Kor. J. Food Hyg., 8(4), 181-188(1993)

Bacterial Lipopolysaccharide가 Prostaglandin 합성에 미치는 작용의 특성

이수환 · 임종석* · 황동호** · 문창규

서울대학교 약학대학 *유전공학 연구소 **미국루이지애나 주립대학

Characteristics of Prostaglandin Synthesis Induced by Bacterial Lipopolysaccharide in Rat Alveolar Macrophages

Soo-Hwan Lee, Jong-Seok Lim*, Daniel Hwang and Chang-Kiu Moon**

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742

**Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejon 305-606*

***Pennington Biomedical Research Center, LSU, Baton Rouge, LA 70808, USA*

ABSTRACT—It is well known that bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulates the prostaglandin (PG) synthesis in various experimental system, but the mechanism and the detailed nature of its action are yet to be understood. Thus, this study was designed to characterize LPS induced PG synthesis in rat alveolar macrophage. Although results were not so much prominent, LPS stimulated PGE_2 synthesis in macrophage with short term exposure, and this was thought to be mainly due to the activation of phopholipase A_2. But there was a burst in the PG synthesis 6 hours after the LPS treatment and this was accompanied with the increase of cyclooxygenase activity. This effect was not mediated by tumor necrosis factor (TNF) or platelet activating factor (PAF), and the existence of serum was prerequisite for its action. Growth factors such as epidermal growth factor (EGF) and platelet derived growth factor (PDGF) themselves did not stimulate PG synthesis and the activity of cyclooxygenase in alveolar macrophages. But with the combination of LPS, they showed stimulatory activities to some extent. Normal rat serum was more effective for the elicitation of the LPS action than growth factors. Thus, considering the amounts of growth fafctors contained in normal serum, it was suggested that another factors like LPS binding protein (LBP) might be involved in the serum effect on LPS action. Conclusively. it was thought that LPS could stimulate PG synthesis through interaction with serum factors such as EGF, PDGF and/or LBP.

Keywords □ Bacterial lipopolysaccharide, prostaglandin synthesis, cyclooxygenase, serum factors, EGF, PDGF

Prostaglandin (PG) H synthase/cyclooxygenase는 prostaglandin 및 thromboxane 합성의 첫단계를 담당하는 효소로서 arachidonic acid로부터 PGG_2를 생성하는 cyclooxygenase 활성과 PGG_2로부터 PGH_2를 생성하는 peroxidase 활성의 두가지 효소 활성을 나타낸다.[1,2] 이 효소는, PGG_2로부터 PGH_2로의 변환시에 불활성화 됨으로써 강력한 생리활성을 갖는 prostaglandin 또는 thromboxane의 과도한 생성을 방지하는 특성을 지니고 있다. 따라서 각종 agonist들에 의한 cyclooxygenase계를 통한 prostaglandin 합성의 활성화는 효소 자체의 빠른 불활성화 덕택에 자동적으로 제한이 된다고 할 수 있다. 이러한 사실은, 세포막 인지질로부터의 arachidonic acid의 유리가 과연 여러 agonist-reponse계에서의 prostaglandin 또는 thromboxane의 폭발적인 생성을 유발하기에 충분한가에 대한 매우 중요한 의문을

Received for publication December 29, 1993

Reprint request: Dr. S.-H. Lee at the above address

제기하고 있다. 현재, arachidonic acid로부터의 prostaglandin 생성을 지속 시키기 위해서는, 종종 이 PGH synthase의 새로운 합성이 필요하다는 의견들이 여러 연구자들에 의하여 제시되고 있으며, 이러한 사실들은, 몇몇 세포계에 있어서, 각종 mitogen처리에 의한 세포내 cyclooxygenase 발현 증가와 병행하여 prostaglandin 합성이 증가된다는 보고들로써 뒷받침 되고 있다.[3-6]

