

High mobility group B1(HMGB1)과 LPS의 염증유발효과 차이의 비교 및 HMGB1에 의한 IL-8 promoter 자극 기전의 규명

중앙대학교 의과대학 내과학교실

전은주, 곽희원, 송주한, 이영우, 정재우, 최재철, 신종욱, 박인원, 최병휘, 김재열

Proinflammatory Effects of High Mobility Group B1 (HMGB1) Versus LPS and the Mechanism of IL-8 Promoter Stimulation by HMGB1

Eun Ju Jeon, M.D., Hee Won Kwak, M.D., Ju Han Song, M.D., Young Woo Lee, M.D., Jae Woo Chung, M.D., Jae Chul Choi, M.D., Jong Wook Shin, M.D., In Won Park, M.D., Byoung Whui Choi, M.D., Jae Yeol Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, ChungAng University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: High mobility group box 1 (HMGB1) is a novel, late mediator of inflammation. This study compared the pro-inflammatory effects of LPS and HMGB1. The transcriptional factors that play an important role in mediating the HMGB1-induced stimulation of IL-8 were also evaluated.

Methods: RAW264.7 cells were stimulated with either LPS (100 ng/ml) or HMGB1 (500 ng/ml). The TNF- α , MIP-2 and IL-1 β levels in the supernatant were evaluated by ELISA at 0, 2, 4, 8, 12 and 24h after stimulation. An acute lung injury was induced by an injection of LPS (5 mg/kg) or HMGB1 (2.5 mg/kg) into the peritoneum of the Balb/c mice. The lung cytokines and MPO activity were measured at 4h (for LPS) or 24h (for HMGB1) after the injection. The transcriptional factor binding sites for NF-IL6, NF- κ B and AP-1 in the IL-8 promoter region were artificially mutated. Each mutant was ligated with pIL-6luc and transfected into the RAW264.7 cells. One hour after stimulation with HMGB1 (500 ng/ml), the cell lysate was analyzed for the luciferase activity.

Results: The expression of MIP-2, which peaked at 8h with LPS stimulation, increased sequentially until 24h after HMGB1 stimulation. An intraperitoneal injection of HMGB1, which induced a minimal increased in IL-1 β expression, provoked the accumulation of neutrophils the lung. A mutation of AP-1 as well as NF- κ B in the IL-8 promoter region resulted in a lower luciferase activity after HMGB1 stimulation.

Conclusion: The proinflammatory effects of HMGB1, particularly on IL-8, are mediated by both NF- κ B and AP-1. (*Tuberc Respir Dis 2007; 62: 299-307*)

Key words: HMGB1, LPS, TNF- α , MIP-2, IL-1 β , MPO, NF- κ B, AP-1.

서 론

HMGB1(amphoterin 또는 HMG1)은 30년 전에 발견된 핵단백질(nuclear protein)이다¹. 인간의 HMGB1 유전자는 chromosome 13q12에 위치하며, 216개의 아미노산으로 구성된 HMGB1 단백질을 생산한다².

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-041-E00174)

Address for correspondence: **Jae Yeol Kim, M.D.**
Department of Internal Medicine, ChungAng University College of Medicine, 224-1 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul, 155-756, Korea
Phone: 82-2-6299-1396, Fax: 82-2-825-7571
E-mail: jykimmd@cau.ac.kr
Received: Feb. 8. 2007
Accepted: Mar. 20. 2007

HMGB1은 세 개의 domain으로 구성되어 있는데 A box와 B box는 DNA에 결합하는 부위이고, 음전하를 가진 C terminus가 있다(Figure 1)³. HMGB1은 인체 내에서 흉선, 림프절, 고환, 태아의 간 등에서 높은 농도로 존재하며, 간세포와 뇌세포를 제외하면 대부분의 세포에서는 주로 핵 내에 존재한다⁴. HMGB1은 핵 내에서 nucleosome을 안정화시키고, 전사작용을 활성화시키며, 손상된 DNA를 복구하는 데 중요한 역할을 담당한다^{5,6}.

1999년도에 Tracey 등은 그 동안 핵단백질로만 여겨졌던 HMGB1이 염증을 유발하는 cytokine의 역할을 하며, 또한 HMGB1의 길항제가 폐혈증에서 치료 효과를 보인다는 사실을 보고하였다⁷. 이후의 연구에 의하면 HMGB1은 핵 내에서 외부자극에 의해 아세틸화(acetylation)되어 세포질로 이동된 후 세포 밖으로

분비되거나 또는 괴사에 빠진 세포로부터 외부에 분비될 수 있다^{8,9}. 현재까지 HMGB1의 수용체로는 RAGE (receptor for advanced glycation end-products)와 Toll like receptor 2와 4(TLR2와 TLR4)가 알려져 있다^{10,11}. HMGB1과 수용체와의 결합은 NF-κB를 활성화시키며, ERK와 p38과 같은 mitogen-activated protein kinase(MAPK)도 활성화시켜서 TNF-α, IL-6, 그리고 IFN-γ 같은 cytokine의 분비를 촉진시킨다. 이렇게 분비된 사이토카인들은 생체의 염증반응을 확대 증폭시킨다¹².

