

Hiper-Ekspresi TNF-Stimulated Gene 6 (TSG-6) dari Aspirat Trakea dan Sikatan Bronko-Alveolar pada Perokok Berat dan TBC Paru

Hyperexpression of TNF-Stimulated 6 (TSG-6) of Human Tracheal Aspirate and Bronchial Alveolar Lavage from Heavy-Smoker and Lung TB

Djoko Trihadi^{1*}

ABSTRACT

Background: TSG-6, an inflammation-associated protein, forms covalent complexes with heavy-chains from TNF. These protein potentiating the antiplasmin activity of this serine protease inhibitor. The aim of study was to determine and show that TSG-6 are present in Bronchoalveolar Lavage (BAL) from patients with lung TB and heavy smoker.

Design and Methods: Experiments conducted in vitro with purified components revealed that TSG-6 had immunodetection in the Human Tracheal Aspirates (HTA) and BAL of heavy smoker and Lung Tuberculosis.

Results: Immunoprecipitation revealed that TSG-6 accounts in airways hyperresponsiveness for significant proportion of BAL and HTA, but not in control ($p < 0,01$). TSG-6 relevant protease inhibitor in airway secretion. In primary cultures of differentiated human airway epithelial, which suggest that TSG-6 may be induced by TNF. Our results suggest that TSG-6 may play an important protective role in bronchial epithellium buy increasing the antiprotease screen on the airway lumen. The present study identifies a novel function of TSG-6 by a distinct mechanism system regulated, enhancement of anti TK activity, and provides a rational for this activity within the context of inflamed airways. These findings correlate with the observed increases in protein expressions in human HTA and BAL.

Conclusions: TSG-6 are hyper-expressed in airway epithelial cells in cultures of smoker and lung TB. The interactions of TSG-6 with other molecules are also potentially important to the pathophysiologic aspects of inflammatory airways diseases that remain to be elucidated (Sains Medika, 3(1):31-40).

Key words: TSG-6, BAL, HTA, expression

ABSTRAK

Pendahuluan: TSG-6 merupakan protein anti-inflamasi, terbentuk dari ikatan kovalen "heavy – chains – HCs" TNF- α . Secara in vitro berefek sebagai penghambat serin protease. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi dan menunjukkan bahwa TSG-6 berada dalam cairan sikatan bronko-alveolar pada pasien Tuberkulosis Paru dan perokok berat.

Metode: Penelitian dilakukan secara in vitro dengan imunodeteksi untuk menghasilkan komponen terpurifikasi TSG-6 pada aspirat HTA (Human Tracheal Aspirate) dan BAL (Broncho Alveolar Lavage) pada perokok berat dan pasien TB paru.

Hasil: Imunopresipitasi menunjukkan proporsi yang signifikan dari TSG-6 pada kondisi hipersensitifitas, tetapi tidak pada kontrol ($p < 0,01$). Penelitian ini menunjukkan bahwa TSG-6 merupakan inhibitor protease dalam permukaan sekresi. Pada kultur primer jaringan epithelial manusia yang terdifferensiasi, TSG-6 diinduksi oleh TNF. TSG-6 diduga berperan penting dalam mekanisme protektif pada epithelial bronkus melalui peningkatan sekresi antiprotease pada permukaan lumen. Penelitian ini mengidentifikasi sebuah fungsi baru dari TSG-6 melalui sistem mekanisme teregulasi yang berbeda, memacu aktifitas anti TK, dan merasional aktifitas permukaan yang terinflamasi. Hasil ini berkorelasi dengan peningkatan ekspresi protein pada HTA dan BAL.

Kesimpulan: Hiper ekspresi TSG-6 terjadi pada permukaan sel epitel dari kultur BAL dan HTA pasien perokok berat dan Tuberkulosis Paru. Interaksi TSG-6 dengan molekul lain berpotensi penting pada aspek patofisiologi penyakit antiinflamasi, akan tetapi masih diperlukan penelitian lanjut (Sains Medika, 3(1):31-40).

