

# 만성폐쇄성폐질환에서 상피중간엽이행 조절을 통한 Celecoxib의 폐 손상 개선효과

이선경  
동강대학교 임상병리학과 교수

## Effect of Celecoxib on Lung Injury Improvement by Controlling Epithelial-Mesenchymal Transition(EMT) in Chronic Obstructive Pulmonary Disease(COPD)

Sun-Kyung Lee  
Professor, Dept. of Biomedical Laboratory Science, Donggang University

**요약** 본 연구는 만성폐쇄성폐질환(COPD)의 동물 모델을 이용하여 Celecoxib의 폐 손상 개선효과를 연구하였다. COPD는 LPS와 담배연기추출물(CSE)로 유도하여 in vitro와 in vivo에서 병행 연구하였다. In vitro는 인간 섬유아 세포(MRC5)에서 MTT assay, real-time PCR를 하였고 in vivo는 mRNA 발현, 기관지폐포세척액(BALF), collagen content, 단백질을 발현을 확인하였다. 실험을 통해 Celecoxib는 BALF에서 염증세포 수의 감소와 사이토카인, soluble protein의 축적을 감소시켰고 동물모델에서는 체중과 폐 무게를 감소시켰으며, 폐 콜라겐 축적도 개선하였다. 또 웨스턴 블로팅과 real-time PCR을 통해 EMT 표지자의 감소를 확인하였다. 결과적으로 Celecoxib는 EMT를 조절하여 LPS+CSE로 유도된 COPD의 폐 손상에서 개선제로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

**주제어** : 만성폐쇄성폐질환, 상피중간엽이행, 셀렉코시브(Celecoxib), 비스테로이드성 항염제, 염증

**Abstract** This study confirmed the effects of improving lung damage of celecoxib using an animal model of chronic obstructive pulmonary disease(COPD). It was induced in models LPS + CSE and performed in vitro and in vivo. MTT assay and real-time PCR were performed in MRC5 cells as in vitro, and mRNA expression, BALF, collagen content, and protein expression were confirmed as in vivo. Celecoxib reduced the number of inflammatory cells, cytokine and soluble protein accumulation in BALF, decreased body weight and lung weight in animal models, and improved lung collagen deposition. In addition, the reduction of EMT markers was confirmed through Western blotting and real-time PCR. Consequently, celecoxib is thought to improve lung damage of COPD induced to LPS+CSE by regulating EMT.

**Key Words** : COPD, EMT, Celecoxib, NSAID, Inflammation

### 1. 서론

만성폐쇄성폐질환(Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD)은 국내 40대 이상에서 발병률이 13.4%로 10대 사망 원인 중 8위에 해당하는 질환이며 기류 제한 및 폐포벽이 파괴되고 만성 염증 반응

을 보이는 것이 특징이다[1,2]. 현재 COPD의 약물치료제로는 항콜린제, 메틸잔틴 등의 기관지확장제나 스테로이드 제제 등을 주로 사용하고 있으나, 부작용이 따르며 소기도나 폐실질의 염증에 직접적으로 작용하지 못하여 염증반응 개선 효과는 부족한 것으로 보고되었다[2]. COPD를 발생시키는 가장 중요한 원인으로

\*Corresponding Author : Sun-Kyung Lee(pathoq@hanmail.net)

Received September 30, 2021

Accepted November 20, 2021

Revised November 2, 2021

Published November 28, 2021

흡연을 들 수 있는데 담배연기나 담배연기 추출물이 다양한 경로를 통해 염증, 폐섬유증, 산화스트레스 및 상피중간엽이행(Epithelial-mesenchymal transition; EMT)을 유도하여 폐기능 손상을 가져온다고 알려져 있다[3-5].

이 중 EMT는 흡입가스에 의한 자극으로 폐포의 상피세포가 근섬유아세포로 표현형이 전환되는 현상으로 세포손상에 따른 사이토카인의 분비로 유도되는데 TGF- $\beta$ 1(Transforming growth factor)이 대표적이다. 더불어 vimentin,  $\alpha$ -SMA(smooth muscle actin) 및 콜라겐의 비정상적인 축적이 증가되어 COPD를 유도한다. 비스테로이드성 항염제(Non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAID)는 폐암, 위암, 결장암 및 방광암의 하위 집합에서 세포간 부착분자인 E-cadherin 발현을 회복시켜 EMT를 조절한다고 보고되었다[6-9]. 그러나 EMT 및 COPD에서 비스테로이드성 항염제에 의한 사이토카인, 콜라겐 축적 및 E-cadherin 발현 조절에 대한 효과 연구는 부족한 실정이다.

