

3T3-L1 지방전구세포에서 합토글로빈에 의한 염증성 cytokine 발현 조절

조진경 · 김남훈 · 오미경 · 박선주 · 김인숙*

가톨릭대학교 의과대학 자연과학교실

Received April 4, 2008 / Accepted April 14, 2008

The Effect of Haptoglobin on Expression of Inflammatory Cytokines in 3T3-L1 Preadipocytes.
Jin-Kyung Cho, Nam-Hoon Kim, Mi-Kyung Oh, Seon-Joo Park and In-Sook Kim*. *Department of Natural Sciences, College of Medicine, The Catholic University of Korea* - White adipose tissue is now recognized as an important endocrine organ which secretes various signal factors and proteins termed 'adipokine'. Haptoglobin (Hp), which has been known as an acute phase protein, belongs to the adipokine. However, the function of Hp in adipose tissue remains unclear. To verify the role of Hp in preadipocytes, in this study, 3T3-L1 preadipocyte cells were stably transfected with human Hp gene and Hp-overexpressing cells were made. The Hp had no effect on cell growth of preadipocytes. By RT-PCR and Western blot analysis, the Hp inhibited gene expression of IL-6 and COX-2 and enhanced HO-1 synthesis in preadipocytes. Moreover, invasion assay showed the Hp suppressed migration of monocytes to preadipocytes. These findings suggest that the Hp may inhibit an inflammatory reaction in adipose tissue by regulating the expressions of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators, and by repressing monocytes/macrophages infiltration.

Key words : Haptoglobin, cyclooxygenase-2, interleukin-6, heme oxygenase-1, 3T3-L1 preadipocytes

서 론

백색지방조직(white adipose tissue)은 오랫동안 에너지를 저장하는 기관 정도로 여겨져 왔으나 현재는 다양한 생리활성을 가진 'adipokines'을 분비하는 중요한 내분비 기관으로 주목 받고 있다. 현재 50 가지 이상의 많은 adipokine들이 알려져 있는데, 에너지 균형을 조절하는 leptin, adiponectin 같은 호르몬뿐만 아니라 전통적으로 잘 알려져 있는 cytokines (tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor- β (TGF- β)) 들도 이에 속한다[19]. 뿐만 아니라 급성기반응 단백질(acute phase protein)로 알려진 합토글로빈(haptoglobin), C-반응성 단백질(C-reactive protein), plasminogen activator inhibitor-1 등도 adipokine에 속하는 단백질이다[5,11,16].

합토글로빈은 헤모글로빈과 비가역적인 강한 결합을 하는 혈장단백질로서, 생리적 기능으로는 항산화제(anti-oxidant) 작용이 알려져 있다. 즉, 용혈 시에 적혈구로부터 유리된 헤모글로빈과 결합하여 대식세포의 scavenger receptor (CD163)를 통해 제거됨으로써 헤모글로빈의 과산화작용으로 발생하는 세포손상을 방지한다는 것이다[14]. 최근에는 합토글로빈 자체도 항산화 작용을 한다고 보고된 바 있다[21]. 또한, 합토글로빈은 프로스타글란딘(prostaglandin) 합성을 저해하며 leukocytes에 결합하는 등 항염증 반응에도 관여한다[1]. 합토

글로빈의 유전형 및 혈중농도는 특정 질환의 발병과도 연관성이 있는데 고지혈증 및 동맥경화증이나 당뇨병과는 상관관계가 매우 높다고 보고되었다[23].

합토글로빈은 주로 간에서 합성된 후 혈액 내로 분비되어 전신적으로 작용한다고 알려져 있다[2]. 그러나 여러 연구들에 의해 축적된 결과들은 간 이외의 여러 조직에서도 합토글로빈이 발현되어 국소적으로 특정 작용을 할 것임을 제시하고 있는데[9,12,15,25]. 성숙된 지방세포에서도 합토글로빈 발현이 관찰되었다[19]. 또한, 마른 사람보다 비만인 사람의 혈중 합토글로빈 농도가 더 높다고 보고되고 있다[3,23]. 따라서 비만 시 지방조직에서 합토글로빈이 특정 역할과 기능을 할 것으로 기대되나 이에 대한 연구는 거의 없다.