Cyclooxygenase에 대한 cDNA는 sheep,[7-9] mouse,[10] human[11] 세포에서 이미 분리되어 그 염기 서열이 밝혀진 바 있으며, 극히 최근에는 mitogen에 의해 유도되는 새로운 type의 cyclooxygenase의 존재가 Rous sarcoma virus에 의해 변형된 chicken embryo fibroblast[12] 및 phorbol ester 또는 serum에 의해 자극된 3T3 cell[14,15]에서 확인된 바 있으며, 이후 전자를 PGHS-1, 후자를 PGHS-2로 명명하여 사용하고 있다. 강력한 항염증제로 이용이 되고 있는 dexamethasone은 각종 stimulant에 의해 자극된 fibroblast에서의 PGHS-2의 발현을 선택적으로 억제함이 보고된 바 있으며, 이때, PGHS-1의 발현에는 전혀 영향을 주지 않음이 확인된 바 있다. 이러한 사실은 이 두가지 type의 cyclooxygenase의 발현이 서로 다른 기전에 의해 조절되고 있음을 시사하고 있으나 아직 자세한 발현 조절 기전에 대한 연구는 이루어지고 있지 않으며, 또한 각종 agonist에 의해 자극된 세포 또는 병리, 생리학적 상태에서의 전반적인 prostaglandin 합성에 대한 각 isozyme의 공헌도 등에 대해서도 아직 이렇다할 연구가 진행되어 있지 않다.[16]

따라서 본 연구에서는 세균 감염시 병리학적 제증상을 발현하는 원인 물질로 알려져 있는 endotoxin lipopolysaccharide를 rat alveolar macrophage에 처리하여, 이때 유발되는 prostaglandin 합성 증가 특성을 검토함으로써 bacterial lipopolysaccharide의 작용 기전 및 cyclooxygenase의 세포내 발현 기전에 대한 기초 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

시약

Platelet activating factor (PAF), platelet derived growth factor (PDGF), aspirin, prostaglandin E_2 등은 Sigma chemical사에서, RPMI 1640 media, fetal calf serum, epidermal growth factor (EGF) 등은 GIBCO 사에서, [^{35}S]-methionine은 ICN radiochemical사에서, tumor necrosis factor (TNF)는 Genzyme사로부터 그리고 ^{3}H-PGE_2는 New England Nuclear (NEN)에서 각각 구입하였으며, 기타의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

Alveolar macrophage 분리

자성 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 생후 5~6주 (150~180 g)에 서울대학교 동물사육장으로부터 공급받아 실험에 사용하였다. Alveolar macrophage는 Chandler와 Fulmer[18]의 Bronchoalveolar lavage법에 준하여 다음과 같이 분리하였다. 즉, 랫드를 ethyl ether로 마취시켜 개복한 후, 복대 동맥으로부터 최대한의 혈액을 취하여 실혈 치사시켰다. 흉강을 열어 기도를 cannulation 시키고 lung을 분리한 후, 30 ml의 cold PBS를 three-way cock의 한쪽으로 조금씩 넣어 조심스럽게 마사지하면서 다른쪽으로부터 lavage한 fluid를 취했다. 1500 rpm에서 5분간 원심 분리시켜 얻은 pellet에 100 U/ml penicillin(Sigma)과 100 μg/ ml streptomycin(Sigma)이 함유된 RPMI-1640(GIBCO) 5 ml을 가하여 부유시켰다. Cell 수와 viability는 hemocytometer를 사용하여 trypan blue exclusion법으로 결정하였다. 24-well microtiter plate (Falcon)에 5×10^5 cells/well을 가하고 37℃, 5% CO_2/95% O_2 조건하에서 2시간 동안 배양하여 cell이 plate 바닥에 부착되도록 하였다. 이와 같은 방법으로 얻은 macrophage의 순도는 통상 95% 이상임을 differential counting에 의해 확인하였다.[19]

Prostaglandin 생성능과 Cyclooxygenase 활성의 측정

Cell에 3% fetal calf serum(FCS, GIBCO) 또는 rat serum, TNF, PAF 및 growth factor 등이 함유된 RPMI 배지를 가하고 37℃에서 일정 시간 배양하였다. 일정 시간 동안 배양한 후 배지를 전량 취하여 −20℃에 보관하였다가, 생성된 PGE_2의 양을 radioimmunoassay(RIA)로 측정하였다.

RIA는 다음 방법에 준하여 실시하였다. 적당량의 배지를 취해 PBS-gel (0.1% gelatin/PBS buffer, pH 7.