연구에 사용된 Celecoxib는 NSAID 종류 중 하나 이면서 COX-2의 선택적 억제제로 대장암, 난소암, 류머티스 관절염, 골관절염 등에서 항암 및 항염작용에 대한 효과가 알려져 있다. 따라서 본 연구는 *in vitro*와 *in vivo*를 병행하여 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS)와 담배연기추출물(Cigarette smoke extract, CSE)로 유도된 EMT 및 COPD 모델에서 COX-2에 선택적 NSAID 중 하나인 Celecoxib를 처리하여 사이토카인, EMT 표지자(TGF- $\beta$ 1, Collagen 1, vimentin,  $\alpha$ -SMA) 및 E-cadherin의 조절 효과를 확인하여 폐손상 개선제로서의 사용 가능성을 연구하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료

Celecoxib는 GIBCO(Grand Island, NY, USA)에서 구매하였으며, 담배연기추출물(Cigarette smoking extract, CSE)은 Murty Pharmaceuticals, Inc. (Lexington, USA)에서 구매하였고, 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS)는 List Biological Laboratories, Inc.(Campbell CA, USA)에서 구매하였다. 1차 항체로 사용한 E-cadherin과 vimentin은 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서

구입하였고,  $\alpha$ -SMA, Collagen I, TGF- $\beta$ 1는 cam, Inc.(Cambridge, UK)에서 구입하였다. GAPDH와 2차 항체(IgG-conjugated horseradish peroxidase, HRP)는 Bethyl(TX, USA)에서 구입하였다.

### 2.2 세포 배양

인간 폐섬유아세포(human lung fibroblast, MRC5)는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 세포 배양을 위해 100 units/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 10% calf serum이 포함된 DMEM 배지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에 배양 하였다. MRC5 세포에는 LPS(1  $\mu$ g/mL) + CSE(200  $\mu$ g/mL)와 Celecoxib(150  $\mu$ g/m)을 처리하였다.

### 2.3 동물 및 COPD 모델 제작

7주령의 C57BL/6 계열 암컷 생쥐(8 ~ 10마리)를 대상으로 HEPA 여과된 공기(12 시간 주/야 조절)와 식량 및 물에 자유롭게 접근할 수 있는 케이지에 보관 되었다(Samtako, Osan, Korea). COPD는 LPS와 CSE를 이용한 모델을 제작하여 실험을 진행하였다. 동물모델은 3개의 그룹으로 나누어 실험하였다.

- (1) 정상군 : 인산완충액(phosphate buffer saline, PBS) 투여
- (2) COPD 유도한 대조군 : LPS + CSE 투여
- (3) Celecoxib 투여군 : LPS + CSE 투여 후 Celecoxib 투여

LPS + CSE 그룹은 1 mg의 CSE(25  $\mu$ l로 PBS에 희석)를 매일 비강 투여하고 10  $\mu$ g의 LPS(50  $\mu$ l로 PBS에 희석)를 2주간 주 1회 기관 내 투여하였다. 그 후, Celecoxib 20 mg/mL을 2 주간 경구 투여하였다.

### 2.4 세포 생존률(MTT assay) 측정

MRC5 세포를 96well plate에 1X10<sup>4</sup>으로 분주하고 24시간 후, Celecoxib을 0 ~ 4000  $\mu$ g/mL로 처리하였다. 24시간 후, MTT 시약을 처리하고 4시간 반응시킨 뒤, 배지를 제거하고 DMSO를 처리하였다. 흡광광도계(microplate reader, Titertek Multiskan; Flow Laboratories, North Ryde, New South Wales, Australia)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5 체중 및 폐 중량 측정

체중은 COPD 동물 모델에서 Celecoxib 투여 전과 투여 후 일주일 간격으로 측정하였고, 폐의 중량은 실험이 종료 된 후 최종 무게를 측정하였다.

2.6 Real-time PCR 측정

세포와 폐조직의 mRNA(TGF-β1, collagen I, α-SMA, E-cadherin, vimentin)를 측정하기 위해 SYBR Green system(Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여 합성된 cDNA의 Real-time PCR을 측정하였고, 사용된 primer는 Table 1과 같다. Denaturation은 95℃에서 10분간 한번, annealing은 95℃에서 5초, elongation은 60℃에서 30초간 수행하였는데 이를 40번 반복하였다. 또 Melting은 55℃부터 95℃까지 천천히 온도를 올리며 수행하였다.

사용된 MRC5 세포는 LPS(1 μg/ml)와 CSE(200 μg/ml)를 분주하고 Celecoxib(150 μg/ml)을 처리 및 무처리하여 48시간 후 확인하였고 폐조직은 동물 모델에서 채취하여 real-time PCR을 확인하였다.

