

연구노트

## Ovalbumin에 의한 cyclooxygenase-2와 inducible nitric oxide synthase 유도

이아눔 · 박세정<sup>1</sup> · 정애리 · 이재란 · 박혜정 · 김수정 · 민인순<sup>2</sup> · 윤형선\*  
순천향대학교 의료과학대학 임상병리학과, <sup>1</sup>순천향대학교 의료과학대학 의료과학과,  
<sup>2</sup>순천향대학교 의료과학대학 보건행정경영학과

### Ovalbumin Induces Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression

A-Neum Lee, Se-Jeong Park<sup>1</sup>, Ae-Ri Jeong, Jae-Ran Lee, Hye-Jeong Park,  
Soo-Jung Kim, In Soon Min<sup>2</sup>, and Hyung-Sun Youn\*

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University

<sup>1</sup>Department of Medical Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University

<sup>2</sup>Department of Healthcare Management, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University

**Abstract** Egg allergies are the most prevalent food hypersensitivity in children. The major egg allergens are proteins, such as ovalbumin (OVA) and ovomucoid (OVM), which are mainly contained in egg whites. OVA is the major protein in egg white, comprising 54% of the total protein content. OVA has been widely used in experimental inhalant and dietary allergy animal models, but its mechanism has not been clearly identified. In this study, we showed that OVA induced nuclear factor- $\kappa$ B activation. OVA also induced the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. These data suggest new approaches for developing efficient anti-allergic strategies.

**Keywords:** ovalbumin, egg allergy, NF- $\kappa$ B, cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase

## 서 론

음식 알러지(food allergies)는 음식 단백질에 대한 면역 거부반응이다. 음식 알러지는 아토피 피부염(atopic dermatitis), 알러지 위장장애(allergic gastrointestinal disorders)와 같은 만성적인 장애를 일으킬 수 있는 즉각적이며 잠재적으로 생명을 위협하는 반응이다. 알레르기를 일으키는 물질을 알러젠(allergen)이라 하며, 사람마다 차이가 있지만 우유, 계란, 대두, 땅콩 및 생선 등이 중요한 식품 알러젠들이다(1). 이 중 계란은 알러지 위험성이 높은 물질로, 아이들에게 음식 알러지를 유발하는 물질들 중 두 번째로 흔한 알러젠으로 알려져 있다(2). 몇몇 산업국가에서, 계란 알러지는 소아들에게서 우유 알러지를 넘어 가장 흔한 음식 과민 반응으로 알려져 있다(3). 계란 알러젠으로는 lysozyme, ovomucin, ovalbumin(OVA)과 ovomucoid(OVM) 등이 있다(4). 이 중에서도 계란 흰자 단백질인 OVA와 OVM이 주요한 알러젠으로 알려져 있으며, 계란 흰자 단백질 중 약 65%를 차지하고 있다. OVA는 계란 흰자 단백질 중 약 54%로 가장 많은 비율을 차지하고 있으며, 45 kDa의 분자량을 가지고 있는 인당단백질(phosphoglyco-

protein)이다. OVA는 단백질의 구조나 기능의 연구를 위한 표준 물질로서 뿐만 아니라 알러지 연구를 위한 실험 동물 모델 안에서 광범위하게 사용된다. 현재까지 계란 알러지를 치료하는 가장 효과적인 방법은 계란을 먹지 않는 것이었다. 하지만 음식문화의 발달로 계란을 이용한 음식들이 많아지면서 계란을 피하는 것은 더욱 어려워지게 되었다. 특히 MMR(measles, mumps, rubella) 백신을 포함한 여러 백신들은 계란을 사용해서 제조를 하고 있기 때문에 계란 알러지는 바이러스 백신의 사용에 있어서 중요한 이슈로 떠오르고 있다.