4)에 희석하여 500 μl로 만든 후, 여기에 [^{3}H]-PGE_2 용액 100 μl와 PGE_2-antibody 200 μl를 가하여 잘 혼합하고, 4℃에서 12시간 동안 방치하여 반응액 중의 PGE_2와 [^{3}H]-PGE_2가 antibody에 경쟁적으로 결합하도록 하였다. 반응하여 생성된 PGE_2-PGE_2 antibody complex를 제외한 free PGE_2를 제거하기 위하여 600 μl의 charcoal (1 mg/ml dextran, 6 mg /ml charcoal in PBS)을 가해 섞은 후, 4℃에서 15분간 방치하였다. 생성된 PGE_2-charcoal complex는 3600 rpm에서 5분간 원심 분리를 행하여 침전시켜 제거하였으며, 상층에 남겨진 [^{3}H]-PGE_2-PGE_2 antibody complex의 radioactivity를 liquid scintillation counter (LKB 1211 rackbeta, Pharmacia LKB, Finland)를 이용하여 측정하였다. 사용한 scintillation cocktail은 Xylene과 Triton X-100을 3 : 1의 비율로 혼합한 용액에 PPO가 0.3% 함유되도록 조제하였다. 검체 중의 PGE_2의 양은 PGM-2 program에 의하여 검량선으로부터 산출하였다. Cyclooxygenase (COX) 활성은 Fu 등[4]에 의한 실험 방법에 준하여 측정하였다. 즉, PGE_2 생성능을 측정하기 위해 배지를 제거한 cell에, 과량의 arachidonate (30 μM, Sigma)가 함유된 PBS를 가하여 10분간 배양하였다. 그 후, 배지를 취하여 여기에 포함된 PGE_2의 양을 RIA로써 정량하여 COX의 활성으로 표시하였다. 외부에서 직접 과량의 arachidonate를 가하여 합성된 PGE_2의 양은 phospholipase A_2의 작용을 bypass하게 되므로 COX의 활성을 대체로 반영하는 것으로 가정하였다.

Metabolic labeling과 Cyclooxygenase의 Immunoprecipitation[5,19]

6-well tissiue culture plate(Falcon)에 2×10^6/2 ml/well의 cell을 분주하고 약물이 처리된 RPMI 배지에서 일정 시간 동안 배양하였다. PBS (pH 7.4)로 2회 세척한 후, 약물이 함유된 Methionine-free DMEM(GIBCO)으로 갈아 주었다. 여기에 [^{35}S]-methionine(ICN) 100 μCi가 함유된 배지 10 μl를 가한 후 37℃에서 2시간 더 배양하였다. Cold PBS로 3회 washing하고 solubilization buffer를 200 μl씩 가한 후 sonication에 의해 cell을 solubilize 시켰다. Solubilization buffer의 조성은 다음과 같다; 50 mM Tris(pH 7.4), 1% Tween 20, 10 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 μM Leupeptin, 1 mM Phenylmethyl Sulfonylfluoride.

Solubilized cell suspension을 10,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심 분리한 후 얻은 상층액의 10 μl를 취해 radioactivity를 측정하고 동일한 radioactivity를 갖도록 aliqout를 취하여 4℃에서 preimmune rabbit serum과 1시간, protein A-bead와 1시간 동안 반응시키고 원심 분리하여 상층만 취함으로써 nonspecific binding이 가능한 물질을 미리 제거시켰다. Cyclooxygenase antibody를 2 μl씩 가해 immunoprecipitation 시킨 후, SDS-polyacrylamide gel상에서 전기 영동하였다. Gel을 30% methanol과 10% acetic acid용액에서 1시간 동안 처리하여 protein을 fixation 시킨 후 En^{3}hance(NEN)로 1시간 동안 처리하였다. Gel dryer(Bio-Rad)에서 gel을 건조하고 −70℃에서 X-ray film(XAR-5, Kodak)에 일정 시간 동안 노출시킨 후 현상하였다.

통계 처리

모든 data는 mean± Se로 나타내었으며, student's t-test에 의하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

LPS는 gram negative bacteria의 cell wall의 성분으로 bacterial infection의 주요 증상을 발현하는 주원인 물질로 알려져 있다.[20,21] LPS는 lipid A와 polysaccharide 부분으로 크게 나뉘며, 이중 lipid A는 LPS의 생리 활성의 많은 부분을 대변해 주고 있으나, 최근 polysaccharide 부분도 LPS의 활성 발현에 있어 중요한 역할을 하리라는 시사적인 보고가 발표되고 있어, 각 구성성분의 중요도에 대해서는 아직 논란이 지속되고 있다.[20] LPS는 표적세포에 작용하여 다양한 생리, 생화학적인 반응을 일으키며 특히, macrophage로부터 다양한 생리 활성 mediators의 생성을 유도함으로써 면역 기능의 변화, 세포 괴사, 염증 반응 또는 endotoxic shock 등 다양한 반응을 일으키게 된다.[17] LPS에 의하여 유도되는 반응 중 prostaglandin의 합성 증가에 대해서는 많은 보고가 되어 있으나 그 자세한 반응 특성, 반응 양식 또는 작용 기전 등에 대해서는 그다지 연구되어 있지 않은 실정이다. 본 연구에서는 LPS의