Table 1. Primer sequences used for RT-qPCR

Gene	Forward(5'-3'), Reverse(3'-5')
human TGF-β1	F - AAGGACCTCGGCTGGAAGTG R - CCGGGTTATGCTGGTTGTA
human collagen-I	F - CAGCCGCTTACCTACAGC R - TTTTGTATTCAATCACTGTCTT
human α-SMA	F - CCGACCGAATGCAGAAGGA R - ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA
human E-cadherin	F - CCACCAAAGTCACGCTGAAT R - GGAGTTGGGAAATGTGAGC
human vimentin	F - GAGAAGCTTTGCCGTTGAAGC R - CTCGAATGTCAAGGGCCATCT
human GAPDH	F - GACAGTCAGCCGCATCTTC R - CAACAATATCCACTTTACCAG
mouse TGF-β1	F - ACCTGCAAGACCATCGACATG R - CGAGCCTTAGITTTGGACAGGA
mouse collagen I	F - ACGGCTGCACGAGTCACAC R - GGCAGGCGGAGGTCCTT
mouse α-SMA	F - CTGACAGAGGCACCACTGAA R - CATCTCCAGAGTCCAGCACA
mouse E-cadherin	F - GGTTTTCTACAGCATCACCG R - GCTTCCCCATTTGATGACAC
mouse vimentin	F - GAAATTGCAGGAGGAGATGC R - TCCACTTTCCGTTCAAGGTC
mouse GAPDH	F - AGGTCCGTTGTGAACGGATTGT R - GGCCTCACCCATTTGATGT

2.7 웨스턴 블로팅(Western blotting)

실험이 종료 후 폐 조직 및 세포를 얻어 RIPA Lysis 시약(ATTO, Tokyo, Japan)를 사용하여 단백질을 추

출하였다. 이를 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분석한 다음 분획된 단백질들을 PVDF (polyvinylidene difluoride membranes) 멤브레인에 옮기고 단백질들이 옮겨진 PVDF 멤브레인을 1X TBST에 5% skim milk로 희석한 블로킹 완충용액에서 1시간 동안 흔들며 블로킹시킨 다음, 1차 항체인 anti-TGF-β1 antibody, anti-Collagen I antibody, anti-α-SMA antibody, anti-E-cadherin antibody, anti-vimentin antibody를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 2차 항체(IgG-conjugated horseradish peroxidase(HRP))를 블로킹 완충용액에 2000배 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 세척된 멤브레인에 ECL(Amersham, Buckinghamshire, UK)로 반응시켜 확인하였다.

2.8 면역세포화학검사(Immunocytochemistry)

MRC5 세포에 LPS와 CSE를 처리한 COPD 유도군과 Celecoxib 처리군에서 세포내에 TGF-β1과 collagen I의 발현 변화를 확인하기 위해 면역세포화학검사를 하였다. MRC5 세포를 chamber slide에 분주하고 24시간 후, LPS(5 μg/ml) + CSE(300 μg/ml)와 Celecoxib (150 μg/ml)을 처리하였다. 48시간 후, 4% 포르말데하이드로 2분간 고정하고 PBS로 5분씩 3번 세척하였다. 5% 정상 혈청으로 1시간 동안 blocking하고 1차 항체인 anti-TGF-β1, anti-Collagen I를 4℃에서 반응시켰다. PBS로 5분씩 3번 세척하고 2차 항체인 DyLight 488-conjugated goat anti-rabbit IgG(Bethyl, TX, USA)를 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 5분씩 3번 세척하고 핵을 DAPI로 염색하여, 형광현미경(ECLIPSE Ti; Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

2.9 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)

마우스 실험을 종료 후, 마우스의 기도부위 피부를 절개하고 기도를 노출시켜 기관 내로 PBS 800 μl를 넣어 세척하여 500 μl를 다시 회수하고 4℃, 1,200 rpm, 5분간 원심분리한 후, 상층액을 얻었다. 상층액은 따로 보관하고, BALF에서 분리한 세포는 기관지폐포 세척액 50 μl과 sircol 시약 1 ml을 30분간 혼합한다. 4℃,

12,000 rpm으로 10분간 원심분리 후, 상층액은 버리고, Diff-Quik 시약을 사용하여 세포수를 측정하였다. 세포수는 총 세포수(total cells)를 확인하고 림프구(lymphocytes)와 대식구(macrophages)의 세포수를 측정하였다.

