

# Ghrelin Attenuates Dexamethasone-induced T-cell Apoptosis by Suppression of the Glucocorticoid Receptor

Jun Ho Lee

Department of Biochemistry and Division of Brain Korea 21 plus Program for Biomedical Science, Korea University College of Medicine, Seoul 136-701, Korea

Received November 12, 2014 / Revised December 19, 2014 / Accepted December 19, 2014

Ghrelin is a 28 amino acid orexigenic peptide hormone that is secreted predominantly by tX/A cells in the stomach, and it plays a major role in energy homeostasis. Activated ghrelin has an n-octanoyl group covalently linked to the hydroxyl group of the Ser3 residue, which is critical for its binding to the G-protein coupled growth hormone secretagogue receptor-1a (GHS-R1a). According to recent reports, both ghrelin and its receptor, GHS-R1a, are expressed by a variety of immune cells, including T- and B-lymphocytes, monocytes, and dendritic cells, and ghrelin stimulation of leukocytes provides a potent immunomodulatory signal controlling systemic and age-associated inflammation and thymic involution. Here, we report that ghrelin protected murine thymocytes from dexamethasone (DEX)-induced cell death both *in vivo* and *in vitro*. Subsequently, we explored the molecular mechanisms of the antiapoptotic effect of ghrelin. According to our experiments, ghrelin inhibited the expression of proapoptotic proteins via the regulation of glucocorticoid receptor (GR) phosphorylation. As a result, ghrelin inhibited the proapoptotic activation of proteins, such as Caspase-3, PARP, and Bim. These data suggest that ghrelin, through GHS-R, inhibits the pathway to apoptosis by regulation of the proapoptotic protein activation signal pathway. They provide evidence that blocking apoptosis is an essential function of ghrelin during the development of thymocytes.

**Key words** : Anti-apoptosis, dexamethasone, ghrelin, glucocorticoid receptor, thymus

## 서 론

흉선(Thymus)은 혈액 속에 있는 백혈구의 일종인 T-림프구의 성숙에 관계되는 림프조직의 일부로 세포 매개 면역(cell-mediated immunity) 기능의 발달과 성숙을 담당하는 중요한 면역기관이다[4]. 하지만 이러한 흉선 및 흉선세포(Thymocyte)들은 세균 등으로부터의 감염이나, 면역 억제제, 방사선 치료 등에 민감하여 성숙단계에서 세포사멸(apoptosis)을 초래할 수 있으며[1, 3, 6], 뿐만 아니라 노화, 불안감(anxiety), 영양실조, 아편금단(opiate withdrawal), 임신 및 알코올 중독[6, 25, 26], 또는 부신피질자극 호르몬(adrenocorticotropic hormone, ACTH)의 자극에 반응하여 Glucocorticoids (GCs)를 생성할 때 나타나는 스트레스 반응에 의해 발생하기도 한다[9, 12, 23]. GCs는 흉선 세포와 림프구(lymphocyte) 세포사멸에 중요한 조절물질로 알려져 있는데[9, 12], 흉선에서뿐만 아니라 시상 하부-뇌하수체-부신 축(HPA; hypothal-

amus-pituitary-adrenal axis)에서 이루어지는 GCs생성은 염증이 노화와 같은 다양한 자극에 반응하여 발생된다[6, 13].

합성 Glucocorticoid 약물인 덱사메타손(Dexamethasone; DEX)은 안구, 피부 및 관절부위 등의 염증성 장애 및 악성 종양의 치료, 또는 장기 골수 이식에서 면역 기능을 억제시키기 위한 치료제이며[18], 흉선에서의 DEX에 대한 보고는 T 세포의 성숙이나 세포주기 및 세포활성과 관련하여 다양한 신호전달기전을 규명하면서 이해되기 시작하였다[6, 13, 18].

28개의 아미노산으로 이루어져 있는 그렐린(Ghrelin)은 위 기저부의 X/A-유사 신경내분비 세포에서 주로 합성 분비되는 물질로 음식의 섭취나 비만, 에너지 항상성 등을 조절하는 역할을 한다[19]. 이러한 그렐린의 생체 내 활성화는 기본 골격사슬의 세 번째에 위치하는 serine기(Ser3)에 n-octanoyl group이 붙어있어, 그렐린의 수용체인 G-protein coupled growth hormone secretagogue receptor-1a (GHS-R1a)와 결합함으로써 일어나는데[16], 최근 연구된 보고들에 의하면, 이러한 GHS-R1a가 leukocyte를 비롯하여 T 세포, 단핵구(monocytes), 대식세포 및 수지상세포(dendritic cells)와 같은 여러 면역세포들에게서 발현하고 있으며, 자체적으로 그렐린을 생산하고 분비하고 있다[2, 7, 14, 20]. 이렇게 면역세포에서 분비되는 그렐린은 염증 반응에 있어 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)의 생산 및 분비를 조절하여 급성 및 만성 염증 상태를 완화시킬 수 있으며, 흉선 및 흉선세포의 발달 중요한

### \*Corresponding author

Tel : +82-2-920-6251, Fax : +82-2-920-6252

E-mail : immunojun@korea.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

역할을 한다[1, 7, 11, 14, 24]. 하지만 이러한 연구에도 불구하고, 아직까지 면역세포에서 그렐린의 역할이 명확하게 밝혀지지 않고 있으며, 특히 T 세포의 증식 및 활성화에 대한 연구는 부분적으로만 보고되어 있을 뿐이다. 이에 본 연구에서는 DEX에 의해 유도되는 흉선세포의 세포사멸에 있어 그렐린의 세포사멸 억제기전, 즉 Caspase-3, PARP 및 Bim 등을 조사하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

본 연구에 사용된 실험 동물은 생후 5 주령의 수컷 C57BL/6 생쥐로 오리엔트 바이오(Gyeonggi, Korea) 로부터 공급 받아 일반식으로 1주일간의 적응 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험동물 사육실은 온도 22±3℃, 습도 50±5%로 유지시켰으며, 12시간 light-dark cycle로 조정된 동물실험실에서 각 그룹당 5마리씩으로 나누어 사육하였다. 모든 동물실험은 고려대학교 동물실험윤리위원회의 승인(KUIACUC-20130624-1)을 받은 후에 수행하였다.

