

# Attenuation of Anemia by Relma in LPS-Induced Inflammatory Response

Mi-Ran Lee\*

## Abstract

In this paper, we propose to evaluate the effect of resistin-like molecule alpha (Relma) on the progression of anemia of inflammation. Anemia of inflammation is a common feature of inflammatory disorders, including chronic kidney disease, infections, and rheumatoid arthritis. Relma is highly up-regulated in various inflammatory states, especially those involving asthma, intestinal inflammation, and parasitic diseases, and regulates the pathogenesis of those diseases. However, the role of Relma in anemia of inflammation is unknown. To explore the roles of Relma in anemia of inflammation *in vivo*, we generated mouse model of the disease by injecting 0.25 mg/kg lipopolysaccharides (LPS) intraperitoneally into Relma-deficient and wild-type (WT) mice daily for 10 days. Research data was expressed as differences between LPS-treated Relma-deficient and WT mice by a two-tailed non-parametric Mann-Whitney *U*-test using GraphPad InStat program. The results of the study are as follows: LPS-treated Relma-deficient mice had significantly ( $p < 0.05$ ) lower hemoglobin contents, hematocrit levels and red blood cell indices including mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin than WT controls. This decrease was accompanied by significant ( $p < 0.05$ ) increase in total white blood cell and monocyte counts in the blood. However, there was no significant difference in mRNA levels of hepatic hepcidin and renal erythropoietin between the two animal groups. Taken together, these results indicates that Relma deficiency exacerbates the anemia by increasing inflammation, suggesting therapeutic value of Relma in the treatment of anemia of inflammation.

▶ Keyword: Resistin-like molecule alpha, Anemia of inflammation, Lipopolysaccharide, Red blood cell, Hemoglobin, Hepcidin, Erythropoietin

## I. Introduction

적혈구는 우리 몸을 순환하면서 조직으로 산소를 공급해 주는 중요한 역할을 하는 세포이다. 적혈구의 감소는 빈혈이라는 질환을 유발하는데, 이 질환은 전 세계적으로 유병율과 사망률의 주요 원인이 된다고 알려져 있다[1]. 염증반응 빈혈(anemia of inflammation)은 만성 질환 빈혈(anemia of chronic disease)이라고도 알려져 있고, 빈혈 중에서 가장 발생 빈도수가 높은 철결핍성 빈혈 다음으로 흔히 발생하는 빈혈이다. 염증

반응 빈혈의 발병은 만성 신장 질환, 말라리아와 주혈흡충증과 같은 여러 만성 감염증, 류마티스 관절염과 같은 만성 염증성 질환, 악성종양 등 전신 염증을 유발하는 다양한 질환과 동반되어 나타난다[1-4].

염증반응 빈혈의 증상은 경한 빈혈에서부터 심한 빈혈까지 나타날 수 있는데, 대개의 경우 정구성(normocytic) 정혈색소성(normochromic)의 경증 혹은 중증도 빈혈을 나타낸다[5].

• First Author: Mi-Ran Lee, Corresponding Author: Mi-Ran Lee

\*Mi-Ran Lee (leemr@jwu.ac.kr), Dept. of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University

• Received: 2018. 10. 08, Revised: 2018. 10. 23, Accepted: 2018. 10. 24.

• This work was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (NRF-2015R1C1A2A01053571).

그러나 기저질환이 오래되거나 기저질환에 의한 발열, 체중감소, 신체장애 등의 증세가 있는 경우 심한 빈혈을 초래할 수 있으며, 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)와 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV)이 감소되는 소구성(microcytic) 빈혈이 관찰될 수 있다[5]. 빈혈은 그 자체로도 조직 내 산소운반을 유지하기 위해 심장의 과부하를 초래할 뿐만 아니라 예후를 불량하게 만들 수 있기 때문에 교정해 주어야 한다. 특히 염증반응 빈혈의 경우 중증도 이상의 빈혈은 기저질환의 치료를 어렵게 하고 사망률을 높일 수 있을 뿐만 아니라 빈혈 자체에 의한 심부전을 일으킬 수 있기 때문에 더욱 빈혈을 교정해 주는 것이 중요하다[4]. 그럼에도 불구하고 염증반응 빈혈은 기저질환의 주증세에 의해 그 발현이 곧잘 간과되기도 하고 기저질환에 동반되어 나타나는 혼란 현상이라 여겨지기도 하는 등 질환의 심각성에 대한 인식이 부족한 실정이다[5-6].

