

마우스 복강 대식세포의 Prostaglandin 합성에 미치는 Bacterial Lipopolysaccharide의 영향

아주대학교 의과대학 생리학교실

문 창 현 · 김 지 영 · 최 소 연
박 정 미 · 어 수 익 · 이 수 환

Studies on the Prostaglandin Synthesis Stimulated by Bacterial Lipopolysaccharide in Mouse Peritoneal Macrophages

Chang-Hyun Moon, Ji Young Kim, So Yeon Choi, Jeong Mi Park
Soo Ik Aw and Soo Hwan Lee

Department of Physiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Production of inflammatory mediators by the host in response to bacterial lipopolysaccharide (LPS) is generally believed to be responsible for the pathogenesis of septic shock. One of the mediators associated with septic shock sequelae are arachidonic acid metabolites, including prostanoids and leukotrienes. Prostaglandin H synthase (PGHS) is a rate-limiting enzyme in prostanoid synthesis of which there were very recently reported two different isotypes. Their activities and expressions are known to be regulated by different mechanisms. Also, differences in response to stimulators have been shown for the different cell types. Even in the macrophage populations, there have been reported diverse profiles of prostanoid synthesis. These discrepancies might be due to the differences in the underlying regulation mechanisms, but presently, little information is available regarding these. Thus, in order to get insights into these discrepancies, firstly, we compared the characteristics of LPS-induced prostanoid production in alveolar macrophages and mouse peritoneal macrophages and secondly, we examined whether variations of glucose concentration affect LPS-induced prostanoid synthesis and PGHS-2 activity in both cell types. Overall responses to LPS were qualitatively similar between both cell types, and LPS-induced TXB₂ production was attenuated in high glucose media.

Key Words: Peritoneal macrophage, Alveolar macrophage, Bacterial lipopolysaccharide, Prostaglandin H synthase

서 론

그람 음성균의 주된 구성물인 LPS (lipopolysaccharide)는 박테리아성 감염의 주요 병인으로 알려져 왔으며, 생체내 노출시 열, 쇼크, 전신성 혈관내 응축 (disseminated intravascular coagulation) 등의 증상을 유발한다. LPS가 일으키는 병적증상은 표적세포에서 유리 또는 생성되는 여러 cytokine들의 매개물들이 직, 간접적

인 요인이 되며, 따라서 LPS가 유발하는 병리학적 이상에 관한 연구 역시 이러한 매개물들의 생성조절에 주된 관심이 집중되어 있다^{1,2}. 이중 대표적인 것이 arachidonic acid 대사체들로서 prostaglandin H synthase 경로 또는 lipoxygenase 경로를 통해 생성된 prostanoids와 leukotrienes들이다.

Prostaglandin H synthase(PGHS)는 prostaglandin 및 thromboxane 합성의 첫 단계를 담당하는 효소로서 arachidonic acid로부터 PGG₂를 생성하는 cyclooxygenase 활성화와 PGG₂로부터 PGH₂를 생성하는 peroxidase 활성화의 두가지 효소 활성을 나타낸다³. 이 효소는, PGG₂로부터 PGH₂로의 변환시에 불활성화 됨으로써 강력한 생

저자연락처: 문창현, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5, 아주대학교 의과대학 생리학교실, Tel (0331) 219-5040, Fax (0331) 219-5049

리활성을 갖는 prostaglandin 또는 thromboxane의 과도한 생성을 방지하는 특성을 지니고 있다. 따라서 각종 agonist들에 의해 일어나는 cyclooxygenase계를 통한 prostaglandin 합성의 활성화는 효소 자체의 빠른 불활성화 덕분에 자동적으로 제한이 된다고 할 수 있다. 이러한 사실은 세포막 인지질로부터의 arachidonic acid의 유리가 과연 여러 agonist-response계에서의 prostaglandin 또는 thromboxane의 폭발적인 생성을 유발하기에 충분한가에 대한 매우 중요한 의문을 제기하고 있다. 현재, arachidonic acid로부터의 prostaglandin 생성을 지속시키기 위해서는, 종종 이 PGHS의 새로운 합성이 필요하다는 의견들이 여러 연구자들에 의하여 제시되고 있으며, 이러한 사실들은, 몇몇 세포계에 있어서 각종 mitogen 처리에 의한 세포내 PGHS 발현 증가와 병행하여 prostaglandin 합성이 증가된다는 보고들로써 뒷받침되고 있다⁴⁻⁶.