### 실험군의 처리 및 흉선세포(Thymocyte) 분리

생후 6주차 수컷 C57BL/6 생쥐를 5마리씩 4개의 군으로 나누어 실험에 사용하였다. 그렐린(Genscript, NJ, USA)의 처리는 덱사메타손(DEX; Sigma, MO, USA)으로 자극하기 전날과 자극 당일 각 마리당 100 µg/kg의 농도로 2회 복강주사(i.p.)하였고, DEX는 각 마리당 1.0 mg씩 18시간 동안 어깨 돌기 사이인 경배부에 피하주사(s.c.) 하였다. 다음 날 CO<sub>2</sub>가스로 안락사 시킨 후 흉선(thymus)을 적출하여 2% FBS RPMI 1640 배지로 세척한 뒤 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 세포 현탁액은 70 µm Cell strainer (SPL Life Sciences, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 불필요한 조직들을 제거한 후 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 분리시켰다. 분리된 세포는 ACK buffer (154.95 mM NH<sub>4</sub>Cl, 9.99 mM KHCO<sub>3</sub>, 99.5 µM Disodium EDTA·2H<sub>2</sub>O)로 적혈구를 제거시킨 다음 2% FBS RPMI 1640 배지로 세척한 뒤에 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 (10 µM/l HEPES, 2 mM/l L-glutamine, 50 µM/l 2-ME, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 첨가) 배지에 부유시켰다.

조직 염색을 위한 흉선조직시료를 만들기 위해, 앞서 언급한 방법으로 자극 및 안락사 시킨 생쥐를 왼쪽 심실과 오른쪽 심방귀를 절개한 후 10 cc 주사기로 0.9% 생리식염수를 흘려 체내 혈액을 제거해 주고 10% formalin 용액으로 관류 고정하였다. 이 후 흉선을 떼내어 10% formalin 용액에 넣어 하루 동안 고정시킨 후, ethanol 탈수과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하였다.

### 흉선세포사멸(Apoptosis) 측정

Paraffin에 포매된 조직을 절편기(Leica, Austria)를 사용하여 5 µm 두께의 절편을 Superfrost plus (Fisher Scientific, USA) 슬라이드에 부착시켜 건조시킨 후, TUNEL과 Caspase-3 조직염색을 실시하였다.

### TUNEL 염색

Xylene과 ethanol로 paraffin을 제거시킨 조직을 PBS로 충분히 세척해준 후, In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, PA, USA)에 제공된 방법대로 TUNEL 반응을 시킨 후, mounting solution으로 봉인한 다음 형광현미경(Zeiss Axioplan fluorescence microscope, Jena, Germany)으로 관찰하였으며, 결과는 MCID core 7.0 (InterFocus Imaging Ltd, Linton, UK)으로 분석하였다.

### 면역조직화학염색(Immunohistochemistry; IHC)

흉선조직에 있는 paraffin을 Xylene으로 제거시킨 후, Ethanol로 재수화시켜 PBS로 3분씩 3회 세척하였다. 내인성 과산화효소 활성을 억제하기 위하여 실온에서 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유한 PBS에 20분 동안 처리한 후, 항원에 있는 항체결합부위(epitope)를 노출시켜주기 위해 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에 담귀 10분 동안 전자레인지(650 W, 강)를 이용해 끓여주었다. 그 후 Blocking solution (2% skim milk + 2% BSA in PBS)을 이용하여 상온에서 30분 동안 blocking 과정을 수행한 다음 cleaved Caspase-3 (Cell Signaling Tech., MA, USA) 항체를 0.01% Triton X-100가 섞여있는 Blocking solution에 희석시켜 4℃에서 밤새 반응시켰다. 다음 날 VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Labs, CA, USA)을 이용하여 이차항체와 HRP를 부착시킨 후, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) Substrate Kit (Vector Labs)을 사용하여 염색을 진행하였다. Mayer's hematoxylin (Sigma)으로 대조 염색 후 증류수에 세척하고 Ethanol과 Xylene으로 탈수 과정을 거친 다음 Permount™ (Fisher Scientific, USA) 용액으로 봉입하여 현미경으로 관찰하였으며, 결과는 MCID core 7.0으로 분석하였다.