염증반응 빈혈의 병태 생리는 크게 세 가지로 나눌 수 있는데, 철분 대사의 장애, 적혈구 생존기간의 단축, 그리고 적혈구 생성 촉진 인자인 erythropoietin(EPO)의 생성 감소이다. 철분 대사의 장애는 interleukin(IL)-6와 같은 염증성 사이토카인(cytokine)의 작용으로부터 시작된다[7-9]. 이 사이토카인의 증가는 간에서 생성되는 철분조절호르몬인 hepcidin의 생산을 자극하게 되는데, 증가된 hepcidin은 철분의 소장 흡수를 억제할 뿐만 아니라 소장 점막세포나 세망내피세포로부터 철분을 요구하는 조직으로의 이동을 억제하게 된다[4, 10]. 이러한 반응은 적혈구를 생산하는 골수에서 적혈구 전구체 또는 전구 세포의 분열과 분화에 이용되는 철분의 부족현상을 유발하게 되어 적혈구 생성 저해가 초래된다[3, 11, 12]. 만성질환에서의 전신 염증 반응은 IL-6 이외에도 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), IL-10과 같은 각종 사이토카인의 분비를 유도하는데, 이로 인해 활성화된 대식세포의 적혈구 탐식 증가는 적혈구 생존기간의 단축을 초래하게 된다[11]. 또한, 이들 사이토카인은 신장의 EPO 생산을 억제하여 골수에서 적혈구의 생성을 감소시킨다[4, 5]. 이와 같이 염증반응 빈혈의 병태생리가 규명됨에 따라 기저질환 자체의 치료뿐만 아니라 철분과 EPO의 투여, 수혈 등이 빈혈을 교정하기 위한 치료법으로서 사용되어지고 있다. 그러나 환자의 삶의 질을 향상시키고 사망률을 줄이기 위한 최적의 방법을 모색하기 위해서는 기저질환 또는 염증을 완화함과 동시에 빈혈을 교정할 수 있는 새로운 치료전략에 대한 연구가 더욱 요구된다.

Resistin-like molecule alpha(Relma)는 난황(ovalbumin)으로 알레르기성 폐 염증을 유도한 마우스의 기관지 세척액에서 처음 발견되었고, 마우스의 폐, 비장, 심장, 지방조직 등 여러 장기에서 발현되어 분비되는 사이토카인으로 알려져 있다[13]. 지금까지 보고된 바에 의하면 Relma는 염증조절인자로서[14], 폐 염증[15], 장 염증[16-17], 대장염[18], 호산구 식도염[19], 기생충을 감염으로 유발되는 염증[20] 등의 진행에서 중요한 역할을 한다. 최근 본 연구팀에서도 만성질환인 동

맥경화와 천식에서 Relma의 기능을 연구하였는데, Relma 유전자결손마우스에 동맥경화와 천식을 유발하였을 때 Relma 결손에 의해서 이들 질환이 완화되는 효과를 확인하였고, 신약 개발을 위한 표적물질로서의 가능성을 제시하였다[21-22].

이에 본 연구에서는 Relma가 염증반응 빈혈의 발병에서 염증을 조절함과 동시에 빈혈을 교정할 수 있는지를 알아보고, 염증반응 빈혈의 새로운 치료전략 및 치료를 위한 표적물질로서 Relma의 가능성을 제안하고자 한다.

## II. Methodology

### 1. Reagents and Instruments

2,2,2-tribromoethanol(Sigma, Saint Louis, USA), Lipopolysaccharides(Sigma, Saint Louis, USA), Trizol(5 Prime, Hilden, Germany), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas, Vilnius, Lithuania), SYBR Green PCR master mix(KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), Ethylenediamine tetra-acetic acid(EDTA) 채혈튜브(BD Biosciences, Oxford, UK), ADVIA 2120i(Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany), ABI Prism 7300 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하였다.

### 2. Animal Study

Relma 결손마우스가 미리 보고된 바와 같이 제작되었다[22]. 염증반응 빈혈의 마우스 모델을 생산하기 위해서 Relma 결손마우스와 대조 마우스에 0.25 mg/kg LPS를 10일 동안 매일 복강 내 투여하였다. 사육환경은 실내 온도  $22 \pm 2$  °C, 습도  $50 \pm 10$  %, 명암 12시간의 조건을 유지하였고, 케이지 당 5마리 마우스를 넣어 사육하였다. 동물 실험이 한양대학교의 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 윤리적으로 시행되었다.

### 3. Analysis of Hematological Parameters

생리식염수에 2, 2, 2-tribromoethanol를 용해하여 12.5mg/ml 농도의 마취제(avertin)를 제조하였고, 마우스의 몸무게 1kg당 20ml의 양으로 복강 내 투여하였다. 안와정맥채혈이 마지막 LPS 투여 후 24시간 후에 시행되었고, EDTA 튜브에 넣어 ADVIA 2120i를 통해 측정하였다.