### 2.10 사이토카인(Cytokine) 측정

BALF 내의 IL-6(BD, san Diego), IL-1 $\beta$ (BD, san Diego) and TNF- $\alpha$ (eBioscience, USA)의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 수행하였다. 흡착항체를 완충액에 혼합하여 각 well당 100  $\mu$ l씩 넣고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시킨 후, 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 반응 희석액을 well당 200  $\mu$ l씩 넣고, 실온에서 1시간 동안 블로킹을 한 후, 세척 완충액으로 4회 세척하였다. 각 실험군의 혈청 및 standard를 반응 희석액에 2-10배의 농도로 희석한 후, 각각의 흡착항체로 coating된 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 세척 완충액으로 4회 세척하고, biotin- conjugate antibody reagent를 각각의 well에 100  $\mu$ l씩 처리하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 4회 세척하고, streptavidine-HRP solution을 각 well에 100  $\mu$ l씩 처리하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 다시 4회 세척하였다. 여기에 기질액을 100  $\mu$ l씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후, 50  $\mu$ l의 stop solution을 처리하여 반응을 종결시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.11 Soluble collagen 측정

Soluble collagen에 대한 Celecoxib의 효과를 확인하기 위해, BALF에서 sircol assay를 수행하였다. BALF 50  $\mu$ l과 sircol 시약 1 ml을 30분간 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여, 상층액은 버리고, Acid-salt 세척액 750  $\mu$ l넣어 세척해준 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액은 버리고 Alkali 시약을 1 ml 넣어 풀어준 후, 555 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.12 통계분석

각 실험은 3회 이상 수행되었으며 모든 값은 샘플의 평균  $\pm$  SD로 표시하였다. 각 군 간의 차이는 one way-ANOVA 분석 후 대응 t-test로 통계적 유의성을

결정하는 데 사용되었고  $p < 0.05$ 의 값은 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 3. 연구 결과

### 3.1 Celecoxib가 세포 생존율에 미치는 영향

인간 폐섬유아세포인 MRC5에 Celecoxib를 0 ~ 4000  $\mu$ g/ml 농도로 처리하여 세포 생존율을 측정한 결과, 250  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다( $p < 0.05$ ). 따라서 이후의 *in vivo* 실험은 무독성 범위에 있는 150  $\mu$ g/ml 농도를 선택하여 실험을 진행하였고 반복 측정한 각 군 간의 차이는 one way-ANOVA 분석 후 t-test로 통계적 유의성을 결정하였다. 결과는 Fig. 1과 같다.

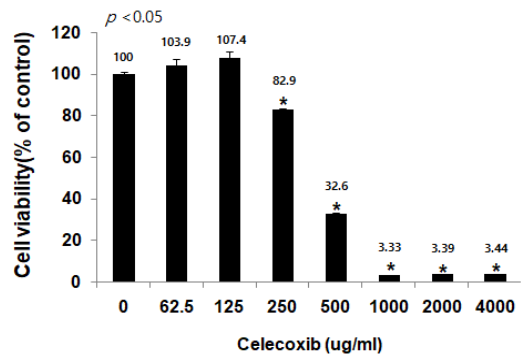


Fig. 1. Effects of Celecoxib on cell viability.

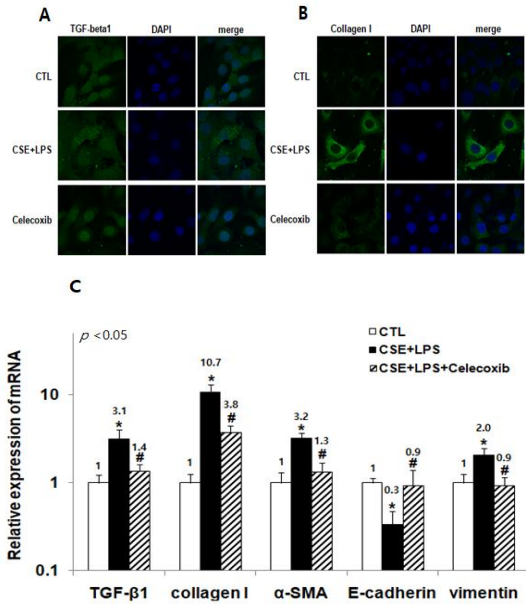
The data provided are the mean SD of the values obtained from three independent experiments. ANOVA, \* $p < 0.05$  versus the control.