### 유세포 분석(Flow Cytometry)

유세포 분석기(Flow Cytometry)를 이용한 Annexin V-FITC 염색을 통해 세포사멸의 변화여부를 확인하였다. 먼저 흉선으로부터 분리한 세포를 10% FBS가 녹아있는 RPMI 1640 배지에 5.0 × 10<sup>5</sup>씩 24 well plate에 분주하여 3시간 동안 37℃ CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양시킨 후, 100 nM 그렐린을 첨가하고 1시간 동안 배양한 후 주어진 시간 동안 DEX로 자극하였다. FACS buffer (2%FBS, 0.02% Sodium Azide in PBS)로 세척한 흉선세포를 Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche)에서 제공하는 Annexin V-FITC와 PI항체로 염색한 다음 BD FACSCanto™ II (BD biosciences; CA, USA)로 분석하였다. 결과 분석은 FlowJo software (Version 7.6.4; OR, USA)을 사

용하였다.

### 단백질 분리 및 Western blot 분석

단백질 추출을 위해 세포를 차가운 PBS (pH 7.4)로 1회 세척한 후, protease inhibitor와 phosphatase inhibitor가 첨가된 RIPA buffer (Sigma, MO, USA)로 cell을 lysis시킨 후, Bradford protein assay kit (Bio-rad, CA, USA)을 사용하여 595 nm 흡광도에서 단백질을 정량하였다. 모든 단백질시료는 12% PAGE gel에 50 µg씩 정량하여 전기영동을 실시하였고, 이후 0.2 µm PVDF membrane (EMD Millipore, MA, USA)으로 transfer를 진행하였다. 단백질들이 옮겨진 membrane을 5% BSA 또는 5% Skim Milk로 1시간 동안 blocking한 후, 1차 항체를 넣고 4°C에서 밤새 반응시켰다. 다음 날 TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 3번 씻어준 다음 HRP가 붙어있는 2차 항체를 넣고 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이러한 과정을 거친 PVDF membrane은 ECL (Luminata™ Crescendo, EMD Millipore)을 도말한 후, X-ray film에 감광시켜 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

### Real-Time PCR

세포 내 Total RNA는 Trizol® reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출과정을 간략히 기술하면, 먼저 PBS로 1회 세척한 세포에 1 ml Trizol을 넣고 5분간 반응시킨 후, 200 µl Chloroform을 넣고 4°C, 12,000× g에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 분리한 다음 동일한 양의 iso-propanol을 넣어 4°C, 12,000× g에서 10분간 원심분리를 통해 얻은 RNA pellet을 70% ethanol로 7,500x g로 5분씩 두 번 세척한 후 0.1% DEPC가 처리된 증류수에 녹여 total RNA를 얻었다. 이렇게 추출된 RNA는 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, PA, USA)을 사용하여 cDNA를 합성한 다음, Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific)로 7500 Real-time Thermal Cycler (Applied Biosystems, IL, USA)을 사용하여 유전자를 증폭시켰다. cDNA의 반응량은 18S rRNA를 가지고 비교하였으며, ddCT값을 계산하여 상대정량 분석하였다. 사용한 primer는 다음과 같다. Bim-LE (f): GGT CCT CCA GTG GGT ATT TCT C; Bim-L (f): GAA CCG CAA GAC AGG AGC CC; Bim-S (f): AGA ACC GCA AGC TTC CAT ACG AC; Bim (r): TAA GTT TCG TTG AAC TCG TCT CC; 18S (f): AGA AAC GGC TAC CAC ATC CAA; 18S (r): CCT GTA TTG TTA TTT TTC GTC ACT ACC T.

### 통계처리

본 실험결과의 통계처리는 SigmaStat® (Version 3.5; Systat Software Inc., CA, USA) 프로그램을 이용하여 계산하였다. 각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻은 후

각각의 시료농도에 대해 mean ± s.e.m으로 나타내었으며, 통계적 유의성은 Student's t-test를 이용하여  $p < 0.05$  이하를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 그렐린(Ghrelin)의 흉선 내 세포사멸(Apoptosis)의 저해 효과

그렐린(ghrelin) 투여군에서 텍사메타손(DEX) 으로 유도된 흉선 내 세포사멸의 억제효과를 알아보기 위해 생쥐에 100 µg/kg 농도로 그렐린과 1.0 mg의 DEX를 처리한 후 paraffin 조직을 만들어 TUNLE 염색을 통해 확인하였다. 생쥐의 흉선에서 DEX 단독 처리군(442.4±40.4 cells)과 비교하여 그렐린을 함께 처리한 군(160.8 ± 12.1 cells)에서 흉선세포의 세포사멸 저해효과를 확인할 수 있었으며(Fig. 1A and B), 흉선의 무게 역시 DEX 단독 처리한 경우와 그렐린을 함께 처리한 경우 각각 21.9±0.9 mg과 26.6±0.5 mg으로 나타나 DEX에 의한 흉선의 위축(Thymic atrophy)이 그렐린에 의해 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

Caspase-3의 활성화는 세포사멸과정이 진행에 있어 중추적인 역할을 하는 단백질이다 [5]. 이러한 Caspase-3 활성화에 그렐린이 미치는 영향을 알아보기 위해 DEX로 자극한 흉선조직의 단백질 발현변화를 확인하였는데, Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 그렐린을 함께 처리한 군에서 Caspase-3의 단편이 DEX를 단독으로 처리하여 세포사멸을 유도한 그룹에 비해 유의성 있게 감소하고 있음을 알 수 있었으며, 뿐만 아니라 Caspase-3에 의해 절단되어 활성화되는 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 역시 그렐린에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A and B). 또한 Fig. 2C에서 보는 바와 같이, cleaved Caspase-3 항체로 조직염색 한 결과에서도 그렐린이 Caspase-3 단백질의 절단을 유의성 있게 억제함을 알 수 있었다(Fig. 2C and D).

