

인체 대장 상피세포주에서 C-X-C Chemokine 유전자의 발현 및 조절에 관한 예비 연구

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 내과학교실
및 ¹아산생명과학연구소

양석균 · 김옥희¹ · 이미화 · 박선미
정훈용 · 홍원선 · 민영일

= Abstract =

A Preliminary Study on the Expression and Regulation of C-X-C Chemokine Genes in a Human Colon Epithelial Cell Line

Suk-Kyun Yang, M.D., Ok-Hee Kim, B.S.¹, Me Hwa Lee, M.D.
Seon Me Park, M.D., Hwoon-Yong Jung, M.D., Weon-Seon Hong, M.D.
and Young Il Min, M.D.

*Department of Internal Medicine and ¹Institute for Life Science,
University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea*

Human colon epithelial cells secrete an array of proinflammatory cytokines that includes IL-8, MCP-1, GM-CSF, TNF α and IL-6. This response may serve to attract neutrophils and macrophags to the site of infection. In addition to IL-8 and MCP-1, the chemokine family contains other members, which, alone or in combination, can recruit and/or activate inflammatory and lymphoid cells. In this study, we asked whether colon epithelial cells express a broader array of chemokines than previously described. The colon epithelial cell line, Caco-2, was stimulated for 3h with IL-1 α , or was infected with *Salmonella dublin*. RNA was extracted and chemokine mRNA levels were determined by quantitative reverse transcription-PCR using internal RNA standards. Expression of GRO α , GRO β , GRO γ and IP-10 increased by bacterial infection or IL-1 α stimulation. These data strongly support the notion that epithelial cells are an important and integral component of the host's natural immune system.

Key Words: Chemokine, Epithelial cell, Colon

책임저자 : 양석균, 서울시 송파구 풍납동 388-1, 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 소화기내과(우편번호: 138-736)
(Tel: 224-3190, Fax: 485-5782)

*본 연구는 1996년도 아산생명과학연구소 연구 지원의 일부 보조로 수행되었음.

서 론

대장 상피세포는 개체와 환경 사이에 경계를 이루는 장점막의 표면을 덮고 있는 세포이다. 따라서 대장 상피세포는 장내 세균이나 각종 외부 자극에 일차적으로 접촉하게 된다. 이러한 대장 상피세포는 개체와 환경 사이에 가로 놓인 단순한 기계적 장벽으로서 작용할 뿐 아니라 intercellular adhesion molecule^{8,10,12,14} 및 MHC class II^{18,24}도 발현할 수 있음이 알려져 점막의 염증반응 또는 면역반응에 있어 중요한 역할을 할 가능성이 제기되어 왔다. 또한 최근에는 대장 상피세포에서 interleukin(IL)-8,^{4,9,19} monocyte chemotactic protein (MCP)-1,^{9,22} granulocyte monocyte-colony stimulating factor(GM-CSF),⁹ tumor necrosis factor α (TNF α)⁹ 및 IL-6^{7,25} 등의 항염증성 cytokine들을 생성할 수 있음이 알려졌는데 이 중 IL-8과 MCP-1은 소위 chemokine이라고 불리는 cytokine들이다.

Chemokine은 크기가 8~10 kD 정도의 항염증성 cytokine으로서 호중구, 단핵구, 호산구, 호염구 또는 림프구 등 각종 염증세포 및 면역세포들이 염증반응 또는 면역반응이 일어나는 장소로의 이동을 유발함으로써 숙주 염증반응의 시작과 유지에 필수적인 역할을 수행한다.^{1,20,21} Chemokine은 amino terminal domain에 있는 cysteine의 배열에 따라 분류되는데 즉 2개의 cysteine이 연속하여 있으면 C-C chemokine이라 불리고 2개의 cysteine 사이에 다른 amino acid가 끼여 있으면 C-X-C chemokine이라고 불리며^{1,20,21} 이밖에 cysteine이 2개가 아니라 1개 밖에 없으면 C-chemokine이라고 불린다.¹³ C-X-C chemokine은 다시 ELR(Glu-Leu-Arg) motif의 유무에 따라 둘로 세분된다. ELR motif를 가진 C-X-C chemokine은 호중구의 활성화와 화학주성에 중요한 역할을 하며, 같은 C-X-C chemokine일지라도 ELR motif가 없으면 이와 같은 기능이 없다. C-X-C chemokine과는 달리 C-C chemokine은 단핵구 및 T 림프구에 주로 작