비만인 상태의 지방조직에는 지방전구세포(preadipocytes), 큰 크기의 지방세포와 함께 대식세포들이 많이 침윤되어 있다[24]. 대식세포들은 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증매개체들을 분비하고 지방전구세포들의 증식을 유도한다[7]. 최근 연구들에 의하면 지방전구세포도 대식세포와 유사한 성질을 가지고 있으며 염증반응에 관여한다[4,20]. 따라서 비만한 상태에서는 TNF- α 나 IL-6의 농도가 증가하게 되고, 이로 인해 인슐린 저항성이 나타나기도 한다[8,10,22]. 이러한 이유로 인해 비만은 만성적 염증상태(chronic low-grade inflammatory state)로 인식되고 있다.

본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포에서의 염증성 cytokine 발현이 합토글로빈에 의해 어떻게 조절되는지를 조사하여, 합토글로빈이 지방조직의 염증반응에 어떤 역할을 하는지를 알아 보고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-2-590-1269, Fax : +82-2-592-7068

E-mail : ikim@catholic.ac.kr

재료 및 방법

세포 배양

Mouse 지방전구세포주인 3T3-L1은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였고, 10% Bovine Calf Serum (BCS) (Gibco, Grand Island, NY)과 100 µg/ml streptomycin이 포함된 DMEM (Gibco) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 80~90% confluent하게 되면 trypsin-EDTA (Gibco)를 처리하여 계대배양 하였다.

MTT assay

3T3-L1 세포를 96 well 배양판에 1×10^3 개로 심은 후, 1일, 2일, 3일에 각각 5 mg/ml 농도의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St. Louis, MO) 용액을 10 µl씩 가하였다. 37°C에서 2시간 반응 후 배지를 제거하고 lysis solution (0.04 M HCl/iso propanol)을 100 µl 가하였다. 10분 후 100 µl 증류수를 가한 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Transfection

합토글로빈 cDNA를 green fluorescent protein (GFP) 유전자를 가지는 retroviral vector에 ligation 시키고 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 Phoenix-Ampho 세포에 transfection 시켰다[17]. 세포 배양액을 모은 다음 3T3-L1 세포에 infection 시킨 후 GFP를 이용하여 transfection된 세포를 sorting하였다(FACSVantage SE; BD, Franklin lakes, NJ).

Western blot

3T3-L1 세포를 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.1% SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride)로 용해시킨 후 10% SDS-polyacrylamide gel 전기 영동한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. 5% skim milk로 blocking한 후 여러 가지 1차 항체(anti-heme oxygenase-1 (HO-1), anti-haptoglobin, anti-cyclooxygenase-2 (COX-2) antibodies: Santa Cruz, Santa Cruz, CA) 및 horseradish peroxidase (Sigma) 가 부착된 2차 항체로 반응시키고 ECL 용액(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다.

RNA추출 및 역전사 증합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)

STAT-60TM (Tel-test, Friendswood, TX)을 이용하여 total

RNA를 추출하고 diethyl pyrocarbonate (Sigma)를 처리한 증류수에 녹여 -70°C에서 보관하였다. M-MLV reverse transcriptase, dNTPs 및 oligo dT₁₈를 이용하여 1 µg의 RNA를 역전사시켜 cDNA를 얻었다. 합성된 cDNA는 아래의 PCR primers (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 증폭시키고 1% agarose gel에서 분석하였다. COX-2 (forward strand, 5'-GCA TTC TTT GCC CAG CAC TT-3'; reverse strand, 5'-AGA CCA GGC ACC AGA CCA AAG A-3'), IL-6 (forward strand, 5'-TTC CAT CCA GTT GCC TTC TTG G-3'; reverse strand, 5'-CIT CAT GTA CTC CAG GTA G-3'), GAPDH (forward strand, 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'; reverse strand, 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3').