Kata kunci : TSG-6, cairan sikatan bronko-alveolar, aspirat trakea, ekspresi

1 Bagian Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA)

* Email: dr.trihadi@yahoo.com

PENDAHULUAN

Tumor Necrosis Factor-stimulated gene 6 (TSG-6) adalah protein anti-inflamasi, terbentuk dari ikatan kovalen “ *heavy – chains – HCs* ” TNF- α . Secara *in vitro* berefek sebagai penghambat serin protease (Mouzer *et al.*, 2007). Protein ini diekspresikan pada cairan sikatan bronko-alveolar (*Broncho Alveolar Lavage – BAL*) dan aspirat trakea (*Human Tracheal Aspirate - HTA*) pada infeksi paru khronis, perokok berat, asma, penyakit alergi saluran nafas, cairan sendi dan ovarium (Polansky, 2007; Boston *et al.*, 2006). Tujuan penelitian adalah menganalisis ekspresi TSG-6 dari HTA dan BAL pada perokok berat dan Tuberkulosis Paru–Bakteri Tahan Asam (TBP – BTA) negatif dengan membandingkan antara sampel dengan kontrol sehat.

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan studi observasional pada aspirat HTA (*Human Tracheal Aspirate*) dan BAL (*Broncho Alveolar Lavage*) sesuai Protokol Institutional Review Boards – Universitas Miami (Frankey *et al.*, 2004). Aspirat HTA dan BAL didapatkan dengan cara bronkoskopi dengan anestesi lokal sesuai standar operasional yang berlaku. *Informed consent* diperoleh pada semua responden. Kriteria inklusi adalah: 1) pria berusia antara 35 sampai 50 tahun; 2) BTA dahak SPS negatif; 3) merokok minimal 15 pak setahun bagi perokok berat; 4) tidak ada eksaserbasi akut pada PPOK; kriteria eksklusi adalah: 1) gagal organ; 2) keganasan; 3) gangguan pembekuan / kelainan darah; 4) dalam pengobatan rutin (hemodialisa, sitostatika, pacu jantung, stent koronaria, tindakan khusus : skleroterapi); 4) penyakit degeneratif (DM, hipertensi, hiperlipidemia). Bagi sukarelawan dianggap “sehat” bila tidak ada riwayat merokok, batuk kronis berulang, bukan penderita DM dan hipertensi. Penelitian dilaksanakan di RSUD Kota Semarang, Lembaga Pengujian Penelitian Terpadu Unit III dan Program Antar Universitas (PAU), Universitas Gadjah Mada Jogjakarta, dari 1 Januari 2004 sampai 31 Maret 2008.

Prosedur penelitian

Aspirat HTA dan BAL didapatkan dengan semprotan 4 ml saline melalui kateter isap atau bronkoskop lentur Olympus GX-462 dan segera dihisap melalui *endotracheal tube*. Sampel disentrifus pada 500 RPM selama 5 menit untuk memisahkan sel.

Supernatan I ini disentrifus lagi pada 1600 RPM selama 20 menit - suhu 4° C. Hasil supernatan II ini disimpan pada – 20 ° C sebelum digunakan. Aktivitas eosinofil peroksidase diukur dengan Colorimetric Assay dengan larutan Dapson 10⁻⁴ M yang spesifik untuk lakto-peroksidase standar.

TSG-6

Ekspresi TSG-6 diukur dengan *Drosophila Schneider* dan purifikasi dengan *ion-exchange chromatography* dan *Reverse Phase HPLC*. Konsentrasi TSG-6 ditentukan secara langsung dengan analisis asam amino (Human Pα L).

Imunoblotting

Visualisasi TSG-6 dari BAL maupun HTA diperiksa dengan cara: sampel berisi sel protein supernatan II dielektroforesis pada 4 – 15 % wt/vol *Polyacrilamine Minigels* (Biorad, Hercules, CA). Selanjutnya, ditransfer ke membran *polyvinilene difluoride* (Millipore, MA). Setelah blocking dengan 1% wt/vol gelatin dalam *Bufer Triss saline* mengandung 0,05% wt/vol Tween 20, membran ditetesi antibodi yang sesuai : *Rabbit Anti Human TSG-6* 1/ 10.000. Dilihat dengan *Western Blotting* menggunakan pengenceran 1 : 10.000 *Rabbit Polyclonal Antisense* yang spesifik untuk TSG-6.