### 4. RNA Isolation, RT-PCR, and qRT-PCR

간조직과 신장조직의 전체 RNA가 Trizol 시약을 이용하여 추출되었고, 1.5ug RNA가 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit를 이용하여 cDNA로 합성되었다. qRT-PCR이 ABI Prism 7300 Sequence Detection System을 이용하여 두

단계로 실행되었고, SYBR Green PCR master mix가 이용되었다. RT-PCR에 사용된 hepcidin, EPO 와  $\beta$ -actin에 대한 primer는 다음과 같다. hepcidin forward, 5'-ttgcgataccaatgcagaaga-3', hepcidin reverse, 5'-gatgtggctctaggtctatgtt-3', EPO forward, 5'-gctctcagaagccatcctg-3', EPO reverse, 5'-cagtgaagtgaggctacgta-3',  $\beta$ -actin forward, 5'-acggccaggtcatcactattg-3',  $\beta$ -actin reverse, 5'-cacaggattccataccaagaag-3'.

### 5. Statistical Analysis

모든 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었고, Relma 결손마우스와 대조 마우스간의 차이가 양측 비모수적 맨-휘트니 U 검정(two-tailed non-parametric Mann-Whitney U-test)을 이용하여 평가되었다. 두 그룹간의 평균이 유의수준 0.05이하 일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 이러한 분석은 통계프로그램인 GraphPad Instat(GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA)를 사용하여 실시하였다.

## III. Results

### 1. Experimental Procedures

본 연구를 수행하기 위한 전체적인 실험 설계는 다음과 같다 (Fig. 1). Relma가 염증반응 빈혈에 미치는 영향을 in vivo 수준에서 알아보려고 Relma 결손마우스와 대조 마우스에 0.25 mg/kg LPS를 10일 동안 매일 복강 내 투여하여 전신의 염증반응을 유발함으로써 염증반응 빈혈을 가진 마우스 모델을 생산하였다. 그람 음성 세균의 세포외막에서 유래된 LPS는 내독소 작용을 하는 물질로서, 혈액으로의 유입은 백혈구를 자극하여 염증매개물질을 분비하게 하고 염증을 유발한다고 알려져 있다[23-24]. 이와 같이 만성 염증이 유발된 Relma 결손마우스와 대조 마우스를 이용하여 다음의 세 가지 실험을 진행하였고, 통계프로그램인 GraphPad Instat software를 이용하여 양측 비모수적 맨-휘트니 U 검정으로 이들 두 마우스 그룹을 비교 분석하였다. 첫 번째 실험으로 이들 마우스로부터 혈액을 채취하여 백혈구 수에 대한 혈액학적 분석을 수행함으로써 Relma 결손이 염증반응에 미치는 영향을 관찰하였다. 두 번째 실험으로 Relma 결손이 빈혈 수치에 미치는 영향을 혈액학적 분석을 통해 관찰하였다. 마지막으로 hepcidin과 EPO 유전자의 발현을 간과 신장 조직에서 각각 확인함으로써 Relma의 결손이 철대사와 적혈구의 생성과정에 미치는 영향을 평가하였다.

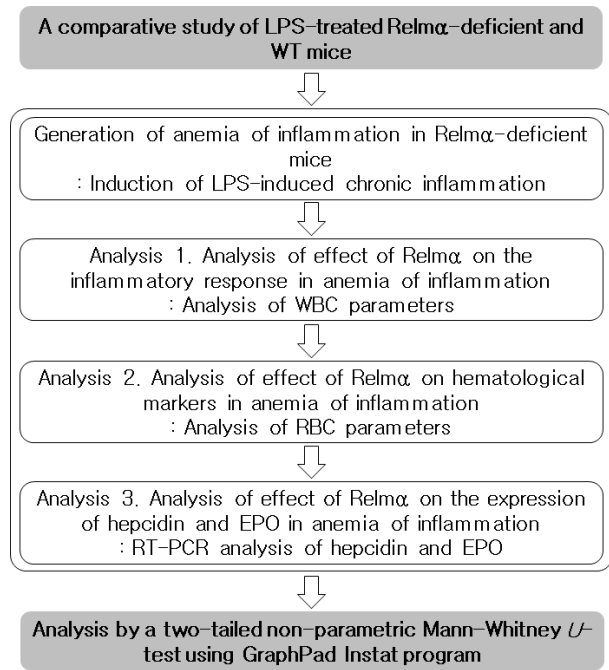


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental design used in this study.

### 2. Red Blood Cell Characteristics by Relma in Inflammation of Anemia

빈혈의 진단이나 원인을 알아보기 위한 일반 혈액 검사 항목으로는 적혈구(red blood cell, RBC)의 수, 혈색소(hemoglobin, Hb)의 양, 적혈구 용적률(hematocrit, Hct), 그리고 적혈구지수(red blood cell index) 등이 있다. 적혈구지수에는 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 적혈구분포지수(red cell distribution width, RDW) 등이 포함된다. 본 연구에서는 LPS를 복강 투여하여 염증반응 빈혈이 유발된 Relma 결손마우스와 대조마우스의 혈액에서 이들 항목을 측정함으로써 Relma에 의한 빈혈의 혈액학적 소견의 변화양상을 알아보려고 하였다(Table 1). 그 결과, Relma 결손마우스의 경우 대조마우스에 비해 혈색소의 양, 적혈구 용적률, 평균적혈구용적, 평균적혈구혈색소량이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 염증반응 빈혈의 마우스 모델에서 Relma의 결손은 혈색소 양과 적혈구 크기 감소를 초래함으로써 빈혈을 심화시킨다는 것을 알 수 있다. 또한, 두 그룹 간에 적혈구 수의 유의적인 차이는 관찰할 수 없었지만 Relma 결손마우스에서 대조마우스에 비해 감소하는 경향을 확인하였다. Relma 결손에 의해 빈혈의 증상은 심화되었지만 망상적혈구(reticulocyte)의 수치 변화는 관찰할 수 없었다.