### 3.2 LPS와 CSE에 의해 유도된 세포의 COPD모델에서 Celecoxib의 EMT 억제 효과

MRC5 세포에 LPS와 CSE 처리 후 면역세포화학검사를 통해 DAPI 염색하여 대조군에 비해 TGF- $\beta$ 1과 collagen I 발현이 증가되어 EMT 및 COPD 유도를 확인하였고 이후 처리한 Celecoxib에 의해 증가된 TGF- $\beta$ 1과 collagen I의 발현 억제 효과를 확인하였다. 결과는 Fig. 2A, 2B와 같다.

또 MRC5 세포에서 LPS와 CSE를 분주하고 Celecoxib(150  $\mu$ g/ml)을 처리 및 무처리하여 48시간 후, real-time PCR을 수행하였다. 결과는 LPS와 CSE에 의해 증가되었던 TGF- $\beta$ 1, collagen I,  $\alpha$ -SMA, vimentin의 mRNA 발현이 Celecoxib 처리군에서 감

소하였고, LPS와 CSE에 의해 감소했던 E-cadherin의 mRNA 발현이 Celecoxib 처리군에서 증가하였다. Fig. 2C에서와 같이 각각의 mRNA 발현은 LPS+CSE 실험군에서 음성대조군에 비해 유의하게 증가 및 감소하였고(\* $p < 0.05$ ), Celecoxib 처리군에서 LPS+CSE 실험군에 비해 유의하게 감소 및 증가하였다(# $p < 0.05$ ).

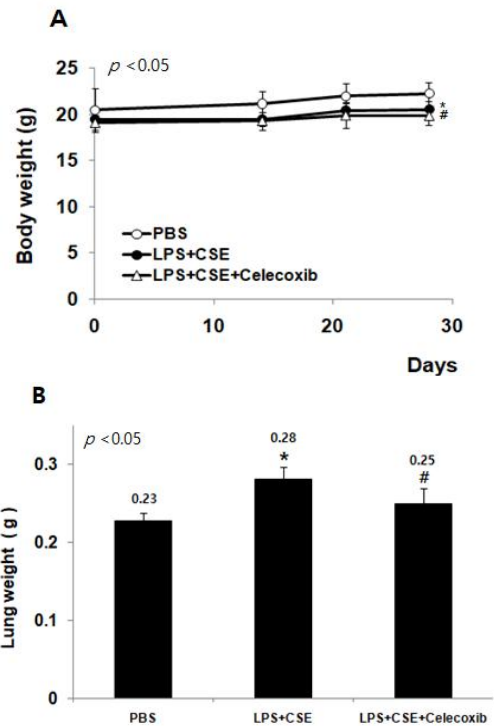


**Fig. 2. Inhibitory Effect of epithelial mesenchymal transition of celecoxib in the COPD model of cells induced by LPS and CSE.**

Data are presented as mean ± SD, n=5. \* $p < 0.05$ , compared with the PBS group. # $p < 0.05$ , compared with the CSE+LPS group

### 3.3 동물모델에서 Celecoxib가 동물의 몸무게 및 폐의 무게에 미치는 영향

LPS와 CSE에 의해 유도된 COPD 모델에서 Celecoxib의 효과를 확인하기 위해 1 mg의 CSE를 매일 비강 투여하고 10 μg의 LPS를 2주간 주 1회 기관내 투여하였으며, Celecoxib 20 mg/ml를 2주간 경구 투여하였다. 결과는 각 그룹간 생쥐의 무게는 큰 차이가 없었고, 정상군과 비교하여 LPS와 CSE에 의해 증가했던 폐의 무게가 Celecoxib 처리군에서 감소하였다. 이러한 결과는 Fig. 3A, 3B에 제시하였다.



**Fig. 3. Effects of celecoxib on animal weight and lung weight in animal models.**

Data are presented as mean ± SD, n=5. \* $p < 0.05$ , compared with the PBS group. # $p < 0.05$ , compared with the CSE+LPS group

### 3.4 LPS와 CSE에 의해 유도된 동물의 COPD 모델에서 Celecoxib의 EMT 억제 효과

Celecoxib가 LPS와 CSE에 의해 유도된 EMT에 미치는 영향을 확인하기 위해 real-time PCR과 western blot을 통해 mRNA와 protein 발현을 측정하였다. LPS와 CSE에 의해 증가했던 TGF-β1, collagen I, α-SMA, vimentin의 mRNA 발현이 Celecoxib 처리군에서 감소하였고, LPS와 CSE에 의해 감소했던 E-cadherin의 mRNA 발현이 Celecoxib 처리군에서 증가하였다( $p < 0.05$ ). mRNA 조절 패턴과 단백질 발현 결과가 유사하게 나타났으며 이러한 결과는 Fig. 4A, 4B에 제시하였다.

