

□ 원 저 □

폐상피세포에서 Triptolide에 의한 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자 전사활성 억제기전

단국대학교 의과대학 내과학교실 호흡기내과, 생화학교실¹

지영구, 김윤섭, 윤세영, 김용호, 최은경,
박재석, 김건열, 채기남¹, 곽상준¹, 이계영

= Abstract =

Triptolide-induced Transrepression of IL-8 NF- κ B in Lung Epithelial Cells

Young Koo Jee, M.D., Yoon Seup Kim, M.D., Se Young Yun, M.D.,
Yong Ho Kim, M.D., Eun-Kyoung Choi, M.D., Jae Seuk Park, M.D.,
Keu-youl Kim, M.D., Gi Nam Chea¹, B.A. Sahng June Kwak¹, M.D.,
and Kye Young Lee, M.D.

*Division of Pulmonary Medicine and Department of Biochemistry,
Dankook University Medical Center, Chonan, Korea*

Background : NF- κ B is the most important transcriptional factor in IL-8 gene expression. Triptolide is a new compound that recently has been shown to inhibit NF- κ B activation. The purpose of this study is to investigate how triptolide inhibits NF- κ B-dependent IL-8 gene transcription in lung epithelial cells and to pilot the potential for the clinical application of triptolide in inflammatory lung diseases.

Methods : A549 cells were used and triptolide was provided from Pharmagenesis Company (Palo Alto, CA). In order to examine NF- κ B-dependent IL-8 transcriptional activity, we established stable A549 IL-8-NF- κ B-luc. cells and performed luciferase assays. IL-8 gene expression was measured by RT-PCR and ELISA. A Western blot was done for the study of I κ B α degradation and an electromobility shift assay was done to ana-

¹이 논문은 1999년 한국과학재단 국산연구기기활용 연구과제 (과제번호 199-209-00-008-1)의 보조로 이루어 졌음.

Address for correspondence :

Kye Young Lee, M.D. & Ph.D.

Division of Pulmonary Medicine Dankook University Medical Center

16-5 Anseo-dong, Chonan, 330-714, Korea

Phone : 041-550-3916 Fax : 041-556-3256 E-mail : kyleemd@anseo.dankook.ac.kr.

lyze NF- κ B DNA binding. p65 specific transactivation was analyzed by a cotransfection study using a Gal4-p65 fusion protein expression system. To investigate the involvement of transcriptional coactivators, we performed a transfection study with CBP and SRC-1 expression vectors.

Results : We observed that triptolide significantly suppresses NF- κ B-dependent IL-8 transcriptional activity induced by IL-1 β and PMA. RT-PCR showed that triptolide represses both IL-1 β - and PMA-induced IL-8 mRNA expression and ELISA confirmed this triptolide-mediated IL-8 suppression at the protein level. However, triptolide did not affect I κ B α degradation and NF- κ B DNA binding. In a p65-specific transactivation study, triptolide significantly suppressed Gal4-p65TA1 and Gal4-p65TA2 activity suggesting that triptolide inhibits NF- κ B activation by inhibiting p65 transactivation. However, this triptolide-mediated inhibition of p65 transactivation was not rescued by the overexpression of CBP or SRC-1, thereby excluding the role of transcriptional coactivators.

Conclusions : Triptolide is a new compound that inhibits NF- κ B-dependent IL-8 transcriptional activation by inhibiting p65 transactivation, but not by an I κ B α -dependent mechanism. This suggests that triptolide may have a therapeutic potential for inflammatory lung diseases. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 52-66)

Key words : IL-8, NF- κ B, Triptolide, Transrepression, p65 transactivation, CBP, SCR-1.

서 론

주로 중국의 남부에서 서식하는 식물인 Tripterygium Wilfordii Hook(雷公藤, thunder god vine, seven-step vine)은 중국에서 오래 전부터 류마티스 관절염, 루푸스, 접촉성 피부염 등의 피부질환, 알레르기 혈관염 등의 염증성 질환에 이용되어 오던 식물이다. 약제로 이용되는 것은 주로 뿌리이며 잎이나 꽃, 껍질은 독성이 강하여 복용하면 사망할 수도 있다고 한다. 약제로 사용되는 뿌리에서 chloroform/methanol로 추출한 물질 중 T2 라는 물질은 면역억제기능을 가지고 있는데¹⁻⁴ 이 T2를 더욱 순수 정제된 물질이 diterpenoids triepoxide, 즉 triptolide이다. 따라서 이 triptolide 역시 면역억제기능이 있다고 하며, triptolide의 작용기전은 NF- κ B의 활성억제제라고 보고되어 있다⁵.

IL-8은 폐상피세포에서 분비되는 C-X-C 가족 군에 속하는 강력한 화학주성인자(chemokine) 중의 하나로 호중구의 내피세포 부착과 이동에도 작용하면

서 많은 폐 질환의 염증반응에 관여하고⁶⁻¹² 특히 천식 등과 같은 IgE 매개성 폐염증반응에도 중요한 역할을 한다^{13,14}. IL-8 mRNA와 단백질의 발현은 안정 시에는 미미하지만 염증성 자극이 발생하면 매우 신속하고 대량으로 유도되는데 이는 IL-8 유전자의 조절이 매우 엄격하게 조절되고 있다는 것을 의미한다. IL-8 유전자의 발현은 전사적 조절에 의해 이루어진다. IL-8 유전자의 전사는 촉진자 영역에서 NF- κ B와 NF-IL-6 혹은 NF- κ B와 AP-1 결합 부위간의 배합이 필요한 것으로 알려져 있는데 이 중에서 NF- κ B가 가장 중요한 역할을 한다¹⁵⁻¹⁷. 그렇기 때문에 기관지천식 등의 염증질환 치료에 NF- κ B의 억제와 관련 가능할 것인가를 평가하고 그 기전을 찾는 데 있어 IL-8 유전자를 목표로 하는 것이 적절할 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 이 triptolide라는 물질이 폐상피세포에서 NF- κ B 의존성 IL-8 사이토카인 유전자의 전사활성을 억제하는 지를 확인하고 triptolide에 의한 NF- κ B 억제기전을 밝혀 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 시약

A549(type II pneumocyte) 세포주를 RPMI 1640 (supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin) 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)는 Sigma사(St Louise, USA), IL-1 β 는 R&D사(Minneapolis, USA)에서 구입하였으며 triptolide는 미국 Pharmagenesis사로부터 제공받았다.

2. 플라스미드(plasmid) 및 유전자 주입

NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성을 평가하기 위하여 IL-8-NF- κ B luciferase report gene construct를 이용하여 luciferase reporter gene assay를 하였다¹⁸. IL-8-NF- κ B luciferase report gene construct를 간략히 설명하면, 한 쌍의 primers (sense : 5' - ATGTCTCGAGAATTCGTACCCAGGCATTAT TTTATC-3', antisense : 5'-TTGT-CCTAGAAGCTTGTGTGCTCTGCTGTC -3'; 밑줄친 부분이 각각 XhoI과 HindIII 절단부위)와 정상인의 백혈구에서 추출된 DNA 1 μ g을 이용하여 IL-8 촉진자 (IL-8 전사 시작 부위를 기준으로 -1481 to +44) 전장의 중합효소연쇄반응 생성물을 얻은 후 이를 luciferase 발현 벡터(vector)인 pCLN15deltaCX의 XhoI-HindIII 절단부위로 subcloning하여 삽입해서 IL-8-NF- κ B luciferase reporter gene construct로 구축된 것이다.