PGHS에 대한 cDNA는 sheep, mouse, human 세포에서 이미 분리되어 그 염기 서열이 밝혀진 바 있다⁷. 특히 최근에는 mitogen에 의해 유도되는 새로운 type의 PGHS의 존재가 Rouse sarcoma virus에 의해 변형된 chicken embryo fibroblast⁸ 및 phorbol ester 또는 serum에 의해 자극된 3T3 cell⁹⁻¹¹에서 확인된 바 있으며, 이후 전자는 PGHS-1, 후자는 PGHS-2로 명명된 바 있다. 강력한 항염증제로 이용되고 있는 dexamethasone은 각종 stimulant에 의해 자극된 fibroblast에서의 PGHS-2의 발현을 선택적으로 억제하며 이때, PGHS-1의 발현에는 전혀 영향을 주지 않음이 확인된 바 있다.⁵ 이러한 사실은 두가지 type의 PGHS의 발현이 서로 다른 기전에 의해 조절되고 있음을 시사하고 있으나 아직 자세한 발현 조절 기전에 대해서는 알려진 바 없으며 또한 각종 agonist에 의해 자극된 세포 또는 병리, 생리학적 상태에서의 전반적인 prostaglandin 합성에 대한 각 isozyme의 공헌도 등에 대해서도 아직 이렇다할 결과가 보고된 바 없다¹². 또한 PGHS의 발현과 관련된 세포내의 반응은 stimulant의 종류 뿐 아니라 세포의 종류에 따라서도 그 기전이 상이하게 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 세균 감염시 병리학적 제 증상을 발현하는 원인 물질로 알려져 있는 내독소인 lipopolysaccharide에 의한 prostaglandin 합성증가 작용 기전을 이해하고 패혈증에 발현기전에 대한 이해를 넓히기 위한 연구의 일환으로 lipopolysaccharide를 랫드 폐포 대식세포 및 마우스 복강 대식세포에 처리하여 이때 유발되는 prostaglandin 합성증가 특성을 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 폐포 대식세포의 분리

자성 Sprague-Dawley (SD) 랫드를 실험에 사용하였으며, 폐포 대식세포는 Chandler와 Fulmer의 bronchoalveolar lavage 법에 준하여 다음과 같이 분리하였다¹³. Ethyl ether로 마취시켜 개복한 후, 복대 동맥으로부터 최대한의 혈액을 취하여 실험 치사시켰다. 흉강을 열어 기도를 cannulation시키고 폐를 분리한 후, 30 ml의 cold PBS (13.6 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)를 three-way cock의 한쪽으로 조금씩 넣어 조심스럽게 마사지하면서 다른 쪽으로부터는 lavage한 액을 취하였다. 이 액을 600 g에서 5 분간 원심 분리시켜 세포 침전물을 얻고 여기에 100 U/ml penicillin (Sigma, St Louis, MO)과 100 µg/ml streptomycin (Sigma, St Louis, MO)이 함유된 RPMI-1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 5 ml를 가하여 재현탁시켰다. 세포 수와 생존율은 hemocytometer를 사용하여 trypan blue exclusion법으로 결정하였으며 통상 90% 이상의 생존율을 나타내었다.

24 well microtiter plate (Nunc, Naperville, IL)에 부유세포를 5×10^5 cells/well이 되도록 가하고 37°C에서 5% CO₂/95% O₂로 2 시간동안 배양하여 세포가 plate 바닥에 부착되도록 하였다.

2. 복강대식세포의 분리

웅성 C57BL/6 마우스를 이용하였으며, Ouwendijk등의 lavage법에 준하여 다음과 같이 분리하였다¹⁴. 마우스를 경추탈골하여 치사시킨 후 주사기를 이용하여 복강에 cold PBS를 조심스럽게 밀어넣었다. 모세혈관이 파열되지 않도록 천천히 흔들어 준 뒤 부유되어 나온 복강 대식세포를 취하였다. 1500 rpm에서 5 분간 원심분리시켜 얻은 pellet에 100 U/ml penicillin (Sigma, St Louis, MO)과 100 µg/ml streptomycin (Sigma, St Louis, MO) 그리고 3% fetal calf serum (FCS, GIBCO BRL, Grand Island, NY)이 함유된 RPMI-1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 5 ml를 가하여 부유시켰다. 세포수와 viability는 hemacytometer를 사용하여 trypan blue exclusion법으로 결정하였다. 24 well microtiter plate (Falcon, USA)에 부유세포를 5×10^5 cells/well이 되도록 가하고 37°C에서 5% CO₂/95% O₂로 2 시간동안 배양하여 세포가 plate 바닥에 부착되도록 하였다.

3. TXB₂ 생성능과 PGHS 활성의 측정

세포에 3% fetal calf serum (FCS, GIBCO BRL, Grand Island, NY)이 포함된 RPMI 1640 배지를 가하고 LPS (10 µg/ml, Sigma, St Louis, MO) 등의 약물과 함께 37 °C에서 배양하였다.

16 시간동안 배양한 후 배지를 전량 취하여 -20°C에 보관하였다가, 생성된 TXB₂의 양을 radioimmunoassay (RIA)로 측정하였다. TXA₂는 alveolar macrophage의 endogenous arachidonic acid가 PGHS에 의해 대사되어 생성하는 활성화 형태의 주대사체이지만, 불안정하여 즉시 TXB₂로 전환되므로 TXB₂를 측정 지표로 삼았다.

PGHS의 활성은 Fu등에 의한 실험 방법에 준하여 측정하였다⁴. 즉, TXB₂ 생성능을 측정하기 위해 배지를 제거한 cell에, 과량의 arachidonic acid (10 µg/ml, Sigma, St Louis, MO)가 함유된 PBS를 가하여 10 분간 배양하였다. 그 후, 배지를 취하여 여기에 포함된 TXB₂의 양을 RIA에 의해 정량함으로써 PGHS의 활성을 알아보았다. 외부에서 직접 과량의 arachidonic acid를 가하여 합성된 TXA₂는 PLA₂가 작용하는 과정을 거치지 않으므로 PGHS의 활성을 반영하는 것으로 추정하였다.