용하고 일부 C-C chemokine은 호산구 및 호염구에도 작용하며 C-chemokine은 림프구에만 작용을 한다.^{1,13,20,21}

앞서 언급한 IL-8과 MCP-1이외에도 지금까지 20여 종류의 chemokine이 알려져 있으나 대장 상피세포에서 생성되는 chemokine들의 종류는 아직 잘 알려져 있지 않다. 그러나 염증반응 또는 면역반응에 있어서 chemokine의 중추적인 역할을 고려할 때 장점막의 염증반응에 있어 대장 상피세포의 기여도를 가늠하기 위해서는 대장 상피세포에서 생성되고 조절되는 chemokine의 종류를 이해하는 것이 필수적이라 하겠다. 특히 장내 세균이나 기타 자극에 일차적으로 접촉하는 세포가 대장 상피세포임을 고려할 때 급성 염증세포인 호중구에 주로 작용하는 C-X-C chemokine들에 대한 이해가 중요하리라 사료된다. 따라서 저자들은 C-X-C chemokine에 속하는 GRO α , GRO β , GRO γ 및 IP-10이 인체 대장 상피세포주에서 생성되고 조절되는지 여부를 확인하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1) 인체 대장상피 세포주의 배양 및 처치

인체 대장상피 세포주인 Caco-2(ATCC HTB 37)를 문헌에 기술된 방법⁴)에 따라 배양하였으며, 처치 전후의 C-X-C chemokine 유전자 발현의 변화를 보기 위하여 20 ng/ml의 IL-1 α (Immunex Corp., Seattle, WA)로 3시간 동안 자극하거나 침습성 세균인 *Salmonella dublin*으로 감염시켰다. 이러한 처치 전후의 배양 세포로부터 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform을 이용하여 RNA를 추출²⁾하여 정량적 역전사 PCR(quantitative reverse transcription(RT)-PCR)에 사용하였다.

2) 정량적 역전사 PCR을 위한 primer 및 표준 RNA

GRO α 및 GRO γ 의 primer는 문헌에 기술된 것을

Table 1. Oligonucleotide primers and PCR product sizes of cDNAs for 13 chemokines and β -actin

| mRNA species | 5' primer | 3' primer | Size of PCR products (base pairs) | |
|----------------|--|---|-----------------------------------|------------|
| | | | Standard RNA | Target RNA |
| GRO α | 5'-ACTCAAGAATGGGCGGAAAG-3' | 5'-TGGCATGTTGCAGGCTCCT-3' | 333 | 468 |
| GRO β | 5'-CAAGAACATCCAAAGTGTGAAG-3' | 5'-TGACATGTGATATGTCATCACG-3' | 372 | 542 |
| GRO γ | 5'-AAGTGTGAATGTAAGGTCCCC-3' | 5'-CTTTCCAGCTGTCCCTAGAA-3' | 370 | 270 |
| IP-10 | 5'-AGTGGCATTCAAGGAGTACC-3' | 5'-ATCCTTGGGAAGCACTGCATC-3' | 388 | 289 |
| β -actin | 5'-TGACGGGGTCACCCAC ACTGTGCCCATCTA-3' | 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGG ACGATGGAGGG-3' | 492 | 661 |

사용하였으며,¹⁵⁾ GRO β ¹⁶⁾ 및 IP-10¹⁷⁾의 primer는 genomic DNA의 염기 서열을 참조하여 sense primer와 antisense primer가 서로 다른 exon에 위치하도록 설계 제작하였다. 한편 추출된 RNA들 사이의 성상을 비교하기 위한 control로 사용된 β -actin의 primer는 Stratagene사(La Jolla, LA, USA)의 염기 서열을 이용하였다(Table 1).

각 chemokine mRNA를 RT-PCR법으로 정량하는데 필요한 표준 RNA는 문헌에 기술된 방법⁹⁾을 이용하여 제작하였다. 이를 간략히 설명하면 oligonucleotide extension법¹¹⁾과 PCR을 이용하여 GRO α , GRO β , GRO γ , IP-10 및 β -actin의 sense primer와 antisense primer들의 염기 서열이 일렬로 연결된 DNA를 합성하였으며 이를 poly(A) 서열이 이미 삽입되어 있는 pGEM-3Zf(-)에 subcloning하여 pHQ5를 만들었다(Fig. 1). 이 plasmid를 T7 RNA 중합효소(Promega)를 이용하여 in vitro transcription 시킴으로써 원하는 표준 RNA를 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 표준 RNA로부터 증폭된 PCR product는 세포에서 추출된 RNA로부터 증폭된 PCR product와 비교하여 약 30%정도 크기가 차이가 나도록 설계되어 있으므로(Table 1) 동시에 전기 영동할 경우 서로 다른 2개의 band를 얻음으로써 그 양을 비교할 수 있었다.