안정적으로 IL-8-NF- κ B luciferase 유전자를 발현하는 A549 세포주(A549 IL8- κ B-luc)를 획득하기 위하여 위에서 언급한 IL-8-NF- κ B luciferase reporter gene construct를 Lipofectamine-plus (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)를 이용하여

A549 폐상피세포주에 유전자 주입을 시행한 후 G418 400 μ g/ml 농도하에서 선택 배양하였다.

NF- κ B p65의 transactivation 연구를 위해서는 p65 특이적 전사활성을 반영하는 Gal4-p65 fusion protein expression vector를 이용하였다. 즉 Gal4, Gal4-p65TA1, Gal4-p65TA2 발현 벡터와 5 \times Gal4-luciferase reporter gene construct (Gal4 결합부위가 5회 반복되어 있고 luciferase 유전자와 결합되어 있음)를 이용하였다^{19,20}.

전사협동 활성인자(transcriptional coactivator)인 CREB-binding protein(CBP)와 steroid receptor coactivator-1(SRC-1) 발현 벡터들(각각 pRc/RSV-mCBP, pcDNA3-hSRC-1A)은 전남대학교 이재운 박사로부터 제공받았다. 이들을 Gal4, Gal4-p65TA1, Gal4-p65TA2 발현 vector들과 함께 유전자주입 실험을 시행하여 이들 전사협동활성인자가 triptolide에 의한 NF- κ B p65의 transrepression에 미치는 영향을 평가하였다.

3. Luciferase assay

해당 세포주를 실험계획에 따라 24 well 배양용기에 배양한 후 정해진 시점에 배양액을 제거하였고 phosphate buffered saline(PBS)로 1회 세척한 후 0.1 ml의 용해완충액(lysis buffer) (0.1 M HEPES, pH 7.6, 1% Triton-X, 1 mM DTT and 2 mM EDTA)을 직접 첨가하여 수확한 후 4°C에서 10분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 세포단백을 얻었다. PMA(20 ng/ml)와 IL-1 β (1 ng/ml)로 자극하는 경우에는 6시간 자극 후 단백질을 수확하였다. Bradford assay(Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 단백질농도를 측정한 후 20 μ g의 단백질을 luciferase assay mix [25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO₄, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 5 mM ATP and 1 mM D-luciferin (Pharmingen International)]에 첨가한 후 TD-20/20 Luminometer(Turner Design, Sunnyvale,

CA)로 luminescence를 측정하였다. 각 실험은 4회 반복하여 결과를 분석하였다.

4. ELISA

A549 세포주에서 PMA (20 ng/ml) 및 IL-1 β 에 의한 IL-8의 분비 정도에 triptolide가 미치는 영향을 평가하기 위해 세포배양액에서 OptEIA™ Human IL-8 ELISA Kit (Pharmingen, San Diego)를 이용하여 IL-8의 농도를 측정하였다. PMA (20 ng/ml) 및 IL-1 β (1 ng/ml) 자극 후 6시간 후에 세포배양액을 IL-8 단클론항체가 부착된 well에 100 μ l 씩 넣고 2시간 반응시킨 후에 검출항체 (detection antibody, biotinylated anti-human IL-8 monoclonal antibody)를 100 μ l 씩 넣고 1시간동안 반응시켰다. 과산화수소 (hydrogen peroxide)와 발색제 (TMB, tetramethylbenzidine)를 넣고 1M phosphoric acid로 반응을 중단시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정해진 농도의 IL-8을 희석하여 작성한 표준곡선을 이용하여 IL-8의 절대 농도를 계산하였다.

5. 역전사-중합효소연쇄반응 (RT-PCR)

A549세포주에서 IL-1 β 자극에 의한 IL-8 mRNA 전사에 triptolide가 미치는 영향을 평가하기 위해 역전사-중합효소연쇄반응을 시행하였다. 정해진 시점에 60 mm 접시의 배양액을 제거한 후 Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg)를 첨가하였다. 이를 eppendorf tube에 옮긴 후 chlorform을 넣고 진탕 혼합한 뒤 2-3분 뒤에 4°C 13,000 rpm에서 원심분리하였다. 조심스럽게 RNA가 포함된 상층액을 얻은 뒤 isopropyl alcohol을 넣고 얼음에서 10분간 반응시키고 4°C 13,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 제거하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 농도를 분광광도계 (OD 260/280에서 흡광도 측정, Beckman, CA)를 이용하여 측정하였다. 2 μ g의 RNA를

oligo(dT)에 첨가하여 65°C에서 5분간 결합반응 (annealing)시킨 후 First strand buffer, 0.1 M DTT, 2.5 mM dNTP, RNAase inhibitor, reverse transcriptase(RT)를 다시 첨가하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다.

cDNA는 10 \times PCR buffer [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl₂], 2.5 nM dNTP, Taq DNA polymerase (TaKaRa Taq™, TaKaRa, Shiga, Japan)의 반응액에서 증폭되었다. DNA thermal cycler (Gene Amp PCR system 9600, Perkin Elmer)에서 94°C 1분 (denaturation), 55°C 1분 (annealing), 그리고 72°C 1분 (extension)으로 25 cycle 반복하였다. PCR 반응 후에 1.5% agarose gell electrophoresis 하였고, β -actin을 같은 방법으로 실험하여 보정하였다. 사용한 oligonucleotide는 주문 제작 (Bioneer, 충북 청원) 하였으며 염기서열 (base sequence)은 아래와 같다.

β -actin sense ; 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCCA-3'

β -actin antisense ; 5'-CTCCTTA\ATGTCACGCACGATTC-3'

IL-8 sense ; 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATT-3'

IL-8 antisense ; 5'-AACTTCTCCACAACCC-TCTG-3'

6. Western blot 분석

A549 세포주에서 IL-1 β 에 의한 I κ B α 의 분해에 triptolide가 미치는 영향을 평가하기 위해 Western blotting을 시행하였다. 각 세포주를 5개의 60 mm 접시 (dish)에서 80-90%의 confluency가 되도록 배양한 후 IL-1 β 1 ng/ml 농도로 각각 0, 10, 30, 60, 120분 처리한 후 trypsin/EDTA로 수확하여 용해 (lysis) 용액 (1% SDS, 1mM sodium vanadate, 10 mM Tris-HCl pH 7.4)으로 전세포용해질 (whole cell lysate)를 획득한 뒤 5분간 4°C 14,000

rpm에서 원심분리하여 단백추출을 얻었다. Bradford assay로 단백질농도를 측정하고 3분간 가열하여 변성(denaturation)시킨 후 SDS-PAGE(12% gel)로 전기영동하여 nitrocellulose에 이전하였다. Blot을 차단완충액(blocking buffer, 4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 배양(incubation)시킨 후 rabbit polyclonal κ B α 항체(Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA)를 4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20 등을 포함한 4% milk 용액에 1:1000 희석하여 1시간동안 실온에서 배양하였다. 10분씩 3회 세척한 후 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG가 1:5000으로 희석된 차단완충액으로 2차 항체반응을 1시간 거친 후 역시 3회 세척하고서 ECL(Amersham, Arlington Heights, IL) 검출하였다.