4. TXB₂ 정량을 위한 radioimmunoassay

RIA는 다음의 방법에 준하여 실시하였다. 적당량의 배지를 취해 PBS-gel (0.1% gelatin in PBS buffer, pH 7.4)에 희석하여 600 µl로 만든 후, 여기에 [³H]-TXB₂ 용액 142.10 Ci/mmol (DuPont NEN, Boston, MA) 100 µl와 TXB₂ 항체 200 µl를 가하여 잘 혼합하고, 4°C에서 12 시간동안 방치하여 반응액 중의 TXB₂와 [³H]-TXB₂가 항체에 경쟁적으로 결합하도록 하였다. 반응하여 생성된 TXB₂-TXB₂ 항체 복합체를 제외한 유리 TXB₂를 제거하기 위하여 600 µl의 charcoal (1 mg/ml dextran, 6 mg/ml charcoal in PBS, Sigma, St Louis, MO)을 가해 섞은 후, 4°C에서 15 분간 방치하였다. 흡착된 유리 TXB₂는 2000 g에서 5 분간 원심분리를 행하여 침전시켜 제거하였으며, 상층에 남겨진 [³H]-TXB₂의 radioactivity는 liquid scintillation counter (LKB 1211 Rackbeta, Pharmacia LKB, Sweden)를 이용하여 측정하였다. Scintillation cocktail은 xylene과 Triton X-100을 3:1의 비율로 혼합한 용액에 PPO가 0.3% 함유되도록 조제하여 사용하였다. 검체 중의 TXB₂양은 작성된 검량선으로부터 산출하였다.

5. 통계처리

모든 data는 mean ± SD로 나타내었으며, Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 복강 및 폐포 대식세포에서 TXB₂ 생성능 및 PGHS 활성에 미치는 LPS의 영향

분리된 폐포 대식세포에 aspirin (500 µM)을 2 시간 동안 전 처리한 후 LPS를 가하고 일정 시간동안 배양하였다. TXA₂는 대식세포에서 생성되는 주된 PGHS 대사체로, 일단 생성된 후 자발적으로 TXB₂로 재빨리 불활성화되므로 본 실험에서는 이 TXB₂를 radioimmunoassay를 통해 측정하였다. LPS에 의한 TXB₂ 생성능 및 PGHS 활성은 복강 대식세포 (Fig. 1, 2) 및 폐포 대식세포 (Fig. 3, 4)에서 동일한 반응 양상을 나타내었다. 각 반응시간동안 LPS 작용에 의해 배지 중으로 유리된 TXB₂ 양은 3시간째부터 약간씩 증가하기 시작하다가 10 시간 이후부터는 급격히 증가하였으며 실험마다 약간의 차이는 있었으나 16 시간에 최대 생성량을 나타내었다. 본 연구실에서 행한 예비 실험 결과 endo-

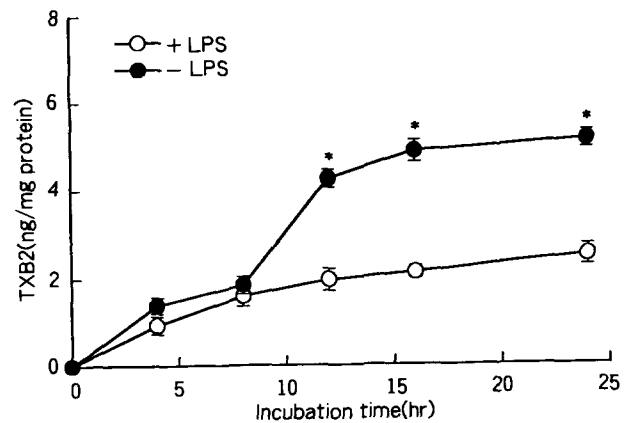


Fig. 1. Time course of TXB₂ accumulation in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages after pretreatment with aspirin. Cells were allowed to adhere for 2 h in the presence of aspirin (500 µM) to inactivate endogenous prostaglandin H synthase and washed three times. The cells were incubated in RPMI 1640 with or without LPS (10 µg/ml) for times shown. After removal of the medium, the levels of TXB₂ were measured by radioimmunoassay. Each point represents mean ± S.D. of triplicate samples. *: p<0.01 vs control.