이러한 작용기전을 고려하면 HMGB1이 패혈증과 같은 전신 염증질환에서 중요한 역할을 시행할 가능성이 높다. 기존에 알려진 염증매개 사이토카인인 TNF-α나 IL-1β 등은 패혈증의 초기에 최고치에 이른 뒤에 바로 혈중치가 정상화된다. 따라서 TNF-α나 IL-1β 등에 대한 길항제를 패혈증의 치료에 사용하려는 시도들은 치료시기의 범위(therapeutic window)가 너무 좁기 때문에 모두 실패하였다. 반면에 HMGB1은 패혈증의 후기에 분비가 최고조에 달하기 때문에 치료시기의 범위가 넓은 장점이 있어서 HMGB1에 대한 길항제가 패혈증의 치료제로서의 유용성이 높을 것으로 예상된다⁷.

Interleukin 8(IL-8)은 CXC chemokine으로 호중구(neutrophil)에 대한 화학주성(chemotaxis)을 나타내며 염증의 증폭에 중요한 역할을 수행한다. IL-8 promoter는 크게 NF-IL6(또는 C/EBP), NF-κB 그리고 AP-1 세 종류의 전사인자에 대한 결합부위를 가지고 있으며, 지금까지는 HMGB1에 의한 자극의 세포 내 신호전달체계에서 전사인자인 NF-κB가 중요한 역할을 수행한다는 사실이 주로 보고되었으나¹³ 나머지 두 종류 전사인자(NF-IL6와 AP-1)의 역할에 대해서는 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 LPS 또는 HMGB1를 생체 외(*in vitro*) 또는 생체 내(*in vivo*)로 투여한 후, 이에 의해 유발되는 염증반응의 정도를 염증매개 사이토카인인 TNF-α, MIP-2 그리고 IL-1β의 발현을 측정하여 비교하고자 하였다. 또한 HMGB1에 유발되는 자극의 세포 내 신호전달체계에서 기존에 알려진 NF-κB외에 다른 전사인자들도 중요한 역할을 수행하는지도

함께 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

대상 동물 및 대상세포

생후 8-12주의 수컷 Balb/c mice(이하 생쥐)를 이용하였다. 대상 생쥐는 12:12 시간의 명암주기 하에 사육하였으며, 자유롭게 음식을 섭취하도록 하였다. 각 실험군당 최소한 5마리 이상의 생쥐를 이용하였으며, 실험과정은 동물실험윤리규정에 따라 진행하였다. RAW264.7 세포주는 쥐의 단핵구(murine macrophage)에서 유래된 세포로 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, USA)에서 구입하였고 ATCC 가이드라인에 맞춰서 배양하였다.

실험 재료

Human HMGB1은 Shino-Test(Sagamihara, Kanagawa, Japan)로부터 기증받았다. TNF-α, MIP-2 그리고 IL-1β의 농도측정은 ELISA kit를 이용하였다(R&D systems, Minneapolis, MN, USA). 생쥐의 마취에 이용한 isoflurane은 Abbott 사(Chicago, IL, USA)에서 구입하였다. 기타의 실험재료는 특별한 언급이 없는 경우에는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

실험 과정

1. RAW264.7 세포에서 LPS 또는 HMGB1 자극 후에 배양상층액에서 시간 경과에 따른 염증매개 cytokine의 발현 확인

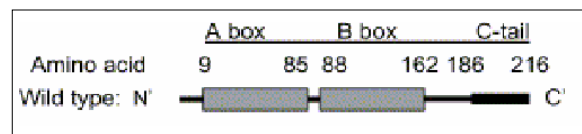


Figure 1. The structure of human HMGB1 protein (Li J et al, J Immunol Methods, 2004).

RAW264.7 세포를 well 당 10^5 으로 분주한 뒤 LPS(100 ng/ml) 또는 HMGB1(500 ng/ml)으로 자극하고, 자극한 뒤로부터 0, 2, 4, 8, 12, 24시간 뒤에 배양상층액을 회수하여 TNF- α , MIP-2 그리고 IL-1 β 의 농도를 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다.