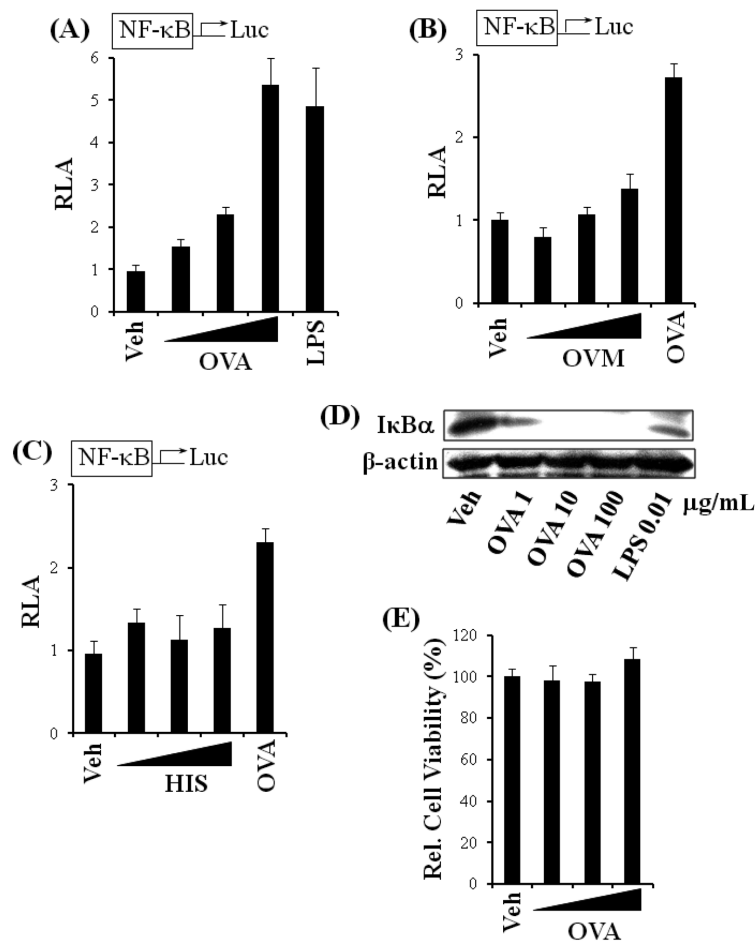
우리는 이번 연구에서 계란 알러젠들이 염증(inflammation) 반응에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 두 가지 중요한 요소인 cyclooxygenase-2(COX-2)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 이러한 연구는 앞으로 계란 알러젠에 의한 알러지 작용기전 규명 및 치료제 개발에 초석이 될 것으로 기대한다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 ovalbumin(OVA)과 ovomucoid(OVM)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA), lipopolysaccharide(LPS)는 List Biological Lab(San Jose, CA, USA)에서 구입하였다. COX-2와  $\beta$ -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA), iNOS 항체는 BD Biosciences(San Jose, CA, USA)로부터 구입하였다. 그 밖의 다른 시약들은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

\*Corresponding author: Hyung-Sun Youn, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam 336-745, Korea  
Tel: 82-41-530-3086  
Fax: 82-41-530-3085  
E-mail: hyoun@sch.ac.kr  
Received September 3, 2010; revised November 16, 2010; accepted November 16, 2010



**Fig. 1. Ovalbumin induced the NF-κB activation.** (A) RAW264.7 cells were transfected with NF-κB luciferase reporter plasmid and treated with OVA (1, 10, 100 μg/mL) or LPS (0.01 μg/mL) for 8 hr. Cell lysates were prepared and luciferase and β-galactosidase enzyme activities were measured as described in materials and methods. Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β-galactosidase activity. Values are mean±SEM (n=3). (B,C) RAW264.7 cells were transfected with NF-κB luciferase reporter plasmid and treated with OVM (1, 10, 100 μg/mL) (B), histamine (1, 10, 100 μg/mL) (C), or OVA (10 μg/mL) for 8 hr. Values are mean±SEM (n=3). (D) RAW264.7 cells were treated with OVA (1, 10, 100 μg/mL) or LPS (0.01 μg/mL) for 30 min. Cell lysates were analyzed for IκBα and β-actin protein by immunoblots. (E) Effect of ovalbumin on cell viability. Cells were treated with ovalbumin (1, 10, 100 μg/mL) for 4 hr. Twenty mL of the CellTiter 96 AQ<sub>ueous</sub> One Solution Reagent was added directly to culture wells. The plate was incubated at 37°C for 4 hr in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The absorbance was recorded at 490 nm with a 96-well plate reader. Veh, vehicle; OVA, ovalbumin; OVM, ovomucoid; HIS, histamine.

