 5B ①). 그에 비해 LPS를 처리한 후 30분과 60분에서 NIH3T3 세포의 세포질이 대조군에 비해 점점 확장된 것이 관찰 되었다(Fig. 5B ②, ③).

Ⅳ. 총괄 및 고안

섬유모세포는 LPS 자극에 따른 사이토카인과 매개체들을 분비함으로서 염증반응과 비특이적 면역반응에 관여한다고 알려졌다[10]. 또한 활성화된 섬유모세포는 대식세포에 비해 더 민감하게 대표적인 염증반응 인자인 산화질소를 만들어 낸다고 밝혀졌다[13]. 따라서 본 연구에서는 이전 실험에서 대식세포에 사용된 LPS의 50 mg/ml 보다 낮은 최소농도인 100 ng/ml로 섬유모세포주인 NIH3T3 세포에 처리하여 SLPI와 다른 성장인자들의 발현을 측정하였다. RT-PCR 결과 LPS 처리 여부와 시간에 상관없이 SLPI mRNA의 발현은 매우 강하게 나타났으나, 정량 PCR에서는 LPS에 의해 발현이 증가하는 양상을 보였다. LPS를 처리하지 않은 대조군에서 SLPI의 발현이 강한 발현을 나타냈다. SLPI 는 크게 항 염증반응에 관여하는 부위와 항 단백질분해 효소에 관여하는 두 부위로 구분된다[25]. 또한 elastase, cathepsin G, trypsin, chymotrypsin, 그리고 chymase와 같은 세린계열(serine) 단백질분해효소들의 작용을 방해하는 것으로 알려졌다[23]. 본 연구에서 LPS에 의해서 SLPI의 mRNA가 다소증가 하였으나, LPS에 관계없이 대조군의 세포에서도 강하게 발현된다는 것은 NIH3T3 세포에서 SLPI의 주된 생리적 역할은 단백질분해효소억제제로 작용하여 조직을 보호하는 기능을 한다는 것을 알 수 있었다.

또한, 본 연구에서는 Western blot 실험을 통해 단백질 수준에서 세포내 SLPI와 분비된 SLPI의 발현 유도를 알아보았다. 흥미롭게도 SLPI 단백질은 LPS 자극 초기부터 점점 증가하여 후반부까지 증가하는 양상을 나타냈는데, 이는 앞선 실험에서 보여준 VEGF 단백질 발현 양상과 일치하는 것이다. 본 연구에서 사용된 LPS는 100 ng/ml로 낮은 농도임에도 불구하고 SLPI가 발현이 증가하는 것으로 보아 NIH3T3 세포가 염증을 매개하는 세포로서의 역할도 할 수 있다는 가능

성과 SLPI는 항염증반응을 매개하는 사이토카인으로서 작용하는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서 VEGF 및 bFGF의 발현은 SLPI와 유사한 양상을 나타냈으며, 치수세포에서의 VEGF mRNA 발현 양상을 보면 LPS 처리 양(0, 20 mg/ml)과 시간(0, 24 hr)에 상관없이 일정하게 나타났지만 단백질 수준에서는 증가하는 양상으로 나타났다[4]. 또한 LPS에 자극되지 않은 치수세포는 비교적 높은 수준의 VEGF를 분비하고 이것은 치수 혈관의 유지를 위해 필요한 혈관생성 인자로서 이용되고 상아모세포 층에 대한 박테리아 침입으로부터 보호하는 역할을 한다고 하였다[4]. 본 연구에서 VEGF 단백질 발현을 확인하지는 못하였으나, VEGF의 mRNA의 발현에 변화가 없다 하더라도 전사 후 단계에서 조절되므로, NIH3T3 세포에서도 VEGF 단백질이 증가할 것으로 생각되나 이는 추후에 보완되어야 할 것이다. 이것으로 미루어 보아 NIH3T3 세포에서 VEGF의 발현은 치수세포에서와 동일하게 혈관생성을 촉진하고 박테리아 침입으로부터 보호하는 기능을 할 것으로 생각된다.