2. LPS 또는 HMGB1의 복강 내 주사에 의해 유발된 생쥐의 급성폐손상의 차이 비교

1) LPS 또는 HMGB1의 복강 내 주사 후에 폐의 cytokine의 발현 측정

LPS(5 mg/kg) 또는 HMGB1(2.5 mg/kg)을 생쥐의 복강 내로 주입한 후에 LPS 주입 쥐는 4시간 뒤에, 그리고 HMGB1 주입 쥐는 24시간 뒤에 생쥐를 희생시켰다. 생쥐에서 폐를 적출한 후 갈아서(homogenize) 얻은 조직부유액을 14,000 g에서 15분간 원심분리하였고, 상층액의 TNF- α , MIP-2 그리고 IL-1 β 의 발현을 ELISA 방법을 통해 측정하였다.

2) LPS 또는 HMGB1의 복강내 주사 후에 폐의 myeloperoxidase(MPO) assay 시행

LPS(5 mg/kg) 또는 HMGB1(2.5 mg/kg)을 생쥐의 복강 내로 주입하고, 4시간(LPS) 또는 24시간(HMGB1) 후에 생쥐를 희생시키고 폐를 적출한 후, 폐의 호중구 침윤 정도를 MPO assay로 측정하였다.

3. HMGB1 자극에 의해 활성화되는 transcriptional factor의 규명

1) IL-8 promoter의 전사인자결합부위에 mutation 유도

IL-8 promoter에 있는 각각의 전사인자 결합부위에 point mutation을 유발하여 wild type과 세 종류의 돌연변이를 포함한 4개의 plasmid를 만들었다. 각각의 plasmid를 luciferase gene(pIL6-luc)과 결합시켜 -133luc, -133lucmNF-IL6, -133lucmNF- κ B, -133

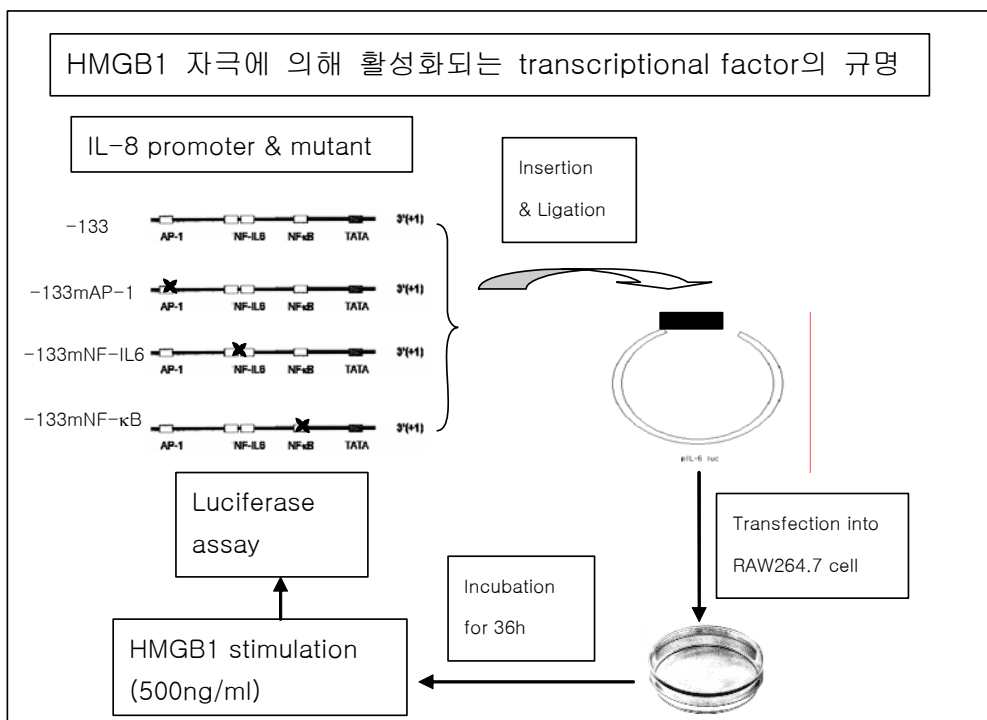


Figure 2. Flow sheet of luciferase assay.

lucmAP-1을 만들었다(m은 mutant를 의미함).

2) Plasmid를 RAW264.7 세포에 transfection

각각의 plasmid(-133luc, -133lucmNF-IL6, -133 lucmNF-κB, -133lucmAP-1) 0.25 μg과 lipofectamin 0.5 μg을 Opti-Med 50 μl에 녹인 후에 5분간 기다렸다가, 두 용액을 합치고, 20분 후에 상기 용액을 5x10³의 RAW264.7 세포배양 상층액에 골고루 뿌려넣었다.