### DEX에 의해 유도된 흉선세포(Thymocyte)의 사멸에 미치는 그렐린의 세포사멸 억제효과

DEX에 의한 세포사멸과정에서 그렐린이 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 흉선으로부터 흉선세포(thymocyte)를 분리하여 실험을 진행하였다. 우선 DEX에 의한 세포사멸 실험조건을 설정하기 위해 자극시간과 적정 농도를 측정하여 10 nM의 농도로 6시간 동안 세포사멸을 유도하기로 설정하였다(Fig. 3A). 세포에 Annexin V-FITC와 PI 염색을 한 다음 유세포 분석기를 이용하여 세포사멸을 측정할 결과, DEX단독 처리의 경우 각각 전체 세포의 38.2±2.3%가 그렐린과 함께 처리한 경우 27.6±1.1%가 항체와 결합 함으로써 DEX에 의한 세포사멸이 그렐린에 의해 유의성 있게 억제되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B and C).

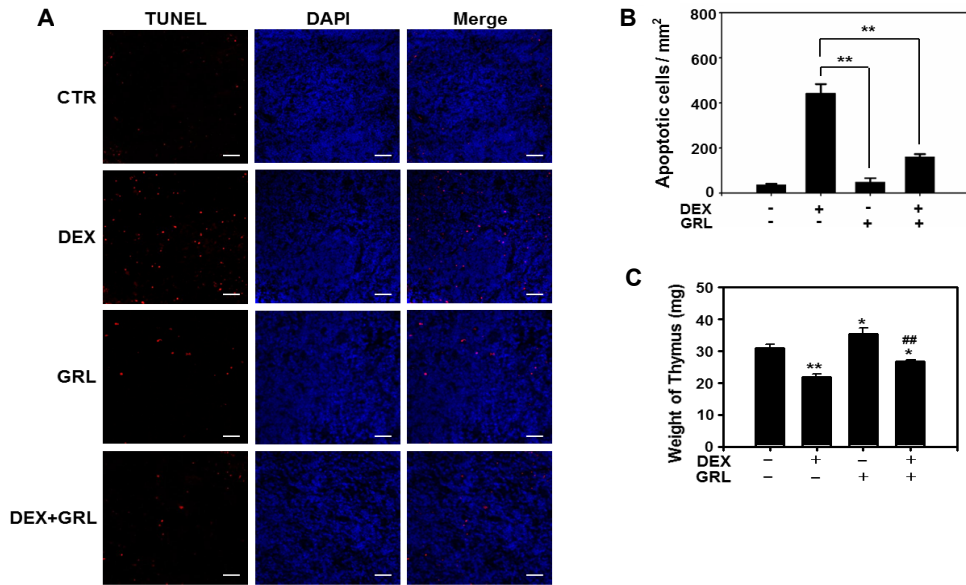


Fig. 1. Protection of apoptosis by Ghrelin as revealed by TUNEL assay. (A) C57BL/6 mice were injected with ghrelin at 100 µg/kg over a 18 hr time period in the presence or absence of DEX. TUNEL staining (red) and staining with DAPI (blue) indicate undergoing apoptotic cell death. (B) Quantity of TUNEL positive cells. The number of TUNEL positive cells was significantly reduced in ghrelin-treated group than in DEX alone group. (C) The weight of the thymus also decreased in ghrelin-treated group. The results are presented as the means ± standard error of the mean (S.E.M). \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  compared to corresponding value for none-treated control mice; ## $p < 0.01$  compared to corresponding value for DEX-treated mice. Scale bars = 100 µm.