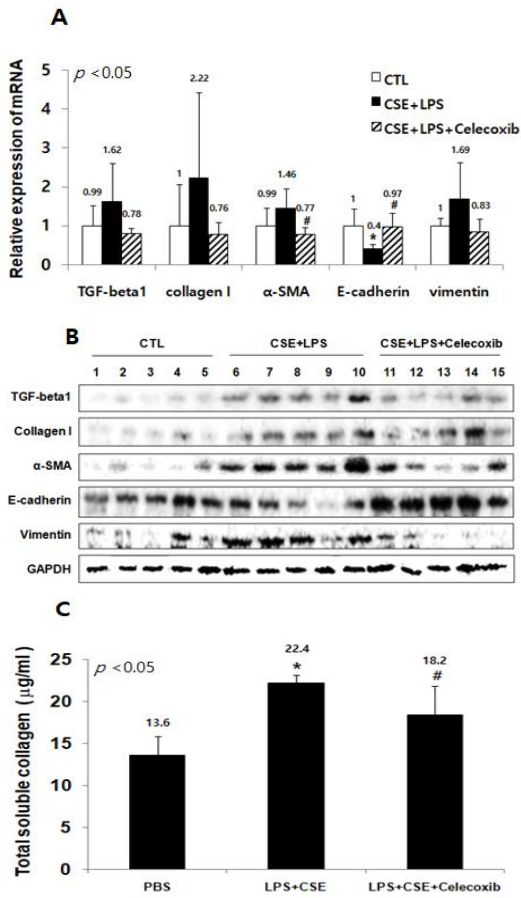


Fig. 4. The inhibitory effect of celecoxib on EMT and soluble collagen in the COPD model of animals induced by LPS and CSE.

Data are presented as mean ± SD, n=5. \* $p < 0.05$ , compared with the PBS group. # $p < 0.05$ , compared with the CSE+LPS group

### 3.5 LPS와 CSE에 의해 유도된 COPD 동물모델에서 Celecoxib의 soluble collagen 억제 효과

EMT는 collagen의 비정상적인 축적이 특징이므로 BALF에서 Soluble collagen에 대한 Celecoxib의 효과를 확인하였다. Fig. 4C에서와 같이 정상군에 비해 LPS와 CSE에 의해 증가했던 soluble collagen이 Celecoxib 처리로 감소하였다( $p < 0.05$ ).

### 3.6 LPS와 CSE에 의해 유도된 동물의 COPD모델에서 Celecoxib의 폐 염증 억제 효과

LPS와 CSE에 의해 유도된 폐 염증에 대한 Celecoxib의 효과를 확인하기 위해, BALF에서 염증세

포의 수를 측정하였다. 결과는 Fig. 5A-C과 같이 정상군에 비해 LPS와 CSE에 의해 증가했던 총 세포수, 대식구, 림프구가 Celecoxib 처리 시 약간 감소하였고 이후, BALF에서 염증성 cytokines(TNF- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-6(interleukin-6), IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ))을 측정하였는데 정상군에 비해 LPS와 CSE에 의해 증가한 발현이 Celecoxib에 의해 감소되었다( $p < 0.05$ ).

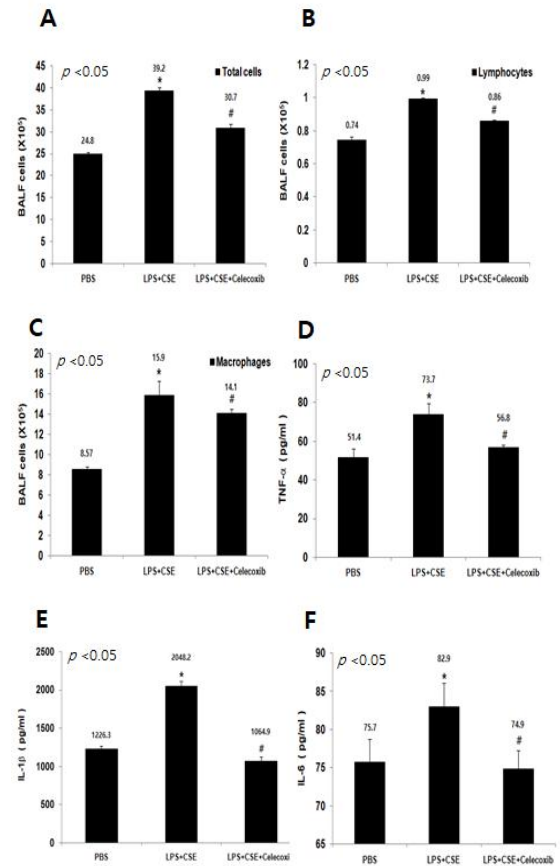


Fig. 5. The inhibitory effect of Celecoxib on pulmonary inflammation in COPD models in animals induced by LPS and CSE.