3) Transfection된 RAW264.7 세포에 HMGB1 투여 및 luciferase assay

Plasmid를 RAW264.7 세포에 transfection하고 36 시간 뒤에 현미경으로 세포가 제대로 자라고 있는지를 확인한 뒤에, 세포상층액에 HMGB1(500 ng/ml)을 투여하였다. 약 1시간 뒤에 세포상층액을 제거하고 바닥에 남아있는 세포를 Renilla luciferase lysis buffer

를 투여하여 녹인 후에 20 μl의 lysate에 100 μl의 luciferase assay agent를 첨가한 후 luciferase assay machine으로 판독하였다(Figure 2).

통계 처리

결과는 평균±표준편차로 표시하였다. SPSS Windows 11.0 프로그램을 이용하여 ANOVA를 시행하였으며, p값이 0.05 미만인 경우 유의하다고 판단하였다. Post-hoc 분석은 Duncan법과 Tukey법을 이용하였다.

결 과

1. RAW264.7 세포에서 LPS 또는 HMGB1 자극 후에 배양상층액에서 시간 경과에 따른 염증매개 cytokine의 발현

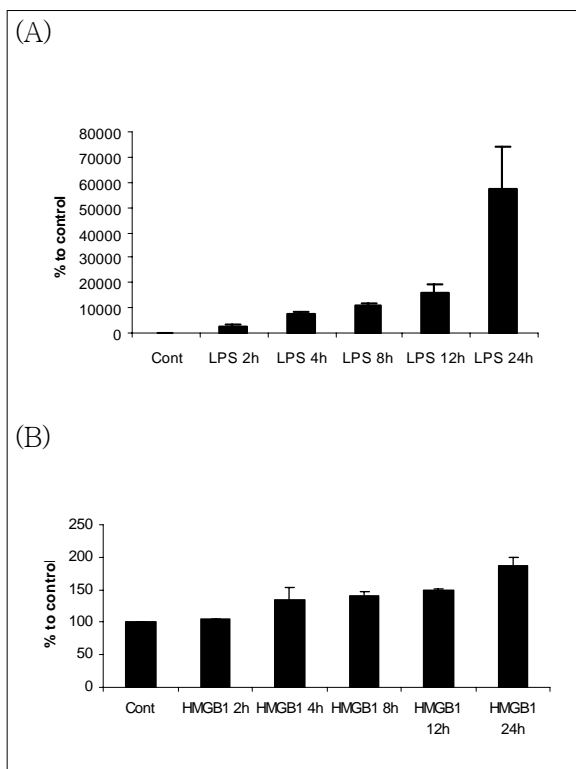


Figure 3. The chronological expression of TNF-α in the supernatant of RAW264.7 cell after stimulation with LPS (100 ng/ml)(A) or HMGB1 (500 ng/ml)(B).

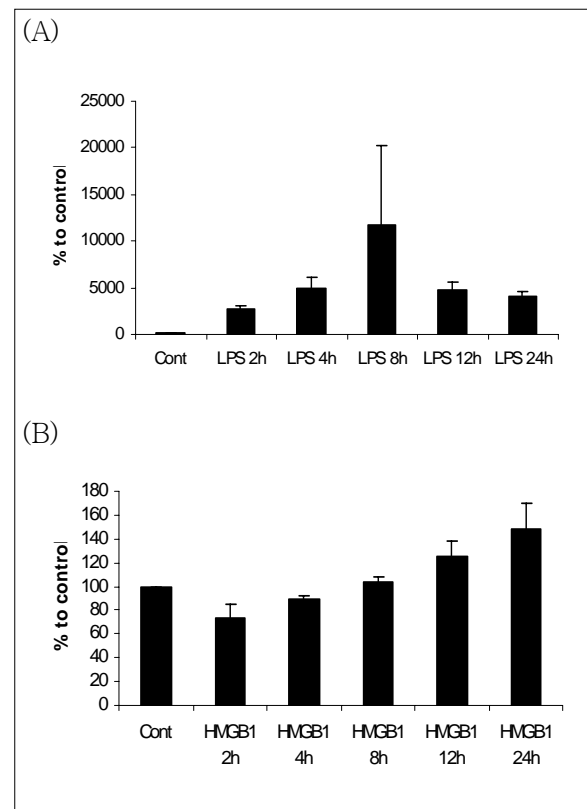


Figure 4. The chronological expression of MIP-2 in the supernatant of RAW264.7 cell after stimulation with LPS (100 ng/ml)(A) or HMGB1 (500 ng/ml)(B).

