감마선 조사에 의한 LPS의 면역 독성 저감화

박종흠 · 성낙윤 · 변의백 · 송두섭 · 송범석 · 김재경
이주운 · 박상현 · 김재훈 · 강근옥[1] · 유영춘[2,*]

한국원자력연구원 첨단방사선연구소,
[1]국립한경대학교 자연과학대학 영양조리학과,
[2]건양대학교 의과대학 미생물학교실

Reduction of Immune Toxicity of LPS by Gamma Irradiation

Jong-Heum Park, Nak-Yun Sung, Eui-Beak Byun, Du-Sup Song,
Beom-Seok Song, Jaekyung Kim, Ju-Woon Lee, Sang-Hyun Park,
Jae-Hun Kim, Geon-Ok Kang[1] and Young-Choon Yoo[2,*]

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea
[1]*Department of Nutrition and Culinary Science, College of Natural Science, Hankyong University, Anseong 456-749, Korea*
[2]*Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea*

Abstract - The purpose of this study is to reduce the immune toxicity of lipopolysaccharide (LPS) by gamma irradiation. LPS was gamma-irradiated at the various doses of 20, 100 and 200 kGy and then evaluated on the immune toxicity through the cell proliferation, nitricoxide production and cytokine release. Cell proliferation significantly decreased in the intact LPS treated groups, whereas gamma-irradiated LPS treated group were not reduced the cell proliferation. Similarly, the production of nitric oxide and cytokine showed the high levels in the intact LPS treated group. However, gamma-irradiated LPS treated group remarkably decreased the production of nitric oxide and cytokine in dose-dependent manner. Therefore, gamma irradiation may effective method to reduce the immune toxicity of LPS.

Key words : Gamma irradiation, Lipopolysaccharide, Cell proliferation, Nitric oxide, Cytokine

서 론

내독소인 Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성 세균의 세포막 성분으로 염증반응을 매개하는 대표적인 염증유도 물질로 널리 알려져 있다 (Shew *et al*. 1993). 이러한 염증 유도 물질이 체내에 유입되면 패혈증과 같은 전신성 염증반응 (SIRS: systemic inflammatory response syndrome)을 유도하고, 패혈증 쇼크 (septic shock)와 다발성 장기 부전 (MODS, multiple organ dysfunction syndrome)의 임상 현상을 통하여 결국 사망에 까지 이르게 하는 치명적인 물질중 하나이다 (Hseu *et al*. 2005).

LPS의 염증 유도반응은, LPS에 의하여 유도되는 nitric

* Corresponding author: Young-Choon Yoo, Tel. +82-70-4642-6495, Fax. +82-70-4642-6495, E-mail. yc-yoo@konyang.ac.kr

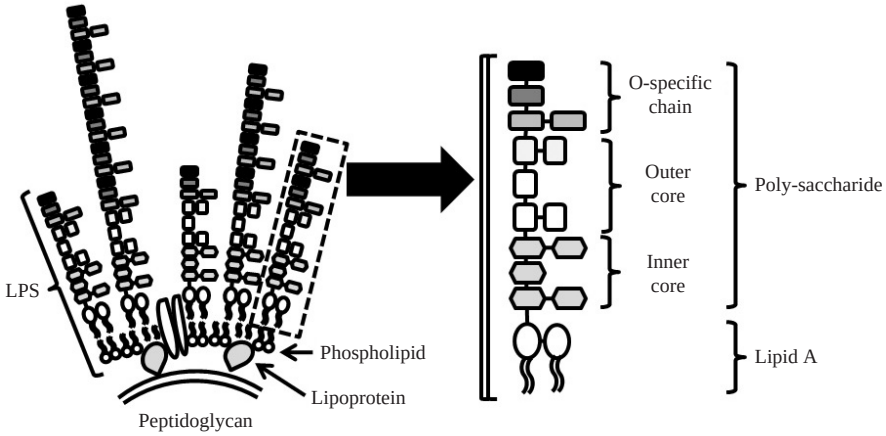

Fig. 1. Structure of lipopolysaccharide (LPS).