Analisis Kuantitatif TSG-6

Kadar TSG-6 cairan bronkus dan aspirate trakea ditentukan dengan ELISA. 96 Sumuran Nune maxisorp (Nune, Rochester, NY) dilapisi dengan 50 µl dari 10µg / ml antibodi monoklonal A38 spesifik untuk TSG 6 dengan buffer bicarbonat selama 1 malam. *Plates* dicuci dengan PBS (*Protein Bovine Serum*) dan diblok dengan 0,25% wt/vol BSA (*Bovin Serum Albumin*) dan 0,05 % Tween 20 selama 30 menit pada suhu kamar. *Plate* dicuci lagi dengan PBS dan diinkubasi dengan 50 µl HTA atau TSG 6 standar pada buffer. Setelah 2 jam sumuran dicuci dengan PBS diikuti 50 µl/ HTA kedalam sumuran dan 0,5 µg Q75 – anti TSG 6 anti bodi yang dikonjugasi dengan kit Q75 – AB (Albio Chem, San Diego, CA). Pewarnaan dengan P-Nitro phenil-phosphate dan dihentikan dengan 3 N NAOH. Absorban dibaca pada 410 nm memakai SPECTRA-max dan Mikroplate reader. Kadar TSG 6 ditentukan dengan interpolasi dari kurva standar TSG 6 Q dengan Soft-max Software. Karena MAB A38 disandi oleh epitope didalam TSG-6 link modul domain yang

spesifik maka TSG-6 pada HTA dan BAL dapat sekaligus ditentukan. Aliquot dari semua sampel dan kontrol dilapisi dengan 10 mU hyaluronidase dari Streptomycin (Seika Gaku, Tokyo) selama 3 jam pada 37 °C. Membran dicetak memakai Chemidox XRS dan di analisis memakai Quantitative-one Software (Biorad) (Gerald *et al.*, 2006).

RT (Real Time) PCR

RNA (2 µg) diekstraksi dari BAL dan HTA kultur sel menggunakan TRIZOL (Invitrogen, Carlstad, CA) dan cDNA yang sesuai dengan *superscript first strand syntetis* sistem untuk RT PCR. TSG 6 Oligonukleotida spesifik primernya didesain sesuai kriteria Kehler, yaitu 5'TTGATTGGAAACCTCCACGL3', anti sens: 5'CCAGGCTTCCCAA TGAGTA3'. Primer untuk MTB yang sepadan, yaitu: 5"GTCCCGGAGGGAGGG CTGTGCTACCC-3', dan 5'GATGAAGGCTCGGCAGGGGGC-3'. Reaksi akhir campuran (0,025 µg/µl) oligo T, 0,5 MM dan NTPs, 1xRT bufer, 5 mM Mgcl2, 0,01 MDTT, dan RNase inkubator, diinkubasikan dengan *super script II reverse Transcriptase* (2,5 U/µl) selama 50 menit pada 42°C. Reaksi diakhiri pada 37 °C selama 20 menit dengan RNA-ase H. Untuk pertama cDNase di amplifikasi PCR memakai Taq polimerase 2,5 U/µl dan primer oligonukleotide. Inisiasi denaturasi pada 45 °C selama 300 detik di ikuti 40 siklus denaturasi pada 95°C selama 25 detik. Anealing pada 60 °C selama 30 detik dan elongasi pada 72°C selama 20 detik memakai *Automatic Cycler* (Biorad instrument, Westbury, NY). Hasil RT-PCR dibaca pada protokol analisis skuensing DNA-core – standar Universitas Miami. Gel agarose dibaca dengan fotografi Chemidoc XRS system (Biorad).

Immuno Floresens

Cairan dihidrolisis dan diinkubasi dengan aseton -20 °C selama 15 menit, kemudian dicuci dengan PBS dan inkubasikan pada Blue solution BSA 1% selama 1 jam. Blocking memakai endogenous Biotic Blocking sesuai petunjuk pabrik (Molecular Probes, Eugerny, OR). Untuk *color-localization*, sediaan diinkubasi dengan *rabbit anti* Hung TSG-6 (Dako 1 : 1000), anti bodi diencerkan dengan *blocking solution*, selama 24 jam dalam – 4 °C. Setelah labeling dengan Alexa SSS dikonjugasikan dengan *goat anti* Rabbit T9G (Molecular Probes), dicuci dengan PBS dengn inkubasi selama 2 jam dengan *Rat anti* TSG-6 Q75 1 µg/ µl dilanjutkan Biotynilated anti Rat-T9G antibodi dan FITC–axidum DCS (Veetor Lab, Burhinsame, CA) untuk visualisasi TSG-6. Nukleus diwarnai dengan DAPI