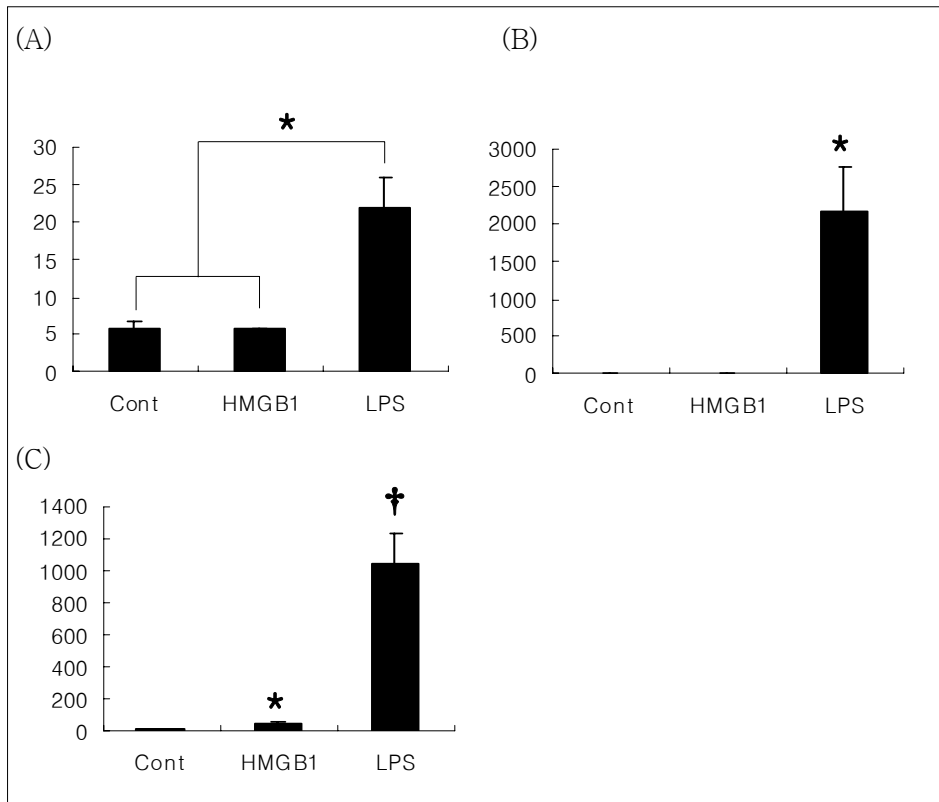


Figure 5. The expression of lung TNF- α (A), MIP-2 (B) and IL-1 β (C) at 24 hour after HMGB1 (2.5 mg/kg) or 4 hour after LPS (5 mg/kg) injection into peritoneum. *p<.05 to control, † p<.05 to HMGB1

RAW264.7세포(10^5 /well)에 LPS(100 ng/ml)를 투여하고, 2, 4, 8, 12, 24시간에 측정된 TNF- α 는 대조군에 비해 시간에 따라 증가하는 경향을 보였으며 24시간째에는 대조군에 비해 $57,161 \pm 16,619\%$ 로 증가하여 최고치에 달하였다(Figure 3A). HMGB1(500 ng/ml) 투여 후 TNF- α 는 대조군에 비해 시간에 따라 증가하는 경향을 보였으며 24시간째에 최고치에 달하였으나 그 수준은 대조치의 $187 \pm 12\%$ 정도로 LPS 자극에 의한 증가와 비교하여 매우 낮은 수준이었다(Figure 3B). LPS 투여 후 MIP-2는 대조군에 비해 시간에 따라 증가하는 경향을 보이다가, 8시간째에 대조군의 $11,780 \pm 8,494\%$ 최고치를 보였으며, 이후 감소하였다(Figure 4A). HMGB1 투여 후 MIP-2는 시간에 따라 증가하는 경향을 보이다가 24시간째에 대조군의 $149 \pm 21\%$ 로 최고치를 나타내었다(Figure 4B). IL-1 β 는 LPS 또는 HMGB1 투여 후 모두에서 측정되지 않았다.

2. LPS 또는 HMGB1의 복강 내 주사 후에 폐의 염증 매개 cytokine의 발현

LPS(5 mg/kg)를 생쥐의 복강 내로 주입하고 24시간 뒤에 측정된 폐의 TNF- α , MIP-2 그리고 IL-1 β 는 대조군에 비해 의미있게 증가하였다(각각 p<.05)(Figure 5 A,B,C). 하지만 HMGB1(2.5 mg/kg)을 생쥐의 복강 내로 주입하고 4시간 뒤에 폐의 IL-1 β 는 소폭 증가하였으나(p<.05), 다른 두 사이토카인에서는 의미있는 증가를 관찰할 수 없었다(Figure 5 A,B,C).