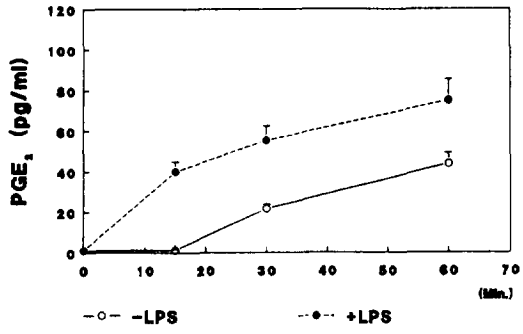

Fig. 1. Short term profile of lipopolysaccharide (LPS) induced PGE_2 synthesis in rat alveolar macrophage.
Macrophages were incubated with or without LPS (10 μg/ml) in the presence of 3% fetal calf serum (FCS) for indicated time. Cell culture supernatants were collected and PGE_2 were quantified by radioimmunoassay.

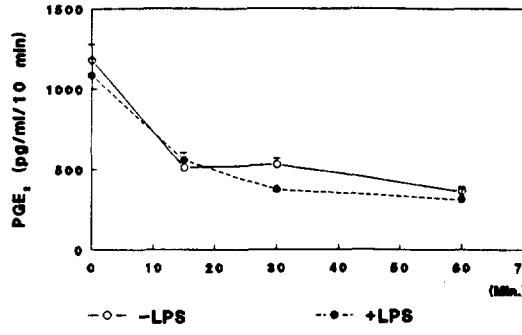

Fig. 2. Short term profile of the effects of lipopolysaccharide (LPS) on the activity of cyclooxygenase in rat alveolar macrophage.
Macrophages were treated with or without LPS (10 μg/ml) in the presence of 3% fetal calf serum (FCS) for indicated time. Cells were then incubated with 30 μM of arachidonic acid for 10 minutes and PGE_2 were quantified by radioimmunoassay.

prostaglandin 합성증진 효과에 대한 작용 기전과 그 반응 특성을 검토함으로써, LPS에 의한 macrophage의 비정상적인 활성화에 대한 기초적 지견을 얻고 이로부터 적절한 대응 방법을 모색하고자 하는 연구의 일환으로 우선 alveolar macrophage를 분리하여 이에 LPS를 농도별, 시간별로 처리하여, 그 반응 양상을 확인하여 보았다. LPS는 본 연구자 및 기타 보고에 따라 10 ug/ml의 농도에서 prostaglandin 합성 증진에 있어 최대 효과를 보이고 있음이 이미 확인되어 있었으므로 (결과는 제시하지 않았음) 본 연구에서는 시간별 반응 곡선만을 검토하였다. LPS는 여러 보고에 의한면 serum free 또는 serum 존재하에서 arachidonic acid 대사를 촉진하며, 이 작용은 약 30분 경과 후에는 plateau에 도달한다고 알려져 있으며, 이것은 주로 phospholipase A_2의 활성화에 기인하는 것으로 추정되고 있다.[22] 본 실험에서도 short term time course에서는 이러한 경향이 재확인 되고 있음에도 불구하고 절대량 변화에 있어 장시간 처리시에 비해 그다지 눈에 띄는 증가는 보여 주고 있지 못하고 있으며 (Fig. 1), 이때 cyclooxygenase의 활성은 시간 경과에 따라 오히려 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 현상은 cyclooxygenase 자체가 효소 반응 과정 중 autoinactivation 된다는 사실을 감안하면, LPS가 phospholipase A_2 활성화를 통한 prostaglandin의 생성을 증

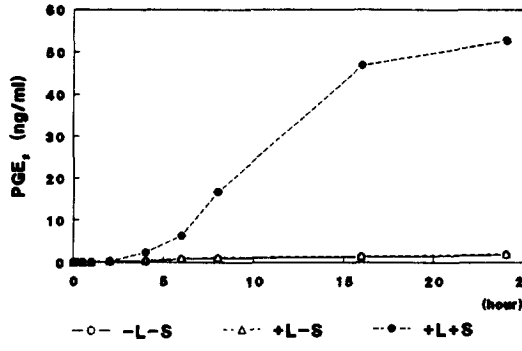

Fig. 3. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on PGE_2 synthesis in rat alveolar macrophage. (Long term profile)
Macrophages were incubated with or without LPS (L, 10 μg/ml) in the presence or absence of 3% fetal calf serum (S) for indicated time. Cell culture supernatants were collected and PGE_2 were quantified by radioimmunoassay.