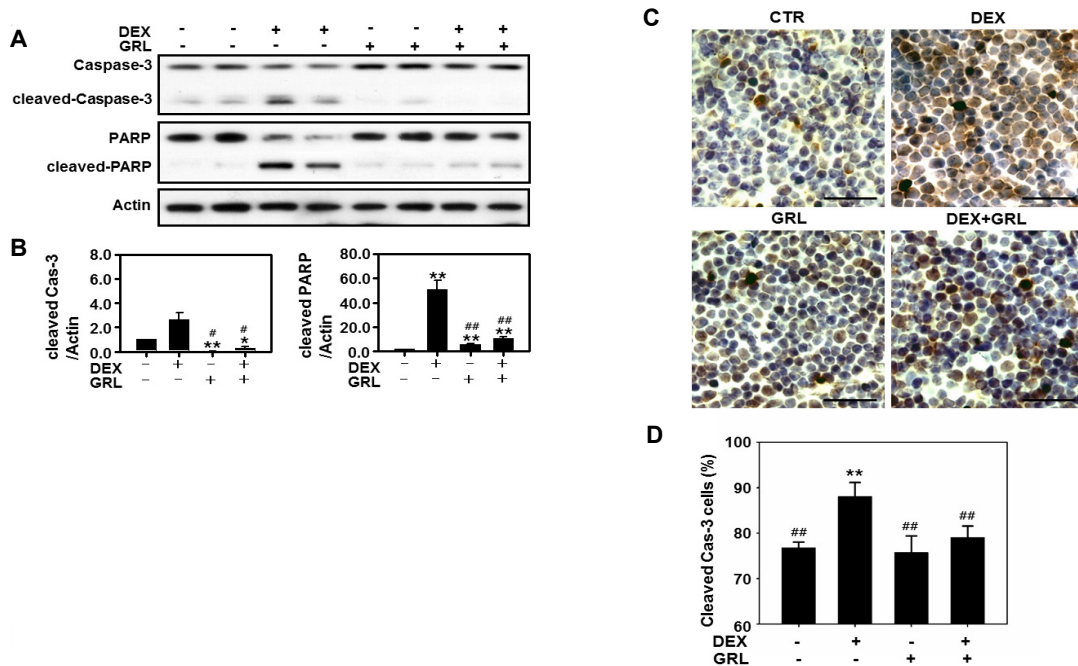


Fig. 2. The inhibitory effect of ghrelin on DEX-induced apoptosis in mice as demonstrated by western blot and Immunohistochemical analysis. (A) Mice were injected with ghrelin at 100 µg/kg over a 18 hr time period in the presence or absence of dexamethasone after which the thymi were lysed and extracted proteins were examined by Western blot analysis using antibodies specific for caspase-3 and PARP. (B) The percentage of cleaved-Caspase-3 and -PARP expression as calculated by Densitometric analysis. The density of each band was measured by Multi Gauge V3.1 software (Fujifilm, Tokyo, Japan) and used to calculate the increased fold based on β-actin. (C) Immunohistochemical analysis was performed using a polyclonal anti-cleaved Caspase-3 antibody in thymus. (D) Percentage of cleaved-Caspase-3 positive cells (n=5 for each group). The results are presented as the means ± S.E.M. \*\* $p < 0.01$  compared to corresponding value for untreated control mice; ## $p < 0.01$  compared to corresponding value for DEX-treated mice. Scale bars = 20 µm.

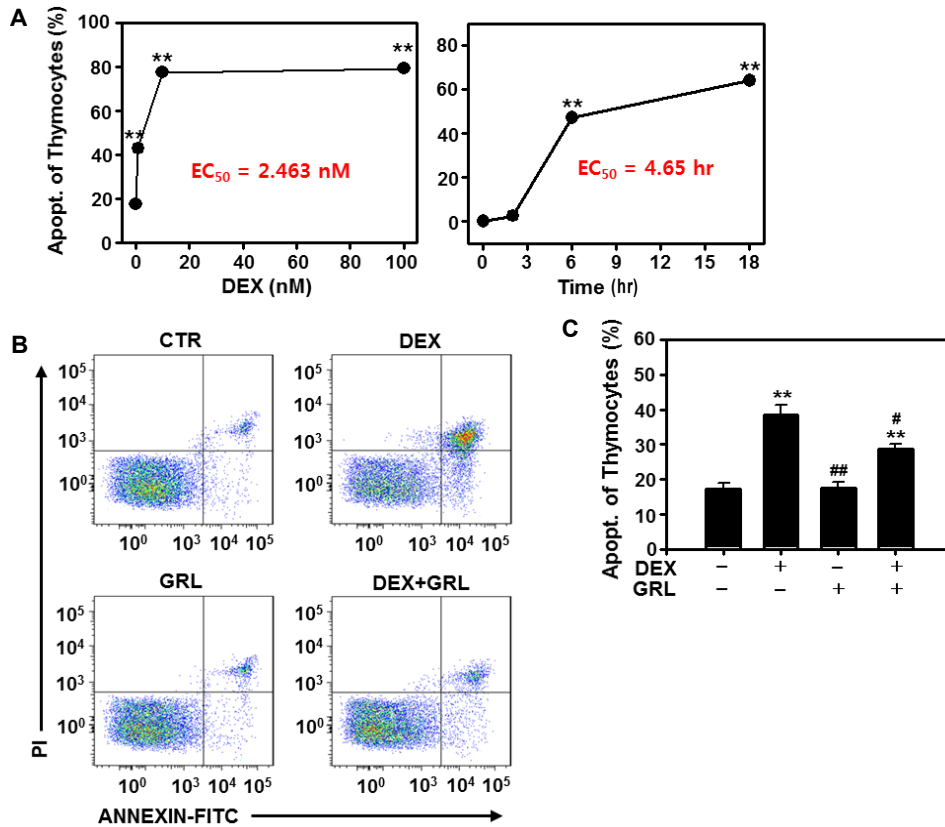


Fig. 3. In vitro assessment of apoptosis in thymocytes. (A) Thymocytes ( $5 \times 10^5$ ) were treated with different concentrations for 24 hr, or were treated for different times with 10 nM of DEX. Cells were then harvested and incubated with recombinant annexin V-FITC. PI was added to all samples just before analysis by flow cytometry. (B, C) Thymocytes ( $5.0 \times 10^5$ ) were treated with ghrelin (100  $\mu$ M) for 18 hr in the presence or absence of DEX (10 nM). The induction of apoptosis was determined by flow cytometric analysis of Annexin V-FITC and PI-staining. Mean  $\pm$  s.e.m. (n=3). \*\* $p < 0.01$  compared to corresponding value for none-treated untreated cells.; # $p < 0.05$  ## $p < 0.01$  compared to the DEX-treated cells.