Data are presented as mean ± SD, n=5. \* $p < 0.05$ , compared with the PBS group. # $p < 0.05$ , compared with the CSE+LPS group

## 4. 고찰

COPD는 유해한 입자나 가스 등의 흡입으로 인해 폐의 염증 및 기도 폐쇄를 특징으로 하는 질환이다. COPD를 유발하는 가장 중요한 위험인자는 흡연이며,

이외에도 화학물질, 미세먼지 등이 관여한다고 알려져 있다[2, 10]. 이에 본 연구에서는 LPS와 CSE를 이용한 COPD 모델을 제작하여 실험을 진행하였다. 폐에 염증은 COPD 초기 단계에 유도되며 이후 세포증식, 점액과다 분비, 섬유증이 나타난다[11,12]. IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  등과 같은 염증성 사이토카인 및 케모카인이 COPD 조절에 관여한다고 알려져 있다[13,14]. 각 사이토카인의 작용을 살펴보면 TNF- $\alpha$ 는 IL-8을 유도시켜 호중구가 증가하고, 증가한 호중구에 의해 엘라스타제와 같은 단백질 분해 효소가 분비되어 폐포벽이 파괴된다[15-17]. 활성화된 TGF- $\beta$ 는 기도 주변 섬유증을 형성하고, 폐 조직 재형성에 관여한다[18,19]. IL-6는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 에 의해 자극되어 상피세포, 섬유아세포와 같은 비 염증성 세포의 기능에 작용한다[20]. 실험 결과를 통해 LPS와 CSE를 처리했을 때, 기도주변으로 콜라겐이 축적되고, 폐 중량이 증가하는 것을 확인하였으며 Celecoxib 투여군에서 개선되는 것을 확인하였다. 또한, 증가된 염증성 cytokine인 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 발현이 Celecoxib 투여군에서 감소하였다.

EMT는 상처 치유, 종양 형성 및 다양한 섬유증에 관여한다고 알려져 있다[21, 22]. 다시 말해 EMT는 세포 외 기질 단백질을 방출하여 섬유아세포가 되어가는 과정이라고 할 수 있다. 이러한 섬유아세포가 상피를 자극하여 EMT를 유도하고 기도 협착 및 기류 형성에 작용한다고 판단되어진다[22,23]. 흡연에 의해 COPD가 진행되면 기저막에서  $\alpha$ -SMA가 증가하고, 기도 상피내에 vimentin의 발현이 증가하여 EMT가 활성화 된다고 보고되었다[24]. 본 연구에서는 LPS와 CSE에 의해 유도된 COPD에서 EMT가 관련이 있는지 확인하기 위해, COPD 동물 모델의 조직을 이용하여 real-time PCR과 western blot 수행하였다. LPS와 CSE에 의해 EMT 관련 표지자(TGF- $\beta$ 1, collagen I,  $\alpha$ -SMA, vimentin) 발현이 증가하였고, 세포간 부착분자인 E-cadherin은 감소되어 EMT에 의한 COPD 유도가 확인되었다. 이에 COX-2에 선택적 비스테로이드 항염제 (NSAID)로 알려진 Celecoxib를 처리한 군에서 관련 표지자의 발현 감소와 E-cadherin의 발현이 증가되었다. *In vitro*에서도 같은 결과를 보여주는지 확인하기 위해, 섬유아세포인 MRC5 세포를 이용하여 실험을 진행하였는데, 역시 *in vivo*와 같은 결과를 보여주었다.

본 연구는 LPS와 CSE에 의한 COPD 모델에서 *in vitro*와 *in vivo*를 통해 Celecoxib의 억제 기전을 확인하였다. Celecoxib는 LPS와 CSE에 의해 증가된 사이토카인을 감소시켜 염증을 억제하고, EMT의 표지자인 TGF- $\beta$ 1, collagen,  $\alpha$ -SMA 및 vimentin의 발현 증가를 감소시키고 E-cadherin을 증가시켜 상피의 섬유아세포로의 표현형 전환을 조절하여 폐 손상을 개선하는 것으로 나타났다.