bFGF의 mRNA 발현은 일정하게 나타났는데 이전에 보고된 결과를 보면 bFGF의 발현이 LPS 자극 보다는 살아있는 박테리아를 감염시켰을 때 더 잘 나타났다고 하고 발현 양상은 박테리아의 수와 감염시간에 따라 달라진다고 하였다[19]. 또한 박테리아의 감염 후 섬유증(fibrosis)의 형성에 관여한다고 알려져 있으며, *in vivo*에서 신생혈관형성과정(angiogenesis)과 과립조직의 형성을 촉진한다고 하였다[7]. 이러한 양상으로 보아 bFGF의 발현은 NIH3T3 세포에서 LPS 자극에 별 영향을 받지 않는 것으로 생각된다. 그러나 VEGF처럼 전사 수준에서의 조절가능성 있기 때문에 추후에 단백질의 검증이 필요할 것으로 생각된다.

PDGF는 사람의 염증성 잇몸 조직에서 증가하는 경향을 나타내고 주로 주머니상피(pocket epithelium) 조직에 위치한다고 알려졌으며, 이러한 PDGF의 발현 증가는 치주질환 동안 일어나는 염증반응의 변화에 기여 한다고 하였다[18]. 또한

LPS는 PDGF-수용체 alpha형 발현을 증가 시키는 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 본 연구에서 NIH3T3 세포에서 PDGF mRNA의 발현이 LPS에 의해 적은 양이기는 하나 증가한 것은 염증반응에 관여하여 주변의 세포들(염증반응세포 또는 이후 세포)의 순환과 섬유모세포 등에 작용하여 유사분열을 촉진 할 것으로 생각된다[21].

위상차 현미경을 이용해 관찰한 결과 LPS 자극에 의해 NIH3T3 세포의 증식이 촉진되었다. 일반적으로 NIH3T3의 증식시간(doubling time)은 12시간인 것을 볼 때 60분에서부터 증가된 것을 볼 때 LPS 신호에 의해서 증식이 되었거나 LPS에 의해서 분비된 다른 성장인자들의 자극에 의해 세포가 증식된 것으로 생각된다. 그런데 이미 LPS는 잇몸 섬유모세포의 증식 활성을 억제한다는 보고가 있다[3]. SLPI는 사람의 자궁 내막 암종에서 세포의 분열 주기에 관여하는 cyclin D1 유전자의 프로모터 활성에 관여하여 이 유전자의 발현을 증가시키며, 세포내 SLPI는 항세포증식인자(anti-proliferative factor)를 억제하는 것으로 알려졌다[26]. 따라서 세포내에서 유도된 후 분비된 SLPI는 LPS 반응에 대해 길항작용을 할 것으로 보이고 이러한 길항작용에 의해 분비된 SLPI는 주변의 NIH3T3 세포의 증식을 촉진한 것으로 보인다(Fig. 6).

또한, 본 연구에서는 주사전자현미경을 이용하여 LPS에 자극된 NIH3T3 세포의 미세구조적인 변화를 관찰하였다. LPS에 의해 자극된 대식세포는 세포질 부위의 신장이 나타나지만 잇몸섬유모세포(gingival fibroblast)는 형태학적인 변화가 나타나지 않는다고 보고되었다[4]. 그러나 이 연구에서는 위상차 현미경 관찰만을 통해 형태학적인 변화를 관찰했을 뿐, LPS 자극에 따른 세포의 미세구조 변화는 보고되지 않았다. 본 연구에서 LPS 자극 후 30분과 60분대에서 세포질이 대조군에 비하여 신장된 것이 확인되었다. 염증반응에 가장 잘 반응하는 대식세포의 경우 LPS를 처리하였을 때 많은 세포질돌기가 형성되었지만[20], 잇몸섬유모세포에서는 형태학적인 변화가 나타나지 않았다[4]. 일반적으로 섬유모세포에서의

신장은 PDGF나 EGF 등의 신호에 의해 세포이동과 관련되어 나타나는 형태적인 특징으로, 본 주사현미경관찰로 미루어 볼 때, LPS에 의해 자극된 섬유모세포가 2차 신호전달 물질인 SLPI나 PDGF를 발현 분비함으로서 주변의 세포에 영향을 미친 것으로 볼 수 있다. 이중 발현이 약한 PDGF 보다는 SLPI의 작용에 의한 것으로 생각된다.