3. LPS 또는 HMGB1의 복강 내 주사 후에 폐의 myeloperoxidase(MPO) assay

LPS(5 mg/kg) 또는 HMGB1(2.5 mg/kg)을 생쥐의 복강 내로 주입하고 각각 4시간 또는 24시간 뒤에 측

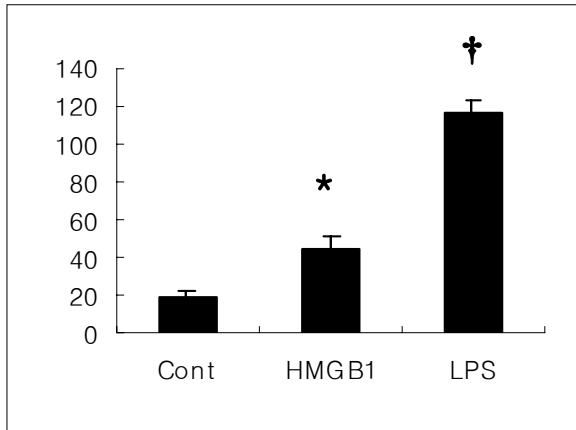


Figure 6. The MPO activity of lung at 24 hour after HMGB1 (2.5 mg/kg) or 4 hour after LPS (5 mg/kg) injection into peritoneum. * $p < .05$ to control, † $p < .05$ to HMGB1

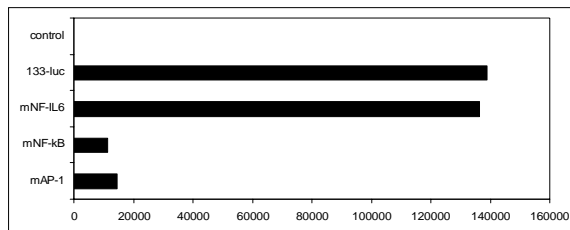


Figure 7. Luciferase activity of control (pIL-6luc), wild type (-133luc), mutant of NF-IL6 (-133 lucmNF-IL6), mutant of NF-κB (-133lucmNF-κB) and mutant of AP-1 (-133lucmAP-1) at one hour after HMGB1 (500 ng/ml) stimulation.

정한 폐의 MPO 활성도는 대조군에 비해 의미있게 증가하였으며, LPS를 투여한 경우는 HMGB1을 투여한 경우에 비해서도 의미있게 높은 MPO 활성도를 나타내었다($p < .05$)(Figure 6).

4. HMGB1 자극 후의 luciferase activity

각각의 plasmid(pIL-6luc control, -133luc, -133 lucmNF-IL6, -133lucmNF-κB, -133lucmAP-1)를 RAW264.7세포에 transfection한 후에 HMGB1(500 ng/ml)으로 자극하고 1시간 뒤에 측정한 luciferase 활성도는 각각 103, 138,790, 136,265, 11,237 그리고 14,510 RLU/well 이었으며, 대조군에 비해 NF-κB 또는 AP-1의 mutant plasmid를 삽입한 경우에

luciferase 활성도가 의미있게 감소하는 것으로 확인되었다(Figure 7).

고찰

패혈증(sepsis)은 미국에서 매년 약 70만명의 환자가 발생하며 이 중 21만명 정도가 사망한다¹⁴. 노령 인구 및 각종 면역결핍 환자의 증가에 따라 패혈증의 발생빈도도 매년 1.5-8% 정도로 계속 상승하고 있다¹⁵. 급성폐손상(acute lung injury)은 패혈증 및 기타질환들 즉 흡인, 다량의 수혈, 흉부 외 손상 등에 의해 발생하는 비심인성폐부종(non-cardiogenic pulmonary edema)이다. 급성폐손상에 의한 사망자 수는 후천성 면역결핍증후군(AIDS), 유방암, 또는 천식 등과 같은 중요 질환의 사망자 수와 비슷하며, 중환자치료 영역에서 중요한 의미를 가지고 있는 질환이다¹⁶.

패혈증 및 급성폐손상에 치료효과가 있는 물질을 개발하고자 하는 노력은 계속되고 있으며, HMGB1은 패혈증의 후기에 분비되면서 패혈증의 예후와 깊은 연관성을 가지고 있기 때문에 특히 관심이 집중되고 있다. 실제로 인간과 생쥐의 급성폐손상에서 혈장 및 폐조직의 HMGB1 발현이 증가하고¹⁷, HMGB1을 생쥐의 기도 내로 투여하면 호중구 침윤, 폐부종, 염증성 cytokine의 증가 등과 같은 전형적인 급성폐손상 소견들이 유발된다¹⁸. 출혈성쇼크에 의해 유발된 급성폐손상에서 혈장 및 폐 내의 HMGB1의 발현이 증가하며, anti-HMGB1 antibody를 투여하면 폐손상이 감소되었다¹⁹. 또한 HMGB1에 대한 길항제(e.g., monoclonal anti-HMGB1 antibody, A-box of HMGB1, ethyl pyruvate) 투여가 패혈증에 치료효과를 발휘하였다^{20,21}. 이런 점에서 HMGB1에 대한 길항제는 패혈증 및 다양한 원인에 의한 급성폐손상에 대한 치료제로 이용될 가능성이 높다.