Table 1. Red blood cell characteristics by Relm $\alpha$  deficiency in mouse model of anemia of inflammation induced by intraperitoneal injection of LPS

Parameters	Wild-type mice	Relm $\alpha$ -deficient mice	P value
RBCs ( $\times 10^{12}/L$ )	9.72 $\pm$ 0.46	9.43 $\pm$ 0.39	0.15
Hb (g/dL)	14.13 $\pm$ 0.7	13.45 $\pm$ 0.64	0.04
HCT (%)	46.6 $\pm$ 2	44.38 $\pm$ 1.72	0.02
MCV (fL)	47.92 $\pm$ 0.36	47.04 $\pm$ 0.62	0.002
MCH (pg)	14.52 $\pm$ 0.19	14.25 $\pm$ 0.24	0.01
MCHC (g/dL)	30.32 $\pm$ 0.38	30.28 $\pm$ 0.51	0.86
RDW (%)	15.4 $\pm$ 1.02	15.2 $\pm$ 0.85	0.65
Reticulocytes ( $\times 10^9/L$ )	622.96 $\pm$ 161.01	692.28 $\pm$ 210.93	0.44
Reticulocytes (%)	6.44 $\pm$ 1.79	7.34 $\pm$ 2.25	0.36

\* Data are presented as mean  $\pm$  S.D. according to the Mann-Whitney U-test, n=5 per group.  
 \* RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW, red cell distribution width; S.D., standard deviation.  
 \* There were significant differences between wild-type and Relm $\alpha$ -deficient mice at P<0.05.

### 3. Effect of Relm $\alpha$ on White Blood Cell Parameters in LPS-induced Chronic Inflammation

Relm $\alpha$ 는 염증반응을 조절하는 유전자로 보고되었기 때문에 [14-22], 이들 마우스 모델을 이용하여 염증반응 빈혈에서 Relm $\alpha$ 의 영향을 알아보기에 앞서 Relm $\alpha$ 가 LPS에 의해 유발된 염증반응을 조절할 수 있는지를 먼저 확인해 보고자 하였다. 이를 위하여 염증반응 표지자 중 하나인 백혈구 수치의 변화를 혈액검사를 통해 분석해 보고자 하였는데, LPS의 마지막 투여 후 24시간 후 전혈을 채취하여 총 백혈구 수 및 백혈구의 종류별 절대수치와 상대수치를 측정하여 두 그룹을 비교분석하였다 (Table 2). 그 결과, Relm $\alpha$  결손마우스의 경우 대조 마우스에 비해 총 백혈구 수의 유의적인 증가를 나타내었고, 단구의 절대수치와 상대수치가 모두 유의적으로 증가하였다. 림프구의 경우 Relm $\alpha$  결손마우스에서 대조마우스에 비해 절대수치가 증가하는 경향을 나타낸 반면, 상대수치는 유의적으로 감소하였는데, 이처럼 절대수치와 상대수치의 결과가 일치하지 않아 큰 의미가 없다고 할 수 있다. 또한 호중구, 호염기구의 상대수치가 Relm $\alpha$  결손마우스에서 대조마우스에 비해 증가하는 경향을 나타내었지만, 절대수치에서 유의적인 증가를 나타내었기 때문에, 의미가 있는 결과라고 사료된다. 그 외에 호산구의 절대수치와 상대수치가 두 그룹 간에 유의적인 차이를 보여주지는 않았지만 Relm $\alpha$ 의 결손에 의해 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같이 염증반응을 유발하였을 때 마우스에서 Relm $\alpha$ 의 결손은 혈액 내 백혈구들의 전반적인 증가를 초래한다는 사실을 알 수 있다.