oxide (NO)와 밀접한 관계가 있다. NO는 저분자량의 막-투과성 기체이며, 세포내의 산화질소 합성효소 (NOS: nitric oxide synthase)에 의해 아미노산 L-arginine과 산소 분자가 L-citrulline과 NO로 전환되는 과정에서 생성된다 (Alderton *et al*. 2001; Tintinalli and Kelon *et al*. 2003). NOS에는 3가지의 동종형 (isoform)들이 존재하는 것으로 알려져 있는데, eNOS (endothelial NOS; NOS I), iNOS (inducible NOS; NOS II)와 nNOS (neuronal NOS; NOS III) 등이다. 이중에서 eNOS와 nNOS는 체질성 NOS (cNOS: constitutional NOS)라 불리며, 휴지기 세포에서 항상 존재하다가 칼슘과 칼모듈린 (calmodulin)에 의해 활성화된다 (Aktan 2004). 신호전달물질의 요구에 따라 NO는 cNOS에 의해 낮은 농도로 합성되며, 수용성 guanylate cyclase의 헴 철 (heme iron)과 결합하여 2차 메신저인 cGMP를 만들어, 여러 가지 매개물질들을 조절함으로써 세포내 칼슘 농도를 떨어뜨려 결국 평활근의 이완을 일으키고 혈소판이 응집하여 혈관벽에 부착되는 것을 방해한다 (Ignarro 1992; Chiang *et al*. 2002). iNOS는 휴지기 세포에는 존재하지 않으며, 세균 감염이나 LPS와 같은 생산물과 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), interferon-γ (IFN-γ)와 같은 cytokine들에 의해 혈관내피세포 (endothelium), 간세포 (hepatocyte), 단핵세포 (monocyte), 비만세포 (mastcell), 대식세포 (macrophage)와 평활근 등에서 유도되어 세포내 칼슘 농도와 무관하게 NO를 과량으로 생산하게 된다 (Mayer and Hemmens 1997; Alderton *et al*. 2001)

방사선의 조사는 비열처리 공정의 장점을 가지고 있어, 열에 쉽게 변성되는 물질을 위한 효과적인 멸균공정으로 사용되며, 국제 원자력기구 (IAEA)에서도 오염되어 있는 세균이나 바이러스를 제거하기 위한 효과적인 방법으로 방사선을 조사하는 것을 허가하고 있는 실정이다 (IAEA 1973). 또한 최근 연구에 따르면 방사성 동위원소로부터 전리되는 이온화 에너지를 이용하여 항원성이 높은 알레르기성 물질의 알레르기원성을 쉽게 제거할 뿐 아니라 (Seo *et al*. 2004), 고분자 다당체의 글리코시딕본드 (glycosidic bond)에 영향을 미쳐 고분자의 구조를 쉽게 깨트리는 것으로 알려져 있다 (Cho *et al*. 2003). 따라서 본 연구에서는 내독소인 LPS에 방사선을 조사하여 LPS가 매개하는 면역독성의 감소효과에 관하여 측정하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 감마선 조사

본 연구에서 *E. coli* O55:B5 기원의 LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다 (Fig. 1). 감마선 조사는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 (Jeongeup, Republic of Korea) 내 선원 11.1 PBq, Co^{60} 감마선 조사시설 (point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd, Ottawa, ON, Canada)을 이용하였다. 흡수선량 확인은 alanine dosimeter (5 mm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 사용하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구 (IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 총 흡수선량의 오차는 2% 이내였다.

2. 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였다. RAW 264.7 세포주는 10% FBS와 penicillin, streptomysin (100 IU ml^{-1}, 100 μg ml^{-1})을 함유한 Dubecco's Modified Eagle Medium

(DMEM)용액을 사용하여 37°C로 유지되는 5% CO_2 세포 배양기에서 배양하며 실험에 사용하였다.

3. 대식세포 분화능 평가

대식세포주에 대한 세포증식능 평가를 위하여 RAW 264.7 세포를 1×10^4 cells $well^{-1}$씩 96 well plate에 90 μl씩 분주하고 20에서 200 kGy로 감마선 조사된 LPS를 0.2, 2 μg ml^{-1}의 농도로 각각 10 μl씩 처리하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 24시간 동안 배양하여 MTT 분석을 통해 감마선 조사된 LPS의 대식세포 증식능을 평가하였다. MTT assay는 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide용액 (5 mg ml^{-1})를 각각의 well에 30 μl씩 첨가하고 2시간 동안 배양한 후 배양 상등액를 제거하고 세포내 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Proliferation}\,(\%)=\frac{\text{Sample}_{(\text{처리구의 흡광도})}}{\text{Sample}_{(\text{무처리구의 흡광도})}}\times100$$

4. Nitric oxide 분비능측정

액체 용액상태에서 NO는 저절로 nitrate (NO_3^-)와 nitrite (NO_2^-) 이온으로 변하며, 생체 내에서는 이들이 가장 안정된 NO 산물이다. 본 연구에서는 nitrate와 nitrite를 포함한 산화질소의 농도를 측정하기 위하여 Greiss reagent를 사용하는 kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 이용하였다. 혈중 NO의 농도는 μmol로 표시하였다.