가시킨다는 이전의 보고를 재확인해 주는 결과라 할 수 있다. 이와는 달리 LPS를 2시간 이상 처리하였을 경우엔, 4~6시간의 lag time을 가진 후 폭발적인 prostaglandin 합성 증가를 확인할 수 있었으며 (Fig. 3), 이러한 증가 양상은, cyclooxygenase 활성의 증가와 거의 일치함을 볼 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과는 LPS에 의한 prostaglandin 합성의 증가는

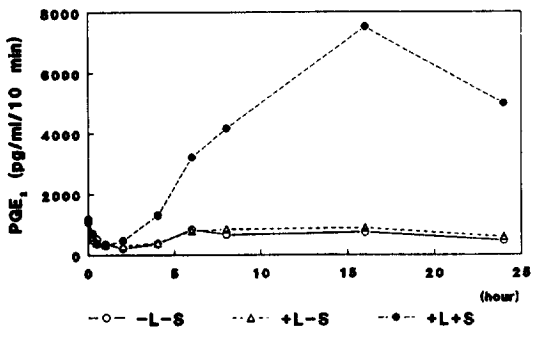

Fig. 4. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on the activity of cyclooxygenase in rat alveolar macrophage. (Long term profile)
Macrophages were treated with or without LPS (L, 10 μg/ml) in the presence or absence of 3% fetal calf serum (S) for indicated time. Cell were then incubated with 30 μM of arachidonic acid for 10 minutes and PGE_2 were quantified by radioimmunoassay.

cyclooxygenase의 de novo synthesis 증가에 기인한다는 이전의 보고와 일치하고 있으며, 이는 본 연구에서 행한 metabolic labeling을 통해서도 재확인 할 수 있었다(Fig. 5). 또한, 이때 serum free 상태에서는 prostaglandin 합성 및 cyclooxygenase 활성 증가는 관찰되지 않는 것으로 보아 LPS의 작용에는 serum 중의 어떤 factor(들)이 필요한 것으로 추정할 수 있었다. LPS의 작용 기전에 대해서는 여러 가설들이 보고되고 있으나 세포막상의 수용체를 경유하여 작용을 나타낸다고 하는 것이 일반적으로 인정되고 있으며, serum 중의 LBP (LPS binding protein)의 존재도 이러한 맥락에서, LPS의 작용에 어떠한 역할을 하고 있으리라 추정되고 있다.[21] Serum 중에는 LBP 이외에도 여러 종류의 factor들 즉 PDGF, EGF 등의 growth factor와 LPS 작용에 의해 생성되는 TNF, PAF 등이 prostaglandin 합성에 관여하고 있음이 이미 보고되어 있다.[23,24] 따라서 LPS에 의한 prostagladin 합성의 증가가 TNF 또는 PAF 등을 매개로한 2차적인 반응을 매개로 한 것인지, 또는 LPS 반응성에 대한 serum의 역할을 PDGF 등의 growth factor들이 대신 할 수 있는지 등의 여부를 확인하기 위하여 다음의 실험에 착수하였다. Macrophage에 의한 TNF의 생성은 LPS 처리 후 4~6시간에 최대에 달한다는 사실과 (연구자 등의 미발표 연구 결과에 의함) 본 실험 조건하에서 4~6시간의 lag time 후에 prostaglandin 합성이 증가되는 결과로부터 prostaglandin 합성에 대한 LPS의 작용을 TNF가 매개할 가능성이 있어 이를 타진코자 우선 TNF 처리가 prostaglandin 합성 증가 양상에 미치는 영향을 시간별로 확인하여 보았다. 실험 결과, Fig. 6에 보인 바와 같이 TNF는 24시간까지 처리에 의해 prostaglandin 합성에, 대조군에 비해 유의적인 변화를 주지 못했다. 따라서, 본 실험 조건하에서 TNF는 LPS에 의한 prostaglandin 생성 증가를 직접적으로 매개하지는 않는 것으로 판단되었다.