Invasion assay

Vector 또는 합토글로빈 유전자가 transfection된 3T3-L1 세포를 Transwell (Corning, Corning, NY)의 아래판에 각각 3×10^4 개로 심고 배양하였다. 12 시간 후, 1×10^5 개의 THP-1 monocytes를 Matrigel (0.5 mg/ml, BD)로 coating된 위판에 가했다. 3T3-L1 세포 쪽으로 이동한 THP-1 세포수를 hematoxylin 염색을 통해 시간 별로 측정하였다.

Zymography

Vector 또는 합토글로빈 유전자가 transfection된 3T3-L1 세포를 35 mm dish에 3×10^5 개로 심고 2일간 배양한 후 배양액을 모았다. 각각의 배양액 15 µl씩을 1% gelatin이 첨가된 8% SDS-PAGE 젤에 전기영동 하였다. 젤을 버퍼A (2.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaCl)에서 3시간 동안 반응시킨 후 버퍼B (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂, 0.02% sodium azide)에 담그고 37°C에서 17 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 젤을 염색용액(0.2% coomassie Brilliant Blue R250, 45% methanol, 10% acetic acid)에 1시간 담근 후 탈색시켜 matrix metalloproteinase (MMP) 활성을 확인하였다.

결 과

지방전구세포의 성장에 미치는 합토글로빈의 효과

비만 시에는 분화된 지방세포의 크기가 크고 지방전구세포의 수가 증가한다[7]. 비만 지방조직에서는 합토글로빈 농도도 증가하기 때문에 합토글로빈이 지방전구세포의 증식에 영향을 미치는지 조사하였다. 3T3-L1 세포에 합토글로빈(0.8 mg/ml)을 가하고 1-3일 동안 배양한 다음, MTT assay를 통해 세포성장을 조사하였다. 동량의 알부민을 가하거나 같은 부피의 PBS를 가한 실험도 병행하여 대조군으로 비교하였다. 그 결과 합토글로빈은 지방전구세포의 증식에 별 영향을

미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 1A). 합토클로빈이 과발현된 세포를 사용한 실험에서도 같은 결과를 보였다(Fig. 1B).

합토클로빈에 의한 염증성 cytokine 발현 조절

합토클로빈은 프로스타글란딘 합성을 저해할 뿐만 아니라 백혈구 활성을 저해하는 등의 항염증 기능을 나타낸다고 보고되었기 때문에[1,14] 지방전구세포의 염증성 cytokines 발현에는 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 합토클로빈 유전자로 transfection시킨 3T3-L1 세포에서 합토클로빈이 잘 발현되고 있음을 확인한 후 IL-6 및 COX-2 mRNA를 RT-PCR 방법으로 측정된 결과, 합토클로빈이 과발현되는 세포에서는 이러한 cytokines 발현이 감소함을 알 수 있었다(Fig 2A).