7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

각 세포주를 100 mm 접시(dish)에서 80-90% confluency되게 배양한 후 (1) 무처리, (2) triptolide (20 ng/ml) 12시간, (3) IL-1 β (1 ng/ml) 1시간, (4) triptolide를 전처리한 다음 IL-1 β 1시간으로 각각 처리한 후 trypsin/EDTA로 수확하였다. 100 μ l Buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.2% NP-40 with protease inhibitors)를 첨가한 후 25 gauge 주사바늘로 5-6회 통과시켜 세포막을 파괴시켰다. 4°C에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 세포 핵 pellet을 얻은 후, 100 μ l Buffer C (20 mM HEPES (pH 7.9), 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA plus protease inhibitors)를 첨가하여 핵막을 파괴시키고 4°C에서 30분간 휘저어 섞었다. 4°C에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 chromatin을 pellet시켜 핵추출(nuclear extraction) 성분을 얻은 후 4°C에서 Buffer

D (20mM HEPES (pH 7.9), 20% glycerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM DTT)로 6시간 투석하였다. 핵단백을 획득한 후 Bradford assay로 단백질농도를 측정하였다. EMSA는 추출된 핵단백 7.5 μ g을 1 μ g의 poly(dI-dC) : poly(dI-dC)와 2.5 pg의 (α -³²P)-labeled oligonucleotide probe (1 \times 10⁵ cpm)이 포함된 20 μ l의 결합완충액(binding buffer, 25 mM HEPES(pH 7.6), 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 50mM KCl, 0.05 mM DTT)에 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 0.5 \times Tris-Borate EDTA (pH 8.3) 완충액에서 4% nondenaturing polyacrylamide gel을 전기영동하여 단백질-DNA 복합체를 분리한 후 autoradiography로 결과를 얻었다. Oligonucleotide 소식자 (probe)는 IgG kappa chain 유전자의 5 flanking 부위의 NF- κ B site(5'-tcgaGTCGGGGACTTTCCTCTGA-3')를 사용하였고 이에 대한 상보적 strand를 5' 쪽에 네 개의 염기 overhang을 갖도록 고안하여 결합반응(annealing)시킨 후 (α -³²P) dCTP (Amersham, Arlington Heights, IL)와 non-radioactive dA/T/GTPs, 그리고 Klenow DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 제조하였다. Cold competition assay를 위해서는 250 pg(100 \times)의 cold oligonucleotide probe를 radio-labeled probe와 반응시키기 5분전에 먼저 반응시켰다.

결 과

1. Triptolide에 의한 NF- κ B 의존성 IL-8 전사활성 억제효과

폐상피세포에서 PMA와 IL-1 β 자극에 의한 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성에 대한 triptolide의 억제효과를 확인하기 위하여 triptolide(20 ng/ml)로 전처리한 후 PMA(20 ng/ml)와 IL-1 β (1 ng/

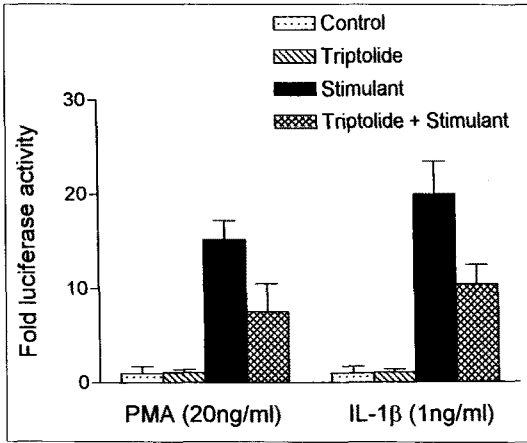


Fig. 1. Inhibition of PMA or IL-1 β -induced NF- κ B- dependent IL-8 gene transcriptional activation by triptolide. A549 IL-8-NF- κ B luciferase cells were pretreated with or without triptolide (20 ng/ml) for 12 hr and harvested 6 hrs after culture in the presence of PMA (20 ng/ml) or IL-1 β (1 ng/ml) for analysis of luciferase activity. Data represent the mean \pm SD.

ml)로 자극하여 luciferase assay를 한 결과 triptolide로 전처리한 경우 전처리를 하지 않은 경우와 비교하여 luciferase 활성이 약 50% 정도 억제되는 결과를 보였다(Fig. 1). Triptolide 단독으로는 거의 luciferase 활성변화가 없었다.

2. PMA 및 IL-1 β 에 의한 IL-8 생성에 대한 단백질 수준에서의 triptolide의 억제효과

폐상피세포에서 PMA와 IL-1 β 에 의한 IL-8 분비증가에 대한 triptolide의 효과를 관찰하기 위해 triptolide 전처리 유무에 따른 세포배양액에서의 IL-8 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다.

IL-8의 농도는 대조세포주의 868 pg/ml에서 PMA(20 ng/ml)와 IL-1(1 ng/ml)로 자극한 후 4853 pg/ml, 3155 pg/ml로 증가하였고, triptolide (20 ng/ml)를 전처리한 세포주에서는 884 pg/ml, 697 pg/ml로 감소하였다(Fig. 2).

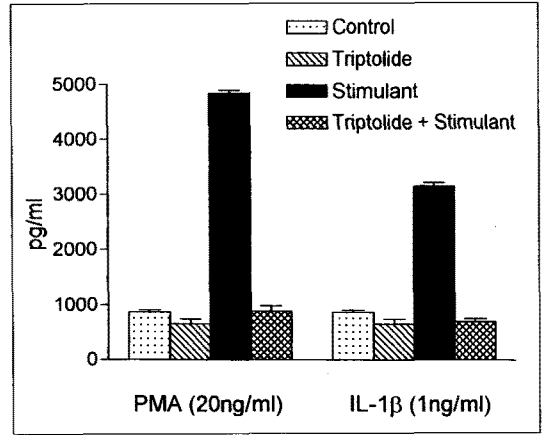


Fig. 2. Suppression of PMA or IL-1 β -induced IL-8 production by triptolide. A549 cells were pretreated with or without triptolide(20 ng/ml) for 12 hr and harvested 6 hrs after culture in the presence of PMA (20 ng/ml) or IL-1 β (1 ng/ml) for ELISA. Data represent the mean \pm SD.