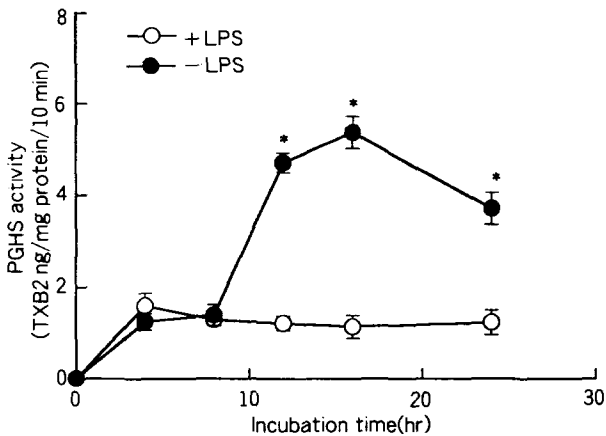


Fig. 2. Time course of PGHS activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages after pretreatment with aspirin. Cells were allowed to adhere for 2 h in the presence of aspirin (500 μ M) to inactivate endogenous prostaglandin H synthase and washed three times. The cells were incubated in RPMI 1640 with or without LPS (10 μ g/ml) for times shown. For the measurement of PGHS activity, cells were incubated with arachidonic acid (30 μ M) for 10 min, and the levels of TXB₂ from the medium were measured by radioimmunoassay. Each point represents mean \pm S.D. of triplicate samples. *: p<0.01 vs control.

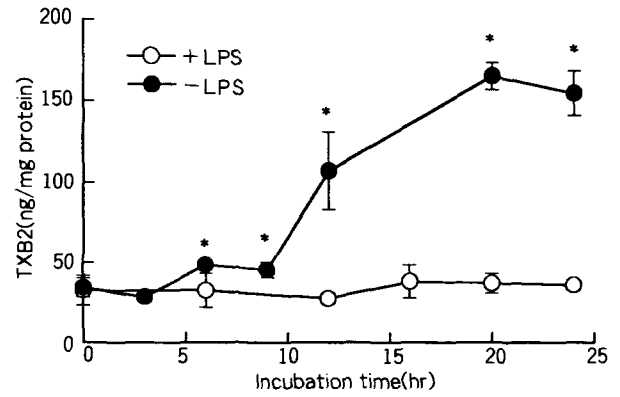


Fig. 3. Time course of TXB₂ accumulation in LPS-stimulated rat alveolar macrophages after pretreatment with aspirin. Cells were allowed to adhere for 2 h in the presence of aspirin (500 μ M) to inactivate endogenous prostaglandin H synthase and washed three times. The cells were incubated in RPMI 1640 with or without LPS (10 μ g/ml) for times shown. After removal of the medium, the levels of TXB₂ were measured by radioimmunoassay. Each point represents mean \pm S.D. of triplicate samples. *: p<0.01 vs control.

genous PGHS 활성은 aspirin 전처리에 의해 90% 이상 억제되었으므로 LPS처리에 의해 측정된 PGHS 활성은 새로이 합성된 효소의 활성을 반영하는 것으로 추정할 수 있었다. PGHS 활성 역시 처음 3 시간까지는 약간 감소하다가 그 후 약간씩 증가하여 16 시간째에 최대 효과를 나타내었다. 따라서 이후의 실험은 LPS 처리시간을 16 시간으로 하여 진행하였다.

2. 여러농도의 포도당이 LPS에 의한 TXB₂ 생성 및 PGHS 활성 증가에 미치는 영향

복강 및 폐포 대식세포의 LPS에 대한 반응성의 차이를 확인하고자 세포내 protein kinase C (PKC)를 활성화시키는 것으로 알려져 있는 포도당¹⁶의 농도를 변화시켜 가면서 TXB₂의 생성에 미치는 영향을 살펴보았다.

포도당은 LPS 처리군 및 비처리군 모두에서 그 농도가 증가함에 따라 TXA₂ 생성능을 감소시키는 경향을 보였으며 이러한 작용은 복강 (Fig. 5) 및 폐포 (Fig. 6) 대식 세포에서 동일한 양상을 나타내었다. 특히, 배지 중에 존재하는 정상적인 포도당 농도 (2 mg/ml)에 비하여 고농도 포도당 (8 mg/ml)에서는 LPS에 의한 induction 경향이 통계적으로 유의성있게 감소됨을 확인하였

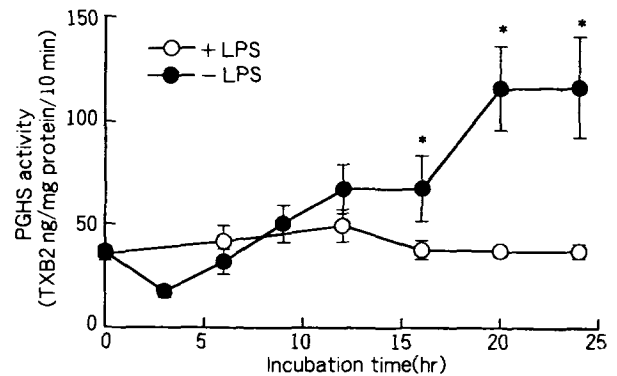


Fig. 4. Time course of PGHS activity in LPS-stimulated rat alveolar macrophages after pretreatment with aspirin. Cells were allowed to adhere for 2 h in the presence of aspirin (500 μ M) to inactivate endogenous prostaglandin H synthase and washed three times. The cells were incubated in RPMI 1640 with or without LPS (10 μ g/ml) for times shown. For the measurement of PGHS activity, cells were incubated with arachidonic acid (30 μ M) for 10 min, and the levels of TXB₂ from the medium were measured by radioimmunoassay. Each point represents mean \pm S.D. of triplicate samples. *: p<0.01 vs control.