본 연구에서는 패혈증 등의 전신염증에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 기존에 이미 밝혀진 내독소(LPS)와 패혈증에서의 역할로 인해 새롭게 관심이 커지고 있는 HMGB1의 생체 외 및 생체 내 염증유발효과를 상호 비교하고, HMGB1이 염증을 유발하는 기전을 IL-8의 promoter region을 이용하여 살펴보았

다.

RAW264.7 세포를 이용한 생체 외 실험에서 LPS와 HMGB1은 모두 세포 배양액의 TNF- α 발현을 증가시켰으며, 이러한 효과는 24시간 동안에 시간에 따라 증가하는 경향을 나타내었다(Figure 3). 하지만 LPS는 자극 후 24시간 후의 TNF- α 농도가 기저치에 비해서 600배까지 증가한 반면, HMGB1은 자극 후 24시간 후의 TNF- α 농도가 기저치에 비해 약 2배 정도 증가하는 정도에 불과하였다. 이러한 점에서 HMGB1의 염증유발효과는 LPS에 비해서는 그 강도가 상당히 약한 것으로 판단된다. MIP-2의 발현에 대한 LPS와 HMGB1의 효과를 살펴본 실험에서는 흥미로운 사실이 관찰되었다. LPS 자극 후에 세포배양액의 MIP-2 농도는 8시간째에 최고치에 달한 후에 감소하는 경향을 보인 것에 비하여, HMGB1 자극 후에는 MIP-2 농도가 24시간까지도 계속해서 증가하는 소견을 나타내었다(Figure 3). 이러한 점에서 HMGB1의 자극의 강도는 LPS에 비해 떨어지지만 자극 효과가 상당히 나중까지도 지속되는 것으로 보인다.

생체 외 실험에서 HMGB1의 자극효과가 LPS에 비해 오래 지속된다는 것을 확인하였으며, Abraham 등은 생쥐를 대상으로 한 급성폐손상 실험에서 HMGB1 주입 후 24시간 후에 폐의 사이토카인 농도가 최고치에 이르¹⁸, 내독소(LPS) 투여 후에는 1시간 후에 이미 폐에 염증성 변화가 나타나며 4시간 후에는 이미 충분한 효과가 나타난다고 보고하였다²². 따라서 본 연구에서는 LPS(5 mg/kg) 복강 내 주사 후 4시간째에, 그리고 HMGB1(2.5 mg/kg) 복강 내 주사 후 24시간째에 폐의 염증 반응을 평가하였다. LPS를 복강 내로 주사한 생쥐에서는 대조군에 비해 폐의 TNF- α , MIP-2 그리고 IL-1 β 의 발현이 현저하게 증가하였으나, HMGB1을 주사한 생쥐에서는 IL-1 β 만 다소 증가하였을 뿐 다른 두 사이토카인은 대조군과 차이를 보이지 않았다(Figure 4). 이러한 점에서 생체 외 실험의 결과와 마찬가지로 HMGB1에 의한 생체 내 염증유발 효과는 LPS에 비해 많이 떨어지는 것으로 판단된다. 하지만 폐의 호중구의 침윤을 나타내는 MPO 활성도에 있어서, HMGB1을 투여한 생쥐는 대조군에 비해 높은 값을 나타내었다($p < .05$)(Figure 5). 비록

LPS를 투여한 후의 MPO 활성도보다는 낮지만, HMGB1 투여에 의한 폐의 변화는 염증유발효과보다는 폐로의 호중구 침윤증가 등의 손상효과에 주로 기인하는 것으로 판단된다.

IL-8의 promoter region에 있는 NF-IL6, NF- κ B 그리고 AP-1에 대한 결합부위 각각에 대해 변이를 유발한 plasmid를 RAW264.7 세포에 전이한 후에 HMGB1으로 자극하고 luciferase 활성도를 측정하였을 때, NF- κ B와 AP-1에 대해 변이를 일으킨 경우에 luciferase 활성도가 상당히 감소한다는 사실이 확인되었다(Figure 6). 이상의 사실로 HMGB1에 의한 IL-8의 발현 자극에 있어서 NF- κ B와 AP-1이 중요한 역할을 수행한다는 사실이 확인되었다.

HMGB1은 LPS에 비해서 염증유발효과의 강도는 떨어지나 효과는 더 오래 지속되는 것으로 판단되며, 급성폐손상의 유발기전으로는 폐염증효과보다는 폐손상효과가 더 중요한 것으로 판단된다.

또한 HMGB1에 의한 IL-8의 발현증가에는 NF- κ B와 AP-1 같은 전사인자들이 중요한 역할을 수행하는 것으로 사료된다.