## 5. 결론

본 연구는 흡연 등의 흡입가스 자극에 의해 증가한 TGF- $\beta$ 1에 의해 유도되는 EMT에서 NSAID 중 하나인 Celecoxib의 관련성을 확인하고 이러한 결과가 COPD에 미치는 영향을 연구하기 위해 수행하였다. LPS와 담배연기추출물에 의한 COPD 모델을 제작하여 *in vitro*와 *in vivo*를 통해 Celecoxib의 억제 기전을 확인하였다. 결과적으로 Celecoxib는 LPS와 담배연기추출물에 의해 유도된 염증반응을 억제하였고, EMT를 조절하여 COPD에 의한 폐 손상 개선제로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- [1] M. Xie, X Liu, X Cao, M Guo & X Li. (2020). Trends in prevalence and incidence of chronic respiratory diseases from 1990 to 2017. *Respir Res*, 21(1), 49.
- [2] I. Tsiligianni, E. Metting, T. van der Molen, N. Chavannes & J. Kocks. (2016). Morning and night symptoms in primary care COPD patients: a cross-sectional and longitudinal study. An UNLOCK study from the IPCRG. *NPJ Prim Care Respir Med*, 26, 16040.
- [3] J. Milara, T. Peiró, A. Serrano & J. Cortijo. (2013). Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. *Thorax*, 68, 410-420.
- [4] R. Chatterjee & J. Chatterjee. (2020). ROS and oncogenesis with special reference to EMT and stemness. *Eur J Cell Biol*, 99, 151073.
- [5] J. X. Jiang et al. (2017). Rac1 signaling regulates cigarette smoke-induced inflammation in the lung via the Erk1/2 MAPK and STAT3 pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1863(7), 1778-1788. DOI : 10.1016/j.bbdis.2017.04.013

- [6] D. G. Menter, R. L. Schilsky & R. N. DuBois. (2010). Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Clin. Cancer Res*, 16, 1384-1390.
- [7] T. H. Chu. (2014). Celecoxib suppresses hepatoma stemness and progression by up-regulating PTEN. *Oncotarget*, 5, 1475-1490.
- [8] P Venkatesan. (2011). The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomaterials*, 32, 3794-3806.
- [9] D. Chakraborty. (2011). Dopamine stabilizes tumor blood vessels by up-regulating angiopoietin 1 expression in pericytes and Kruppel-like factor-2 expression in tumor endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 20730-20735.
- [10] K. H. Yoo, Y. S. Kim & S. S. Sheen. (2011). Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Korea: the fourth Korean National Health and Nutrition Examination Survey, 2008. *Respirology*, 16(4), 659-665.
- [11] J. C. Hogg, F Chu & S Utokaparch. (2004). The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine*, 350(26), 2645-2653.
- [12] A. Butler, G. M. Walton & E. Sapey. (2018). Neutrophilic inflammation in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 15(4), 392-404.
- [13] P. J. Barnes. (2009). The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(6), 631-638.
- [14] M. Rincon & C. G. Irvin. (2012). Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1281-1290.
- [15] V. M. Keatings, P. D. Collins, D. M. Scott & P. J. Barnes. (1996). Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 153(2), 530-534.
- [16] P. J. Barnes. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(3), 183-192.
- [17] G. G. Brusselle, G. F. Joos & K. R. Bracke. (2011). New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 378(9795), 1015-1026.
- [18] J. C. Hogg & W. Timens. (2009). The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 435-459.
- [19] A. Soltani, S. Sohal, S. Weston, R. Wood-Baker & E. H. Walters. (2012). Vessel-associated transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) is increased in the bronchial reticular basement membrane in COPD and normal smokers. *PLoS ONE*, 7(6), e39736.
- [20] M. Rincon & C. G. Irvin. (2012). Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1281-1290.
- [21] M. Javier, N. Rafael, J. Gustavo, P. Teresa, S. Adela & R. Mercedes. (2012). Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition. *Thorax*, 67(2), 147-156.
- [22] N. Kaosia, S. Sukhwinder Singh, P Gregory, P Rahul & H. W. Eugene. (2014). Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis, remodeling and cancer. *Expert Rev Respir Med*, 8(5), 547-559.
- [23] D. Bartis, N. Mise, R. Y. Mahida, O. Eickelberg & D. R. Thickett. (2014). Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax*, 69, 760-65.
- [24] Q. Wang, Y. Wang, Y. Zhang, Y. Zhang & W. Xiao. (2013). The role of uPAR in epithelial-mesenchymal transition in small airway epithelium of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res*, 14, 67.

## 이 선 경(Sun-Kyung Lee)

[정회원]



- 2003년 2월 : 원광대학교 보건학과 (보건학 석사)
- 2011년 2월 : 원광대학교 의학과 (의학학 박사)
- 2009년 3월 ~ 현재 : 동강대학교 임상병리학과 교수

- 관심분야 : 임상생리기능, 세포신호전달체계
- E-Mail : pathoq@hanmail.net