5. Cytokine 분비능 측정

감마선 조사된 LPS의 대식세포 cytokine 분비능에 미치는 영향을 측정하기 위하여, RAW264.7 세포를 3×10^4 cells $well^{-1}$씩 48 well plate에 450 μl씩 분주하고 20에서 200 kGy로 감마선 조사된 LPS를 0.2, 2, 5 μg ml^{-1}의 농도로 각각 50 μl씩 처리하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 24시간 동안 배양한 후, 배양 상등액을 분리하여, 이 상등액에 포함되어있는 tumor-necrosis factor (TNF)-α와 interleukin (IL)-6와 함량을 측정하였다. 사이토카인의 측정은 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (eBioscience, USA)를 사용하여 측정하였다.

6. 통계처리

모든 실험은 3번 이상 반복 하여 평균값과 오차를 결과로 나타내었고, 이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0)를 이용하여 One Way ANOVA test 방법으로 분석하였으며, 시료간의 유의성은 Student's two-tailed *t*-test를 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 비교하였다.

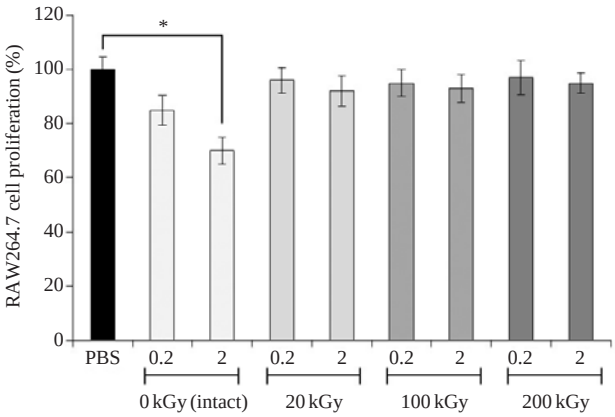

Fig. 2. Cell proliferation of gamma-irradiated lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 macrophage cell. Gamma-irradiated and non-irradiated LPS were treated at the concentration of 0.2 and 2 μg ml^{-1} (n=3), respectively.

결과 및 논의

1. 감마선 조사된 LPS의 대식세포 분화능평가

감마선 조사된 LPS의 대식세포 세포 분화능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 마우스 기원의 대식세포주인 RAW264.7세포에 선량별 (20, 100, 200 kGy) 감마선 조사된 LPS를 농도별 (0.2, 2 μg ml^{-1})로 처리하여 RAW264.7의 분화능을 관찰하였다 (Fig. 2). RAW264.7세포에 비조사 LPS를 처리한 결과, 세포분화능이 소폭으로 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 20, 100, 200 kGy로 감마선 조사된 LPS를 처리하였을 경우, 대조구인 PBS 처리구와 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 미루어 보아 방사선의 조사는 LPS가 매개하는 염증 유도 반응을 효과적으로 감소시키는 것으로 사료되며, 이러한 염증유도 반응을 좀 더 면밀히 관찰하기 위하여 방사선 조사된 LPS가 유도하는 대표적인 염증반응인 nitric oxide 및 사이토카인의 분비능에 관하여 관찰하였다.

2. 감마선 조사된 LPS의 nitric oxide 분비능

염증 단계에서 중요한 역할을 수행하는 NO의 생성원인 중 iNOS에 의한 생성이 절대적으로 지배적이며,

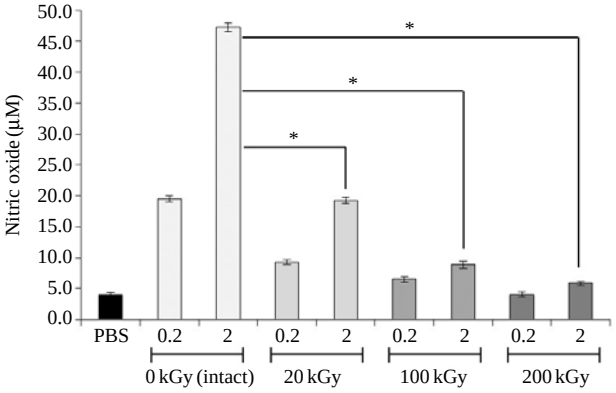

Fig. 3. Nitric oxide (NO) production of gamma-irradiated lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 macropharge cells. Gamma-irradiated and non-irradiated LPS were treated at the concentration of 0.2 and 2 μg ml^{-1} (n=3), respectively.