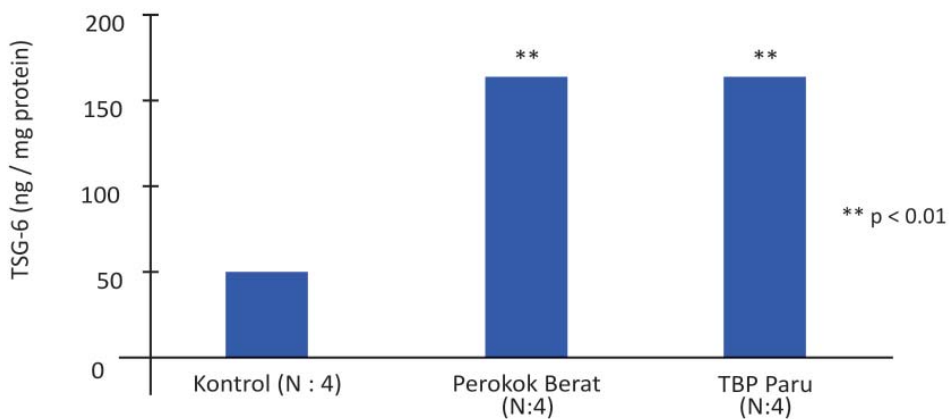
(Kirkegaard, Perby lab, Gaithersburg, MD) dan imaging dengan lensa Zeiss LSM-510 Confocal Laser-scanning microscope (Zeiss, Germany) (Van Nueten and Wellens, 1979; Susane *et al.*, 2007).

Analisis Statistik.

Data dianalisis menggunakan ANOVA one way, dilanjutkan dengan Tuerkey-Kramer, uji Levene digunakan untuk menentukan homogenitas varian.