Table 2. Total and differential white blood cell counts from Relm $\alpha$ -deficient and wild-type mice in mouse model of anemia of inflammation induced by intraperitoneal injection of LPS

Parameters	Wild-type mice	Relm $\alpha$ -deficient mice	P value
Total WBCs ( $\times 10^9/L$ )	4.23 $\pm$ 0.81	5.98 $\pm$ 0.63	0.02
Neutrophils ( $\times 10^9/L$ )	0.58 $\pm$ 0.19	1.2 $\pm$ 0.22	0.01
Lymphocytes ( $\times 10^9/L$ )	3.4 $\pm$ 0.69	4.25 $\pm$ 0.52	0.11
Monocytes ( $\times 10^9/L$ )	0.05 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.004	0.0001
Eosinophils ( $\times 10^9/L$ )	0.11 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.12	0.07
Basophils ( $\times 10^9/L$ )	0 $\pm$ 0	0.01 $\pm$ 0.004	0.0007
Neutrophils (%)	13.88 $\pm$ 4.27	19.98 $\pm$ 3.09	0.07
Lymphocytes (%)	80.32 $\pm$ 3.64	71.03 $\pm$ 3.76	0.01
Monocytes (%)	1.32 $\pm$ 0.2	1.75 $\pm$ 0.17	0.02
Eosinophils (%)	2.58 $\pm$ 1.6	4.53 $\pm$ 2.27	0.23
Basophils (%)	0.1 $\pm$ 0	0.18 $\pm$ 0.08	0.12

\* Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. according to the Mann-Whitney U-test, n=5 per group.  
 \* WBC, white blood cell; S.D., standard deviation.  
 \* There were significant differences between wild-type and Relm $\alpha$ -deficient mice at P<0.05.

### 4. Effect of Relm $\alpha$ on the Expression of Hepatic Hecpudin and Renal Erythropoietin in Inflammation of Anemia

염증반응 빈혈의 마우스 모델에서 Relm $\alpha$  결손에 의한 빈혈 심화 현상이 hepcidin 증가에 의한 철분 대사의 장애나 EPO 감소로 인한 적혈구 생성 감소 때문인지를 알아보려고 LPS가 복강으로 주입된 Relm $\alpha$  결손마우스와 대조마우스의 간과 신장 조직에서 RNA를 추출하여 이들 유전자의 발현을 관찰하였다 (Fig. 2). 그 결과, Relm $\alpha$  결손마우스와 대조마우스 간에 hepcidin과 EPO의 mRNA 발현 양에 유의한 차이가 없다는 것을 알 수 있었다.

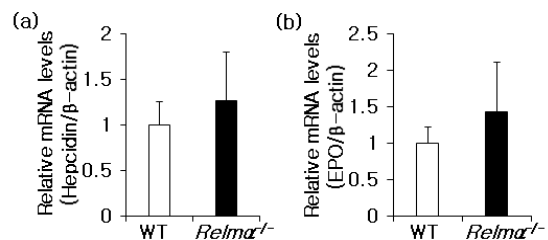


Fig. 2. Effect of Relm $\alpha$  deficiency on the expression of hepcidin and EPO in mouse model of anemia of inflammation induced by intraperitoneal injection of LPS. (a) Hepatic hepcidin mRNA levels. (b) Renal EPO mRNA levels. The mRNA levels were measured in wild-type (WT) and Relm $\alpha$ -deficient (*Relm $\alpha$ <sup>-/-</sup>*) mice injected with LPS daily for 10 days (n = 5 per group). Data are presented as mean  $\pm$  S.D. according to the Mann-Whitney U-test.

#### IV. Discussion

최근 우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 만성 질환의 유병률이 급증함에 따라 만성 감염증이나 만성 염증성 질환에 대한 새로운 치료 전략을 모색하기 위한 노력 및 신약개발의 필요성이 대두되고 있다. 만성 질환에서 추가적으로 빈번히 발생하는 염증반응 빈혈은 이들 만성 질환의 치료를 어렵게 하고 사망률을 높이게 하는 요인이 되고 있기 때문에[4], 염증반응 빈혈의 발병 기전을 명확히 규명하는 것은 만성질환의 치료 타겟 발굴과 치료제 개발에 대한 새로운 전략을 제공할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 이유로 전 세계적으로 만성 염증과 빈혈의 연관성에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있고, 최근에는 IL-6, hepcidin, EPO의 상호작용이 염증반응 빈혈의 발병 및 진행에서 중요하다고 보고되었다[4, 25]. 이러한 연구 결과에 근거하여 철분과 EPO의 투여, 수혈 등이 빈혈을 교정하기 위한 치료법으로서 사용되어지고 있지만, 이는 빈혈 자체에 대한 치료 효과만 나타낼 뿐 기저질환에 의한 염증반응을 완화하지는 못하기 때문에 염증을 완화함과 동시에 빈혈을 교정할 수 있는 치료전략이 필요하다.

염증반응의 조절에서 Relma 유전자의 기능이 보고되면서 다양한 염증 질환의 진행에서 Relma의 역할 연구가 되어오고 있지만[14-22], 염증반응 빈혈에서 Relma의 역할은 현재까지 보고된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 Relma 결손마우스와 대조마우스에 LPS를 투여하여 염증반응 빈혈을 유발함으로써 염증반응 빈혈에서 Relma 유전자의 역할을 알아보려 하였다.

