

CCR Expression of Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF) Neutrophils and Chemotactic Activity of BALF

Eugene Choi¹, Eun Ju Yang², Dong-Hee Kim³, Ji-Sook Lee⁴ and In Sik Kim^{5,†}

¹Department of Respiratory Internal Medicine, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 302-718,

²Department of Clinical Laboratory Science, College of Health and Therapy, Daegu Hanny University, Gyeongsan 712-715, ³Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University,

Daejeon 300-716, ⁴Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University,

Iksan 570-750, ⁵Department of Biomedical Laboratory Science, School of Medicine,

Eulji University, Daejeon 301-746, Korea

Asthma is an inflammatory airway disease and is characterized by the releases of inflammatory mediators including chemokines. They are mainly associated with the recruitment, activation and dysregulation of specific inflammatory cells, especially neutrophils in neutrophilic asthma. CC chemokines bind to CC chemokine receptors (CCRs) in the surface of their target cells. The aims of this study are to examine the CCR expression in neutrophils of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of asthmatic patients and to determine the alternation of migration and apoptosis of neutrophils by the BALF. We demonstrate that CCR3 strongly expresses in BALF neutrophils of asthmatic patients as compared to other CCRs and increases during apoptosis of the BALF neutrophils. The migration of asthmatic blood neutrophils increases in response to asthmatic BALF as compared to BALF of normal volunteer. In addition, asthmatic BALF includes the higher levels of IL-8 protein than normal BALF and it has no effect on apoptosis of asthmatic blood neutrophils. Taken together, our results indicate that CCR3 expression may be associated with unknown function of asthmatic BALF neutrophils and BALF may be involved in the recruitment of neutrophils into the airway, but not in the neutrophils apoptosis.

Key Words: Asthma, Neutrophils, Bronchoalveolar lavage fluid, CC chemokine receptors, Cell migration

천식은 다양한 알러젠에 의해서 기도에 발생하는 만성 염증질환으로 최근까지도 발병률이 증가 추세에 있다 (Braman, 2006; Holgate, 2008). 많은 수의 염증세포가 기도나 기관지로 이동하고 침윤한 세포는 과도한 면역반응의 활성을 유발하여 기도 과민반응 및 점액분비의 증가로 기침, 천명, 호흡곤란 등의 천식증상을 일으킨다 (Busse and Rosenwasser, 2003). 천식질환은 주로 호산구의 작용에 의해 발병하지만, 중증의 천식질환에서는 호중구가 중요한 역할을 한다 (Jatakanon et al., 1999). 정상적인 사람의 혈액에 존재하는 호중구는 다양한 면역 매개물질에 의해 초기 면역반응에 작용하는 세포이지만 짧은 생

존기간을 가지고 있어서 순환하다가 자발적인 세포고사를 통해 제거된다. 자발적인 세포고사는 일정한 세포 수를 유지하면서 체내 면역반응을 조절하는 역할을 한다 (Savill et al., 1989). 그러나 호중구성 천식질환에서는 말초 혈액의 호중구가 세포유주운동을 통하여 폐기관지로 침윤하고, 이동한 호중구가 정상적인 세포고사를 통해 제거되지 않고 지속적으로 축적되면서 다양한 염증반응에 관여하고 염증물질을 분비하면서 증상을 더 악화시키고 결국 조직손상을 일으킨다 (Ordonez et al., 2000; Scheel-Toellner et al., 2004). 특히, 케모카인은 염증세포가 분비하는 화학전달물질로 케모카인 수용체와 반응하여 세포의 유주운동 뿐만 아니라 세포의 생존과 활성, 분화에 작용한다 (Murdoch and Finn, 2000). 그 중 CC 케모카인은 호산구와 Th2 세포 외에 다른 면역세포에 작용하여 천식 발병기전에서 다양하게 관여한다는 연구가 진행되고 있지만 (Romagnani, 2001), 호중구에서는 거의 발현되지 않

*접수일: 2011년 2월 7일 / 수정일: 2011년 3월 15일

채택일: 2011년 3월 20일

†Corresponding author: In Sik Kim, Department of Biomedical Laboratory Science School of Medicine, Eulji University 143-5, Yeungdu-dong, Jung-gu Daejeon 301-746, Korea.