V. 결　　론

분비백혈구단백분해효소억제제(SLPI)는 염증 부위에서 중성구 엘라스타제에 의한 손상 작용에 대해 조직을 보호하는 역할을 한다. SLPI 의 새로운 기능에 대한 연구들은 단백질분해효소억제제 역할보다는 선천적 면역반응 작용에 주로 관여 할 것임을 보고하였다.

따라서 본 연구는 섬유모세포 세포주(NIH3T3)에서 박테리아성지질다당류(LPS) 자극에 의한 SLPI의 기능을 확인하기 위하여 LPS 처리에 따른 여러 성장인자들과 비교하여 SLPI의 발현을 알아보았다.

역전사효소 중합반응(RT-PCR) 과 면역학적 단백질 검출법(Western blot)은 LPS 처리 후 SLPI와 몇몇 성장 인자들(VEGF, bFGF, PDGF)의 mRNA 와 단백질의 검출을 위해 수행하였다. NIH3T3 세포주를 ml 당 100ng 의 LPS 에 각각 30분, 60분, 90분, 24시간, 48 시간 동안 노출 시켰다. RT-PCR 결과 SLPI 와 VEGF mRNA 는 LPS 처리와는 상관없이 강한 발현 양상을 보였다. bFGF mRNA는 대조군과 같이 약하게 발현 하였고, PDGF mRNA 는 LPS 노출 시간에 따라 점진적으로 증가하는 양상을 나타냈다. 그러나 세포질 용해액 과 세포배양액에서 SLPI 단백질의 수준은 LPS 처리에 의해 증가하였다. 또한 광학 현미경 관찰과 전자 현미경 관찰은 LPS가 NIH3T3 세포주의 형태학적인 변화를 유발시킴을 증명 하였다.

따라서 LPS는 NIH3T3 세포에서 SLPI의 발현 증가를 조절하며, 분비된 SLPI는 세포분열과 이동을 자극할 것이라는 결론을 얻었다. SLPI가 세포분열과 세포이동에 어떻게 관여하는지는 아직까지 규명되지 않은 실정이므로, 추후에 SLPI 단백질이나 유전자 도입을 통하여 세포이동에 관련된 실험이 진행되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, Brewer MT, Thompson RC, Crystal RG (1991). Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. J Clin Invest 87:2207 - 2215.

2. Albert B, Johnson A, Lewis J, Martin R, Roberts K, Walter P (2002). The molecular biology of The cell. 4rd ed pp. 1300-1301.

3. Bartold PM, Narayanan AS, Page RC (1992). Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. J Periodontal Res 27:499-505.

4. Botero TM, Mantellini MG., Song W, Hanks CT, Nör JE (2003). Effect of lipopolysaccharides on vascular endothelial growth factor expression in mouse pulp cells and macrophage. Eur J Oral Sci 111:228-234.

5. Coin PG, Lindroos PM, Bird GS, Osornio-Vargas AR, Roggli VL, Bonner JC (1996). Lipopolysaccharide up-regulates platelet-derived growth factor (PDGF) alpha-receptor expression in rat lung myofibroblasts and enhances response to all PDGF isoforms. J Immunol 156:4797-4806.

6. Fritz H (1988). Human mucus proteinase inhibitor (human MPI). Human seminal inhibitor I (HUSI-I), antileukoprotease (ALP), secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI). Biol Chem Hoppe-Seyler 369:79 - 82.

7. Gospodarowicz D (1990). Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. Clin Orthop Relat Res 257:231-248.

8. Jeffrey RJ, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. FASEB J 11: 457-465.

9. Jin F, Carl N, Danuta R, Aihao D (1997). Secretory leukocyte protease inhibitor: A macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. Cell 48:417-426.

10. Kaoru T, Teruo K, Masayasu N (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced IL-6 production by embryonic fibroblasts isolated and cloned from LPS-responsive and LPS-hyporesponsive mice. Mol Immun 34: 16-17.

11. Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K (2005). Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis. Infec Immun 73:2655-2664.