흥미롭게도 Relma 결손마우스의 경우 대조마우스에 비해 혈색소의 양과 평균적혈구혈색소량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었는데, 이 결과를 통해 Relma가 혈색소 양을 조절하는 유전자라는 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라 Relma 결손마우스의 경우 대조마우스에 비해 적혈구 용적률과 평균적혈구용적이 유의적으로 감소하였는데, Relma의 결손은 적혈구 크기의 감소를 유발한다는 것을 알 수 있다. 이와 같이 염증유발 마우스에서 Relma의 결손은 혈색소의 양과 적혈구 크기의 감소를 초래함으로써 빈혈을 악화시키는 역할을 하였으므로, Relma는 염증반응에서 유발되는 빈혈을 완화시키는 역할을 하는 유전자라는 것을 알 수 있다.

염증반응 빈혈의 주요 병태생리가 철분 대사의 장애[7-9], 적혈구 수명의 단축[11], 그리고 적혈구 생성 촉진 인자인 EPO의 생성 감소[4, 5]라는 점을 고려하여, LPS에 의해 유발된 염증반응에서 Relma에 의한 빈혈 완화 효과의 기전을 확인해 보고자 하였다. 먼저 염증반응 빈혈에서 철분대사의 장애를 유발한다고 알려진 hepcidin 유전자의 간에서 발현이 Relma 결손 마우스와 대조마우스 간에 유의한 차이를 나타내지 않았기 때문에 염증반응 빈혈에서 Relma에 의한 염증 완화 효과는 철분대사의 장애와는 무관할 것으로 사료된다. 다음으로 EPO의 신장에서 발현이 두 그룹 간에 유의한 차이가 없었으므로 Relma에 의한 염증완화 효과는 적혈구 생성 감소와 무관할 것

으로 사료된다. 골수에서 적혈구 생성 능력에 대한 지표로 알려진 망상적혈구의 혈액 수치 또한 두 그룹 간에 다르지 않았는데, 이는 Relma에 의한 염증완화 효과가 적혈구 생성 감소와 무관하다는 결과를 뒷받침 해 주는 결과이다.

Relma 유전자의 염증 조절 작용은 LPS에 의해 유발된 염증반응에서도 확인 할 수 있었는데, Relma 결손마우스의 경우 대조마우스에 비해 혈액 내 총 백혈구 수의 유의적인 증가를 보여주었다. 이 결과를 통해 Relma는 염증반응 빈혈이 유발된 마우스에서 염증을 완화시키는 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 염증반응은 T 림프구와 단구 및 대식세포와 같은 면역세포들의 수의 증가 및 활성화를 유발하여 IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등을 포함하는 각종 사이토카인들의 분비를 증가시키게 되는데, 이는 탐식활성이 강한 단구 및 대식세포를 활성화시켜서 적혈구의 탐식을 유도하기 때문에 말초혈액 내 적혈구 수의 감소 및 적혈구의 수명이 단축될 수 있다[11]. 그러므로 본 연구의 혈액검사 결과로서 대조마우스와 비교했을 때 Relma 결손 마우스에서 관찰된 단구의 절대수치와 상대수치의 유의적인 증가는 Relma 결핍에 의해 나타난 적혈구 수의 감소 경향에 대한 원인을 설명할 수 있게 하는 결과라고 사료된다. 또한, 염증반응에서 사이토카인들의 분비 증가는 대식세포 내 저장된 철분의 유출을 억제하여 적혈구 전구세포의 혈색소 합성에 필요한 철분 이용을 저하시키고 분열 및 분화를 방해하는데[5], Relma 결손마우스에서 관찰된 혈색소 양의 유의적인 감소는 Relma 결손에 의해 심화된 염증반응의 결과 때문이라고 사료된다.

본 연구에서 제안하고 있는 Relma 유전자는 염증반응 빈혈에서 염증을 완화함과 동시에 빈혈을 교정하는 효과를 나타내었는데, 이 결과는 기저질환의 치료나 빈혈 자체의 교정 효과만 나타내었던 기존의 치료전략과 차이가 있다는 점에서 매우 의미 있는 결과라고 볼 수 있다. 그러나 Relma 유전자를 표적으로 하는 치료제 개발이나 Relma 단백질 자체를 치료의 표적물질로서 이용하기 위한 가능성을 제시하기 위해서는 염증반응 빈혈의 진행에서 Relma의 작용 기전이 더욱 명확히 규명되어야 할 필요성이 있다.