### 세포 배양

RAW264.7 cells(a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71)은 10% (v/v) FBS, 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다. 세포들은 5% CO<sub>2</sub>/air를 포함하고 있는 37°C 배양기 안에서 배양하였다.

### Plasmid

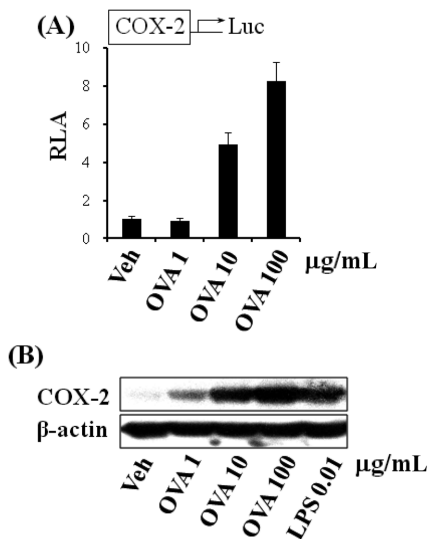
Nuclear factor-κB(NF-κB)발광 plasmid는 F. Mercurio(Signal Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA)로부터 제공받았으며, heat shock protein(HSP) 70-β-galactosidase plasmid는 R. Modlin(University of California, Los Angeles, CA, USA)으로부터 제공받았다. Transfection을 위한 모든 DNA는 EndoFree Plasmid Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 준비되었다.

### 트랜스펙션(transfection)과 발광효소 유전자 분석(luciferase reporter gene assay)

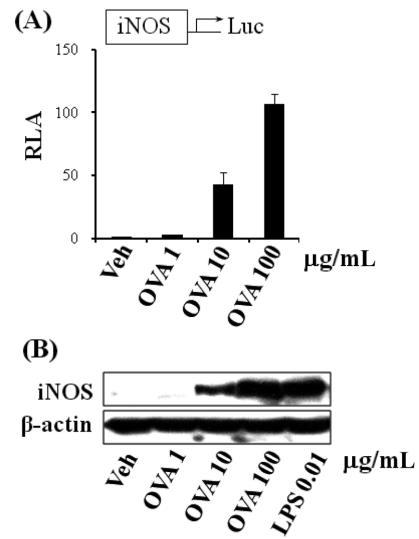
NF-κB발광효소 유전자 분석은 선행연구에서 사용한 방법에 의하여 분석하였다(5,6). 발광효소 plasmid와 HSP70-β-galactosidase plasmid는 superfect transfection 시약(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 세포 안으로transfection 시켰다. 발광 효소의 활성화는 luciferase assay system(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 발광효소의 활성화는 β-galactosidase의 활성화를 측정하여 표준화시켰다.

### 면역압(immunoblotting)방법

선행연구의 방법에 의하여 단백질 추출물들은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이



**Fig. 2. Ovalbumin induced the COX-2 expression.** (A) RAW264.7 cells were transfected with COX-2 luciferase reporter plasmid and treated with OVA (1, 10, 100 µg/mL) for 8 hr. Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β-galactosidase activity. Values are mean±SEM (n=3). (B) RAW264.7 cells were treated with OVA (1, 10, 100 µg/mL) or LPS (0.01 µg/mL) for 8 hr. Cell lysates were analyzed for COX-2 and β-actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; OVA, ovalbumin.



**Fig. 3. Ovalbumin induced the iNOS expression.** (A) RAW264.7 cells were transfected with iNOS luciferase reporter plasmid and treated with OVA (1, 10, 100 µg/mL) for 8 hr. Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β-galactosidase activity. Values are mean±SEM (n=3). (B) RAW264.7 cells were treated with OVA (1, 10, 100 µg/mL) or LPS (0.01 µg/mL) for 8 hr. Cell lysates were analyzed for iNOS and β-actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; OVA, ovalbumin.

전되었다(7,8). Membrane은 0.1% Tween 20 그리고 5% 탈지 건조된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline(PBS)을 가지고 blocking 하였다. Membrane은 1차 항체를 가지고 blotting하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, iNtRON western blot detection system(Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)을 사용하여 원하는 단백질을 규명하였다.