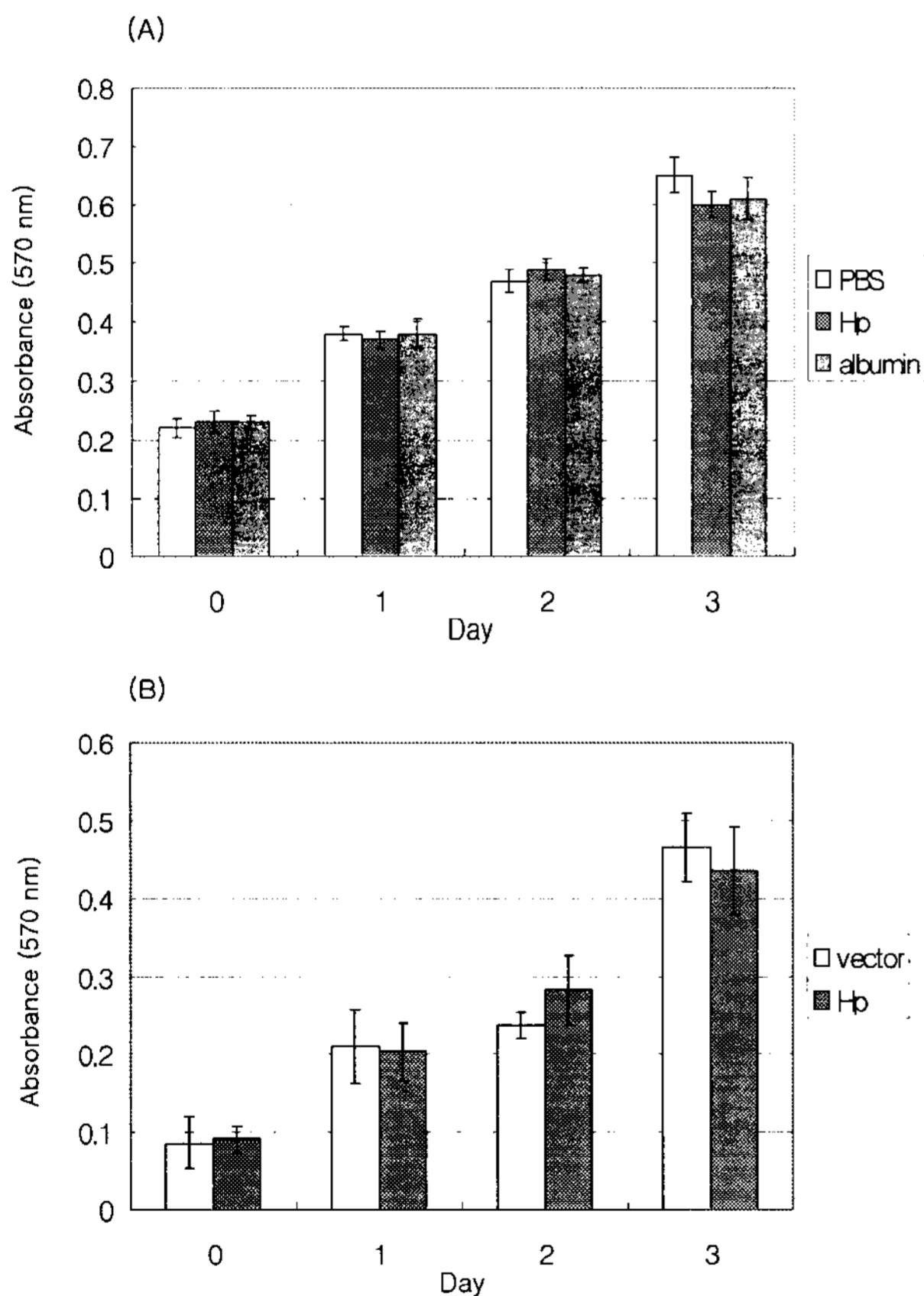


Fig. 1. The effect of haptoglobin (Hp) on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes. (A) 3T3-L1 cells (1×10^3 /well) were plated in a 96 well plate and treated with 100 μ g/ml of Hp or albumin. The same volume of PBS was added in a vehicle control group. (B) The 3T3-L1 cells transfected with vehicle vector DNA (vector) and Hp cDNA (Hp) were plated at a density of 1×10^3 /well in a 96 well plate. After incubation for 1, 2 and 3 days, MTT assay was performed as described in the Material and Methods. The results represent means \pm S.D. of the data in triplicate experiments.