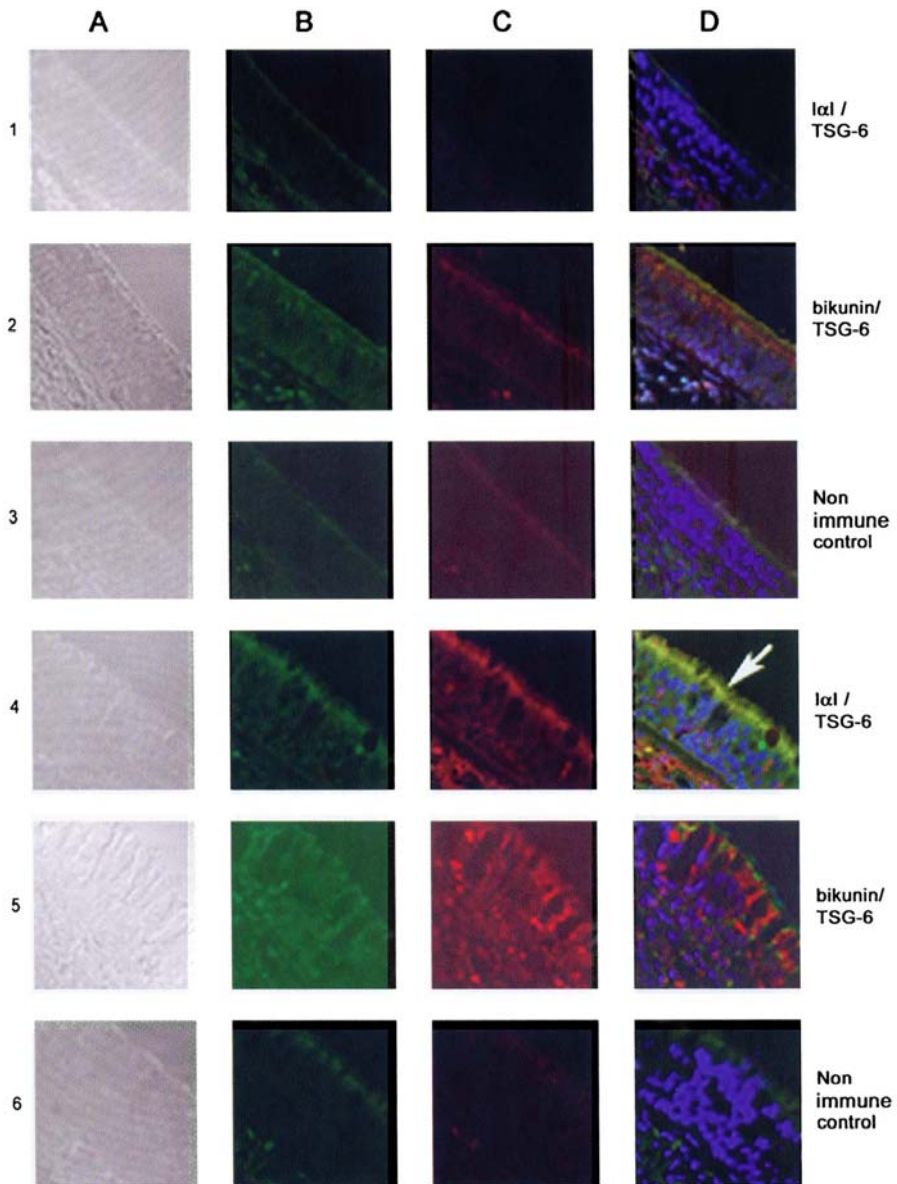
HASIL PENELITIAN

Duabelas responden memenuhi kriteria inklusi, terdiri dari 4 responden kontrol, 4 responden perokok berat, dan 4 responden TBP-BTA negatif. Rerata umur yaitu $38,62 \pm 9,73$ tahun (IK 95%, $p > 0,05$). Kadar TSG-6 meningkat pada perokok berat dan TBP paru dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,01$), tetapi kadar yang hampir sama terdapat pada perokok berat dan TBP Paru ($p > 0,05$) sesuai Gambar 1.



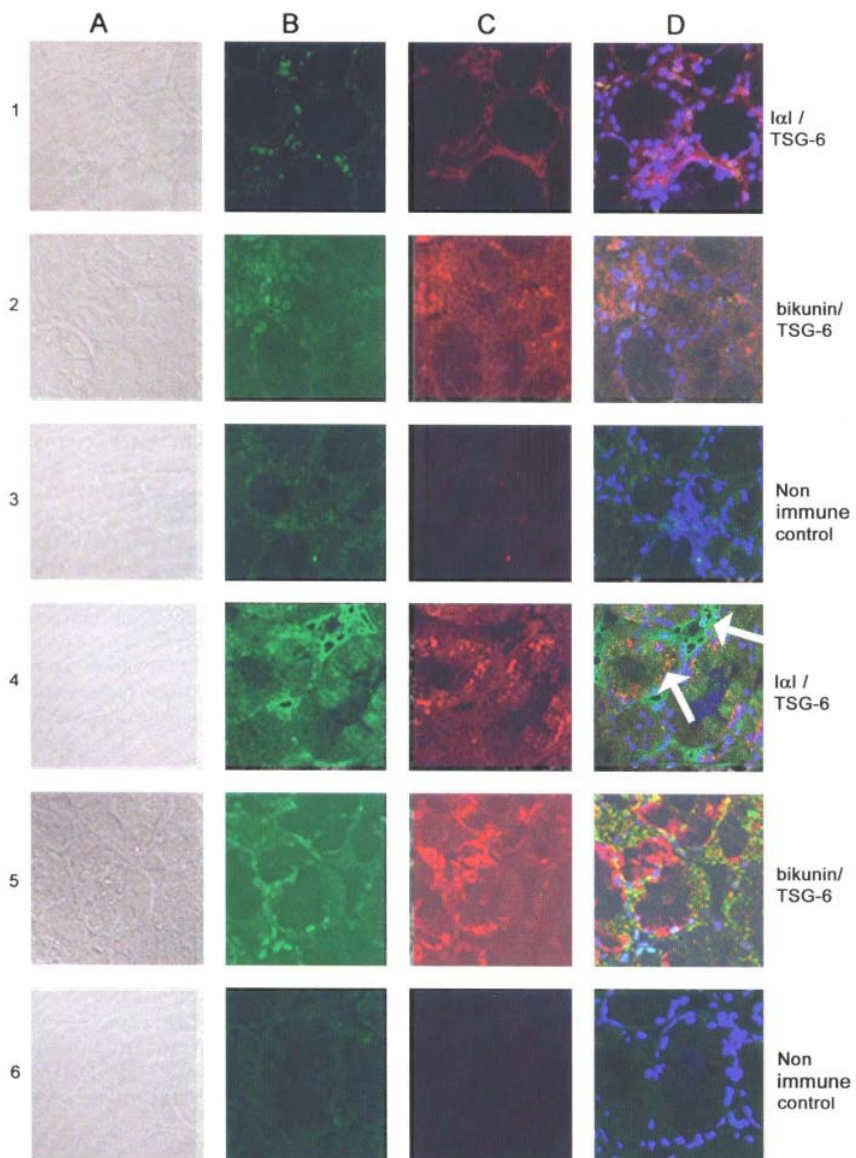
Gambar 1. Kadar TSG-6 antar kelompok (N : 12)