3. PMA 및 IL-1 β 에 의한 IL-8 유전자 전사 유도에 대한 triptolide의 억제효과

폐상피세포에서 PMA와 IL-1 β 에 의한 IL-8 유전자 전사의 증가에 대한 triptolide의 효과를 관찰하기 위해 triptolide 전처리에 따른 세포주의 IL-8 mRNA를 역전사-중합효소연쇄반응으로 관찰하였다. IL-1 β (1 ng/ml)로 각각 2, 4시간 자극한 경우 뚜렷한 IL-8 mRNA의 발현 유도가 관찰된 반면 Triptolide(20 ng/ml)로 12시간 전처리한 경우 IL-8 mRNA의 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

4. I κ B α 분해과정에 triptolide가 미치는 영향

Triptolide가 폐상피세포에서 NF- κ B 전사를 억제하는 기전을 밝히기 위해 triptolide가 IL-1 β (1 ng/ml)에 의한 I κ B의 분해에 영향을 미치는지 알아보고자 Western blotting으로 확인하였다. I κ B α 는 IL-1 β 자극 후 10분에 신속히 분해되었다가 시간이 지남에

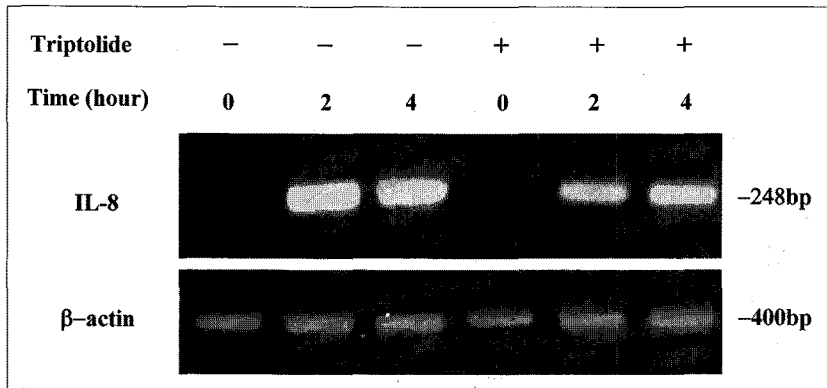


Fig. 3. Suppression of IL-1 β -induced IL-8 mRNA transcription by triptolide. A549 cells were pretreated with or without triptolide(20 ng/ml) for 12 hr and harvested at 6 hrs after culture in the presence of IL-1 β (1 ng/ml) for RT-PCR.

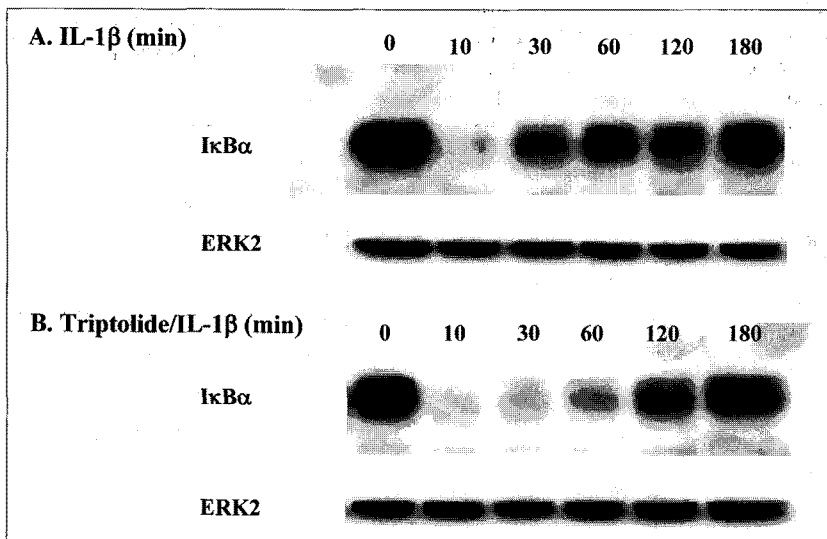


Fig. 4. No effect of triptolide on IL-1 β -induced $I\kappa B\alpha$ degradation. A. A549 cells were treated without triptolide(20 ng/ml) and harvested 0, 10 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 3 hr after treatment of IL-1 β (1 ng/ml) for Western blot analysis with a polyclonal $I\kappa B\alpha$ antibody. B. The same experiment was done after 12 hr-pretreatment with triptolide (20 ng/ml).

따라 다시 나타나는 양상을 보이는데 이는 $I\kappa B\alpha$ 가 NF- κB 활성화에 의해 전사유도되는 유전자이기 때문이다. 이러한 NF- κB 활성화 시 관찰되는 $I\kappa B\alpha$ 의 재등장은 NF- κB 의 지나친 활성화를 방지하는 일종의

자동 switch-off system 가능하다. 반면 triptolide는 IL-1 β 에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해에 아무런 영향을 미치지 못하였다(Fig. 4).

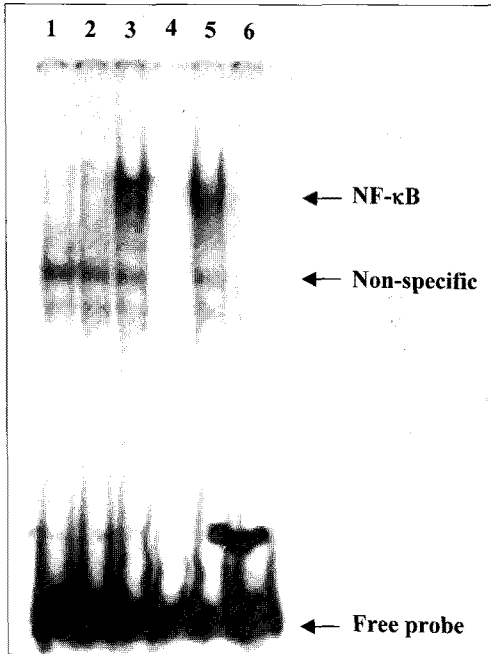


Fig. 5. No effect of triptolide on IL-1 β mediated induction of NF- κ B DNA binding. Nuclear extracts were prepared and analyzed by electrophoretic mobility shift assay in A549 cell line with a radiolabeled IgG κ -NF- κ B probe. In the lane 4 and 6, a 100 \times excess of unlabeled IgG κ oligonucleotide was added 5 min prior to the addition of radiolabeled probe. Lane 1; control, lane 2; triptolide (20ng/ml), lane 3; IL-1 β (1 ng/ml), lane 4; + \times 100 cold competition, lane 5; triptolide/IL-1 β lane 6; +100 \times cold competition.

5. IL-1 β 자극에 의한 NF- κ B의 핵이동과 DNA 결합에 triptolide가 미치는 영향

Triptolide가 IL-1 β 에 의한 NF- κ B의 핵이동과 DNA 결합에 미치는 영향을 평가하기 위하여 EMSA를 시행하였다. 그 결과 IL-1 β (1 ng/ml) 1 시간 자극으로 뚜렷한 NF- κ B 복합체가 유도됨을 확

인할 수 있었으며 cold competition으로 차단되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5). 그러나 triptolide는 IL-1 β 에 의한 NF- κ B DNA 결합에 대해 아무런 영향을 미치지 않았다.