Tel: +82-42-259-1753, Fax: +82-42-259-1759

e-mail: orientree@eulji.ac.kr

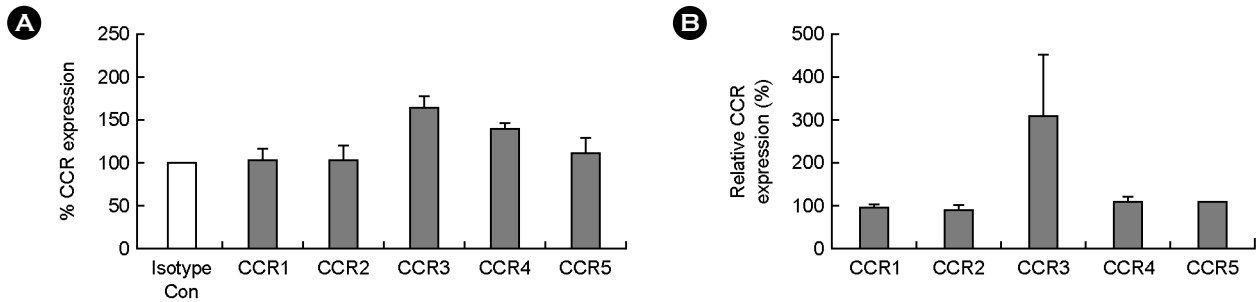


Fig. 1. CCR 3 expression in neutrophils of asthmatic BALF. Neutrophils were isolated from BALF of asthmatic patients (n=2). (A) The CCRs expression on the cells was analyzed by flow cytometry using anti-CCR subtype antibodies at 0 h. Isotype control (Isotype Con) was analyzed by incubating normal mouse IgG. (B) The CCR expression of each receptor at 24 h are presented in relation to the CCR expression at 0 h, which was set at 100%. Data are expressed as the means \pm SD.

아서 CC 케모카인 수용체 및 그와 반응하는 CC 케모카인에 대한 연구는 미미한 실정이다.

이에 본 연구에서는 천식환자의 혈액과 천식 발생 기관인 폐의 세척액에서 각각 호중구를 분리하여 CC 케모카인 수용체의 발현과 폐세척액에 의해 세포유주운동 및 세포고사에 어떠한 변화가 있는지 확인하고자 하였다. 이 연구는 건양대학교 병원의 기관생명윤리심의위원회의 승인 (승인번호 08-44)을 받은 다음 자발적인 참여 동의의사를 가진 정상인과 천식환자에 한해서 실시하였다. 정상인군에는 천식과 같은 알려진 질환뿐만 아니라 다른 질환을 앓고 있지 않은 성인을 대상으로 하였고, 천식환자군은 건양대학교병원에 내원하여 호흡기내과 전문의에 의해 천식질환으로 진단받은 환자를 대상으로 하였다. 폐세척액 채취는 정상인 또는 천식환자의 인·후두 마취 후 기관지 내시경을 통해 기관지 점막과 구조를 관찰하고 생리식염수를 이용하여 폐포를 세척하여 폐세척액을 채취하였다. 채취된 폐세척액은 Ficoll-Hypaque (Amersham phamacia biotechnology, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 과립구층을 분리하였다. 또한 혈액을 채취한 다음 폐세척액과 동일한 방법으로 과립구층을 분리하고, 분리된 과립구층에서 적혈구를 저장성 용액으로 용해시켰다. 폐세척액과 혈액에서 분리한 세포는 CD16 양성 미세구슬 (Miltenyi Biotechnology, Bergisch Gladbach, Germany)을 이용하여 과립구에서 호중구 분리를 실시하였다. CD16은 호중구에 존재하는 세포표면 단백질로 과립구 중에 CD16 미세구슬이 부착된 세포가 호중구이다. 분리된 세포는 각각 10% 소태아혈청, 페니실린 (100 U/ml), 스트렙토마이신 (100 g/ml)을 함유한 RPMI 1640 배지에 3×10^6 cells/ml의 농도로 부유하였다. 각 세포는 트립판 블루 (trypan blue) 염색을 통해 생존율이 90% 이상인 것을

확인하였고, 사이토스핀 (cytospin) 후 Wright 염색을 하여 호중구 순도가 97% 이상임을 관찰하였다. 혈액세포를 이용하여 실험한 모든 결과는 통계적인 유의성을 측정하기 위해 대조군과 정상인군 및 천식환자군의 결과를 Student's *t*-test로 분석하였다. 각 통계 처리의 *P* 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있다고 해석하였다.

