

사람 융모 성선 자극 호르몬에 의한 복강 대식세포로부터 산화질소의 발생

이은희 · 신태용* · 김형민*

원광대학교 약학대학, *우석대학교 약학대학

(Received February 3, 1997)

Nitric Oxide Generation from Peritoneal Macrophages by Human Chorionic Gonadotropin

Eun-Hee Lee, Tae-Yong Shin* and Hyung-Min Kim*

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea, and

*College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju, Chonbuk, 565-701, Korea

Abstract—Human chorionic gonadotropin (hCG) is a placental hormone and is involved in maintenance of the corpus luteum during pregnancy. In the present study, effect of hCG on nitric oxide (NO) generation from peritoneal macrophage was examined. hCG had no effect on NO generation by itself, whereas recombinant interferon- γ (rIFN- γ) alone had modest activity. When hCG was used in combination with rIFN- γ , there was a marked cooperative induction of NO generation in a dose-dependent manner. The optimal effect of hCG on NO generation was shown at 6 hr after treatment with rIFN- γ . Furthermore, northern blot analysis showed that hCG increased the expression of inducible NO synthase (iNOS) gene. These results suggest that hCG induces NO generation from macrophages by increasing the expression of iNOS gene.

Keywords □ Nitric oxide, human chorionic gonadotropin, macrophage.

Nitric oxide (NO, 산화질소)는 매우 불안정하며, 반응성이 강한 물질로서 생체내에서 다양한 작용을 하고 있다.¹⁻³⁾ NO를 합성하는 효소는 크게 구성성 효소 (constitutive NO synthase, cNOS)와 유도성 효소 (inducible NO synthase, iNOS)로 구분되며, 전자는 이미 세포내에 존재하는 단백질로 어떤 자극에 의하여 활성을 갖게 되는 것이고 후자는 자극에 반응하여 새로운 단백질이 합성되는 것이다.^{4,5)} NO는 내독소 (lipopolysaccharide, LPS)를 투여한 실험동물에서 많은 양의 nitrate가 배설된다고 알려진 후⁶⁾에, 대식세포가 recombinant interferon- γ (rIFN- γ)와 LPS에 의해 활성화되어 nitrite와 nitrate를 발생시키고,⁵⁾ 이 nitrite와 nitrate는 대식세포에서 발생된 NO에서 유

래하는 것이 증명되었다.⁷⁾ NO는 대식세포의 항미생물 작용과 항암작용의 중요한 매개물이라는 사실이 많은 연구자들에 의하여 밝혀졌다.^{3,8-10)} 사람융모성선자극 호르몬 (human chorionic gonadotropin, hCG)은 임신기간동안 임신유지를 위한 필수 호르몬이다.¹¹⁾ hCG는 여러종의 생식선 및 생식선외 성선자극호르몬 (gonadotropin) 수용체와 결합한다.¹²⁻¹⁵⁾ Powers 등¹⁶⁾은 혈액난포막의 조절과 작용이 NO에 의하여 매개되고 있는 것을 증명하였다. 본 연구에서 hCG는 LPS처럼 생쥐 복강에서 분리한 복강대식세포에 대한 "second signal"로 작용하여 iNOS 유전자의 발현을 증가시키고 NO를 생성하는 사실을 보고한다.

실험방법

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0653-50-6805 (팩스) 0653-843-3421

실험동물 - 원광대학교 약학대학 사육실에서 사육한

8-12주 사이의 BALB/c계 마우스를 사용하였다.

시약 - hCG는 유한양행에서 구입하였다. Murine recombinant IFN- γ 는 Genzyme (Munche, Germany)에서, RPMI 1640, L-arginine, arginase, LiCl, Urea, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, sodium nitrite, sulfanilamide는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서, agarose, phenol, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, RNase inhibitor, DNA polymerase I, Taq polymerase, deoxynucleotide triphosphate는 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. N³-monomethyl-L arginine (N³MMA)은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

대식세포의 배양 - 생쥐의 복강내에 4% thioglycolate 1 ml를 주사하고 4일 후에 복강을 RPMI 1640으로 세척하여 얻은 다음 저장액채리를 하여 적혈구를 제거하고 10% 우대혈청을 함유하는 RPMI 1640에 부유시켜, 96-well plate의 한 well 당 2×10^5 세포 혹은 10 cm² petri dish당 1×10^7 세포가 되도록 분주하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 약 3 시간 후에 배양액을 교환하여 배양용기 표면에 부착되지 않은 세포는 제거하고, 부착된 대식세포만을 실험에 사용하였다.