6. Triptolide에 의한 p65 transactivation 억제효과

이상의 결과에서 triptolide가 IL-1 β 에 의한 NF- κ B 의존성 IL-8 전사활성을 의미있게 억제함을 luciferase assay를 통하여 확인한 반면 NF- κ B 활성화경로의 전형인 I κ B α 의 분해 및 NF- κ B의 핵이동과 DNA 결합과정에는 아무런 영향을 미치지 못함을 확인하였다. 이는 triptolide가 다른 경로를 통하여 NF- κ B 활성을 억제한다는 것을 시사하며 이상의 결과로부터 추론해 볼 때 NF- κ B와 DNA 결합 이후에 발생하는 것으로 추측할 수 있으며 그 가능성으로 가장 높은 것은 NF- κ B 전사활성에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 p65의 transactivation 기능에 영향을 미치는 것이라 가정하고 triptolide가 p65 transactivation에 미치는 영향을 조사하였다. p65에 특이적인 전사 활성을 평가하기 위하여 효모균의 전사인자인 Gal4와 p65 transactivation domain의 fusion 단백질을 발현하는 expression vector와 Gal4에 대한 전사 활성을 평가할 수 있는 5 \times Gal4 luciferase vector를 동시에 유전자 주입한 후 luciferase를 시행하였다. 그 결과 Gal4 vector만 유전자주입한 경우 luciferase 활성의 증가가 전혀 없었으나 p65 transactivating domain이 결합된 Gal4-p65TA1 혹은 Gal4-p65TA2 발현 플라스미드를 5 \times Gal4-luciferase reporter gene과 함께 유전자주입한 후에는 각각 5.7배와 500.8배의 전사활동의 증가를 관찰할 수 있었다. 반면 triptolide는 이러한 p65TA1 및 TA2의 전사 활성을 현저히 감소시키는 결과를 나타내어 triptolide가 NF- κ B를 억제하는 기전은 핵내에서 p65에 의한 transactivation을 억제함으로써 이루어진다는 것을 확인하였다(Fig. 6).

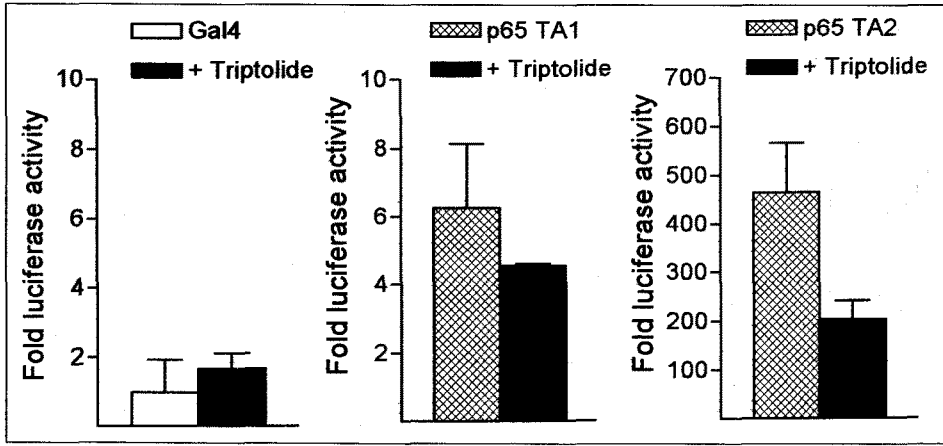


Fig. 6. Inhibition of p65 transactivation by triptolide. A549 cells were transfected with Gal4, Gal4-TA1 (p65 TA1) or Gal4-TA2 (p65 TA2) vector and 5× Gal4-luciferase vector. After 48 hr cells were harvested for analysis of luciferase activity.

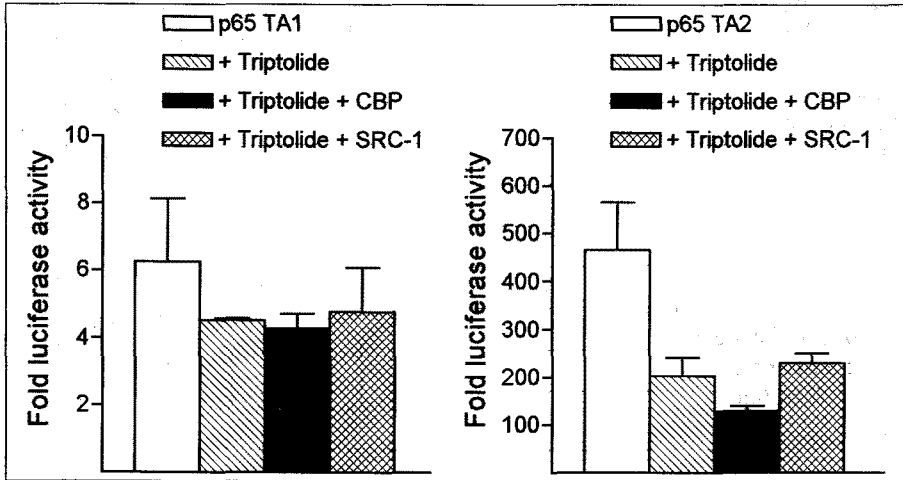


Fig. 7. No recovery of triptolide-mediated inhibition of p65 transactivation by cotransfection with CBP or SRC-1. CBP and SRC-1 were cotransfected with Gal4-TA1 (p65 TA1) or Gal4-TA2 (p65 TA2) vector and 5x Gal4-luciferase vector after pretreatment of triptolide. After 48 hr cells were harvested for analysis of luciferase activity.

7. 전사협동 활성인자 CBP 및 SRC-1가 triptolide에 의한 p65 transactivation 억제에 미치는 영향

다음 과정으로 triptolide가 어떻게 p65 transactivation의 억제 효과를 유도하는가에 대한 의문을 풀기 위하여 최근에 주목받고 있는 transcriptional

coactivator의 역할을 조사하여 보았다. transcriptional coactivator는 전사인자와 basal transcriptional apparatus 사이에서 교량역할을 하는 단백질군의 하나이다. 이 중에서 가장 잘 알려져 있는 것이 CBP (CREB-binding protein)로서 이는 NF- κ B 외에 AP-1, STATs, p53 등 여러 전사인자의 전사

활성을 증폭시키는 coactivator 역할을 함이 이미 잘 밝혀져 있다. 이 외에 SRC-1 (steroid receptor coactivator-1)도 최근 알려진 coactivator로서 역시 NF- κ B의 전사활성에 중요한 역할을 함이 밝혀져 있다. 만약 CBP나 SRC-1과 같은 coactivator가 triptolide에 의한 p65 transactivation의 억제에 영향을 미친다면 CBP나 SRC-1 발현 vector를 유전자주입 함으로써 CBP나 SRC-1을 보충시켰을 때 triptolide에 의한 p65 transactivation 억제 효과가 소실되어 p65 활성화가 회복될 것이다. 그러나 triptolide에 의한 p65 transactivation 억제효과는 CBP나 SRC-1의 과발현으로 아무런 영향을 받지 않았다(Fig. 7). 이는 최근 보고된 p65와 CBP의 물리적 결합을 면역침전법을 이용하여 확인한 실험에서⁵ triptolide가 CBP를 통한 p65의 transactivation에 미치는 영향이 없다는 결과와 일치되는 결과라 하겠으며 triptolide가 어떻게 p65 transactivation을 억제하는지에 대해서는 추후 보다 깊은 연구가 있어야 될 것으로 생각되며 특히 p65의 인산화 과정은 좋은 목표가 되리라고 생각된다.