Bailey 등[25,26]은 일차 배양 rat smooth muscle cell에 aspirin을 처리하여 cyclooxygenase를 불활성화 시킨 후, serum을 처리하면, cyclooxygenase 활성이 회복되는 사실을 확인하고, 이러한 serum의 효과는 serum 중의 EGF 또는 PDGF에 의한 것으로 보고한 바 있다. 또한 LPS에 의하여 그 생성이 증가되는 것으로 알려진 platelet activating factor (PAF)도, macrophage에 prostaglandin 합성을 증가시킨다는 보고가 있어, 다음 실험에서는 이러한 gro-

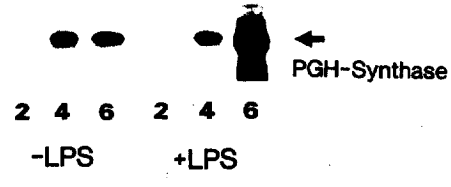

Fig. 5. The effect of LPS on the *de novo* synthesis of cyclooxygenase in rat alveolar macrophages.
Macrophages were treated with LPS (10 μg /ml) for indicated time and washed twice with PBS (pH 7.4) and incubated for another 2 hours in the methionine free DMEM containing 100 μCi of [^{35}S]-mehionine. Then, cells were washed three times with PBS and solubilized with 1% tween 20. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-cyclooxygenase antibody and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Resulting gel was fluorographed, exposed to XAR-5 film and developed.

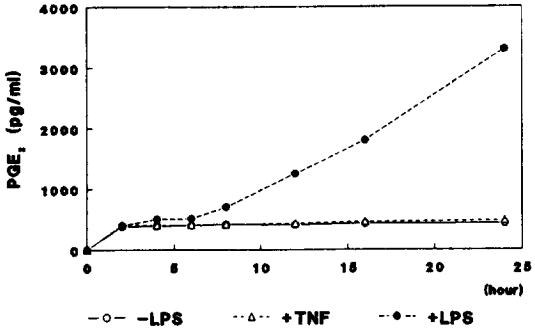

Fig. 6. The effect of tumor necrosis factor (TNF) on PGE_2 synthesis in rat alveolar macrophage.
Macrophages were incubated with LPS (10 μg/ml) or TNF (10^4 U/ml) in the presence of 3% fetal calf serum (FCS) for indicated time. Cell culture supernatants were collected and PGE_2 were quantified by radioimmunoassay.

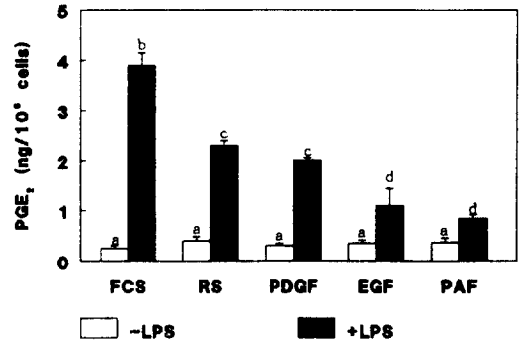

Fig. 7. The effects of growth factors and platelet activating factor (PAF) on PGE_2 synthesis in rat alveolar macrophage.
Macrophages were incubated with LPS (10 μg/ml), PDGF (10 ng/ml), EGF (20 ng/ml) or PAF (1 mM) for 16 hours. Cell culture supernatants were collected and PGE_2 were quantified by radioimmunoassay. FCS and RS denote fetal calf serum and rat serum, respectively.
a vs b, c; b vs c, d: $p<0.01$.
a vs d; c vs d: $p<0.05$.

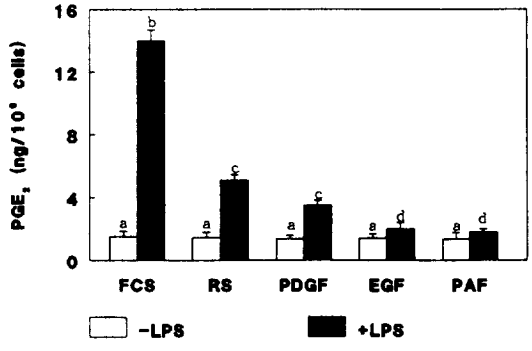

Fig. 8. The effects of growth factors and platelet activating factor (PAF) on the activity of cyclooxygenase in rat alveolar macrophage.
Macrophages were treated with LPS (10 μg/ml), PDGF (10 ng/ml), EGF (20 ng/ml) or PAF (1 mM) for 16 hours. Cell were then incubated with 30 μM of arachidonic acid for 10 minutes and PGE_2 were quantified by radioimmunoassay. FCS and RS denote fetal calf serum and rat serum, respectively.
a vs b, c; b vs c, d: $p<0.01$.
c vs d: $p<0.05$.