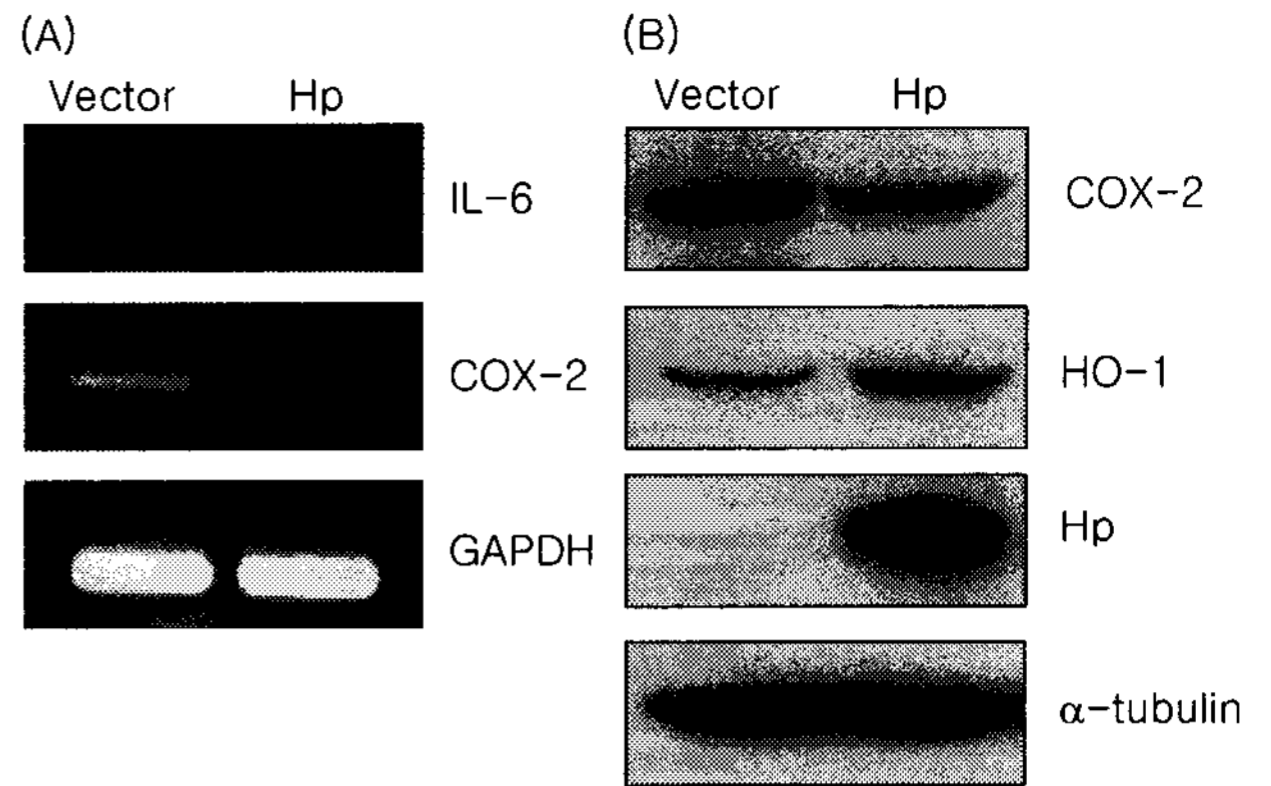


Fig. 2. The regulation of inflammatory cytokine expression by Hp. (A) Total RNAs were extracted from 3T3-L1 cells transfected with vector DNA (vector) and Hp cDNA (Hp), and gene expressions of IL-6, COX-2 and Hp were analyzed by RT-PCR. (B) The cell lysates (70 μ g of protein) were analyzed by Western blot with anti-COX-2, anti-HO-1 and anti-Hp antibodies. Anti- α -tubulin antibody was used to ensure equal protein loading. The result shown here is representative of three independent experiments.

Western blot 실험으로 COX-2 단백질 합성도 역시 저하되어 있음을 확인하였다(Fig. 2B). 반면에 항염증 작용이 있는 HO-1의 합성은 합토클로빈에 의해 증가되었다(Fig. 2B).

합토클로빈에 의한 monocytes 이동 저해

지방조직에서 분비된 염증성 cytokines은 monocytes/macrophages를 지방조직으로 유인하여 지속적인 염증반응을 유도한다[24]. 지방조직에서 합성되는 합토클로빈이 monocytes/macrophages의 침윤에 어떤 영향을 나타내는지 알아보려고 invasion assay를 수행하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 합토클로빈이 합성되는 세포로는 monocytes의 이동이 억제됨을 알 수 있었다.

지방전구세포에서 MMP-2 합성에 미치는 합토클로빈의 효과

합토클로빈이 MMP 발현에도 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 vehicle vector DNA와 합토클로빈 DNA로 각각 transfection시킨 3T3-L1 세포를 2일간 배양한 후 그 배양액으로 zymography를 수행하였다. 그 결과 이 세포는 MMP-2를 발현하고 분비함을 확인할 수 있었으나 합토클로빈은 MMP-2 발현에 영향을 미치지 않았다(Fig. 4).