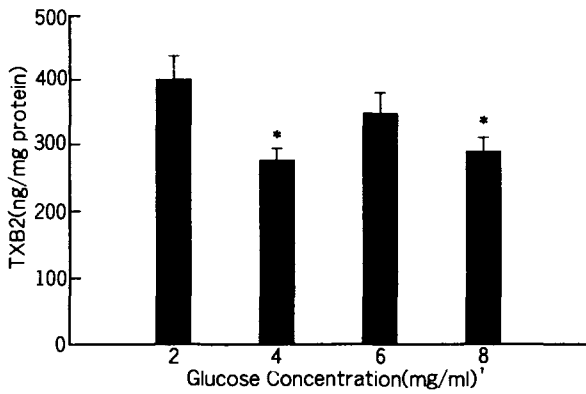


Fig. 5. Effects of glucose on TXB₂ accumulation in LPS stimulated mouse peritoneal macrophages. Isolated cells were incubated with LPS (10 µg/ml) and each concentration of glucose (2, 4, 6, 8 mg/ml) for 16h. Accumulated levels of TXB₂ synthesized from endogenous arachidonic acid were determined from the incubation medium removed. The results represent mean ± S.D. of triplicate samples. *: p<0.05 vs 2 mg/ml glucose treated group.

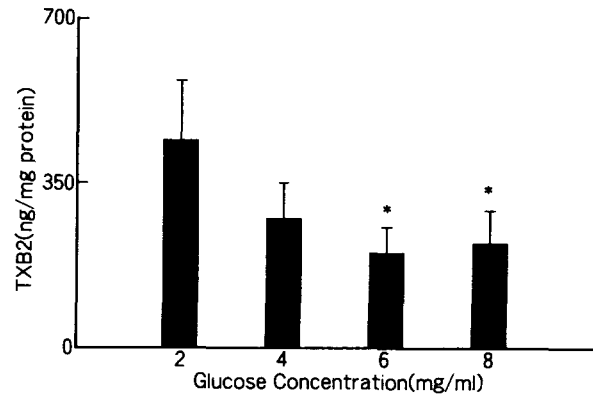


Fig. 6. Effects of glucose on TXB₂ accumulation in LPS stimulated rat alveolar macrophages. Isolated cells were incubated with LPS (10 µg/ml) and each concentration of glucose (2, 4, 6, 8 mg/ml) for 16h. Accumulated levels of TXB₂ synthesized from endogenous arachidonic acid were determined from the incubation medium removed. The results represent mean ± S.D. of triplicate samples. *: p<0.05 vs 2 mg/ml glucose treated group.

다. 한편, 포도당 자체는 그 농도가 증가하더라도 세포의 생존률이나 성장에는 별다른 변화를 일으키지 않았다.

고 찰

LPS는 그람 음성 박테리아의 세포외벽을 구성하는 주된 물질로 여러 eukaryotic 세포 및 포유동물 조직에 영향을 미치는 강력한 생리적 인자로 패혈증을 유발하는 주된 요인이 된다. 포유동물에 대한 LPS의 작용은 다양하여 면역계에 대한 비특이적인 활성화, complement cascade의 활성화, 특징적인 쇼크작용 등을 수반하며¹, 이러한 LPS의 작용은 cytokine, TNF-α, IL-1β, eicosanoids 등의 과도한 생성에 의하여 유발된다^{1,17}. LPS에 의한 prostanoids의 증가는 내피세포¹⁸, 호중구¹⁹, 대식세포²⁰ 그리고 단핵세포²¹ 등에서 이미 보고된 바 있으며, 특히 사람의 단핵세포에서는 LPS가 eicosanoids 중 주로 TXA₂ 생성을 시간 및 농도 의존적으로 증가시키며 보고되었다²². 몇몇 연구에서 이러한 LPS의 작용이 prostanoids의 기질이 되는 arachidonic acid 유리에 관여하는 phospholipases를 활성화시킴으로써 비롯된다는 보고가 있으나 아직 논란의 여지가 많으며²³ 최근 사람의 단핵세포⁴, 폐포 대식세포⁵, 복강 대식세포²⁴ 등

의 실험에서 LPS에 의한 prostanoids의 생성증가가 PGHS를 활성화시킴으로써 일어난다고 보고하고 있다. PGHS는 PGHS-1과 PGHS-2의 적어도 두 가지 이상의 isozyme이 존재하며 PGHS-1은 기저상태에서 세포 및 조직의 항상성을 유지하는 데 중요하며, PGHS-2는 염증반응등 병적 상태에서 그리고 mitogen등에 의해 세포가 활성화되었을 때 그 활성이 급격히 증가되는 효소로 LPS는 이 PGHS-2에 작용하여 prostanoid의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 여러 in vitro 실험 결과에 의하면 LPS에 의한 prostanoid의 생성 증가는 LPS가 작용하는 세포에 따라, 심지어 같은 대식세포 안에서도 그 세포 type에 따라 작용 기전이 상이함이 보고되고 있다²⁵. 이러한 사실들을 토대로 하여, 저자들은 마우스 복강 대식세포와 랫드 폐포 대식세포에서 LPS가 TXB₂ 생성 및 PGHS-2 활성화에 어떠한 양식으로 작용하는가를 살펴봄으로써 LPS의 세포 특이적인 작용기전을 살펴보고자 하였다.