wth factor 및 PAF의 영향을 검토하여 보았다. 실험 결과, 각 growth factor 및 PAF는 그 자체로는 prostaglandin의 생성능 및 cyclooxygenase의 활성에 그다지 유의적인 변화를 주지 못하였으나, LPS의 병용 처리에 의해서는 괄목할 만한 증가 양상을 보였다(Fig. 7, 8). 이러한 결과는 growth factor들에 의해 prostaglandin 합성이 촉진되며, 이때 cyclooxygenase의 활성도 함께 증가된다는 이전의 보고[25,26]들과는 일치하지 않고 있으며, 따라서, cyclooxygenase의 활성 조절에는 세포에 따라 서로 다른 조절 기전이 관여하고 있을 가능성을 추정할 수 있었다. LPS 병용 처리에 의한 alveolar macrophage에서의 prostaglandin 합성 증진 및 cyclooxygenase의 활성 증가에 대한 potency는 FCS>rat serum>PDGF>EGF>PAF의 순서였으며, PDGF, EGF의 처리 용량과 serum 중 함유되어 있는 PDGF, EGF의 양을 고려하여 볼 때, 이들 단일 growth factor들 만으로는 이러한 potency의 차이를 설명하기가 어려우며, 따라서 이러한 차이는 PDGF 또는 EGF 이외의 growth factor에 기인하거나 여러 growth factor들의 combination 효과에 기인할 가능성을 추정할 수 있었다. 또한 growth factor의 함량이 상대적으로 현저히 낮을 것으로 추정되는 rat serum의 경우 단일 growth factor들에 비하여 오히려 높은 정도의 증강효과를 보인 것은, 최근 논의가 많이되고 있는 serum 중의 LPS binding protein (LBP)의 작용에 기인할 가능성을 시사해 주고 있다. 즉 LPS가 이

LBP와 결합함으로써 putative LPS receptor와의 interaction이 증진된다는 사실이 이미 보고된 바 있어[21] 본 실험의 결과에 대한 추론을 뒷받침해 주고 있다. 따라서 LPS의 prostaglandin 합성 증진 작용에는 serum의 존재가 필수적임을 알 수 있었으며, 이는 serum 중의 LBP의 존재 및 각종 growth factor들과의 상호 작용에 의할 가능성을 확인할 수 있었다. 또한 실험 결과 FCS와 rat serum의 영향이 정성적으로 별다른 차이를 보이지 않고 있으므로 세포 배양 중에 이용되는 FCS의 존재 때문에 영향을 받을 것으로 여겨지는 여러 nutritional factor들, 예를 들어, vitamin E. essential fatty acid 등이 prostaglandin 합성에 미치는 영향들을 검토함에 있어서 homologous serum의 사용이 가능함을 확인할 수 있었다.

결론적으로 rat alveolar macrophage에서의 LPS에 의한 prostaglandin 합성 증진 작용은 cyclooxygenase의 활성 증가에 기인하고 있으며, 이는 TNF나 PAF의 생성을 매개로 하고 있지 않음을 확인하였다. 또한 LPS의 작용에는 serum의 존재가 필수적이었으며 따라서 LP는 serum 중의 LBP 또는 각종 growth factor들과의 상호 작용을 통하여 prostaglandin 합성을 증진 시키는 것으로 추정되었다.

감사의 글

본 연구의 일부는 1993년도 보건사회부 지원 신약개발 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