고 찰

분화된 지방세포에서 합토클로빈이 합성되고 비만 시에 혈중 농도가 증가하는 것으로 보아 지방조직과 세포에서 합토클로빈이 특정 역할을 할 것으로 생각되지만 이에 대한 합

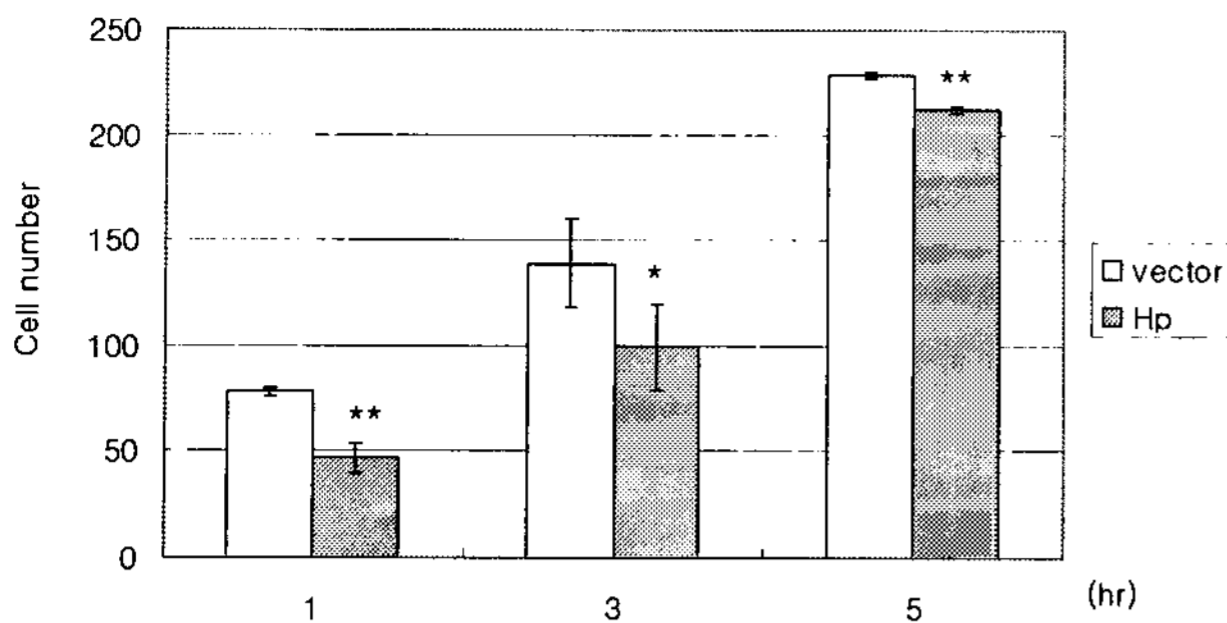


Fig. 3. The inhibitory effect of Hp on invasion of THP-1 monocytes. The invasion assay using transwell was done by the same method described in Material and Methods. The number of migrated cell was counted after hematoxylin staining. The results represent means±S.D. of the data from three separate experiments. ***p*<0.01 compared with vector control group; **p*<0.05 compared with vector control group.



Fig. 4. The effect of Hp on MMP-2 synthesis in preadipocytes. The vector DNA (vector)- and Hp cDNA (Hp)-transfected 3T3 L1 cells were cultured for 2 days. The culture medium was harvested and an aliquot (15 µl) was analyzed by zymography using 8% SDS-polyacrylamide gel containing 1% gelatin.

토클로빈의 작용은 아직 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 사용하여 합토클로빈을 과발현하는 세포를 만들고 염증성 cytokine 발현 조절에 대한 합토클로빈의 효과를 조사하였다. 합토클로빈은 지방전구세포의 증식에는 별 영향을 미치지 않았지만(Fig. 1), pro-inflammatory mediator인 IL-6와 COX-2의 발현을 저해하고 anti-inflammatory mediator인 HO-1의 발현은 증가시켰다(Fig. 2). 또한 합토클로빈은 monocytes의 침윤을 억제하였다(Fig. 3). 이러한 결과들은 지방세포에서 합성되어 분비된 합토클로빈이 지방조직으로의 monocytes/macrophages 침윤을 저해하는 동시에 지방전구세포의 염증반응을 억제시키는 항염증제로 작용할 것임을 시사한다.