NO 발생량 측정 - 대식세포에서 발생된 NO의 양은 배지에 축적된 NO의 산화물인 nitrite를 Griess 반응으로 정량하였다.¹⁷⁾ 즉 0.1% naphthylethylene diaminedihydrochloride와 1% sulfanilamide를 동일 양 섞은 Griess reagent 50 μ l와 배양액 50 μ l를 섞은 다음 10 분 후에 ELISA reader (Bio-Tek Instruments Co.)를 이용하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도계산은 sodium nitrite를 표준 물질로 사용하여 결정하였다.

Probe의 조제 - iNOS mRNA 전사물을 검출하기 위하여 iNOS 유전자¹⁸⁾의 암호영역에 대한 sense 및 antisense oligonucleotide primer를 다음과 같이 제작하였다. forward primer, 5'-GGCCTTGCTC-CAGCATGTAC-3', 1856~1876; reverse primer, 5'-GCTGCCGCTCTCATCCAGAAC-3', 2395~2415. 생쥐의 복강에서 분리한 대식세포에 rIFN- γ 와 LPS를 처리하여 활성화시킨 다음 total cellular RNA를 주형으로 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. sense 및 antisense primer를

첨가하여 증폭한 PCR 산물을 pBluescript II KS (-) plasmid *EcoRV* site에 subcloning하였다. [α -³²P] dCTP와 함께 random priming 방법으로 probe를 조제하였다.

RNA 추출 및 Northern blotting - Total RNA는 변형한 LiCl-urea 방법¹⁹⁾으로 분리하여 1% agarose-formaldehyde gel에 전기영동하고 nylon membrane에 전이시켰다. 50% formamide, 4 \times SSC, 0.5 mg/ml sheared salmon sperm DNA 및 1 \times Denhardt's 용액을 함유한 완충용액에서 prehybridization했다. Hybridization은 [α -³²P] dCTP로 표지한 probe (1×10^6 cpm/ml)를 함유하는 같은 완충용액에서 수행하였다. 여과지는 순차적으로 2 \times SSC/0.1% SDS, 1 \times SSC/0.1% SDS 용액으로 각각 55 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 세척한 다음 건조하여 자동방사선 사진술에 의해 분석하였다.

통계학적 분석 - 모든 자료는 means \pm SD로 나타내었으며, 유의성검사는 student's *t*-test로 행하였다. 유의 수준은 $p < 0.001$ 로 하였다.

실험결과 및 고찰

생쥐복강대식세포에 배지 단독 혹은 rIFN- γ (5 U/ml)을 함유한 배지에 hCG (100 U/ml)를 처리한 후 48 시간 동안 배지에 축적된 nitrite의 양을 측정하였

Table I— Synergistic cooperation between rIFN- γ and hCG to induce NO synthesis in mouse peritoneal macrophages

Addition		Final concentration (μ M) ^{c)}
rIFN- γ ^{a)}	hCG ^{b)}	NO ₂ ⁻
None	None	<7
+	None	14 \pm 2
None	+(0 h)	<8
+	+(0 h)	19 \pm 3
+	+(3 h)	35 \pm 4*
+	+(6 h)	41 \pm 6*
+	+(9 h)	38 \pm 4*

^{a)} TG-elicited macrophages were cultured either in medium alone or in medium containing rIFN- γ (5 U/ml)

^{b)} The cells were stimulated with hCG (100 U/ml) at various times after incubation

^{c)} The amount of NO₂⁻ released by macrophages was measured after 48 h of incubation. Values are means \pm SD of three experiments. Significantly different from the control. *: $p < 0.01$.

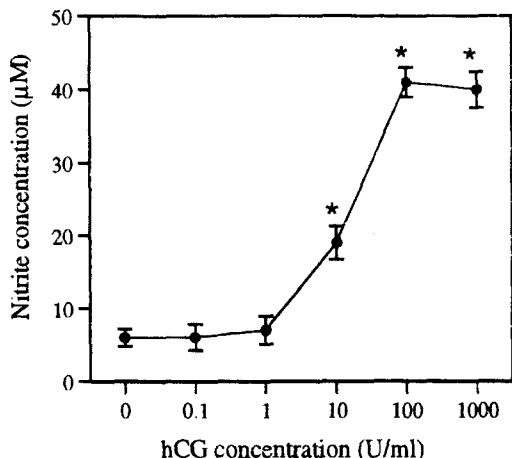


Fig. 1—Dose-dependent effects of hCG for NO release on the rIFN- γ -treated macrophages. Cells (2×10^5 cells/well) were incubated for 6 h in medium containing rIFN- γ (5 U/ml), stimulated with hCG and incubated in a CO₂ incubator. NO synthesis was measured by the method of Griess (nitrite). Values are means \pm SD of three experiments. Significantly different from the control. *: $p < 0.01$.