#### IV. Conclusions

본 연구는 염증조절인자로 알려져 있는 Relma 유전자가 염증반응 빈혈을 치료하는 효과를 나타내는지 알아보기 위해 시행되었고, 염증반응 빈혈이 유발된 Relma 결손 마우스와 대조마우스를 이용하여 연구 결과를 비교분석하였다. 연구 결과 염증반응 빈혈의 마우스 모델에서 Relma 유전자의 결손은 혈색소의 양과 적혈구의 크기를 감소시킴으로서 빈혈을 심화하였다. Relma 결손에 의한 빈혈의 심화 원인을 알아보려 염증반응 빈혈의 주요 병태생리로 알려져 있는 적혈구 수명의 단축, 철분 대사의 장애, 그리고 적혈구 생성 촉진 인자인 EPO 생성의 감

소에서 Relma의 역할을 확인해 보고자 하였다. 먼저 적혈구 수명 단축과 철분대사의 장애를 초래할 수 있는 원인으로 염증반응의 변화를 확인해 보았는데, Relma 결손 마우스의 경우 대조마우스에 비해 염증반응 표지자인 혈액 내 총 백혈구의 수치가 유의적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 다음으로 Relma 결손 마우스와 대조마우스의 간 조직에서 철분대사를 조절하는 hepcidin 유전자의 발현 양과 신장 조직에서 적혈구 형성을 조절하는 EPO 유전자의 발현 양을 확인 해 보았으나 두 마우스 그룹 간에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 이와 같이 마우스에서 Relma 결손에 의한 빈혈의 심화 현상은 hepcidin에 의한 철분대사나 EPO에 의한 적혈구 형성에 영향 없이 염증의 증가로 인한 철분 이용의 저하 및 혈색소 합성의 감소와 적혈구 분열 및 분화의 억제 때문인 것으로 사료된다. 이 결과는 Relma가 염증반응 빈혈 환자에서 기저질환에 효과 없이 빈혈 자체에 대한 교정 효과만을 나타내는 기존의 치료 전략을 개선할 수 있는 표적물질이 될 수 있다는 점을 제시한다.

## REFERENCES

- [1] N. J. Kassebaum, R. Jasrasaria, M. Naghavi, S. K. Wulf, N. Johns, R. Lozano, M. Regan, D. Weatherall, D. P. Chou, T. P. Eisele, S. R. Flaxman, R. L. Pullan, S. J. Brooker, and C. J. Murray, "A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010," *Blood*, Vol. 123, No. 5, pp. 615-624, Jan. 2014.
- [2] C. Madeddu, G. Gramignano, G. Astara, R. Demontis, E. Sanna, V. Atzeni, and A. Maccio, "Pathogenesis and Treatment Options of Cancer Related Anemia: Perspective for a Targeted Mechanism-Based Approach," *Front Physiol*, Vol. 9, pp. 1294, Sep. 2018.
- [3] C. M. Witmer, "Hematologic manifestations of systemic disease (including iron deficiency, anemia of inflammation and DIC)," *Pediatr Clin North Am*, Vol. 60, No. 6, pp. 1337-1348, Oct. 2013.
- [4] G. Weiss and L. T. Goodnough, "Anemia of chronic disease," *N Engl J Med*, Vol. 352, No. 10, pp. 1011-1023, Mar. 2005.
- [5] C. S. Kim, "Anemia of Chronic Disease", *J Korean Med Assoc*, Vol. 49, No. 10, pp. 920-926, 2006
- [6] N. I. Solomakhina, E. S. Nakhodnova, and Y. N. Belenkov, "[Anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: Comparative characteristics of ferrokinetic parameters and their relationship with inflammation in late middle-aged and elderly patients with CHF]," *Kardiologiya (S8)*, pp. 58-64, Aug. 2018.
- [7] P. Huang, J. Wang, X. Lin, F. F. Yang, and J. H. Tan, "Effects of IL-10 on iron metabolism in LPS-induced inflammatory mice via modulating hepcidin expression," *Eur Rev Med Pharmacol Sci* Vol. 21, No. 15, pp. 3469-3475, Aug. 2017.
- [8] L. Kautz, G. Jung, E. V. Valore, S. Rivella, E. Nemeth, and T. Ganz, "Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism," *Nat Genet*, Vol. 46, No. 7, pp. 678-684, Jul. 2014.
- [9] T. Ganz, "Systemic iron homeostasis," *Physiol Rev*, Vol. 93, No. 4, pp. 1721-1741, Oct. 2013.
- [10] T. Ganz, "Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease," *Pediatric blood & cancer*, Vol. 46, No. 5, pp. 554-557, May 2006.
- [11] E. Nemeth, S. Rivera, V. Gabayan, C. Keller, S. Taudorf, B. K. Pedersen, and T. Ganz, "IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin," *The Journal of clinical investigation*, Vol. 113, No. 9, pp. 1271-1276, May 2004.
- [12] A. Krstic, J. Kocic, V. Ilic, S. Mojsilovic, I. Okic-Dordevic, D. Trivanovic, J. F. Santibanez, G. Jovcic, and D. Bugarski, "Effects of IL-17 on erythroid progenitors growth: involvement of MAPKs and GATA transcription factors," *J Biol Regul Homeost Agents* Vol. 26, No. 4, pp. 641-652, Oct-t-Dec. 2012.
- [13] I. N. Holcomb, R. C. Kabakoff, B. Chan, T. W. Baker, A. Gurney, W. Henzel, C. Nelson, H. B. Lowman, B. D. Wright, N. J. Skelton, G. D. Frantz, D. B. Tumas, F. V. Peale, Jr., D. L. Shelton, and C. C. Hebert, "FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family," *The EMBO journal*, Vol. 19, No. 15, pp. 4046-4055, Aug. 2000.
- [14] M. G. Nair, D. W. Cochrane, and J. E. Allen, "Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro," *Immunol Lett*, Vol. 85, No. 2, pp. 173-180, Jan. 2003.
- [15] K. Yamaji-Kegan, Q. Su, D. J. Angelini, A. C. Myers, C. Cheadle, and R. A. Johns, "Hypoxia-induced mitogenic factor (HIMF/FIZZ1/RELMalpha) increases lung inflammation and activates pulmonary microvascular endothelial cells via an IL-4-dependent mechanism," *J Immunol*, Vol. 185, No. 9, pp. 5539-5548, Nov. 2010.
- [16] A. Munitz, L. Seidu, E. T. Cole, R. Ahrens, S. P. Hogan, and M. E. Rothenberg, "Resistin-like molecule alpha decreases glucose tolerance during intestinal inflammation," *J Immunol*, Vol. 182, No. 4, pp. 2357-2363, Feb. 2009.
- [17] L. C. Osborne, K. L. Joyce, T. Alenghat, G. F. Sonnenberg,