비만은 인슐린 저항성(insulin resistance)을 유도하며 2형 당뇨병 유발과 관련된다[20]. 인슐린저항성 유도에는 지방조직에서 분비되는 cytokines 들이 중요하게 작용하는데 특히 TNF-α와 IL-6가 주요한 유도인자로 잘 알려져 있다[8,10,22]. 또한 최근의 흥미있는 연구는 항산화 작용에 관여하는 HO-1과 비만과의 관계를 보고하였는데[13], 마른 쥐에 비해 비만

한 쥐에서 HO-1 활성이 저하되어 있었으며 HO-1 유도제로 HO-1 합성이 증가되었을 때에는 체중증가가 방지되고 혈청 adiponectin level이 증가되면서 반면에 TNF-α와 IL-6 level은 감소한다고 하였다. 이에 따라 인슐린민감성(insulin sensitivity)은 향상되었다. Gonzalez-Ortiz들은 COX-2 저해제인 celecoxib 투여가 인슐린민감성을 증가시킨다고 보고하였다[6]. 따라서 지방조직에서 염증을 유발하며 인슐린저항성을 유도하는 TNF-α나 IL-6, COX-2의 발현 저해기전은 비만 치료뿐만 아니라 인슐린민감성 호전에도 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 지방전구세포에서 합토클로빈이 IL-6와 COX-2 발현을 저하시킴을 보였다. 더구나 HO-1 증가도 동시에 관찰되었다. 이러한 결과는 합토클로빈이 비만 관련 인슐린저항성을 방지하고 인슐린민감성을 향상시키는데 기여할 것으로 생각된다.

비만한 지방조직에는 macrophages가 많이 침윤하게 되고 지방조직내의 지방전구세포와 더불어 pro-inflammatory cytokines을 증가시킨다[18]. 지방세포에서 합성되는 adiponectin은 anti-inflammatory factor로 작용하여 TNF-α와 IL-6 발현을 저해하고 macrophages 침윤을 억제한다[13]. 본 연구 결과에서는 합토클로빈이 이러한 adiponectin과 유사한 작용을 한다는 것을 보였다. 따라서 지방세포에서 합성된 합토클로빈과 adiponectin이 서로 관련성을 가지고 상호작용을 하는지에 대한 후속연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

백색지방조직(white adipose tissue)은 에너지 저장뿐만 아니라 다양한 adipokines을 분비하는 중요한 내분비 기관이다. 급성기반응 단백질로 알려져 있는 합토클로빈(haptoglobin)도 adipokine의 한 종류로서 지방세포에서 합성되고 분비된다. 그러나 adipokine으로서의 기능과 지방조직에서의 역할은 아직까지 규명되지 않았다. 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포를 합토클로빈 유전자로 transfection 시켜 합토클로빈을 과발현하는 세포를 만들고 세포증식, 염증관련 인자들의 발현조절 및 단구세포의 유인성을 조사하였다. 그 결과, 합토클로빈은 3T3-L1 세포의 성장에는 별 영향을 미치지 않았으나 IL-6와 COX-2 발현을 저해하고 HO-1 합성을 증가하였다. 또한 THP-1 단구세포를 이용한 invasion assay에서는 합토클로빈이 단구세포의 이동을 저해하였다. 이러한 결과들은 합토클로빈이 지방조직에서 항염증 반응에 관여함을 시사한다. 만성적 염증상태(chronic low-grade inflammatory state)로 인식되고 있는 비만은 염증관련 인자들에 의한 인슐린저항성이 유도되는 바, 합토클로빈은 비만 관련 인슐린저항성을 방지하고 인슐린민감성을 향상시키는 데에도 기여할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년 가톨릭세포치료사업단 기초과학연구사업 연구비에 의하여 이루어 졌음.