이러한 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하고 신호전달기능, 신경독성완화, 혈관확장등 다양한 생리기능을 가지고 있다(Moncada *et al*. 1991; Weisz *et al*. 1996). 그러나 염증상태에서의 과도한 NO의 생성은 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 다른 여러 가지 염증 매개물질의 생합성을 촉진하고 염증을 심화시켜 조직의 손상, 유전자변이 및 신경손상 등을 일으킨다(McCartney-Francis *et al*. 1993; Hippeli and Elstner 1999). 따라서 NO의 측정은 염증반응의 판단을 위한 좋은 사례로써 현재 다양하게 이용되고 있다. 본 연구에서도 방사선 조사된 LPS의 독성(염증성)의 저감화에 관하여 알아보기 위하여 LPS가 매개한는 NO의 분비능에 관하여 관찰하였다(Fig. 3)

방사선 조사 및 비조사된 LPS를 마우스 대식세포 기원의 RAW264.7세포에 처리하여, NO의 분비능에 관하여 관찰한 결과, 비조사된 LPS 처리구에서 NO의 분비능의 처리된 LPS의 농도에 의존하여 급속하게 증가 하는 것으로 관찰되었다. 이에 비해 방사선 조사된 LPS의 경우 20 kGy로 조사된 LPS의 경우 NO의 분비능이 2 μg ml^{-1}의 농도로 처리한 군에서 약간 증가하는 경향이 관찰되었으며, 20 kGy 이상으로 조사된 LPS의 경우 현저하게 NO의 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 염증 유발물질인 LPS에 관하여 방사선 조사는 LPS가 유발시키는 염증반응을 효과적으로 감소시키는 것으로 사료된다.

3. 감마선 조사된 LPS의 cytokine 분비능

염증에는 많은 매개물질이 관여하는데 활성화된 림프구 및 대식세포 등의 여러 세포에서 분비되는 염증성

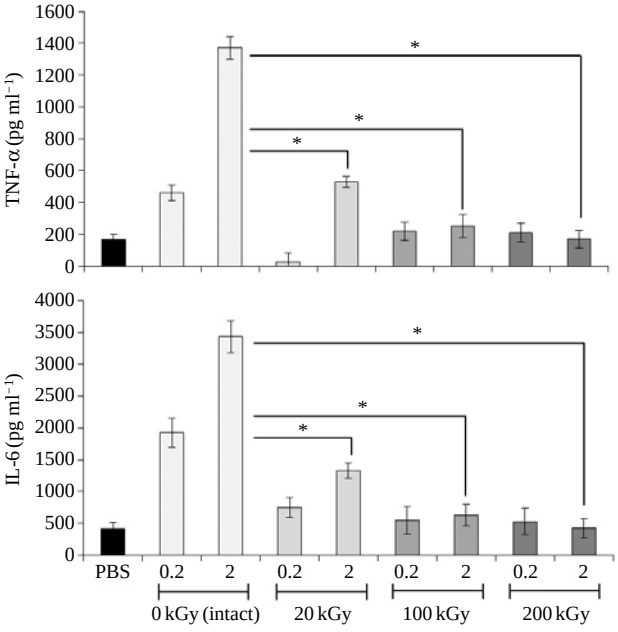

Fig. 4. Cytokine (TNF-α and IL-6) production of gamma-irradiated lipopolysaccharide (LPS) in RAW264.7 macropharge cells. Gamma-irradiated and non-irradiated LPS were treated at the concentration of 0.2 and 2 μg ml^{-1} (n=3), respectively.