먼저, LPS가 대식세포에서 실제로 TXB₂의 생성을 증가시키며, 이때 PGHS의 활성 역시 증가되는지, 그리고 LPS 작용시간과는 어떠한 상관관계를 갖는가를 살펴보았다. LPS 작용 시간에 따른 TXB₂ 생성능 및 PGHS 활성은 복강 및 폐포 대식세포에서 공히 동일한 작용 양상을 나타내었으며 LPS에 의하여 유도된 PGHS 활성화증

가는 TXB₂의 생성능의 변화와 일치하였다. 따라서 폐포 대식세포에서 LPS에 의해 증가된 TXB₂는 LPS가 PGHS의 활성을 증가시켰거나, LPS에 의해 PGHS 효소 자체의 합성이 증가되어 나타난 결과로 생각되었다. LPS를 처리하기 전에 미리 aspirin에 의해 기저상태에서 세포 내에 존재하는 PGHS 효소활성을 불활성화시킨 것이므로 본 실험에서 측정된 PGHS 활성은 전적으로 새로이 합성된 효소가 나타내는 활성을 반영하는 것으로 추정할 수 있다. 따라서 LPS에 의한 TXB₂ 생성능의 증가는 LPS에 의해 새로이 합성된 PGHS가 작용한 결과로 보아야 할 것으로 생각되었다.

최근의 연구 결과에 의하면 LPS가 여러 세포에서 내독소로서의 작용을 나타내기 위한 공통된 기전은 특정 eukaryotic 유전자의 transcription 증가에 기인하는 것으로 알려져 있다. LPS에 의한 transcription의 증가에는 NF-κB (Nuclear Factor κB)의 활성화가 관여되어 있는 것으로 알려지고 있는데 PGHS-2 역시 그 유전자의 promoter 구역에 하나의 NF-κB 결합부위를 가지고 있는 것으로 알려져 있어^{12,26}, LPS에 의한 PGHS의 활성 증가는 이 NF-κB의 활성화를 매개로 한 PGHS의 합성 증가에 기인할 가능성이 있는 것으로 생각된다.

LPS가 PGHS의 어떤 isotype의 합성에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 PGHS-1과 PGHS-2에 대한 polyclonal 항체를 이용하여 metabolic labeling과 immunoprecipitation을 행한 결과, LPS는 PGHS-1의 단백질합성은 증가시키지 못하는 반면, PGHS-2의 *de novo* synthesis는 현저히 증가시켰으며 복강 및 폐포 대식세포에서 동일한 결과를 나타내었다 (결과는 제시하지 않음). 즉, LPS의 prostanoids 생성증가 작용은 PGHS의 isotype중에서도 PGHS-2를 증가시킴에 기인함을 확인할 수 있었으며, 이는 단핵세포⁴, 사람의 태반세포, Swiss 3T3 세포¹² 등에서의 결과와 일치하였다.

복강 대식세포와 폐포 대식세포의 LPS에 대한 반응성은 protein kinase C의 활성을 촉진하는 물질이나 억제하는 물질에 대한 반응성에서 특징적인 차이를 나타낸다. 즉, LPS의 구성성분인 lipid A는 RAW 264.7 세포에서 PKC의 활성을 증가시켰으며²⁷ 그 양상이 PKC에 대해 강력한 활성작용을 가진 PMA와 유사하였고 쥐의 복강대식세포에 대하여서도 LPS와 유사한 작용을 나타내었다²⁸. 또한, PMA 및 LPS는 쥐의 복강대식세포²⁹와 사람의 내피세포⁶에서 prostanoid의 합성을 증가시켰다^{6,27,28}. 이러한 prostaglandin 합성 증가는 transcription 및 translation 억제제에 의해 감소됨으로써 PKC가 LPS에 의한 arachidonic acid 대사에 관여하는 인자들의 합성 증진