References

- Arredouani, M., P. Matthijs, E. Van Hoeyveld, A. Kasran, H. Baumann, J. L. Ceuppens and E. Stevens. 2003. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* **108**, 144-151.
- Bowman, B. H. 1993. Haptoglobin. In hepatic plasma protein (Bowman BH Ed.) 149, Academic Press, San Diego.
- Chiellini, C., F. Santini, A. Marsili, P. Berti, A. Bertacca, C. Pelosini, G. Scartabelli, E. Pardini, J. López-Soriano, R. Centoni, A. M. Ciccarone, L. Benzi, P. Vitti, S. Del Prato, A. Pinchera and M. Maffei. 2004. Serum haptoglobin: A novel marker of adiposity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2678-2683.
- Cousin, B., O. Munoz, M. Andre, A. M. Fotanilles, C. Dani, J. L. Cousin, P. Laharrague and L. Penicaud. 1999. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J.* **13**, 305-312.
- Friedrichs, W. E., A. L. Navarrijo-Ashbaugh, B. H. Bowman and F. Yang. 1995. Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 250-256.
- Gonzalez-Ortiz, M., E. Martinez-Abundis, B. R. Balcazar-Munoz and J. A. Robles-Cervantes. 2001. Inhibition of cyclooxygenase-1 or -2 on insulin sensitivity in healthy subjects. *Horm. Metab. Res.* **33**, 250-253.
- Gustafson, B., A. Hammarstedt, C. X. Andersson and U. Smith. 2007. Inflamed adipose tissue: A culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2276-2283.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91.
- Kim, I. S., I. H. Lee, J. H. Lee and S. Y. Lee. 2001. Induction of haptoglobin by all-trans retinoic acid in THP-1 human monocytic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 738-742.
- Klover, P. J., A. H. Clementi and R. A. Mooney. 2005. Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* **146**, 3417-3427.
- Kratchmarova, I., D. E. Kalume, B. Blagoev, P. E. Scherer, A. V. Podtelejnikov, H. Molina, P. E. Bickel, J. S. Andersen, M. M. Fernandez, J. Bunkenborg, P. Roepstorff, K. Kristiansen, H. F. Lodish, M. Mann and A. Pandey. 2002. A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol. Cell Proteom.* **1**, 213-222.
- Lee, M. Y., S. Y. Kim, J. S. Choi, I. H. Lee, Y. S. Choi, J. Y. Jin, S. J. Park, K. W. Sung, M. H. Chun, I. S. and I. S. Kim. 2002. Upregulation of haptoglobin in reactive astrocytes after transient forebrain ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 1176-1180.
- Li, M., D. H. Kim, P. L. Tsenovoy, S. J. Peterson, R. Rezzani, L. F. Rodella, W. S. Aronow, S. Ikehara and N. G. Abraham. 2008. Treatment of obese diabetic mice with an heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels and improves insulin sensitivity and glucose tolerances. *Diabetes* 2008. In press.
- Lim, Y. K., A. Jenner, A. B. Ali, Y. Wang, S. I. Hsu, S. M. Chong, H. Baumann, B. Halliwell and S. K. Lim. 2000. Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Kidney International* **58**, 1033-1044.
- Lohr, N. L., D. C. Warltier, W. M. Chilian and D. Weihrauch. 2005. Haptoglobin expression and activity during coronary collateralization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, 1389-1395.
- Mohamed-Ali, V., J. H. Pinkney and S. W. Coppack. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obesity* **22**, 1145-1158.
- Oh, M. K., S. J. Park, N. H. Kim and I. S. Kim. 2007. Protein kinase C-delta stimulates haptoglobin secretion. *J. Biochem. Mol. Biol.* **40**, 130-134.
- Permana, P. A., C. Menge and P. D. Reaven. 2006. macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 507-514.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood. 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Brit. J. Nutr.* **92**, 347-355.
- Trayhurn, P. and J. H. Beattie. 2001. Physiological role of adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* **60**, 329-339.
- Tseng, C. F., C. C. Lin, H. Y. Huang, H. C. Liu and S. J. Mao. 2004. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics* **4**, 2221-2228.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino and G. S. Hotamisligil. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. **389**, 610-614.
- Wassell, J. 2000. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin. Lab.* **46**, 547-552.
- Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796-1808.
- Yang, F., A. J. Ghio, D. C. Herbert, C. A. Walter and Coalson, J. J. 2000. Pulmonary expression of the human haptoglobin gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 277-282.