고 찰

NF- κ B는 기관지천식 등의 염증성 질환에서 중요한 전사인자이며 NF- κ B의 조절기전을 밝히는 것은 기관지천식 등의 염증성 질환의 병태생리를 이해하고 치료전략을 수립하는데 매우 중요한 일이다. 폐상피세포에서 triptolide가 TNF- α 의 자극에 의한 NF- κ B의 활성을 억제한다는 보고는 있다⁵. 그러나 전사인자 수준에서 triptolide가 PMA 및 IL-1 β 자극에 의한 IL-8 유전자 전사활성을 어떻게 억제하는가에 대한 논문은 아직 없으며 그 구체적인 분자학적 기전 역시 아직 모르고 있다. 이에 본 연구를 시행하였으며, 본 연구의 결과 triptolide는 폐상피세포에서 NF- κ B를 억제함으로써 PMA 및 IL-1 β 자극에 의한 IL-8 유전자의 전사활성 및 IL-8의 생성을 억제하였다. 그리고 이러한 폐상피세포에서의 triptolide에 의한 NF- κ

B 의존성 IL-8 유전자 전사활성 억제기전은 NF- κ B가 DNA에 결합한 후의 transactivation을 억제함으로써 발생함을 확인할 수 있었다.

NF- κ B 활성화 경로에 있어서 중심이 되는 과정은 I κ B가 I κ B kinase α (IKK α) 혹은 I κ B kinase β (IKK β)에 의해 인산화되고 뒤이어 ubiquitination되어 proteasome에서 분해되는 것이다. 즉 I κ B로부터 분리됨으로써 NF- κ B가 핵내로 이동하고 전사활성이 일어나는 것이다. 이 과정에 있어 NF- κ B의 전사활성을 억제하는 기전은 I κ B α 의 합성을 유도하여 지속적으로 NF- κ B의 유리를 방해하는 방법과 I κ B α 의 인산화와 분해를 방해하여 NF- κ B 활성을 억제하는 방법 두 가지가 알려져 있는데 T 세포와 단핵구 등과 같은 면역세포에서는 전자의 방법이 잘 밝혀져 있으며²¹, 후자의 경우는 salicylic acid에 의한 NF- κ B 활성 억제기전으로 잘 알려져 있다²².

본 연구에서는 IL-1 β 로 자극을 하고서 triptolide가 I κ B 경로에 미치는 영향을 분석하였다. 한편 Human U937 (monocyte) 세포주에서의 보고에 의하면 IL-1 β 자극은 TNF- α 와는 달리 그 자극에 의한 전사활성의 변화가 I κ B α 경로에 의존하는 정도가 적으며, I κ B α 경로 외에 NF- κ B의 전사활성을 증가시키는 다른 기전이 존재한다고 하였다²³. 이러한 Human U937 세포주에서의 결과는 IL-1 β 의 자극이 I κ B 경로와는 다른 경로를 이용한다는 결과이기 때문에 IL-1 β 로 자극을 할 때 I κ B의 분해과정을 검증하는 것은 의미가 없을 수도 있다. 그러나 본 연구의 결과는 Human U937세포에서와 달리 IL-1 β 자극에 의해 100% 가까운 I κ B의 소실을 볼 수 있었기 때문에 적어도 A549 폐상피세포에서는 IL-1 β 자극에 의한 NF- κ B의 활성화는 I κ B 경로가 주된 자극 기전이라고 생각된다. 따라서 폐상피세포에서는 IL-1 β 자극 후에 일어나는 I κ B의 분해과정을 검증하는 것이 의미가 있다고 할 수 있다. 본 연구의 결과 폐상피세포에서의 triptolide에 의한 NF- κ B 억제는 I κ B의 인산화 및 분해에는 영향을 미치지 않았다. 그리고 TNF- α 자극에 대한 triptolide의 NF- κ B 전사활성 억제에

대한 보고에서 triptolide가 TNF- α 의 자극에 의한 I κ B의 활성화 경로에 영향을 미치지 않는다고 하는 결과와⁵ 본 연구의 결과를 볼 때 triptolide가 폐상피세포에서 IL-8 유전자 전사활성을 억제하는 기전이 I κ B의 인산화 및 분해를 억제하는 것은 아니라고 생각한다. 즉 A549 폐상피세포의 경우 이들 여러 자극에 의해 I κ B의 인산화 및 분해가 유도되어 NF- κ B 전사의 활성화가 일어나며, 이러한 I κ B의 인산화 및 분해 과정에 triptolide는 영향을 미치지 못한다고 할 수 있다.

본 연구에서 triptolide에 의한 I κ B의 전사유도에 관한 실험은 하지 않았는데 triptolide가 I κ B의 전사유도를 하지는 않는 것으로 생각된다. 이것은 결과에서 알 수 있듯이 triptolide가 I κ B의 인산화 과정에 영향을 미치지 않았을 뿐 아니라 핵이동에 영향을 미치지 않는 것 같기 때문이다. 만일 triptolide에 의해 I κ B의 전사유도가 일어난다면 NF- κ B의 핵이동 억제대로 되지 않을 것이다.

NF- κ B의 DNA 결합을 방해하지 않으면서 NF- κ B 전사활성을 억제하는 경우가 존재한다는 사실은 최근 알려졌다. 이는 NF- κ B의 조절기전이 DNA 결합 이후에 발생하는 핵내과정에 있을 수 있다는 것이다.^{5,24} NF- κ B의 DNA 결합 이후에 발생하는 핵내과정에서 일어나는 NF- κ B의 전사활성 조절과정에는 p65 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉 NF- κ B의 경우 p50은 DNA 결합에 관여할 뿐 transactivation의 기능은 없고 p65가 transactivation의 기능을 담당하는 것으로 밝혀져 있다. p65의 transactivation 기능은 C-종말부위(아미노산 286-551)에 존재하며 여러 연구에서 p65의 transactivating domain과 효모균(yeast)의 전사인자 Gal4의 DNA-binding domain을 결합 합성하면 Gal4 결합부위를 갖는 보고유전자(reporter gene)를 활성화시키는 것으로 보고하고 있다.^{19,20} 이에 본 연구에서는 이 Gal4-p65 fusion protein expression vector를 이용하였다. p65 transactivating domain은 TA1(아미노산 521-551)과 TA2(아미노산 286-521)로 구성되어

있는데 TA1은 통상적 활성을 보이거나 TA2는 활성화에 PMA 등의 자극을 필요로 한다. Gal4-p65TA1 및 Gal4-p65TA2 fusion protein expression vector 모두에서 실험을 하였었으며, 연구결과 triptolide가 p65의 TA1 및 TA2 transactivation domain의 transactivation을 모두 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로 triptolide에 의한 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자 활성의 억제기전을 모두 설명할 수는 없을 것이다. 그러나 적어도 triptolide에 의한 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자 활성화 억제기전 중의 하나는 NF- κ B transactivation을 억제하는 것이라는 결론을 내릴 수 있다.

p65의 transactivation 기전은 인산화 과정과 관계있다고 한다. 실제로 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 p65의 serine-276 부위에 인산화가 발생하여 p65-mediated transactivation이 발생한다는 보고가 있고²⁵, p65의 C-종말부위의 serine 529 부위에 인산화가 발생하여 TNF- α 에 의한 NF- κ B transactivation이 유도됨이 확인되어²⁶ p65의 인산화가 핵이동이나 DNA 결합에는 아무런 영향을 미치지 못하면서 NF- κ B 전사활성을 증가시키는 것이 증명되었다. 이러한 p65의 인산화에 관여하는 kinase는 아직 확실히 밝혀지지 않은 상태로 triptolide가 p65의 인산화에 미치는 영향에 관한 것은 향후 연구되어야 할 과제이다.