3) RT-PCR

2~5배로 연속 희석시킨 표준 RNA를 5~7개의

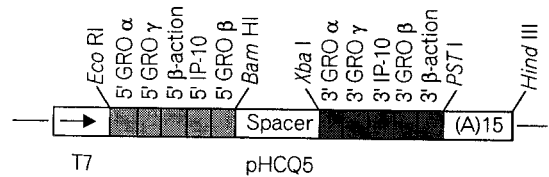


Fig. 1. Structure of pHQ5 plasmid used for generation of standard RNA. Plasmids pHQ5 encodes standard RNAs and contain 5' and 3' priming sites for 4 chemokine genes and β -actin. Priming sites were arranged to yield PCR products that differ in size from those of the target cellular RNA. Sequences are flanked upstream by a T7 RNA polymerase promoter and downstream by a poly(A) sequence.

시험관에 준비하여 배양 세포에서 추출한 일정량의 mRNA를 각각의 시험관에 혼합한 후 37°C에서 60분 동안 reverse transcription을 시행하였다. 이렇게 하여 만들어진 cDNA를 95°C에서 10분간 가열하여 reverse transcriptase를 불활성화시킨 뒤 얼음에서 냉각시켰다. Reverse transcription에 이용한 buffer는 10 mM Tris pH 8.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 각각 1 mM, 20 unit의 RNasin ribonuclease inhibitor(Promega), 0.1 μ g oligo(dT)₁₅와 50 unit의 M-MLV reverse transcriptase(BRL)로 구성하였다. 이렇게 만들어진 각각의 cDNA를 10 mM Tris pH 8.3, 50 mM MgCl₂, 200 μ M씩의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 그리고 25 pmol씩의 sense primer와 antisense primer가 포함된 100 μ L의 buffer에서 PCR로

Table 2. Chemokine mRNA levels in control, IL-1 α stimulated or *S. dublin* infected Caco-2 cells

| Chemokine members | Number of transcripts/ μ g of cellular RNA | | |
|-------------------|--|--------------------------|---------------------------|
| | Control | IL-1 α stimulated | <i>S. dublin</i> infected |
| GRO α | 1×10^2 | 2×10^5 | 3×10^4 |
| GRO β | 1×10^3 | 4×10^4 | 3×10^4 |
| GRO γ | 6×10^3 | 1×10^6 | 3×10^5 |
| IP-10 | $< 10^2$ | 9×10^3 | 2×10^3 |
| β -actin* | 3×10^6 | 3×10^6 | 3×10^6 |

* β -actin, a constitutively expressed "housekeeping" gene, is included as a control.

증폭하였는데 먼저 반응액을 95°C에서 5분간 가열한 후 85°C에서 7분 정도 유지하면서 각 시험관에 2.5 unit의 Taq DNA polymerase(Stratagene)를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분간 denaturation 후 4종의 chemokine은 60°C에서, β -actin은 72°C에서 2.5분간 annealing과 extension이 일어나도록 하였으며 총 시행 횟수는 35회로 하였다.

4) PCR product의 정량

PCR product는 2% NuSieve agarose gel에서 전기 영동하여 Polaroid 665 film으로 찍은 후 imaging densitometer(GS-670; BioRad, Hercules, CA)를 이용하여 각 PCR band의 intensity를 비교하였다. 즉 표준 RNA와 목표 RNA로부터 얻은 PCR product의 비를 구함으로써 특정 chemokine의 mRNA 양을 계산하였다.

결 과

Caco-2 세포주는 특별히 자극을 하지 않은 상태에서도 GRO α , GRO β 및 GRO γ mRNA를 발현하였으나 IP-10 mRNA는 발현하지 않았다. 한편 Caco-2 세포주를 IL-1 α 으로 자극하거나 *Salmonella dublin*으로 감염시킬 경우, 측정된 모든 chemokine mRNA의 발현 수준이 현저히 증가되었다. 그러나 IP-10 mRNA의 발현 수준은 현저한 증가에도 불구하고 1×10^4 transcripts/ μ g RNA 미만인

었다. 자극 전후의 각 chemokine mRNA의 발현 수준의 변화를 정량한 결과 Table 2와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