**그렐린의 Glucocorticoid 수용체(GR) 활성화 억제 확인**

DEX에 의해 활성화 된 세포사멸 신호전달과정에서 그렐린이 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 DEX와 직접적으로 결합하여 신호전달을 조절하는 Glucocorticoid 수용체(GR)의 활성화 정도를 Western Blot을 이용해 확인하였다. GR은 DEX와 같은 glucocorticoid가 없는 상태에서는 세포질에서 heat shock protein 90 (HSP90)와 HSP70 등의 단백질과 복합체를 형성하여 불활성 상태로 있다가 glucocorticoid와 결합하여 활성화되면 HSP단백질들과 분리되어 핵 내로 이동하게 된다 [22]. DEX을 처리하여 세포사멸을 유도한 경우 GR의 인산화(Ser211)가 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 증가는 그렐린을 함께 처리한 세포에서 억제되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4A). 또한 세포질과 핵을 분리하여 western blot을 통해 GR의 세포 내 위치를 확인한 결과, DEX에 의해 자극이 일어나면 GR이 세포질에서 핵으로 이동함을 확인할 수 있었으며, 이러한 이동은 그렐린에 의해 억제되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B). 아울러 비활성화 상태의 GR 복합체는 DEX에 의해 분해되는데, 이러한 GR

복합체의 분해가 그렐린에 의해 억제되는 것도 확인할 수 있었다(Fig. 4C).

미토콘드리아 의존성 세포사멸과정에 있어 대부분의 경우에는 BCL-2 계열 단백질에 의존적이다. 특히, 동시 자극자나 선천면역의 도움 없이 자기 항원을 인식한 T 세포는 Bim이라 불리는 항-세포사멸사유도(pro-apoptotic) 단백질을 활성화시킴으로써 미토콘드리아 경로를 통해 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다[8, 10]. 본 연구에서는 DEX에 의해 세포사멸이 유도된 흉선세포에 그렐린 처리 후 Bim 유전자와 단백질 발현을 확인하였는데, Bim의 발현은 그렐린에 의해 유의성 있게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A and D).

흉선은 혈액 속에 있는 백혈구의 일종인 T-림프구의 성숙에 관계되는 림프조직의 일부로 세포매개성 면역기능의 발달과 성숙을 담당하는 중요한 면역기관이다[1]. 하지만 감염이나 면역 억제제의 처방, 방사선 치료, 노화, 불안감(anxiety), 영양실조 등 다양한 원인에 의해 흉선 세포의 세포사멸을 통한 흉선 위축(Thymic atrophy)을 초래한다[2, 3, 6, 9, 12, 23, 25, 26]. 안구, 피부 및 관절부위 염증성 장애 및 악성 종양의 치료,