12. Laurie RG, Audrey LA, Diane CS (2002). Construction,non-denaturing affinity purification, and characterization of baculovirally expressed human secretory leukocyte protease inhibitor. Prot Exp & Purif 26:179-186.

13. Lavnikova N, Laskin DL (1995). Unique patterns of regulation of nitric oxide production in fibroblasts. J Leukoc Biol 58:451-458.

14. Leung, DW, Cachianes G., Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246:1306-1309.

15. Love RM, Jenkinson HF (2002). Invasion of dental tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 13(2):171-183.

16. Nick D, Gholamreza HG, Jing Z, Lea B, Patrick de B, Hilde R (2003). Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. Proc Natl Acad Sci 100:5778-5782.

17. Ohlsson K, Bergenfeldt M, Bjork P (1988). Functional studies of human secretory leukocyte protease inhibitor. Adv Exp Med Biol 240:123 - 131.

18. Pinheiro ML, Feres-Filho EJ, Graves DT, Takiya CM, Elsas MI, Elsas PP, Luz RA (2003). Quantification and localization of platelet-derived growth factor in gingiva of periodontitis patients. J Periodontol 74:323-328.

19. Prochnau D, Rodel J, Hartmann M, Straube E, Figulla HR (2004). Growth factor production in human endothelial cells after Chlamydia pneumoniae infection. Int J Med Microbiol 294:53-57.

20. Ross HM, Romrell LJ, Kaye GI (1995). Histology: a text and atlas, 3rd ed pp. 107-110.

21. Samuel EL, Jon CN, Robert BC, Harry NA (1987). Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth

factors. Proc Natl Acad Sci 84:7696-7700.

22. Slavin, J (1995). Fibroblast growth factors At the heart of angiogenesis. Cell Biol Int 19:431-444.

23. Stetler G, Brewer MT, Thompson RC (1986). Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases. Nucleic Acids Res 14:7883-7896.

24. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C (1994). Macrophages and angiogenesis. J LeukBiol 55:410-422.

25. Thompson RC, Ohlsson K (1986). Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. Proc Natl Acad Sci 83:6692-6696, 1986.

26. Zhang D, Simmen RC, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D, Simmen FA (2002). Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth-associated genes. J Biol Chem 277:29999-30009.

사진부도 설명

Fig. 3. RT-PCR assay of the SLPI and growth factors mRNA. A) SLPI and VEGF, PDGF, bFGF mRNA expression in NIH3T3 cells treated with LPS for control (lane 1), 30 min (lane 2), 60 min (lane 3), 90 min (lane 4), 24 hr (lane 5), and 48 hr (lane 6), respectively. GAPDH was used as an amplification internal control for the RT-PCR assays (S: 100 bp DNA size marker). B) Fold induction was quantified in band intensity by dividing the intensity of each growth factor and SLPI signal to that of control sample. C) Quantification of SLPI mRNA expression in NIH3T3 cells using Real Time-PCR method. SLPI mRNA expression in NIH3T3 cells treated with LPS for control (1), 30 min (2), 60 min (3), 90 min (4), 24 hr (5), and 48 hr (6), respectively. ····· 22

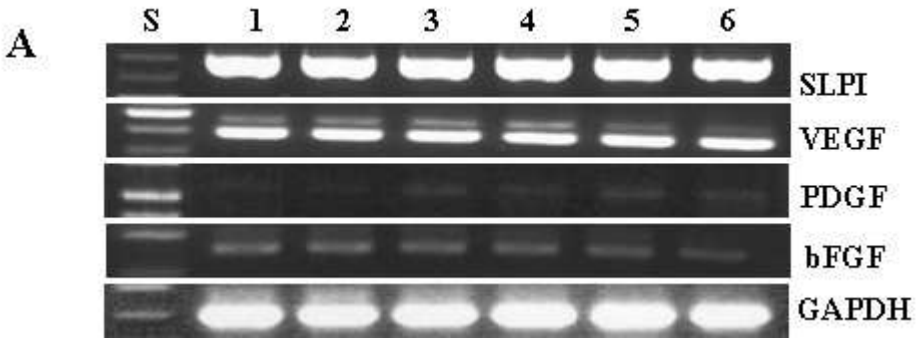
Fig. 4. SLPI protein levels in NIH3T3 cells by LPS treatment. To evaluatethe effect of LPS on SLPI protein expression in NIH3T3 cells (control, lane 1), we exposed to 100 ng/ml LPS for 30 min (lane 2), 60 min (lane 3), 90 min (lane 4), 24 hr (lane 5) and 48 hr (lane 6), collected the supernatant and performed immunoprecipitation. Fold of induction was quantified in the lysates and media by dividing the intensity of SLPI signals to that of control sample (M: medium, L: lysates). ····· 24