요 약

배 경: HMGB1은 염증반응의 후기에 분비되는 중요한 염증유발물질 중 하나이다. 본 연구에서는 기존에 염증유발물질로 잘 알려진 LPS와 새롭게 염증유발물질로 관심을 받고있는 HMGB1의 염증유발작용을 생체 외 및 생체 내 실험을 통해 비교하고자 하였다. 또한 HMGB1의 자극에 의한 IL-8 promoter region의 활성화에 중요한 역할을 수행하는 전사인자들을 확인하고자 하였다.

방 법: RAW264.7 세포에 LPS(100 ng/ml) 또는 HMGB1(500 ng/ml)을 투여하고 각각 0, 2, 4, 8, 12 그리고 24시간 뒤에 세포상층액의 TNF- α , MIP-2 그리고 IL-1 β 의 농도를 ELISA법으로 측정하였다. 생쥐의 복강에 LPS(5 mg/kg) 또는 HMGB1(2.5 mg/kg)을 주입하여 급성폐손상을 유발한 후에 폐의 사이토카인의 발현과 MPO 활성도를 측정하였다(LPS는 4시간 뒤, HMGB1은 24 시간 뒤). IL-8 promoter 부위에 있

는 NF-IL6, NF-κB 그리고 AP-1에 대한 결합부위에 대해 돌연변이를 일으킨 후에 각각의 돌연변이체를 pIL-6luc에 결합시킨 뒤 RAW264.7 세포에 삽입하였다. 이 세포들을 36시간 배양한 후에 HMGB1(500 ng/ml)으로 자극하고, 한 시간 뒤에 세포를 녹인 후 luciferase 활성도를 측정하였다.

결 과: LPS 투여 후에 RAW264.7 세포 배양상층액의 TNF-α 농도는 24시간 뒤에, MIP-2 농도는 8시간 뒤에 최고치를 보였다. 한편 HMGB1 투여 후에는 TNF-α와 MIP-2 농도 모두 24시간 뒤에 최고치를 나타내었다. LPS 복강 내 투여 후 4시간 뒤에 생쥐의 폐의 TNF-α, MIP-2 그리고 IL-1β의 농도는 대조군에 비해 현저히 증가하였으나, HMGB1 복강 내 투여 후 24시간 뒤에 생쥐의 폐에서는 IL-1β의 농도만 약간 증가하였다. MPO 활성도는 LPS와 HMGB1 투여 후에 모두 증가하였으며, LPS 투여 후가 더 의미 있게 증가하였다. NF-κB 돌연변이체와 AP-1 돌연변이체에서 luciferase 활성도가 의미 있게 감소하였다.

결 론: 이상의 결과를 살펴볼 때 HMGB1은 염증 유발효과는 LPS에 비해 강도가 떨어지나 지속시간은 오래 계속되는 것으로 보이며, HMGB1에 의한 IL-8의 활성화에 NF-κB 뿐만 아니라 AP-1도 중요한 역할을 수행하는 것으로 판단된다.

Acknowledgement

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-041-E00174)

참 고 문 헌

1. Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973; 38:14-9.
2. Ferrari S, Finelli P, Rocchi M, Bianchi ME. The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13. *Genomics* 1996;35:367-71.
3. Hardman CH, Broadhurst RW, Raine ARC, Grasser

- KD, Thomas JO, Laue ED. Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1995;34:16596-607.
4. Mosevitsky MI, Novitskaya VA, Iogannsen MG, Zabezhinsky MA. Tissue specificity of nucleocytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions. *Eur J Biochem* 1989;185:303-10.
5. Landsman D, Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioassays* 1993;15:539-46.
6. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtlander T, Ferrier P, Ferrari S, et al. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycemia in newborn mice. *Nat Genet* 1999; 22:276-80.
7. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285: 248-51.
8. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 2003;22:5551-60.
9. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191-5.
10. Stern D, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1615-25.
11. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptor 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004;279:7370-7.
12. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000;192:565-70.
13. Park JS, Arcaroli J, Yum HK, Yang H, Wang H, Yang KY, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C870-9.
14. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lindicker J, Clemont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
15. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-54.
16. Rubenfeld GD. Epidemiology of acute lung injury. *Crit*

- Care Med 2003;31:S276-84.
17. Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, et al. Contribution of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1310-6.
 18. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung injury. *J Immunol* 2000;165:2950-4.
 19. Kim JY, Park JS, Strassheim D, Douglas I, Diaz del Valle F, Asehnoune K, et al. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288:L958-65.
 20. Yang H, Ochani M, Li JH, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous HMGB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:296-301.
 21. Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 12351-6.
 22. Abraham E, Carmody A, Shenkar R, Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279: L1137-45.
-