다. Table I에 나타난 바와 같이 hCG만으로는 NO 합성이 유도되지 않은 반면에 rIFN- γ 와 함께 처리했을 때 NO 합성이 상승적으로 증가하였다. hCG는 rIFN- γ 처리 6 시간 후에 최대의 효과를 나타내었다. hCG의 농도의존적 효과는 Fig. 1에 나타내었다. rIFN- γ 를 처리한 대식세포에 100 U/ml의 hCG를 부가하였을 때 가장 큰 상승효과를 나타내었고 1 U/ml보다 적은 농도에서는 nitrite의 양이 현저하게 감소하였다.

배지중의 증가된 nitrite의 생성량과 대식세포내의 iNOS mRNA량과의 일치성 여부를 실험하기 위하여, rIFN- γ 단독처리군 및 rIFN- γ 함유 배지에 hCG (1, 10, 100 U/ml)를 9 시간 동안 처리한 군으로부터 total RNA를 분리하였다. Northern blot 분석 방법으로 iNOS mRNA 수준을 분석한 결과 Fig. 2에 보인 바와 같이 배지중에 분비된 nitrite의 양과 상관적이었다. 최광은 등²⁰⁾은 hCG가 생쥐대식세포 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과 hCG 100 U, 500 U에서는 대식세포의 세포독성과 임파구 활성화도에 유의한 차이가 없었으나, 1000 U에서는 통계적으로 유의한 차이가 있는 것을 보고했다. 본 실험에 사용된 hCG 100 U에 의한 대식세포로부터 NO의 생성은 rIFN- γ 로 자극된 다음의 hCG 농도이기 때문인 것으로 생각된다.

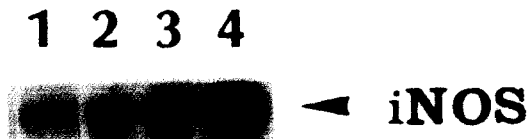


Fig. 2—Detection of iNOS mRNA in stimulated murine macrophages. Lane 1, rIFN- γ alone; Lane 2, rIFN- γ plus 1 U/ml hCG; Lane 3, rIFN- γ plus 10 U/ml hCG; Lane 4, rIFN- γ plus 100 U/ml hCG. Total cellular RNA was hybridized to ³²P-labeled iNOS cDNA probe.

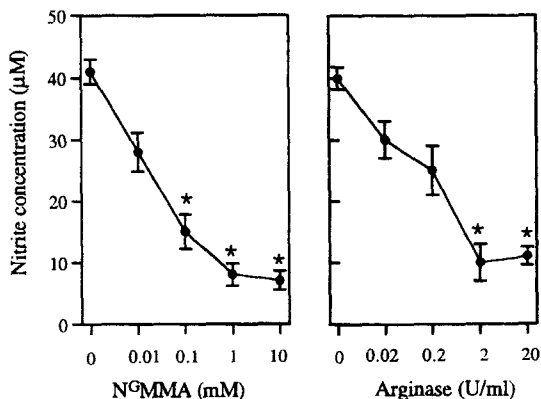


Fig. 3—Effects of N^GMMA or arginase on NO synthesis from murine macrophages. The cells were treated with 5 U/ml rIFN- γ plus 100 U/ml hCG. Then, the cells were incubated with various concentrations of N^GMMA or arginase at 37°C for 48 h. NO release was measured by the method of Griess (nitrite). Values are means \pm SD of three experiments. Significantly different from the control. *: $p < 0.01$.

hCG 유도성 NO 발생 신호기작이 L-arginine 의존적 경로인가를 알아보기 위하여 대식세포를 rIFN- γ 와 N^GMMA 혹은 rIFN- γ 와 arginase 존재하에서 6 시간 동안 배양한 다음 hCG를 처리하여 다시 42 시간 동안 배양하였다. 대식세포에서 rIFN- γ 와 hCG에 의한 nitrite의 생성은 N^GMMA와 arginase의 농도 의존적으로 현저하게 감소하였다. 이는 이들 L-arginine 동족체가 NO synthase 의존적인 것을 시사한다.