작용에 중요한 매개작용을 할 것으로 추정되었다. 그러나 Marc등³¹이 폐포 대식세포를 이용하여 행한 실험에 의하면 복강 대식세포는 PMA등 PKC의 활성을 증가시키는 물질들에 의해 arachidonic acid 대사가 증가하지만 폐포 대식세포에서는 그러한 경향을 나타내지 않았다. 그 이유로, 폐포 대식세포에서는 기저상태의 PKC활성이 높고 전체 PKC 중 많은 부분이 세포막에 결합되어 있어 PMA에 대한 반응성이 낮거나 거의 나타나지 않는다고 추정되고 있다. 또한 김등의 결과에 의하면³² 폐포 대식세포에서 PGHS-2의 활성화 또는 새로운 합성은 protein tyrosine kinase나 특정 PKC isoenzyme이 관계할 것으로 추정된 바 있다. 이러한 PKC 활성 조절제에 대한 복강 및 폐포 대식세포에서의 작용 차이는 각 세포에 존재하는 PKC isotype의 차이때문일 가능성을 제시하는 것으로 저자들은 PKC의 subtype을 활성화시키는 것으로 보고된 바 있는 포도당을 이용하여 그 반응성의 차이를 살펴보았다. 포도당이 PKC의 활성을 증가시킨다는 것은 이미 잘 알려진 사실로 배양액 중의 포도당 농도를 증가시키는 경우 신장 내피세포나 사구체 세포 등에서 PKC가 활성화됨이 보고된 바 있으며, 또한 최근의 *in vitro* 실험 결과에 의하면, 포도당 농도 증가에 의해 세포내에서의 DAG의 *de novo* synthesis가 증가되고 DAG는 Ca²⁺에 대한 kinase의 친화성을 증가시켜 PKC의 활성을 직접적으로 증진시키게 된다고 알려져 있다¹⁶. 또 한편으로는 세포외액의 포도당농도가 증가하면 세포질내의 PKC가 세포막으로 이동하여 활성화된다는 보고도 있다^{33,34}. 이것은 고혈당상태가 되면 세포막의 형태에 변화가 생겨 일어나는 현상으로 추측되고 있다³⁵. 따라서 저자들은 PKC의 활성화가 복강 및 폐포 대식 세포에서의 LPS에 의한 prostaglandin 생성능이나 PGHS 활성 증진 작용에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 배양액중 포도당 농도를 달리한 조건 하에서 LPS를 처리하여 보았다. Fig. 5 및 6은 포도당 농도가 증가할수록 복강 및 폐포 대식 세포에서의 TXB₂ 생성능은 감소함을 보여주고 있다. 또한 PGHS 활성 역시 포도당 농도가 증가할 수록 감소됨으로써 (결과는 제시하지 않음) 포도당에 의한 TXB₂ 생성능 변화는 PGHS에 의하여 매개되는 것으로 추측되었다. 따라서, LPS에 의한 TXB₂ 생성능이나 PGHS 합성 증진 작용은 포도당에 의하여 활성화되는 PKC subtype에 의하여 억제적으로 조절됨을 추정할 수 있었다. 이러한 결과가 PKC의 활성화 자체에 의한 영향인지 혹은 장시간 활성화에 따른 PKC down regulation에 의한 것인지는, 본 실험 결과만으로는 확인할 수 없었으며, 포도

당에 의하여 활성화되는 PKC subtype이 LPS의 signal transduction pathway상에 위치하는지 또는 이와는 별개의 조절 기전인지의 여부등과 함께, 추후 보다 진전된 연구를 통해 규명되어야 하리라 사료된다. 이러한 포도당의 작용은 혈관 평활근 세포에서의 결과와 상반되는 것으로 본 연구실에서 행한 예비 실험 결과에 의하면 혈관 평활근 세포에서는 포도당의 농도가 증가할수록 PGF_{1α}의 생성능이나 PGHS 활성이 증가됨이 확인되었다. 이는 혈관 평활근 세포와 대식 세포에서의 PGHS 작용을 조절하는 기전이 다름을 암시하는 것으로 세포마다 서로 다른 기전으로 PGHS-2가 작용할 가능성을 시사해 주고 있다.

결 론

Bacterial lipopolysaccharide에 의한 prostanoid 생성 증가 작용이 복강 및 폐포 대식 세포에서 어떠한 양상으로 나타나는지를 살펴보았다.

1) LPS 작용 시간에 따른 TXB₂ 생성능 및 PGHS 활성 변화추이는 복강 및 폐포 대식세포에서 동일한 양상을 나타내었다.

2) LPS는 복강 및 폐포 대식세포에서 PGHS-2의 *de novo* synthesis 증가를 통해 TXB₂의 생성을 증가시켰다.

3) 포도당은 그 농도가 증가함에 따라 TXB₂ 생성능 및 PGHS 활성을 감소 시켰으며 이러한 작용은 복강 및 폐포 세포에서 동일한 양상을 나타내었다.

감사의 글

본 연구 경비의 일부는 1995년도 아주대학교 특별 지원금에 의하여 지원되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Morrison DC and Ryan JL: Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Rev Med* 38: 417-432, 1987
2. Christian RH and Raetz GRH: Biochemistry of endotoxins. *Ann Rev Biochem* 59: 129-170, 1990
3. Pace - Asciak CR and Smith WL: Enzymes in the biosynthesis and catabolism of the eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and hydroxy fatty acids. *Enzyme* 16: 543-603, 1983
4. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Ruz A and Needleman P: The induction and suppression of prostaglandin H synthase in human monocytes. *J Biol Chem* 265: 16737-16740, 1990
5. Lee SH, Soyoola E, Chanmugam D, Hart S, Sun W, Zhong