cytokine으로는 TNF-α와 IL-1β, IL-6 등이 있다(Hseu *et al*. 2005). TNF-α는 LPS반응의 주요 매개체로 선천면역반응에 있어서 중요한 역할을 하며 Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF-α는 tumor cell에 대한 강력한 세포독성을 나타내기도 하지만 외부자극에 의하여 그 양이 지나치게 많아지면, 급성 및 만성염증을 일으킨다고 보고되어진다(Zhao *et al*. 1998) 염증성 사이토카인은 염증을 나타내는 중요한 지표로, 방사선 조사 및 비조사된 LPS의 처리가 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6의 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 RAW 264.7 세포에 0, 20, 100, 200 kGy로 감마선 조사된 LPS를 0.2, 2 μg ml^{-1}로 처리한 후 세포 배양 상등액에 생성된 TNF-α, IL-6 의 농도를 ELISA방법으로 측정하였다(Fig. 4). 실험결과 방사선 비조사된 LPS의 경우 농도 의존적으로 대식세포 배양 상등액의 TNF-α, IL-6의 농도를 증가시키는 것으로 관찰되었다. 이에 비해 방사선 조사된 LPS를 처리한 대식세포의 상등액에서는 비조사구에 비하여 TNF-α, IL-6의 농도가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 특히 100, 200 kGy로 방사선 조사된 LPS의 경우 TNF-α, IL-6의 농도가 현저하게 감소하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어 보아 방사선 조사된 LPS는 방사선 조사에 염증유도 반응의 대부분을 상실하는 것으로 판단되며, 따라서 염증유도 물질인 LPS에 대하

여 방사선의 조사는 LPS가 유발하는 염증반응을 효과적으로 제어할 수 있는 방법으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 치명적인 염증을 유발하는 염증유도물질인 LPS에 방사선을 조사하여 LPS가 유도하는 면역독성 저감에 관하여 대식세포주인 RAW264.7 세포를 통하여 관찰하였다. 방사선 비조사된 LPS의 경우 농도 의존적으로 대식세포의 분화능을 감소시키고, nitric oxide 및 염증성 cytokine (TNF-α, IL-6)의 농도를 증가시키는 반면, 방사선 조사된 LPS의 경우 대식세포의 분화능을 유지시켰으며, nitric oxide 및 염증성 cytokine (TNF-α, IL-6)농도가 비조사구에 비하여 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 염증유도 물질인 LPS에 대하여 방사선의 조사는 LPS가 유발하는 염증반응을 효과적으로 제어 할 수 있는 방법으로 사료된다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부 재원으로 한국연구재단 방사선기술개발사업 및 건양대학교 명곡 학술연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Aktan F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **75**:639-653.

Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, fungction and inhibition. *Biochem. J.* **357**:593-615.

Chiang TM, Woo-Rasberry V and Cole F. 2002. Role of platelet endothelial form of nitric oxide synthase in collagenplatelet interaction: regulation by phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**:169-174.

Cho M, Kim BY and Rhim JH. 2003. Degradation of alginate solution and powder by gamma-irradiation. *Food Eng. Prog.* **7**:141-145.

Hippeli S and Elstner EF. 1999. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radic Res* **31** Suppl: S81-87.

Hseu YC, Wu JY, Chang WH and Lu FJ. 2005. Anti-inflammatory potential of Antrodia Camphorata through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *Int. Immunopharmacol.* **5**:1914-1925.

IAEA. 1973. Manual on radiation sterilization of medical and biological materials. IAEA, Vienna.

Ignarro LJ. 1992. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **20**:465-469.

Mayer B and Hemmens B. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 477-481.

McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF and Wahl SM. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**:749-754.

Moncada S, Palmer RM and Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**:109-142.

Seo JH, Lee JW, Kim JH, Byun EB, Lee SY, Kang IJ and Byun MW. 2007. Reduction of allergenicity of irradiated ovalbunin in ovalbumin-allergic mice. *Radiat. Phys. Chem.* **76**: 1855-1857.

Shew RL, Papka RE, McNeill DL and Yee JA. 1993. NADPH-diaphorase-positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction. *Peptides* **14**:637-641.

Tintinalli JE, Kelon GD and Stapczynski JS. 2003. Emergency Medicine, A comprehensive study guide. 6th ed. pp. 231-242. McGraw Hill, New York.

Weisz A, Cicatiello L and Esumi H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-Larginine. *Biochem. J.* **316**:209-215.

Zhao W, Wolfender JL, Hostettmann K, Xu R and Qin G. 1998. Antifungal alkaloids and derivatives from Dictamnus Dasycarpus. *Phytochem* **47**:7-11.

Manuscript Received: July 12, 2012
Revised: July 31, 2012
Revision Accepted: August 17, 2012