- P. R. Giacomin, Y. Du, K. S. Bergstrom, B. A. Vallance, and M. G. Nair, "Resistin-like molecule alpha promotes pathogenic Th17 cell responses and bacterial-induced intestinal inflammation," *J Immunol*, Vol. 190, No. 5, pp. 2292-2300, Mar. 2013.
- [18] A. Munitz, A. Waddell, L. Seidu, E. T. Cole, R. Ahrens, S. P. Hogan, and M. E. Rothenberg, "Resistin-like molecule alpha enhances myeloid cell activation and promotes colitis," *J Allergy Clin Immunol*, Vol. 122, No. 6, pp. 1200-1207 e1201, Dec. 2008.
- [19] P. Mavi, R. Niranjani, P. Dutt, A. Zaidi, J. S. Shukla, T. Korfhagen, and A. Mishra, "Allergen-induced resistin-like molecule- $\alpha$  promotes esophageal epithelial cell hyperplasia in eosinophilic esophagitis," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Vol. 309, No. 4, pp. G281, Aug. 2015.
- [20] J. T. Pesce, T. R. Ramalingam, M. S. Wilson, M. M. Mentink-Kane, R. W. Thompson, A. W. Cheever, J. F. Urban, Jr., and T. A. Wynn, "Retnla (relmalph/fizz1) suppresses helminth-induced Th2- type immunity," *PLoS pathogens*, Vol. 5, No. 4, pp. e1000393, Apr. 2009.
- [21] M. R. Lee, C. J. Lim, Y. H. Lee, J. G. Park, S. K. Sonn, M. N. Lee, I. H. Jung, S. J. Jeong, S. Jeon, M. Lee, K. S. Oh, Y. Yang, J. B. Kim, H. S. Choi, W. Jeong, T. S. Jeong, W. K. Yoon, H. C. Kim, J. H. Choi, and G. T. Oh, "The adipokine Retnla modulates cholesterol homeostasis in hyperlipidemic mice," *Nature communications*, Vol. 5, pp. 4410, Jul. 2014.
- [22] M. R. Lee, D. Shim, J. Yoon, H. S. Jang, S. W. Oh, S. H. Suh, J. H. Choi, and G. T. Oh, "Retnla overexpression attenuates allergic inflammation of the airway," *PloS one*, Vol. 9, No. 11, pp. e112666, Nov. 2014.
- [23] M. Triantafilou and K. Triantafilou, "The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors," *J Endotoxin Res*, Vol. 11, No. 1, pp. 5-11, 2005.
- [24] T. Yokochi, "A new experimental murine model for lipopolysaccharide-mediated lethal shock with lung injury," *Innate Immun*, Vol. 18 No. 2, pp. 364-370, Apr. 2012.
- [25] H. Z. Wang, Y. X. He, C. J. Yang, W. Zhou, and C. G. Zou, "Hepcidin is regulated during blood-stage malaria and plays a protective role in malaria infection," *J Immunol*, Vol. 187, No. 12, pp. 6410-6416, Dec. 2011.

## Authors



Mi-Ran Lee received the B.S. degree in Biomedical Laboratory Science from Inje University, Korea, in 2002. She received M.S. degree in Pathology from Chungnam National University, Korea, in 2004 and Ph.D. degree in Life Science from Ewha

Womans University, Korea, 2012. Dr. Lee joined the faculty of the Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, in 2015. She is currently a Professor in the Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University. She is interested in health care, life sciences and clinical research.