고 찰

GRO는 growth-related라는 용어에서 유래되었으며 원래 melanoma growth stimulatory activity²³⁾로 기술되었다가 후에 GRO로 통일되어 불리게 되었다. GRO 단백질은 amino acid 수준에서 약 90% 정도 서로 일치하는 GRO α , GRO β 및 GRO γ 의 3가지가 있다.⁶⁾ IP-10은 γ -interferon-inducible protein이라는 뜻에서 유래되었다.¹⁶⁾ GRO 및 IL-10은 모두 C-X-C chemokine에 속하지만 호중구에 대한 작용면에서는 전혀 다른 성질을 가진다. 즉, GRO는 IL-8과 마찬가지로 ELR motif를 갖는 C-X-C chemokine에 속하며 따라서 강력한 호중구의 활성화 및 화학주성의 성질을 갖는 반면 IP-10은 C-X-C chemokine에 속하면서도 ELR motif가 없으므로 호중구를 활성화시키는 성질이 없다.^{1,20,21)}

본 연구는 대표적인 C-X-C chemokine인 IL-8 이외에 GRO α , GRO β , GRO γ 및 IP-10의 4가지 C-X-C chemokine들이 대장 상피세포에서 발현되고 조절된다는 것을 보여주었다. C-X-C chemokine은 급성기 염증세포인 호중구의 활성화와 화학주성에 중추적인 역할을 하는 염증 매개 물질이므로 대장 상피세포에서 여러 가지 C-X-C che-

mokine들이 발현되고 조절된다는 사실은 대장 상피세포가 염증반응의 초기 단계에 어떤 역할을 수행할 가능성을 시사한다. 즉 장내 세균이나 기타 외부 자극에 의해 일차적으로 대장 상피세포가 손상을 받게 되면 대장 상피세포에서 주변의 염증 또는 면역세포에 신호를 보내어 점막 염증 반응을 유도할 수 있을 것으로 추정되는데 이 신호들 중 하나가 바로 chemokine이라고 생각되며, 특히 C-X-C chemokine들의 발현이 증가된다는 것은 급성기 염증세포인 호중구를 염증 부위로 모으기 위하여 대장 상피세포가 능동적으로 참여하는 것으로 추정된다. 대장 상피세포에서의 C-X-C chemokine들의 발현이 세균 감염후 불과 2~3시간 이내에 현저히 증가한다는 것도 이러한 맥락에서 이해할 수 있다.

대장 상피세포의 역할이 염증 반응의 초기 단계에만 국한되는지 또는 지속적인 역할을 수행하는지를 알기 위하여는 C-X-C chemokine의 발현이 시간에 따라 어떤 경과를 거치는지 하는 것과 더불어 단핵구나 T 림프구에 작용하는 C-C chemokine의 발현 및 조절 여부를 확인하여야 한다. 만약 C-C chemokine이 발현되지 않거나 발현되더라도 그 수준이 낮거나 또는 자극에 의해 조절되지 않는다면 염증 반응에 있어 대장 상피세포의 주 기능은 초기 단계에 머무른다고 추정할 수 있다. 본 연구에서는 이러한 점을 확인하지는 않았다. 그러나 본 연구에서는 C-X-C chemokine이면서도 ELR motif가 없어 호중구에 대한 작용이 없이³⁾ 오히려 C-C chemokine 처럼 단핵구 및 T 림프구에 대하여 작용²⁶⁾을 보이는 IP-10의 발현을 ELR motif를 가진 C-X-C chemokine인 GRO α , GRO β 및 GRO γ 와 비교하였다. 대장 상피세포는 자극을 받지 않는 상태에서 IP-10을 발현하지 않았으며 세균 감염이나 IL-1 α 으로 자극한 후에도 IP-10의 발현 수준이 1×10^4 transcripts/ μ g RNA 미만으로서 GRO에 비하여 현저히 낮은 수준을 보였다. 이러한 결과는 세균 감염후 2~3시간 경에는 대장 상피세포의 기능이 단핵구 및 T 림프구보다는 호

중구를 끌어모으는데 치중되어 있다는 것을 시사한다.