- H, Liou S, Simmons D and Hwang D: Selective expression of mitogen inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 267: 25934-25938, 1992
6. Wu KK, Hatzalos H, Lo SS, Seong DC, Sanduja SK and Tai HH: Stimulation of *de novo* synthesis of prostaglandin G/H synthase in human endothelial cells by phorbol ester. *J Biol Chem* 263: 19043-19047, 1988
7. Yokoyama C and Tanabe T: Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 888-894, 1989
8. Xie W, Chipman JG, Roberoson DL, Drikson RL and Simmons DL: Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2692-2696, 1991
9. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW and Hershman HR: TIS10, a phorbol ester tumor promoter inducible messenger RNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/ cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266: 12966-12872, 1991
10. O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V and Young DA: A serum regulated and glucocorticoid regulated 4-kilobase messenger-RNA encodes a cyclooxygenase related protein. *J Biol Chem* 266: 23261-23267, 1991
11. Kujubu DA and Hershman HR: Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/ cyclooxygenase gene. *J Biol Chem* 267: 7991-7994, 1992
12. Simmons DL, Xie W, Evett G, Merrill J, Robertson DL and Bradshaw WS: Drug inhibition and cellular regulation of prostaglandin G/H synthase isoenzyme-2. *J Lipid Mediators* 6: 113-117, 1993
13. Chandler DB and Fulmer JD: Prostaglandin synthesis and release by subpopulations of rat alveolar macrophages. *J Immunol* 139: 893-898, 1987
14. Ouwendijk RJTh, FJ Zkijlstra AMWC van den Broek, A. Brouwer JHP, Wilson and JE Vincent: Comparison of the production of eicosanoids by human and rat peritoneal macrophages and rat Kupffer cells. *Prostaglandins* 35: 437-441, 1988
15. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Ruz A and Needleman P: The induction and suppression of prostaglandin H synthase in human monocytes. *J Biol Chem* 265: 16737-16740, 1990
16. Lee TA, Saltsman KA, Ohashi H and King GL: Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: Proposal of a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5141-5145, 1989
17. Beutler B and Cerani A: Tumor necrosis, Cachexia, shock and inflammation: a common mediator. *Ann Rev Biochem* 57:

- 507-518, 1988
18. Bottoms GD, Johnson MA, Lamar CH, Fessler JF and Turek J: Endotoxin-induced eicosanoid production by equine vascular endothelial cells and neutrophils. *J Circ Shock* 15: 155-162, 1985
 19. Doebber TW, Wu MS, Robbins JC, Choy BM, Chang MN and Shen TY: Platelet activating factor (PAF) involvement in endotoxin-induced hypotension in rats. Studies with PAF-receptor antagonist kadsurenone. *Biochem Biophys Res Commun* 127: 799-808, 1986
 20. Aderem AA, Cohen SD, Wright DS and Cohn AZ: Bacterial lipopolysaccharides prime macrophages for enhanced release of arachidonic-acid metabolites. *J Exp Med* 164: 165-179, 1986
 21. Kurland JI and Bockman R: Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 147: 952-957, 1978
 22. Nichols CF, Schenkein AH and Rutheford BR: Prostaglandin E₂, prostaglandin E₁ and thromboxane B₂ release from human monocytes treated with C3b or bacterial lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta* 927: 148-157, 1987
 23. Tanaka Y, Amano F, Kishi H, Nishijima M and Akamatsu Y: Degradation of arachidonyl phospholipids catalyzed by phospholipase-A₂ and phospholipase-C in a lipopolysaccharide-treated macrophage cell-line, Raw 264.7. *Arch Biochem Biophys* 272: 210-218, 1989
 24. Matsunaga A, Miller BC and Cottam GL: Pertussis toxin and H-7 distinguish mechanisms involved in eicosanoid release from lipopolysaccharide-primed macrophages. *Eur J Biochem* 187: 599-603, 1990
 25. Peters-Golden M, RW. McNish, R. Hyzy, C. Shelly and GB. Toews: Alterations in the pattern of arachidonate metabolism accompany rat macrophage differentiation in the lung. *J Immunol* 144: 263-270, 1990
 26. Kujubu DA, Reddy ST, Fleucher BS and Hermann HR: Expression of the Protein Product of the Prostaglandin Synthase-2/Tis10 Gene in Mitogen-Stimulated Swiss 3T3 Cells. *J Biol Chem* 268: 5425-5230, 1993
 27. Wightman PD and Raetz CRH: The activation of protein kinase C by biologically active lipid moieties of lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 259: 10048-10052, 1984
 28. Weiel JE, Hamilton TA and Adams DO: LPS induces altered phosphate labeling of proteins in murine peritoneal-macrophages. *J Immunol* 136: 3012-3018, 1986
 29. Bonney RJ, Wightman PD, Dahlgren ME, Davies P, Kuehl FA and Humes JL: Effects of RNA and protein synthesis inhibitors on the release of inflammatory mediators by macrophages responding to phorbol myristate acetate. *Biochim Biophys Acta* 633: 410-421, 1980
 30. Introna M, Bast RC, Tannenbaum CS, Hamilton TA and Adams DO: The effect of LPS on expression of the early competence gene-Je and gene-Kc in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 138: 3891-3896, 1987
 31. Marc PG, McNish RW, Brieland JK and Fantone JC: Diminished protein kinase C-activated arachidonate metabolism accompanies rat macrophage differentiation in the lung. *J Immunol* 144: 4320-4326, 1990
 32. Kim JY, Lee SH and Moon CK: The involvement of protein tyrosine kinase in the bacterial lipopolysaccharide induced arachidonic acid metabolism. *Arch Pharm Res* 18: 262-266, 1995
 33. Bell RM: Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45: 631-632, 1986
 34. Kraft AS and Anderson WB: Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* 301: 621-623, 1983
 35. Williams B and Schrier RW: Characterization of glucose-induced in situ protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 41: 1464-1472, 1992
-