Fig. 5. Observation of morphology in NIH3T3 stimulation with LPS. A) Morphology of NIH3T3 cells observed using the phase contrast microscopy. The cells exposed to LPS (100 ng/ml) for control (①) and 30 min (②), 60 min (③)and 90 min (④), 24 hr (⑤), and 48 hr (⑥), respectively. All magnification is x 200. B) SEM analysis of NIH3T3 cells stimulation with LPS. The change of morphology was represent at 60 min (③) by LPS compared with control (①) and 30 min (②)

samples. ····· 25

Fig. 6. Diagram of conclusions. A) mRNA expression of SLPI, VEGF, bFGF, PDGF in NIH3T3 cell after LPS stimulation. B) LPS induces the SLPI gene and protein. After induction of SLPI, secreated SLPI inhibits LPS function and released SLPI promotes proliferation and migration of neighboring cells. ····· 26

Figure 3.


A
S
1
2
3
4
5
6
SLPI
VEGF
PDGF
bFGF
GAPDH

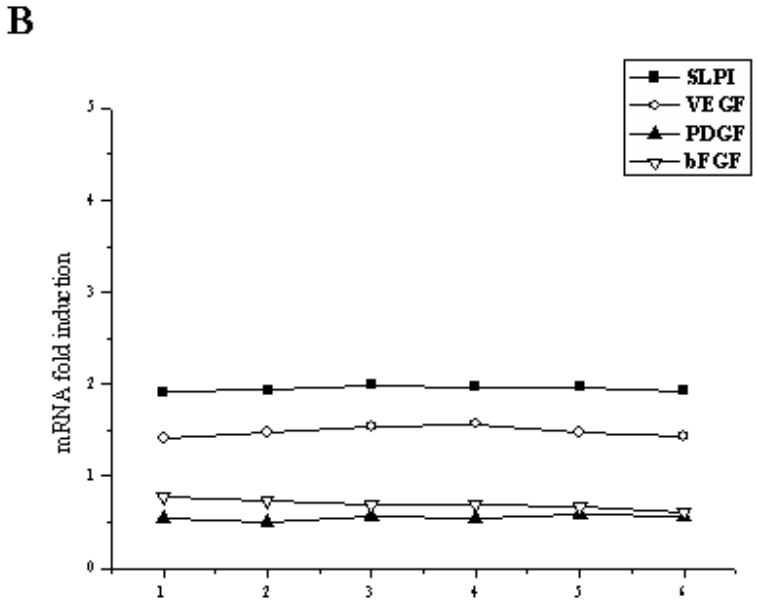

B
SLPI
VEGF
PDGF
bFGF
mRNA fold induction
0
1
2
3
4
5
1
2
3
4
5
6

Figure 3. (continued)