본인들은 태반의 영양세포막에서 생성되어 임신유지에 중요한 기능을 하는 hCG가 rIFN- γ 로 priming된 대식세포에 second signal로 작용하여 다량의 NO를 발생시키는 것을 발견했다. 즉 hCG는 LPS 혹은 phorbol 12-myristate 13-acetate와 같은 효과²¹⁻²³⁾를 나타내는 것으로 사료된다. 지난 10 여년간 hCG 수

용체는 brain과 vascular smooth muscle 등 비생식선 조직에서 다수 발견되었다.^{5, 21-22, 24-25} 현재의 결과만으로 hCG에 의한 NO 발생의 기작 및 생리적 중요성은 정확하게 알 수 없으나 NO는 혈관확장, neural communication, 세포성장조절, 숙주보호 등 다양한 기능을 갖는 세포간 및 세포내의 중요한 조절분자이기 때문에 생체내의 기본적 작용과정의 국소적 조절에 관여할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비 (유전공학)에 의하여 연구되었음.

문헌

- Bredt, D. S. and Synder, S. H. : Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**, 3 (1992).
- Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. : Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109 (1991).
- Nathan, C. F. and Hibbs, J. B. Jr. : Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 65 (1991).
- Nathan, C. F. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
- Stuehr, D. J. and Marletta M. A. : Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7738 (1985).
- Wagner, D. A., Young V. R. and Tannenbaum, S. R. : Mammalian nitrate biosynthesis: Incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7764 (1983).
- Stuehr, D. J., Gross, S. S., Sakuma, I., Levi, R. and Nathan, C. F. : Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.* **169**, 1011 (1989).
- Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R. and Vavrin, Z. : Iron depletion: possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 716 (1984).
- Hibbs, J. B., Jr., Taintor, R. R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**, 473 (1987).
- Stuehr, D. J., and Nathan, C. F. : Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**, 1543 (1989).
- Pierce, J. G. and Parsons, T. F. : Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 465 (1981).
- Ziecik, A. J., Stanchev, P. D. and Tilton, J. E. : Evidence for the presence of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin binding sites in the porcine uterus. *Endocrinology* **119**, 1159 (1986).
- Jensen, J. D., Odell, W. D. : Identification of LH/hCG receptors in rabbit uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **189**, 28 (1988).
- Ziecik, A. J., Derecka-Reszka, K. and Rzcudlo, S. J. : Extragonadal gonadotropin receptors, their distribution and function. *J. Physiol. Pharmacol.* **43**, 33 (1992).
- Lei, Z. M., Rao, ChV., Kornyei, J. L., Licht, P. and Hiatt, E. S. : Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology* **132**, 2262 (1993).
- Powers, R. W., Chen, L., Russel, P. T. and Larsen, W. J. : Gonadotropin-stimulated regulation of blood-follicle barrier is mediated by nitric oxide. *Am. J. Physiol.* **269**, E290 (1995).
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. : Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biologic fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131 (1982).
- Xie, Q-W., Cho H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. and Nathan, C. : Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225 (1992).

- 19) Kim, H. M., Hirota, S., Onoue, H., Hirata, T., Suzuki, K., Ohno, S., Kuroki, T., Kitamura, Y and Nomura, S. : Localization and developmental expression of novel protein kinase C δ gene. *Dev. Brain Res.* **70**, 239 (1992).
- 20) 최광은, 김미란, 권용일, 유기성, 정재근, 남궁성은, 이현영, 김승조 : 용모성 성선자극호르몬이 생쥐대식세포 활성화에 미치는 영향. *대한산부인과학회지* **36**, 235 (1993).
- 21) Jun, C. D., Choi, B. M., Kim, H. M. and Chung, H. T. : Involvement of protein kinase C during Taxol-induced activation of murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **154**, 6541 (1995).
- 22) Yoon, H. J., Jun, C. D., Kim, J. M., Rim, G. N., Kim, H. M. and Chung, H. T. : Phorbol ester synergistically increases interferon- γ -induced nitric oxide synthesis in murine microglial cells. *Neuroimmunomodulation* **1**, 377 (1994).
- 23) Jun, C. D., Choi, B. M., Lee, S. Y., Kang, S. S., Kim, H. M. and Chung, H. T. : Nitric oxide inhibits the expression of protein kinase C δ gene in the murine peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 105 (1994).
- 24) Bhattacharya, S., Banerjee, J., Sen, S. and Manna, P. R. : Human chorionic gonadotropin binding sites in the human endometrium. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **129**, 15 (1993).
- 25) Toth, P., Li, X., Rao, ChV., Lincoln S. R., Sanfilippo, J. S., Spinnato, J. A. and Yussman, M. A. : Expression of functional human chorionic gonadotropin/oluteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 307 (1994).