CBP 및 SRC-1 등은 전사협동 활성인자(transcriptional coactivators)들이다. 최근의 보고에 의하면 NF- κ B의 transactivation에는 CBP 및 SRC-1 등의 전사협동 활성인자가 중요한 역할을 한다고 한다.²⁷⁻²⁹ 전사협동 활성인자는 전사인자와 기초전사기구(basal transcriptional apparatus)를 연결해주는 교량역할을 하는 단백질로서 CREB-binding protein(CBP)과 p300은 중간 기능성이 잘 유지되어 있는 단백질이다.³⁰ 최근의 연구결과에 의하면 CBP/p300가 NF- κ B p65 subunit의 전사협동 활성인자라는 것이 밝혀져 있다.^{25,28} 그리고 p65와 CBP/p300의 상호작용에 p65 serine 276의 인산화가 필요하고

핵내에서의 p65와 CBP의 상호작용이 NF- κ B 의존성 전사증가의 결과로 이어진다는 사실이 확인되어 있다. 즉 NF- κ B의 핵이동과 DNA결합이 이루어지더라도 실질적인 전사가 일어나려면 transactivation 도메인과 기초전사기구(basal transcriptional apparatus)사이를 연결하는 전사협동활성인자와의 단백질-단백질간의 물리적 상호작용이 중요한데 이 역할을 CBP/p300이 담당한다고 한다. 뿐만 아니라 SRC-1(steroid receptor coactivator-1)도 NF- κ B subunit인 p50과 결합하면서 NF- κ B에 의한 전사활동을 매개한다고 한다²⁹. 또한 SRC-1은 p300과 공동 과발현시 전사활동이 더욱 증가함이 보고되고 있다. 최근의 결과에 의하면 폐상피세포에서 스테로이드가 NF- κ B의 전사활성을 억제하는 기전은 이들 CBP 및 SRC-1과 GR(스테로이드 수용체, steroid receptor)과의 상호작용에 의한 것이라고 한다³¹. 그러나 triptolide의 경우 NF- κ B의 transactivation을 억제하는데 있어 이들 전사협동 활성인자들과의 상호작용이 없는 것으로 밝혀졌는데, 이는 최근 보고된 p65와 CBP의 물리적 결합을 면역침전법을 이용하여 확인한 실험에서⁵ triptolide가 CBP를 통한 p65의 transactivation에 미치는 영향이 없다는 결과와 일치되는 결과라 하겠으며 triptolide가 어떻게 p65 transactivation을 억제하는지에 대해서는 추후 보다 깊은 연구가 있어야 될 것으로 생각되며 특히 p65의 인산화 과정은 좋은 목표가 되리라고 생각된다.

본 연구에서는 NF- κ B의 subunit 중 가장 중요한 역할을 하는 p65에 대한 transactivation 과정을 주로 살펴보았는데 최근의 보고에 의하면 c-Rel 결핍 생쥐에서는 알레르겐 처치에 의한 기도염증 및 IgE의 증가 그리고 기도과민반응이 생기지 않는다고 한다³². 이 결과는 알레르겐에 의한 기도염증반응에 있어 c-Rel subunit에 의한 경로가 중요한 것이라는 결과로 c-Rel 등에 대한 triptolide의 영향에 대한 것 역시 추후에 연구되어야 할 것이다. 또한 triptolide가 세포에서 작용할 때 과연 특정 수용체를 이용하는지, 세포 내에서 전사인자와 비슷한 역할을 하는지 등에 대해서

도 역시 추후에 밝혀져야 할 것이다.

Triptolide는 중국에서 오래 전부터 염증성 질환에 사용되어 왔으나 이 약제가 당장 기관지천식과 같은 환자를 진료하는 임상에서 사용될 수는 없을 것이다. 그러나 본 연구에서 밝혔듯이 NF- κ B가 스테로이드 제제 외의 약제에 의해서 조절될 수 있으며 이는 새로운 약제의 개발이 가능하다는 것을 의미한다. 이러한 기전연구에 의해서 NF- κ B의 전사활성을 조절하는 기전을 밝힘으로써 기관지천식 등의 염증성 질환의 병태생리를 이해할 수 있으며, 나아가 새로운 임상에서 이용 가능한 약제의 개발이 가능할 것이다. 특히 기관지천식의 염증반응에서 NF- κ B의 중요성에 비추어 볼 때 NF- κ B를 조절하는 약제의 개발은 매우 중요할 것이다. 또한 가장 흔히 사용되고 중요한 항염증제인 스테로이드의 흡입치료에 의해서 NF- κ B의 DNA binding이나 전사활성이 전혀 감소하지 않았으며, A549 폐상피세포에서 dexamethasone 전처치가 IL-1 β 자극에 의해 일어나는 p65의 발현을 더 증가시킨다는 결과도 있기 때문에 스테로이드 제제의 사용에 따른 부작용의 측면을 고려하지 않더라도 스테로이드 제제와는 다른 기전의 항염증제제를 개발할 필요성이 있다. 따라서 임상이용이 가능한 NF- κ B 억제제의 개발은 큰 의미가 있으며, 본 연구에서 의도한 폐상피세포에서의 NF- κ B 조절 기전 연구의 결과가 도움이 될 것으로 기대한다.

요 약

연구배경 :

폐상피세포가 능동적으로 IL-8을 분비한다는 것은 주지의 사실이다. NF- κ B는 IL-8 발현 조절에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하는 전사인자이다. Triptolide는 최근 밝혀진 NF- κ B 억제제로서 중국한약제인 뇌공등(Tripterygium Wilfordii)에서 추출된 약제이다. 연구자들은 새로운 NF- κ B 억제제인 triptolide가 폐상피세포에서 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성을 억제하는 분자적 기전을 확인함으로써

triptolide가 염증성 폐질환에서 새로운 치료제로서의 가능성을 확인하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

방 법 :

폐상피세포로서 A549 세포주를 사용하였고 triptolide는 미국의 Pharamagenesis(Palo Alto, CA)사로부터 제공받았다. NF- κ B 활성유도물질로는 IL-1 β (R&D)와 PMA(Sigma)를 이용하였다. IL-8 유전자의 발현은 RT-PCR과 ELISA를 이용하여 측정하였다. NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성을 평가하기 위하여는 IL-8 NF- κ B luciferase construct를 안정적으로 유전자주입한 A549 IL-8 NF- κ B luciferase 세포주를 제조해 사용하였고 NF- κ B DNA 결합은 electromobility shift assay(EMSA)를 이용하였다. p65 전사활성을 assay하기 위해서는 Gal4-p65 fusion protein expression system을 유전자주입과 luciferase assay를 통하여 시행하였다. Transcriptional coactivator의 역할을 규명하기 위하여서는 CBP(CREB-binding protein)와 SRC-1(steroid receptor coactivator-1) 발현 벡터를 유전자 주입하고 luciferase assay를 이용하여 확인하였다.