C

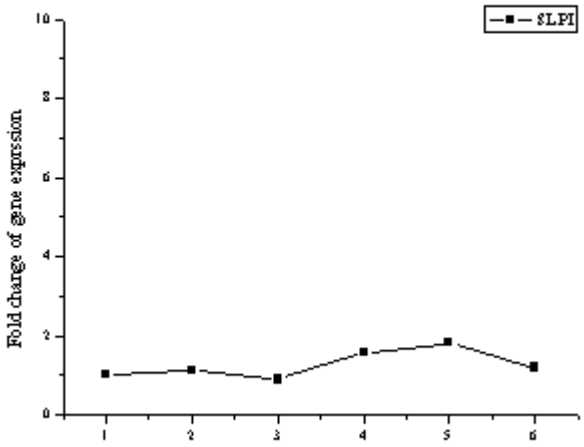
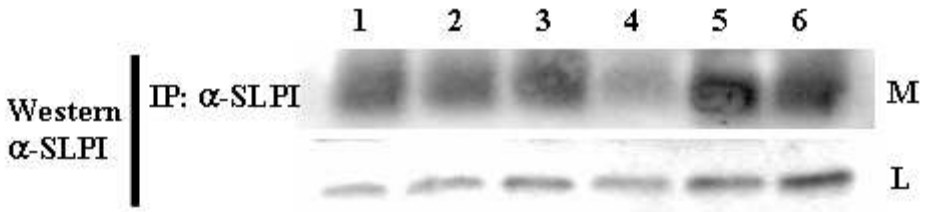
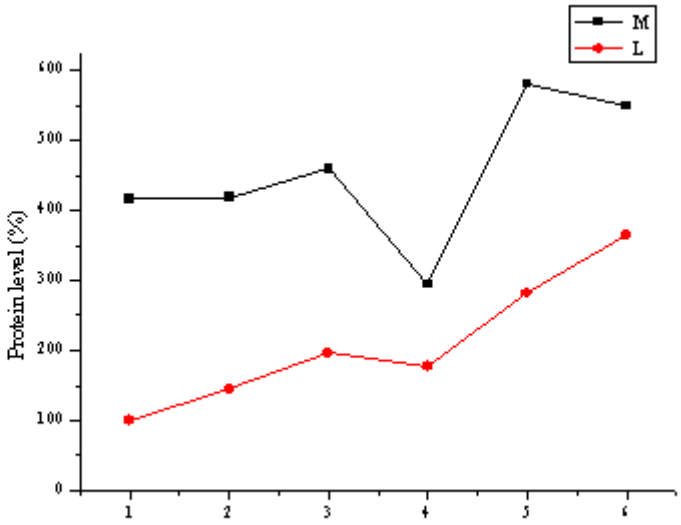


Figure 4.