본 연구는 대장 상피세포주를 이용하여 시행하였으므로 본 연구의 결과가 실제 대장 상피세포에 적용될 수 있다고 단정지을 수는 없다. 따라서 대장 상피세포의 기능을 밝히기 위해서는 실제 인체 대장 상피세포를 이용하는 것이 이상적이겠으나 단핵구나 림프구가 오염되지 않은 순수한 대장 상피세포를 얻는 것이 아직은 불가능하고 또한 대장 상피세포의 배양이 현재로서는 24~48시간밖에 가능하지 않다는 점을 고려할 때 대장 상피세포주의 선택은 불가피하며 다만 변형된 대장 상피세포주의 문제점을 극복하기 위하여는 여러 종류의 대장 상피세포주를 사용하여 일관된 소견을 보이는 지를 확인해 보아야 할 것으로 생각한다.

결 론

대장 상피세포는 이미 알려진 IL-8 이외에도 GRO α , GRO β , GRO γ 및 IP-10 등 다양한 C-X-C chemokine을 생성하고 조절하는 기능을 보인다. 이는 대장 상피세포가 염증반응의 초기 단계에 호중구를 끌어모으는데 능동적으로 참여할 가능성을 시사한다.

REFERENCES

- 1) Baggiolini M, Dewald B, Moser B: *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. Adv Immunol* 55: 97, 1994
- 2) Chomczynski P, Sacchi N: *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem* 162: 156, 1987
- 3) Dewald B, Moser B, Barella L, et al: *IP-10, a gamma-interferon-inducible protein related to interleukin-8, lacks neutrophil activating properties. Immunol Lett* 32: 81, 1992
- 4) Eckmann L, Jung H-C, Schuerer-Maly C-C, et al: *Differential cytokine expression by human intestinal epi-*

- thelial cell lines: regulated expression of interleukin-8. Gastroenterology* 105: 1689, 1993
- 5) Geiser T, Dewald B, Ehrenguber MU, et al: *The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO α , GRO β , and GRO-gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. J Biol Chem* 268: 15419, 1993
 - 6) Haskill S, Peace A, Morris J, et al: *Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7732, 1990
 - 7) Hedges S, Svensson M, Svanborg C: *Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation in vitro. Infect Immun* 60: 1295, 1992
 - 8) Huang GT-J, Eckmann L, Savidge T, et al: *Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) expression and neutrophil adhesion. J Clin Invest* 98: 572, 1996
 - 9) Jung HC, Eckmann L, Yang S-K, et al: *A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J Clin Invest* 95: 55, 1995
 - 10) Kaiserlian D, Rigal D, Abello J, et al: *Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. Eur J Immunol* 21: 2415, 1991
 - 11) Kanangat S, Solomon A, Rouse BT: *Use of quantitative polymerase chain reaction to quantitate cytokine messenger RNA molecules. Mol Immunol* 23: 1229, 1992
 - 12) Kelly CP, O'Keane JC, Orellana J, et al: *Human colon cancer cells express ICAM-1 in vivo and support LFA-1-dependent lymphocyte adhesion in vitro. Am J Physiol* 263: G864, 1992
 - 13) Kennedy J, Kelner GS, Kieyensteuber S, et al: *Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. J Immunol* 155: 203, 1995
 - 14) Kvale D, Krajci P, Brandtzaeg P: *Expression and regulation of adhesion molecules ICAM-1(CD 54) and LFA-3(CD 58) in human intestinal epithelial cell lines. Scand J Immunol* 35: 669, 1992
 - 15) Legoux P, Minty C, Delpech B, et al: *Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin-1 β stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerisation chain reaction method involving co-amplification with an internal multi-specific control. Eur Cytokine Netw* 3: 553, 1992
 - 16) Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV: *γ -Interferon transcriptionally regulates an early response gene containing homology to platelet proteins. Nature* 315: 672, 1985
 - 17) Luster AD, Ravetch JV: *Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene(IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. Mol Cell Biol* 7: 3723, 1987
 - 18) Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, et al: *Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. Gastroenterology* 100: 3, 1991
 - 19) McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, et al: *Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. J Cell Biol* 123: 895, 1993
 - 20) Miller MD, Krangel MS: *Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. Crit Rev Immunol* 12: 17, 1992
 - 21) Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, et al: *Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. Annu Rev Immunol* 9: 617, 1991
 - 22) Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, et al: *Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. Gastroenterology* 108: 40, 1995
 - 23) Richmond A, Balentien E, Thomas HG, et al: *Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to β -thromboglobulin. EMBO J* 7: 2025, 1988
 - 24) Selby WS, Janosy G, Mason DY, et al: *Expression of HLA-DR antigens by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol* 53: 614, 1983
 - 25) Shirota K, LeDuy L, Yuan S, et al: *Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells. Virchows Arch B Cell Pathol* 58: 303, 1990
 - 26) Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, et al: *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, 1993