Gram 음성균의 세포벽 성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 생체내에서 각종 생리 활성 물질의 생성을 증진시킴으로써 내독성 shock 등의 병변을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이중 prostaglandin (PG) 합성 증진 작용에 대해서는 많은 보고가 이루어져 있으나 그 자세한 작용 기전이나 특성 등에 대해서는 아직 많은 연구가 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 랫드 폐포 macrophage를 대상으로 하여 LPS의 PG 합성 증진 작용에 대한 특성을 확인코자 하였다. 우선 LPS에 의한 PG 합성 profile을 시간별로 확인한 결과 처리 6시간 이후에 현저한 합성 증가를 관찰하였으며, 이는 주로 cyclooxygenase의 활성 증가에 기인하는 것으로 추정되었다. LPS는 짧은 시간 동안의 처리에 의해서도 PG 합성을 증진시켰으나, 양적인 면에서, 장시간 처리에 비해 극히 적었고, 이 작용은 phospholipase A_2 활성 증가에 기인하는 것으로 추정 되었다. LPS에 의한 PG 합성 증진 작용은, TNF나 PAF의 생성을 매개로 하지는 않았으며, serum의 존재가 필수적임을 확인하였다. EGF, PDGF 등의 growth factor들은 그 자체로는 PG 합성을 유의적으로 증가시키지는 않았으나 LPS와의 병용 처리에 의해 어느 정도의 증진 작용을 나타 내었다. 또한, 정상 랫드 serum도 LPS와의 병용 처리에 의해 PG 합성을 현저히 증가 시켰으며, 따라서, LPS는 serum 중의 각종 growth factor 외에도 LBP 등의 serum factor들과의 상호 작용을 통하여 PG 합성 증진 작용을 나타내는 것으로 추정되었다.

참고문헌

1. Needleman P., Turk, J., Jakschik B.A., Morrison, A.R. and Lefkowith, J.B. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 69 (1986).
2. Pace-Asciak, C.R. and Smith, W.L. *The Enzymes XVI*, pp. 543-603, (1993).
3. O'Sullivan, M.G., Huggins, E.M. and McCall, C.E. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **191**, 1294 (1993).
4. Fu, J.Y., Masferrer, J.F., Seibert, K., Raz A. and Needleman, P. *J. Biol. Chem.*, **265**, 16737 (1990).
5. Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D. and Hwang, D.H., *J. Biol. Chem.*, **267**, 25934 (1992).
6. Wu, K.K., Hatzakis, H., Lo, S.S., Seong, D., Sanduja, K. and Tai, H.H. *J. Biol. Chem.*, **263**, 19043 (1988).
7. DeWitt, D.L. and Smith, W.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1412, (1988).
8. Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J. and Needleman, P. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3550 (1988).
9. Yokoyama, C., Takai, T. and Tanabe, T., *FEBS Letter*, **231**, 347 (1988).
10. DeWitt, D.L., El-Harith, E.A., Kraemer, S.A., And-

rews M.J., Yao, E.F., Armstrong, R.L. and Smith, W.L., *J. Biol. Chem.*, **265**, 5192 (1990).
11. Yokoyama, C. and Tanabe, T. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **165**, 888 (1989).
12. Xie, W., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L. and Simmons, D.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2692 (1991).
13. Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W. and Herschman, H.R. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12866 (1991).
14. O'Banion, M.K., Sadowaki, H.B., Win, V. and Yong, D.A. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23261 (1991).
15. Kujubu, D.A. and Herschman, H.R. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7991 (1992).
16. Simmons, D.L., Xie, W., Evett, G., Merril, J., Robertson, D.L. and Bradshaw, W.S. *J. Lipid Mediators*, **6**, 113 (1993).
17. Nathan, C.F. *J. Clin. Invest.*, **79**, 319 (1987).
18. Chandler, D.B. and Fulmer, J.D. *J. Immunol.*, **139**, 893 (1987).
19. Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., DeRobertis, C., Sun, W., Seo, K.W., Simmons, D.L. and Hwang, D.H.: *"Essential Fatty Acids and Eicosanoid"* ed. A. Sinclair and R. Gibson, Am. Oil Chem. Soc., pp. 446-449 (1992).
20. Morrison, D.C. and Ryan, J.L. *Ann. Rev. Med.*, **38**, 417 (1987).
21. Raetz, C.R.H., Ulevitch, R.J., Wright, S.D., Sibley, C.H., Ding, A. and Nathan, C.F. *FASEB J.*, **5**, 2652 (1991).
22. Wang, J., Kester, M. and Dunn, M.J. *Biochim. Biophys. Acta*, **963**, 429 (1988).
23. Smith, W. *Am. J. Physiol.*, **263**, F181 (1992).
24. Shimizu, T. and Wolfe, L.S. *J. Neurochem.*, **55**, 1 (1990).
25. Bailey, J.M., Makheja, A.N., Pash, J. and Verma, M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **157**, 1159 (1988).
26. Pash, J.M. and Bailey, J.M. *FASEB J., 2*, 2613 (1988).