CC 케모카인 수용체 1-5는 염증세포들의 면역반응에 주로 작용하는 CC 케모카인과 결합하므로, 본 연구에서도 폐세척액 호중구의 CC 케모카인 수용체 1-5의 발현 정도를 확인하였다. 폐세척액에서 분리한 호중구에 CC 케모카인 수용체 1-5의 항체 (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 각각 부착시킨 다음 fluorescein isothiocyanate (FITC) (Molecular Probes, Eugene, OR)가 부착된 항체와 반응시켜서 FITC가 염색된 세포를 유세포 분석기를 통해 측정하였다. 분리직후의 천식환자의 폐세척액 호중구에서 CC 케모카인 수용체 중 CCR3의 발현이 높게 나타났으며, 다른 CC 케모카인 수용체들은 거의 없거나 아주 약하게 발현되어 있었다 (Fig. 1A). 그러나, 폐세척액 호중구를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에 방치하여 자발적인 세포고사를 유도한 다음 다시 CC 케모카인 수용체의 발현을 확인해보니, 세포고사가 유도된 호중구에서 CC 케모카인 수용체 3의 발현이 급증한 것을 알 수 있었다 (Fig. 1B). CC 케모카인 수용체 3은 호중구보다는 호산구나 호염기구, T 림프구에 발현된 수용체로 케모카인 중 macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)/CCL5, eotaxin/CCL11, leukotactin (Lkn)-1/CCL15와 결합하여 천식질환에서 주로 호산구의 축적 및 활성화에 관여한다 (Murdoch and Finn, 2000; Palmqvist et al., 2007). 그러

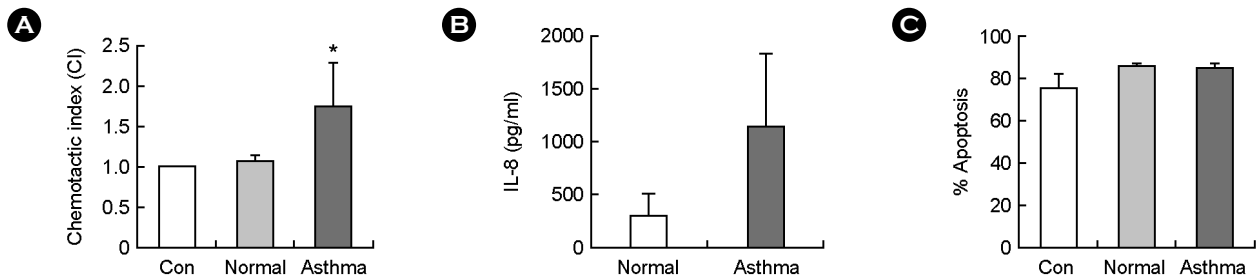


Fig. 2. Migration of asthmatic blood neutrophils in response to asthmatic BALF. Neutrophils were isolated from peripheral blood of asthmatic patients (A and C). (A) Neutrophils (n=12) were applied to BALF of normal volunteers (Normal) and asthmatic patients (Asthma) in a 48-well microchamber and allowed to migrate for 90 m. The cells of two randomly selected fields per well were counted. The chemotactic index (CI) was calculated from the number of cells that migrated to the control. (B) IL-8 levels in BALF of normal volunteers (Normal) and asthmatic patients (Asthma) were analyzed by ELISA. (C) Neutrophils (n=4) were incubated in the absence (con) and the presence of BALF of normal volunteers (Normal) and asthmatic patients (Asthma). The apoptosis of these cells was analyzed by measuring the binding of annexin V-FITC and PI using flow cytometry. The percentage of apoptotic cells in total cell population was included all annexin V binding cells. Data are expressed as the means \pm SD. * $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