Ekspresi gen TSG-6 dari sintesis protein pada BAL, HTA, dan visualisasi lokasi hiper-ekspresi melalui labeling pada pole apikal sel epitel dapat dilihat pada Gambar 2. Panel 1 C dan 2C pada kontrol tidak tampak ekspresi TSG-6. Panel 4C dan 5C tampak hiper-ekspresi pada perokok berat dan TBP. Panel 4D dan 5D tampak jelas hiper-ekspresi TSG-6 pada permukaan dan sel silia alveoler – sesuai arah panah.



Gambar 2. Fluoresens pada permukaan epitel aveoler

Hiper-ekspresi TSG-6 terlihat makin jelas pada hasil teknik imunokolorisasi pewarnaan DAPI (Gambar 3). Panel 1C dan 1D pada kelompok kontrol mulai tampak tanda hiperekspresi. Panel 4D dan 5D pada perokok berat dan TBP paru tampak jelas hiper- ekspresi TSG-6 pada nukleus sel alveolar.



Gambar 3. Imunokolorisasi dengan pewarnaan DAPI

PEMBAHASAN

Dihipotesiskan bahwa TSG-6 memacu aktivitas antiprotease, sehingga pada proses inflamasi akan terjadi hiper-ekspresi protein sesuai hasil penelitian ini. Diduga ekspresi TSG-6 meningkat pada dua kondisi yang mempengaruhi inflamasi saluran nafas yaitu

asma dan paparan kronis perokok sigaret (Henry, 2007). Penelitian ini mendapatkan bahwa TSG-6 berasal dari permukaan sel epitel, pada keadaan makin berat akan terdapat pada nukleus alveoler pada sekresi cairan alveoli. Secara *in vitro* terbukti bahwa TSG-6 meningkat setelah paparan alergen. Kemungkinan TSG-6 bersifat penghambat aktifitas tissue kalikrein (TK) dan bikunin pada sekresi alveoler, dengan mekanisme: serine inhibitor, pengendali kadar natrium Chanel akibat kehilangan cairan perisiliar pada epitel sel alveoli (Wolter, 2008).

Efek TSG-6 secara intraseluler adalah: (1) Mengatur homeostasis saluran nafas; (2) Antiplasmin dan anti inflamasi dengan chondroprotein pada tulang rawan (3) Inhibisi TK (Wolter, 2008; Christiansen *et al.*, 2008); (4) Mempertahankan kelenturan otot submukosal alveoler agar fungsi respirasi tetap adekuat; (5) Menghambat sekresi TNF- α pada perdarahan hebat dan infeksi berat seperti MTB (Christiansen *et al.*, 2008); dan (6) Menghambat serine-protease pada inflamasi saluran nafas sehingga dapat berfungsi sebagai bronkodilator, menurunkan permeabilitas vaskuler alveoli, penghambat netrofil elastase (Proud *et al.*, 2007).

Peningkatan TSG-6 pada perokok berat disebabkan oleh: (1) Efek Inflamasi akibat nikotin dan senyawa-senyawa organik lain yang meningkatkan ekspresi hyaluronidase (Clevert *et al.*, 2007); (2) Sel Silia meningkatkan afinitasnya terhadap protein mediator melalui TLR-*Toll like receptor* (Johnson *et al.*, 2008); (3) Aktivasi anti protease meningkat; dan (4) Meningkatkan "*water retaining capacity*" pada sel-sel silia (Casalino *et al.*, 2008).

Peningkatan TSG-6 pada TBP-BTA negatif disebabkan oleh: (1) Reaksi Innat imuniti yang berhubungan dengan makrofag inflamasi kronis; (2) Memacu efek Mannose-Receptor di dinding monosit lebih aktif (Scuri and Abraham, 2006); (3) Membentuk ikatan kompleks bikunin menghambat sekresi TK (Montgommery *et al.*, 2008); dan (4) Menghambat inflamasi sub-epitel dan sub-mukosal alveoli dan bronkioli.