## 결과 및 고찰

NF-κB는 인간의 면역반응을 위해서 중요한 역할을 하는 전사 요소(transcription factor)이다. 많은 종류의 박테리아나 바이러스가 NF-κB 활성화를 유도하며 그렇게 활성화된 NF-κB는 여러 타깃 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(9). NF-κB는 Rel-homology domains(RHDs)을 포함하는 dimeric transcription factor로 모두 다섯 종류의 NF-κB families(RelA(p65), RelB, C-Rel, p105(NF-κB1; a precursor of p50) 및 p100(NF-κB2; a precursor of p52))가 포유동물 세포 안에서 homo- 또는 hetero-dimers를 형성해서 존재한다(10). 병원균들의 자극에 의하여 NF-κB가 활성화되면 염증(inflammation)을 유도하여 여러 질병을 일으키게 된다. 그래서 NF-κB 활성화를 미리 막을 수만 있다면 COX-2, iNOS와 같은 염증 유전자 생성물들을 줄여서 여러 질병으로부터 숙주를 보호할 수 있게 되는 것이다.

먼저 우리는 계란 OVM와 다른 알레르겐 histamine이 NF-κB 활성화에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 10 µg/mL의 OVA는 2배 정도 그리고 100 µg/mL OVA는 5배 이상의 NF-κB 활성화를 유도하였으나, OVM와 histamine은 NF-κB 활성화를 유도하지 못하였다(Fig. 1A-C). 이 실험에서는 양성반응 대조군으로 Toll-like receptor 4 agonist인 LPS가 사용되었으며, LPS 또한 NF-κB 활성화를 유도하였다(Fig.1A). 또한 OVA는 NF-κB inhibitor인 IκBα 분해를 유도하였다(Fig.1D). 또한 ovalbumin에 의한 세포독성실험

을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)의 formazan으로의 전환에 근거로 한 cell viability assay에 의해 실행하였다. 100 µg/mL ovalbumin의 농도까지 cell viability에 영향을 주지 않았다(Fig. 1E).

다음 실험으로 OVA이 NF-κB활성화에 의해서 유도되는 유전자인 COX-2와 iNOS의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 이 실험을 위해서 COX-2, iNOS 발광효소 유전자 분석과 Western blotting 방법이 사용되었다. 10 µg/mL의 OVA 농도부터 4배 이상의 COX-2의 발현을 증가시켰다(Fig. 2). 또한 10 µg/mL의 OVA는 40배 이상의 iNOS의 발현을 증가시켰다(Fig. 3). 이러한 결과들은 OVA의 알레르기 반응이 NF-κB 신호전달 체계를 통한 COX-2와 iNOS의 발현과 연관되어 있다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있겠다.

염증(inflammation)은 여러 분자화학적 기전에 의해서 유도되는데, 그 중에서도 두 가지 중요한 반응에 의해서 일어난다. 하나는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의한 nitric oxide의 생산이고, 다른 하나는 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의한 prostaglandins(PGs)의 생성이다(11,12). NOS는 NO의 생산과 함께 L-arginine을 L-citrulline으로 전환을 촉매하는 효소이며, COX는 peroxidation에 의해서 arachidonic acid로부터 PG를 합성하는 효소이다(13). 1971년 Vane이 aspirin과 그 것에 연관된 약물이 PG 합성을 억제하여 항염증 효과를 가지고 있다는 것을 발견한 이래로 많은 물질들이 PG 합성을 위한 억제제로써 뿐만 아니라 항염증 성질을 가지고 있는지 탐구하도록 많은 연구자들을 자극하였다. COX-2 억제제는 잠재적으로 부작용이 있음에도 불구하고 항염증제로서 광범위하게 사용되고 있는 반면에, iNOS 억제제는 치료목적으로 현재 널리 사용되지는 않고 있다(11,12,14). Aspirin과 같은 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAID)에 의한 PG 합성의 억제는 COX에 의한 arachidonic acid 대사의 억제에 기인한다고 알려져 있으며, COX는 적어도 두 개의 isoforms인 COX-