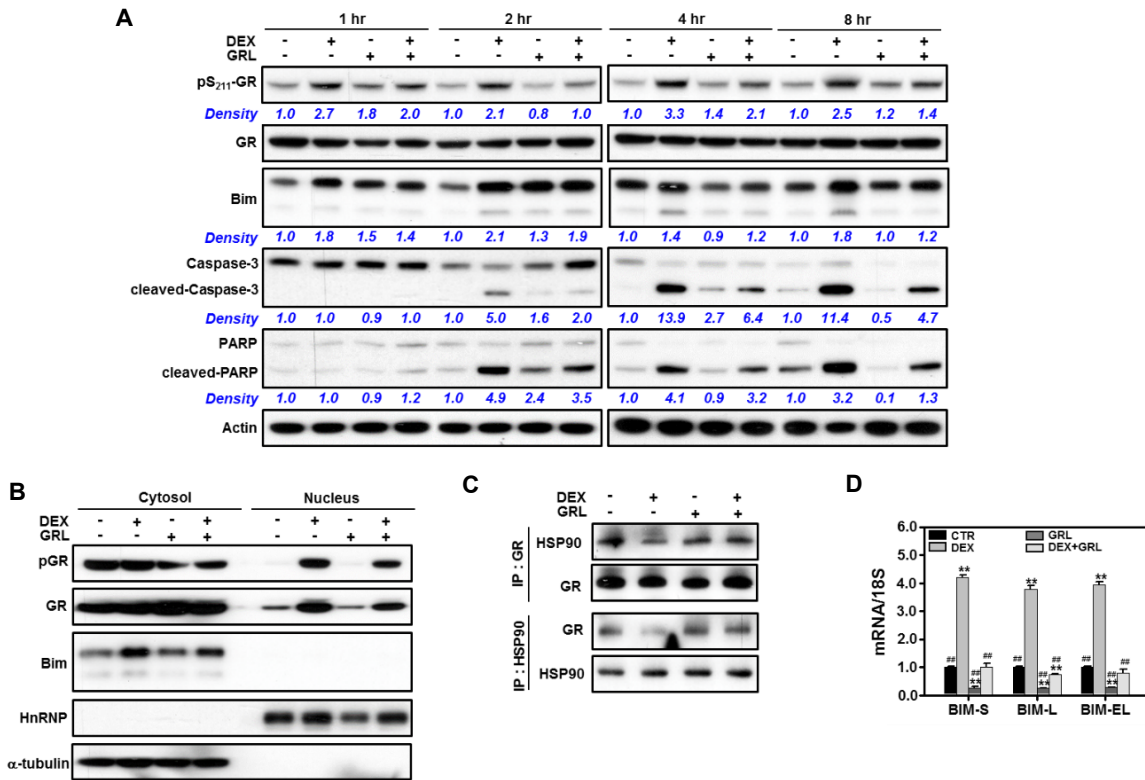


Fig. 4. Inhibition of dexamethasone and glucocorticoid receptor pathways by ghrelin. Thymocytes ( $5.0 \times 10^6$ ) were treated with ghrelin (100  $\mu$ M) in the presence or absence of DEX (10 nM) for the indicated times. (A) Cells were lysed and examined by Western blot analysis using antibodies specific for phospho-GR (Ser21), Bim, cleaved-Caspase-3 and cleaved-PARP. (B) Cytoplasmic and nuclear proteins were isolated using NE-PER Nuclear Protein Extraction Kit (Thermo). Samples were analyzed for nuclear and cytosolic GR and Bim, HnRNP (nuclear indicator), and  $\alpha$ -tubulin (cytosolic indicator) by Western analysis. (C) Cells were immunoprecipitated with anti-GR or anti-HSP90 after which western blots were performed with anti-GR and anti-HSP90. (D) Total RNA from cells treated with ghrelin (100  $\mu$ M) in the presence or absence of DEX (10 nM) for 8 hr was subjected to real-time PCR analysis for BimEL, BimL, and BimS mRNA expression. The results are means  $\pm$  SEM from 3 experiments, are normalized to 18s RNA and are presented as arbitrary units. \*\* $p < 0.01$  compared to corresponding value for none-treated untreated cells; # $p < 0.05$  ## $p < 0.01$  compared to corresponding value for DEX-treated cells.

장기 골수 이식에서 면역 억제제로 사용되는 DEX는 흉선에서 T 세포의 성숙이나 세포활성을 억제하는 물질로 알려져 왔으며[6, 13, 18], 이로 인해 흉선위축(Thymic atrophy)을 발생시킨다[15, 17, 21]. 면역세포에서의 그렐린 역할은 꾸준히 보고되어오고 있으며[2, 7, 14, 20], 흉선세포의 성숙 및 T 세포로의 발달(thymopoiesis)에 중요한 호르몬으로 알려져 있다[7, 14, 27]. 본 실험에서는 DEX로 세포사멸을 유도시킨 흉선세포에 그렐린을 처리하였을 때 세포사멸이 억제됨을 확인할 수 있었으며, 세포사멸에 중요 단백질인 Caspase-3와 PARP 및 Bim의 활성화가 *in vivo* (Fig. 1, Fig. 2) 와 *in vitro* (Fig. 3, Fig. 4) 모두에서 효과적으로 저해됨을 확인할 수 있었다. 그리고 이러한 세포사멸의 억제효과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 그렐린을 처리한 군에서 DEX에 의해 활성화된 GR의 인산화의 억제와(Fig. 4A) 핵으로의 이동 감소(Fig. 4B) 및 GR과 복합체를 이루고 있는 HSP90의 분해 억제(Fig. 4C)를 통해 나타나는 기전임을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과들을 종합해 볼 때, 그렐린은 약물이나 체내 생리적 스트레스에 의한 흉선 내 면역세포들의 사멸, 억제 및 보호에 도움을 줄 것으로 사료되며, 나아가 이로 인한 흉선 위축을 보호할 수 있는 치료 후보물질로서의 연구를 기대할 수 있으리라 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (NRF-2014R1A1A1003163).