Berdasarkan hasil pengamatan meskipun dengan responden sangat sedikit, pada penelitian ini ditemukan fenomena baru dibandingkan dengan laporan sebelumnya, yaitu: (1) TSG-6 mempunyai fungsi baru yaitu secara aktif membentuk senyawa Bikunin sebagai penghambat TNF dan IL-1 β dalam proses inflamasi saluran nafas atas dan bawah; (2) Hiper-ekspresi TSG-6 pada perokok berat dan TBP-BTA negatif bersifat kalakendali sebagai mekanisme proteksi terhadap muko-siliar alveolar; dan (3) Dengan

responden lebih banyak, diharapkan TSG-6 dapat digunakan sebagai penyandi utama pada inflamasi saluran nafas termasuk perokok berat.

KESIMPULAN

TSG-6 dapat berfungsi sebagai penghambat TNF, penghambat serine-protease, anti-inflamasi, memacu *Toll-like receptor* pada reaksi alergen perokok berat dan TBP-BTA negatif. Untuk masa depan, TSG-6 dapat diharapkan sebagai bio-marker baru sebagai petanda proses inflamasi di saluran nafas.

DAFTAR PUSTAKA

- Boston G E, Ahmed A, Cortes A, Caplan J, Burch RM, Abraham WM., 2006, Mechanisms of metabisulfite-induced bronchoconstriction: evidence for bradykinin and TSG-6 stimulation, *J Appl Physiol*; 72: 1831-1837.
- Casalino K, Matsuda SM, Monzon ME, Conner GE, Salathe M., 2008, Role of hyaluronan and reactive oxygen species in TSG-6-mediated epidermal growth factor receptor activation in human airways, *J Biol Chem*; 279: 21606-21616.
- Christiansen SC, Proud D, Cochrane CG., 2008, Detection of tissue kallikrein in the bronchoalveolar lavage fluid of astmatic subject, *J Clin Invest*; 79: 188-197.
- Clevert R, Lauredo I, Abraham WM, Conner GE., 2007, Bronchial TSG-6 activity is regulated by hyaluronic acid binding, *Am J Respir Cell Mol Biol*: 21: 666-674.
- Frankey R, Lauredo IT, Burch R, Abraham WM., 2004, Extracellular metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* produce bronchoconstriction by different TSG-6 mechanisms, *Am J Respir Crit Care Med*; 149: 687-693.
- Gerald R, Botvinnikova Y, Ahmed A, Cortes A, Gundel RH., 2006, The interaction of alpha 1-proteinase inhibitor and tissue kallikrein in controlling allergic human airway hyperresponsiveness, *Am J Respir Crit Care Med*; 154: 36-42.
- Henry K., 2007, Vasoactive peptides: state-of-the-art review, *Hypertension*; 5:117-126.
- Johnson B, Lieb H, Aoki T, Savani RC, Conner GE, Salathe M., 2008, Hyaluronan serves a novel role in airway mucosal host defense, *FASEB J*; 15: 2179-2186.
- Montgomery L, Botvinnikova Y, Lauredo IT, Abraham WM., 2008, Recombinant alpha 1-proteinase inhibitor blocks antigen – and TSG-6 induced airway respons, *J Appl Physiol*; 93: 1900-1906.
- Mouzer H, Sierene M, Howard F., 2007, A bradykinin-antagonist blocks antigen induced airway hyperresponsiveness and inflammation in human. *Pulm Pharmacol*; 3: 9-15.
- Polansky T., 2007, The potential role of bradykinin antagonist in the treatment of asthma, *Agents Actions Suppl*; 38: 439-449.

- Proud D, Sarnoff RB, Juergens U, Cochrane CG, Zuraw BL., 2007, Elevation of tissue kallikrein and decrease of TSG-6 in the airways of asthmatic subjects after endobronchial allergen challenge, *Am Rev Respir Dis*;145: 900-905.
- Scuri M, Abraham WM., 2006, Hyaluronan blocks human neutrophil elastase (HNE)-induced airway responses in human, *Pulm Pharmacol Ther*;16: 335-340.
- Susane M, Forteza R, Lauredo I, Sabater JR, Botvinnikova Y, Allerga L., 2007, Inhaled porcine pancreatic elastase causes bronchoconstriction via a bradykinin-mediated mechanism, *J Appl Physiol*; 89: 1397-1402.
- Van Nueten JM, Wellens D., 1979, Mechanisms of vasodilatation and antivasoconstriction of TSG-6, *Angiology*; 30: 440-446.