A

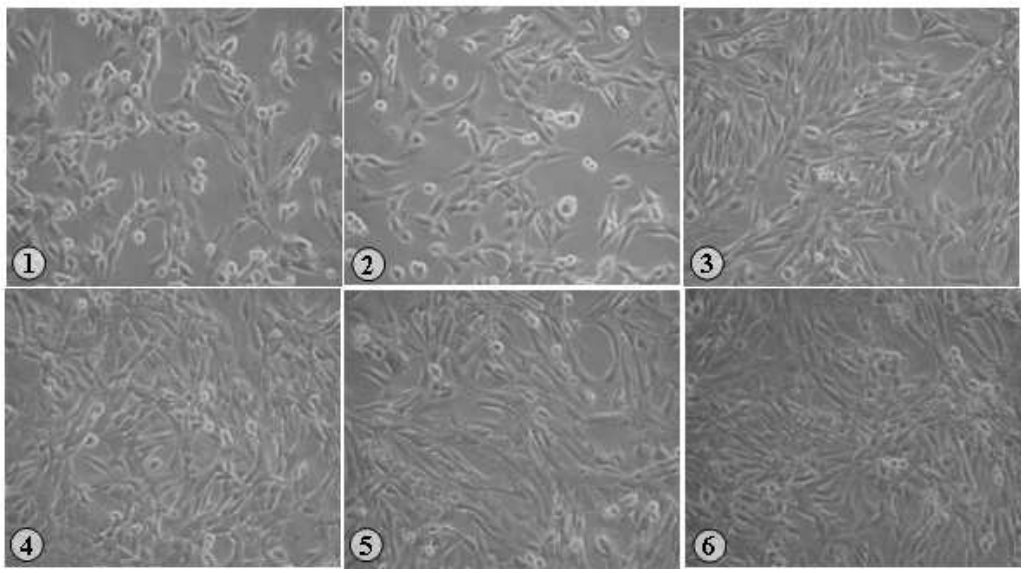

1
2
3
4
5
6
Western
α-SLPI
IP: α-SLPI
M
L

B


M
L
Protein level (%)
0
100
200
300
400
500
600
1
2
3
4
5
6

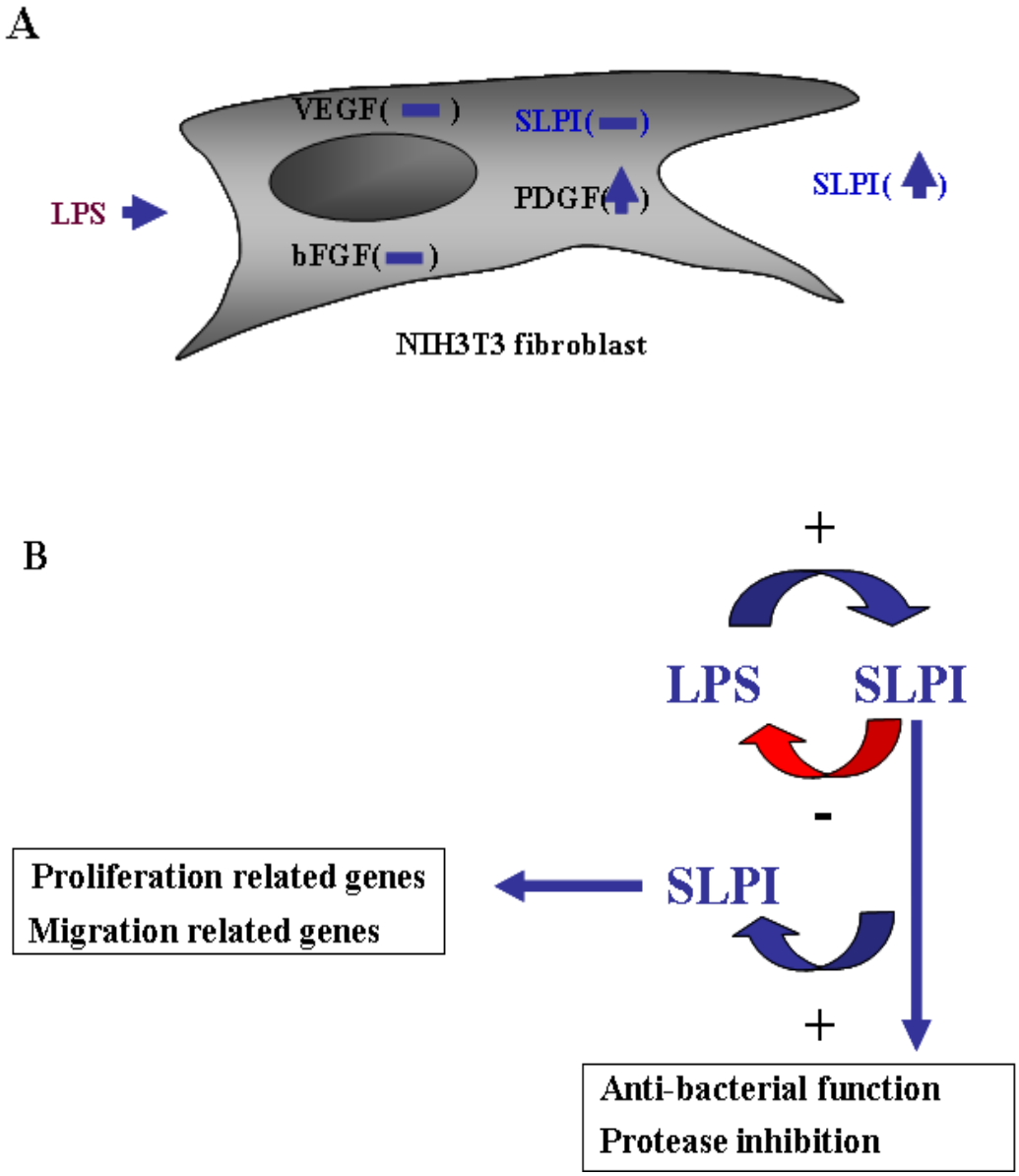
Figrue 5.

A



B

Figure 6.


A
VEGF( )
SLPI( )
LPS
PDGF( )
SLPI( )
bFGF( )
NIH3T3 fibroblast
B
+
LPS
SLPI
-
Proliferation related genes
Migration related genes
SLPI
+
Anti-bacterial function
Protease inhibition