나 호산구 이외에도 종양괴사인자 (TNF)- α , granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), 인터페론- γ 를 처리한 호중구에서 CCR1, CCR3, CCR5의 발현이 증가하면서 CC 케모카인에 의해 이동이 증가했다는 보고가 있다 (Bonicchi et al., 1999; Cheng et al., 2001; Montecucco et al., 2008). 이는 호중구성 천식환자에서 폐조직에 분비되어 있는 여러 염증 인자 및 CC 케모카인과 호중구의 CC 케모카인 수용체와 반응하여 세포이동의 증가 및 다른 염증반응이 일어날 수 있다는 것을 보여준다. 본 연구에서도 호중구에서 증가한 CC 케모카인 수용체 3과 천식환자의 폐조직에 분비되어 있는 물질이 천식질환의 발병기전에서 어떤 작용을 하는지 관찰하기 위해 먼저 호중구의 이동을 세포유주운동 실험으로 확인하였다. 세포유주운동은 실험기구인 48 well-미세챔버 (microchamber) (Neuroprobe, Gaithersburg, MD)의 아래쪽에 대조군으로 생리식염수를 넣고 실험군으로 정상인 또는 천식환자의 폐세척액을 둔 다음 5 μ m polycarbonate 막 (Neuroprobe)을 챔버 사이에 넣었다. 막 윗부분에는 천식환자의 혈액에서 분리한 호중구를 올려두어 90분 동안 37°C에서 배양하였다. 배양이 끝나면 막을 통해 이동한 세포를 메탄올로 막과 함께 고정한 다음 헤마톡실린-에오진 (hematoxylin-eosin) 염색을 하여 현미경으로 막에 존재하는 세포 수를 측정하였다. 결과는 대조군에서 이동한 세포 수에 비해 실험군에서 증가한 세포 수 (세포이동지수, chemotactic index)로 표기하였다. 실험 결과, 호중구는 대조군과 정상인의 폐세척액에는 반응을 하지 않았지만 천식환자의 폐세척액 쪽으로 이동이 증가하였다 (Fig. 2A). 호중구는 혈액에서 순환하다가 염증이 생기면 그 부위로 이동하게

되는데, 이때 호중구의 이동에 관여하는 케모카인으로 대표적으로 CXCL8/interleukin (IL)-8 등이 있다 (Holmes et al., 1991). 이 케모카인은 호중구의 CXC 케모카인 수용체 1, 2와 결합하여 작용하는데, Fig. 2A에서 증가한 호중구의 이동이 IL-8에 의한 것인지 확인하기 위해 효소면역법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)를 이용하였다. 정상인과 천식환자의 폐세척액을 OptEIA™ Set IL-8 (BD bioscience, San Diego, CA)을 이용하여 측정된 결과, 정상인은 IL-8의 발현량이 248.5 \pm 232.7 pg/ml에 비해 천식환자는 1193.1 \pm 698.2 pg/ml의 높은 발현을 보였다 (Fig. 2B). 그러나 IL-8은 적어도 5~10 ng/ml 이상의 농도가 있어야 호중구의 세포유주운동을 일으킬 수 있다는 연구가 있다 (Culpitt et al., 2002). 이 결과는 호중구의 이동이 IL-8의 작용뿐만이 아닌 폐세척액에 발현되어 있는 다른 케모카인에 의해 증가했을 가능성을 보여준다. 만성 폐쇄성 폐질환 환자에서도 폐세척액에 존재하는 호중구는 eotaxin/CCL11에 의해 호중구의 이동이 증가하고, 이때 호중구에 eotaxin/CCL11과 결합하는 CC 케모카인 수용체 3의 발현이 증가되어 있는 것을 확인한 바가 있다 (Hartl et al., 2008). Lkn-1/CCL15도 CC 케모카인 수용체 1과 3에 결합하는 것으로 염증 시 증가하여 호중구, 단구, 림프구의 이동을 촉진한다 (Youn et al., 1997). 선행 연구에서도 정상인의 말초혈액 호중구를 분리하여 Lkn-1에 의한 세포유주운동의 증가를 본 적이 있다 (Lee et al., 2006). 본 연구에서도 Fig. 1과 Fig. 2B에서 나타난 바와 같이, 천식환자의 폐세척액에 존재하는 호중구에서 CC 케모카인 수용체 3의 발현이 높은 것과 호중구의 이동 증가와 관련이 있을 지도 모른다. 한편, IL-8은 호중구에