결 과 :

Luciferase assay로 triptolide가 PMA와 IL-1 β 자극에 의한 IL-8 NF- κ B 활성을 의미있게 감소시킴을 확인하였다. IL-8 ELISA와 RT-PCR로 triptolide가 PMA와 IL-1 β 자극에 의해 유도되는 IL-8 발현을 각각 단백질과 mRNA 수준에서 억제함을 관찰하였다. Triptolide가 PMA와 IL-1 β 에 의한 IL-8 NF- κ B의 전사활성을 억제시킨 반면 EMSA와 I κ B α Western blot을 이용한 실험에서는 triptolide가 NF- κ B DNA 결합과 I κ B α 의 분해에 전혀 영향을 미치지 못함을 확인하였다. 이러한 전사활성 억제와 DNA 결합 간의 불일치의 원인으로서는 DNA 결합 이후에 발생하는 핵내에서의 transactivation에 triptolide가 영향을 미치리라고 생각되어 p65 transactivation study를 Gal4-p65TA(p65의 transactivation domain) fusion protein 발현 시스템과 lu-

ciferase assay를 이용하여 시행한 결과 triptolide가 p65 transactivation을 억제함으로써 NF- κ B를 억제함을 확인하였다. 그러나 CBP나 SRC-1과 같은 coactivator의 역할을 규명하기 위한 유전자주입 실험에서 triptolide에 의한 p65 transactivation 억체에 대해 CBP나 SRC-1의 과발현이 별다른 영향을 미치지 못하였다.

결 론 :

Triptolide는 폐상피세포에서 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성을 억제하고 그 기전은 I κ B α 경로가 아닌 핵내에서의 p65 transactivation 억제에 의해 발생하며 이에 CBP나 SRC-1과 같은 coactivator가 관여하지 않음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Tao XL, Davis LS, Lipsky PE. Effect of an extract of the chinese herbal remedy Tripterygium Wilfordii Hook F on human immune responsiveness. *Arthritis and Rheumatism* 1991;34:1274-81.
2. Tao XL, Cai JJ, Lipsky PE. The identity of immunosuppressive components of the ethyl acetate extract and chloroform methanol extract (T2) of Tripterygium Wilfordii Hook. F. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:1305-12.
3. Tao XL, Davis LS, Hashimoto K, Lipsky PE. The Chinese Herbal Remedy, T2, inhibits mitogen-induced cytokine gene transcription by T cells, but not initial signal transduction. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:316-25.
4. Lipsky PE, Tao XL. A potential new treatment for rheumatoid arthritis: Thunder God Vine. *Semin Arthritis Rheum* 1997;26:713-23.
5. Lee KY, Chang WT, Qiu D, Kao PN, Rosen GD. PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor- α to induce apoptosis in tumor cells. *J*

- Biol Chem 1999;274:13451-5.
6. Leonard EJ, Skeel A, Yoshimura T, Noer K, Kutvirt S, Van Epps D. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activator protein-1. *J Immunol* 1990;144:1323-30.
 7. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheimer JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein(NAP-a) is also chemotactic for T-lymphocytes. *Science* 1989;243:1464-6.
 8. Detmers PA, Lo SK, Oslen-Elbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 1990;171:1155-62.
 9. Huber AR, Kunkel SL, Todd RT, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991;254:99-102.
 10. Lynch JP, Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, Strieter RM. Neutrophilic alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. The role of interleukin-8. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:1433-9.
 11. Jorens PG, Van Damme J, De Backer W, Bossaert L, Dejouh RF, Herman AG, Rampart M. Interleukin-8(IL-8) in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome(ARDS) and patients at risk for ARDS. *Cytokine* 1992;4:592-7.
 12. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993;365:654-7.
 13. Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, GM-CSF and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:1001-9.
 14. Erger RA, Casale TB. Interleukin-8 plays a significant role in IgE-mediated lung inflammation. *Eur Respir J* 1998;11:299-305.
 15. Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K. Cooperative interaction of nuclear factor- κ B and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1990;265:21128-33.
 16. Mahe Y, Mukaida N, Kuno K, Akiyama M, Ikeda N, Matsushima K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting on nuclear factor κ B and CCAAT/enhancer-binding protein-like cis-elements. *J Biol Chem* 1991;266:13759-63.
 17. Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K. Tumor necrosis factor- α and interferon- γ synergistically induce interleukin-8 production in a human gastric cell line through acting concurrently on AP-1 and NF- κ B like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* 1992;267:22506-11.
 18. Aoki Y, Qiu D, Zhao GH, Kao PN. Leukotriene B₄ mediates histamine induction of NF- κ B and IL-8 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:L1030-9.
 19. Schmitz ML, dos Santos Silva, Baeuerle PA. Transactivating domain 2 phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* 1995;270:15576-84.
 20. Finco TS, Westwick JK, Norris JL, Beg AA, Der CJ, Baldwin Jr AS. Oncogenic Ha-ras-induced signaling activates NF- κ B transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J Biol Chem* 1997;272:L24113-6.
 21. Auphan N, Dinonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucoc-

- rticoids : inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 1995;270:283-86.
22. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956-9.
23. Nasuhara Y, Adcock IM, Catley M, Barnes PJ, Newton R. Differential I κ B kinase activation and I B degeneration by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in human U937 monocytic cells. *J Biol Chem* 1999;274:19965-72.
24. Bosscher KD, Schimitz ML, Berghe WV, Plaisance S, Fires W, Haegeman G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13504-9.
25. Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1998; 1:661-71.
26. Wang D, Baldwin Jr AS. Activation of nuclear factor-kappa B-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* 1998;273:29411-6.
27. Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ. Regulation of NF- κ B by cyclin-dependent kinase associated with the p300 coactivator. *Science* 1997;275:523-7.
28. Gerristen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivator of p65. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2927-32.
29. Na S-Y, Lee S-K, Han S-J, Choi H-S, Im S-Y, Lee J-W. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor B-mediated transactivation. *J Biol Chem* 1998;273:10831-4.
30. Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996; 10:1167-77.
31. 이계영. 폐상피세포에서 dexamethasone에 의한 NF- κ B transactivation 억제 기전에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 2000;48 (suppl 1):45-59.
32. Donovan CE, Mark DA, He HZ, Lion HC, Kobzik L, Wang Y, De Sanctis GT, Perkins DL, Finn PW. NF-kappaB/Rel transcriptional factors:c-Rel promotes airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation. *J Immunol* 1999;163:6827-33.