### References

1. Baatar, D., Patel, K. and Taub, D. D. 2011. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. *Mol Cell*

- Endocrinol* **340**, 44-58.
2. Belkaya, S., Silge, R. L., Hoover, A. R., Medeiros, J. J., Eitson, J. L., Becker, A. M., de la Morena, M. T., Bassel-Duby, R. S. and van Oers, N. S. 2011. Dynamic modulation of thymic microRNAs in response to stress. *PLoS One* **6**, e27580
  3. Berczi, I., Quintanar-Stephano, A. and Kovacs, K. 2009. Neuroimmune regulation in immunocompetence, acute illness, and healing. *Ann N Y Acad Sci* **1153**, 220-239.
  4. Billard, M. J., Gruver, A. L. and Sempowski, G. D. 2011. Acute endotoxin-induced thymic atrophy is characterized by intrathymic inflammatory and wound healing responses. *PLoS One* **18**, e17940.
  5. Cannizzo, F. T., Capra, P., Divari, S., Ciccotelli, V., Biolatti, B. and Vincenti, M. 2011. Effects of low-dose dexamethasone and prednisolone long term administration in beef calf: chemical and morphological investigation. *Anal Chim Acta* **700**, 95-104.
  6. Cannizzo, F. T., Spada, F., Benevelli, R., Nebbia, C., Giorgi, P., Brina, N., Bollo, E. and Biolatti, B. 2010. Thymus atrophy and regeneration following dexamethasone administration to beef cattle. *Vet Rec* **167**, 338-343.
  7. Chen, C. Y., Asakawa, A., Fujimiya, M., Lee, S. D. and Inui, A. 2009. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev* **61**, 430-481.
  8. Chen, Y., Qiao, S., Tuckermann, J., Okret, S. and Jondal, M. 2010. Thymus-derived glucocorticoids mediate androgen effects on thymocyte homeostasis. *FASEB J* **24**, 5043-5051.
  9. Chougnet, C. A., Tripathi, P., Lages, C. S., Raynor, J., Sholl, A., Fink, P., Plas, D. R. and Hildeman, D. A. 2011. A major role for Bim in regulatory T cell homeostasis. *J Immunol* **186**, 156-163.
  10. Davenport, A. P., Bonner, T. I., Foord, S. M., Harmar, A. J., Neubig, R. R., Pin, J. P., Spedding, M., Kojima, M. and Kangawa, K. 2005. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev* **57**, 541-546.
  11. Dixit, V. D., Schaffer, E. M., Pyle, R. S., Collins, G. D., Sakthivel, S. K., Palaniappan, R., Lillard, J. W, Jr. and Taub, D. D. 2004. Ghrelin inhibits leptin-and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* **114**, 57-66.
  12. Dixit, V. D., Yang, H., Cooper-Jenkins, A., Giri, B. B., Patel, K. and Taub, D. D. 2009. Reduction of T cell-derived ghrelin enhances proinflammatory cytokine expression: implications for age-associated increases in inflammation. *Blood* **113**, 5202-5205.
  13. Dixit, V. D., Yang, H., Sun, Y., Weeraratna, A. T., Youm, Y. H., Smith, R. G. and Taub, D. D. 2007. Ghrelin promotes thymopoiesis during aging. *J Clin Invest* **117**, 2778-2790.
  14. Faubel, S. and Edelstein, C. L. 2005. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **5**, 269-287.
  15. Gomez-Sanchez, C. E. 2009. Glucocorticoid production and regulation in thymus: of mice and birds. *Endocrinology* **150**, 3977-3979.
  16. Hattori, N., Saito, T., Yagyu, T., Jiang, B. H., Kitagawa, K. and Inagaki, C. 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4284-4291.
  17. Herold, M. J., McPherson, K. G. and Reichardt, H. M. 2006. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* **63**, 60-72.
  18. Kong, F. K., Chen, C. L. and Cooper, M. D. 2002. Reversible disruption of thymic function by steroid treatment. *J Immunol* **168**, 6500-6505.
  19. Miller, J. F. 2002. The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunol Rev* **185**, 7-14.
  20. Pazirandeh, A., Jondal, M. and Okret, S. 2004. Glucocorticoids delay age-associated thymic involution through directly affecting the thymocytes. *Endocrinology* **145**, 2392-2401.
  21. Pierson, W., Cauwe, B., Policheni, A., Schlenner, S. M., Franckaert, D., Berges, J., Humblet-Baron, S., Schönefeldt, S., Herold, M. J., Hildeman, D., Strasser, A., Bouillet, P., Lu, L. F., Matthys, P., Freitas, A. A., Luther, R. J., Weaver, C. T., Dooley, J., Gray, D. H. and Liston, A. 2013. Antiapoptotic Mcl-1 is critical for the survival and niche-filling capacity of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* **14**, 959-965.
  22. Qiao, S., Chen, L., Okret, S. and Jondal, M. 2008. Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes. *Exp Cell Res* **314**, 3027-3035.
  23. Qiao, S., Okret, S. and Jondal, M. 2009. Thymocyte-synthesized glucocorticoids play a role in thymocyte homeostasis and are down-regulated by adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* **150**, 4163-4169.
  24. Schoneveld, O. J., Gaemers, I. C. and Lamers, W. H. 2004. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* **1680**, 114-128.
  25. Taub, D. D., Murphy, W. J. and Longo, D. L. 2010. Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* **10**, 408-424.
  26. Veldhuis, J. D. and Bowers, C. Y. 2010. Integrating GHS into the ghrelin system. *Int J Pept* **2010**, Doi 10.1155/2010/879503.
  27. Youm, Y. H., Yang, H., Sun, Y., Smith, R. G., Manley, N. R., Vandanmagsar, B. and Dixit, V. D. 2009. Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J Biol Chem* **284**, 7068-7077.

## 초록 : 덱사메타손에 의해 유발된 흉선 T세포사멸에 대한 그렐린의 세포사멸억제효과

이준호

(고려대학교 의과대학 BK21플러스 융개중합 의과학 사업단)

28개의 아미노산으로 이루어져 있는 Ghrelin은 위 기저부의 X/A-유사 신경내분비 세포에서 주로 합성 분비되는 물질로 음식의 섭취나 비만, 에너지 항상성 등을 조절하는 역할을 하며, 이러한 Ghrelin 활성화는 수용체인 G-protein coupled growth hormone secretagogue receptor-1a (GHS-R1a)와 결합을 통해 일어난다. 최근 보고된 자료에 따르면, ghrelin과 수용체는 위나 시상하부, 뇌하수체 등뿐만 아니라 T 세포나 단핵구 및 대식세포 등 면역 세포에서도 생성되며, 염증반응을 유도하는 사이토카인의 생성을 억제하는 역할을 한다. 또한 흉선의 퇴화 등 면역기관에 있어서도 중요한 호르몬으로 보고되고 있지만 그 기전이나 기능에 대한 연구가 아직 미미한 실정이다. 본 연구에서는 흉선에서 T 세포의 성숙이나 세포활성을 억제하는 물질로 알려져 있는 덱사메타손(Dexamethasone; DEX)으로 세포사멸을 유도시킨 흉선세포에 ghrelin을 처리하여 세포사멸 억제효과를 알아보았다. 그 결과 Ghrelin은 세포사멸에 중요 단백질인 Caspase-3와 PARP 및 Bim의 활성화가 *in vivo* 및 *in vitro* 모두에서 효과적으로 저해됨을 확인할 수 있었으며, 이러한 세포사멸의 억제효과는 ghrelin을 처리할 경우 DEX에 의해 활성화된 Glucocorticoid 수용체(GR)의 인산화의 억제와 HSP90 등과 복합체를 이루고 있는 GR이 활성화되면서 분해되는 과정을 억제시켜 결과적으로 핵 안으로 이동하는 과정을 억제하는 기전을 통해 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과 등을 통해 볼 때, ghrelin은 약물이나 체내 생리적 스트레스 등으로 인해 발생하는 흉선 내 면역세포들의 세포사멸에 도움을 줄 것으로 사료되며, 나아가 이로 인한 흉선위축을 보호할 수 있는 치료 후보물질로서의 연구를 기대할 수 있으리라 사료된다.