1과 COX-2로 존재한다고 알려져 있다. COX-1은 거의 모든 세포나 조직에서 항상 발현되며 신장(kidney)에서 위장관 세포보호 작용(gastrointestinal cytoprotection)과 전해질 항상성(electrolyte homeostasis)과 같은 중요한 생리적 과정을 조절하는 것으로 알려져 있는 반면 COX-2의 발현은 염증을 유발하는 요소에 의해서 커다랗게 증가되는 것으로 알려져 있다(15). NSAID에 의한 독성 효과 중에서 많은 것은 COX-1의 억제에 기인한다고 알려져 있는 반면 치료효과는 COX-2의 억제에 기인한다고 알려져 있다(16). 이러한 사실은 많은 제약회사들에게 NSAID의 개발에 있어서 COX-2 억제제를 개발하도록 유도하였으며, 현재까지 많은 COX-2 억제제가 개발되었다. 특히 여러 agonist에 의해서 유도된 COX-2 발현을 억제하는 것이 밝혀졌다(17-19).

현재까지 알려진 바에 의하면 상업적으로 이용 가능한 OVA에는 LPS와 같은 endotoxin이 포함되어 있다고 알려져 있다. 그러므로 이 실험에서 OVA에 의해서 유도된 COX-2, iNOS의 발현은 OVA에 포함된 endotoxin에 의해서 유도된 것일 수도 있다. 그래서 우리는 대조군으로 같은 계란 추출물인 OVM에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화를 살펴보았다. 같은 계란 추출물인 OVM에도 endotoxin이 포함되어 있을 것이지만 OVM은 NF- $\kappa$ B의 활성화를 유도하지 못하였다. 이러한 모든 결과를 살펴볼 때 계란 알러젠인 OVA는 endotoxin의 유무에 상관없이 NF- $\kappa$ B의 활성화와 COX-2, iNOS의 발현을 유도한다고 볼 수 있겠다.

## 요 약

음식 알러지는 만성적인 장애를 일으킬 수 있는 즉각적이며 잠재적으로 생명을 위협하는 반응이다. 이 중 계란은 알러지 위험성이 높은 물질로, 아이들에게 음식 알러지를 유발하는 흔한 물질로 알려져 있다. 계란 알러젠 중에서 계란 흰자 단백질인 OVA이 주요한 알러젠으로 알려져 있다. 우리는 이번 연구에서 OVA이 염증 및 면역 반응에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 NF- $\kappa$ B 활성화와 COX-2와 iNOS 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. OVA은 NF- $\kappa$ B 활성화와 COX-2와 iNOS의 발현을 증가시켰다. 이러한 연구는 앞으로 계란 알러젠에 의한 알러지 작용기전 규명 및 알러지 치료제 개발에 중요한 역할을 할 것으로 기대한다.

## 문 헌

1. Wang J, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 1: 19-29 (2009)
2. Eggesbo M, Botten G, Halvorsen R, Magnus P. The prevalence of allergy to egg: A population-based study in young children. *Allergy* 56: 403-411 (2001)
3. Imai T, Iikura Y. The national survey of immediate type of food allergy. *Arerugi* 52: 1006-1013 (2003)
4. Mine Y, Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: Basic, industrial, and clinical perspectives. *J. Agr. Food Chem.* 56: 4874-4900 (2008)
5. Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem. Pharmacol.* 72: 62-69 (2006)
6. Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J. Immunol.* 175: 3339-3346 (2005)
7. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem. Pharmacol.* 72: 850-859 (2006)
8. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Auranofin, as an anti-rheumatic gold compound, suppresses LPS-induced homodimerization of TLR4. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 350: 866-871 (2006)
9. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866 (1999)
10. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13: 460-469 (2007)
11. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 53: 35-57 (2002)
12. Moncada S. Nitric oxide: Discovery and impact on clinical medicine. *J. Roy. Soc. Med.* 92: 164-169 (1999)
13. Murakami A, Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer* 121: 2357-2363 (2007)
14. Flower RJ. The development of COX2 inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 179-191 (2003)
15. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol.* 38: 97-120 (1998)
16. Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J. Med. Food* 8: 125-132 (2005)
17. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat. Res.* 480: 243-268 (2001)
18. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* 3: 768-780 (2003)
19. Khanna D, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7: 344-351 (2007)