작용하여 세포유주운동 이외에도 세포고사를 억제하는데 효과가 있다고 알려져 있는 것처럼 (Sampson, 2000), 케모카인은 세포의 이동에 관여하는 것 이외에도 세포의 활성 및 생존에 관여하므로 천식환자의 폐세척액이 세포고사의 조절에 관여하는지 확인해 보았다. 세포고사 측정을 위해 혈액에서 분리한 호중구에 정상인 또는 천식환자의 폐세척액을 처리하여 24시간 동안 배양한 다음 세포부유액에 annexin V-FITC와 propidium iodide (PI) (BD bioscience)를 첨가하여 실온에서 15분간 방치한 후 염색된 세포는 유세포 분석기를 통해 측정하였다. Annexin V-FITC가 염색된 모든 세포를 세포고사가 일어난 세포로 정의하고 각 샘플당 총 10,000개의 세포를 분석하였다. 그러나, 정상인 뿐만 아니라 천식환자의 폐세척액도 호중구의 세포고사에 영향을 주지 못했다 (Fig. 2C).

이를 통해 천식환자의 폐조직에는 호중구의 이동을 일으키는 물질이 존재하고 이동한 호중구에는 CC 케모카인 수용체 3의 발현이 증가되어 있음을 확인하였지만, 좀 더 명확한 천식 발병기전 규명 및 분류를 위해 앞으로 호중구성 천식과 호산구성 천식질환의 폐조직 내에 존재하는 호중구의 CC 케모카인 수용체를 명확하게 비교 분석하고 케모카인에 대한 호중구의 유주운동을 확인할 필요가 있다. 이러한 연구가 지속적으로 진행된다면 천식질환을 세부적으로 분류하고 그로 인해 좀 더 효율적인 치료방법을 파악하는데 기여할 것으로 기대된다.

Acknowledgement

본 연구는 지식경제부 지정 대전대학교 난치성면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

REFERENCES

- Bonecchi R, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Bernasconi S, Locati M, Power C, Proudfoot A, Wells TNC, Mackay C. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN- γ in human neutrophils. *J Immunol.* 1999. 162: 474-479.
- Braman SS. The global burden of asthma. *Chest* 2006. 130: 4S-12S.
- Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003. 111: S799-S804.
- Cheng SS, Lai JJ, Lukacs NW, Kunkel SL. Granulocyte macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils. *J Immunol.* 2001. 166: 1178-1184.
- Culpitt SV, de Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices and neutrophilic in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002. 165: 1371-1376.
- Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, Hordijk PL, Kuijpers TW, Hoffmann F, Hector A, Eber E, Marcos V, Bittmann I, Eickelberg O, Griese M, Roos D. Infiltrated neutrophils Acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases. *J Immunol.* 2008. 181: 8053-8067.
- Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008. 38: 872-897.
- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 1991. 253: 1278-1280.
- Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999. 160: 1532-1539.
- Lee JS, Yang EJ, Ryang YS, Kim IS. Chemotactic effect of leukotactin-1/CCL15 on human neutrophils. *J Exp Biomed Sci.* 2006. 12: 145-151.
- Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, Mach F, Dallegri F, Ottonello L. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1 α) on human neutrophils through defined signaling pathways. *Cell Signal.* 2008. 20: 557-568.
- Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000. 95: 3032-3043.
- Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000. 161: 1185-1190.
- Palmqvist C, Wardlaw AJ, Pradding P. Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *Br J Pharmacol.* 2007. 151: 725-736.
- Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol.* 2001. 38: 881-885.
- Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000. 30(Sup 1): 22-27.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in

inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophage. *J Clin Invest.* 1989. 83: 865-875.

Scheel-Toellner D, Wang KQ, Webb PR, Wong SH, Craddock R, Assi LK, Salmon M, Lord JM. Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2004. 32: 461-464.

Youn BS, Zhang SM, Lee EK, Park DH, Broxmeyer HE, Murphy PM, Locati M, Pease JE, Kim KK, Antol K, Kwon BS. Molecular cloning of leukotactin-1: a novel human beta-chemokine, a chemoattractant for neutrophils, monocytes, and lymphocytes, and a potent agonist at CC chemokine receptors 1 and 3. *J Immunol.* 1997. 59: 5201-5205.
