

Murine AIDS 감염쥐 splenocytes에서 NF-κB의 활성화 억제를 통한 pycnogenol의 Th2 cytokines의 mRNA 발현 조절 효과

이 정 민*

남부대학교 식품영양학과

Pycnogenol, a Standardized Extract of French Maritime Pine Bark, Inhibited the Transcriptional Expression of Th2 Cytokines by Suppressing NF-κB Activation in Primary Splenocytes of C57BL/6 Mice with Murine AIDS

Jeongmin Lee*

Department of Food and Nutrition, Nambu University

Abstract LP-BM5 murine leukemia retrovirus induces the immune dysfunction by imbalanced secretion of Th1 and Th2 cytokines in the murine AIDS model. In the present study, it was investigated whether pycnogenol (Pyc) administration could deactivate NF-κB to regulate the gene expression of Th1 and Th2 cytokines in C57BL/6 mice with murine AIDS. Treatment with Pyc for 12 weeks significantly inhibited the loss of body weight and enlargement of spleen and lymph node usually seen with AIDS. Moreover, Pyc increased the plasma level of Th1 cytokines, IL-2 and IFN-γ, while reducing the plasma level of Th2 cytokines, IL-6, IL-10, and TNF-α. In primary culture of splenocytes, mRNA expression of Th2 cytokines was suppressed, but that of Th1 cytokines was not affected. The LP-BM5 retrovirus infection stimulated the cytoplasmic activation of NF-κB and nuclear translocation of I-κB, whereas Pyc administration significantly reduced NF-κB activation and I-κB degradation. These results suggested that the inhibitory effect of Pyc on Th2 cytokines in mice with murine AIDS was dependent on suppression of the NF-κB signaling pathway and was not dependent on IFN-γ level, which regulates Th2 cytokines.

Key words: pycnogenol, murine AIDS, splenocytes, Th2 cytokines, NF-κB

서 론

The acquired immune deficiency syndrome(AIDS)은 human immunodeficiency virus(HIV)의 감염에 의해 총체적 면역 결핍, 영양결핍 및 기회감염과 혈액암인 lymphoma 등을 유발시켜 죽음에 이르게 되는 질병으로 알려져 있다(1). HIV의 감염경로는 일반적으로 retrovirus의 gp120 glycoprotein과 CD4⁺ 표면항원의 결합을 통해 면역세포로 침투하여 감염을 일으키는 것으로 여겨지고 있다(2). 따라서 감염된 CD4⁺ 면역세포에서의 HIV 복제를 억제하기 위한 약물치료는 주로 reverse transcriptase의 활성을 억제하는 것에 주된 목적을 두고 있다. HIV의 감염과 AIDS로의 진행과정은 세포내에서 많은 변화를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 특히, 면역세포간의 조절 역할을 하는 cytokines의 경우 궁극적으로 T helper 1(Th1) cytokines과 T helper 2(Th2) cytokines의 균형을 파괴시켜 IL-2와 interferon-γ(INF-γ) 같은 Th1 cytokines은 감소시키고 IL-4, IL-6, 그리고 TNF-α 같은 Th2 cytokines을 증가

시키게 된다(3). 이렇게 형성된 cytokines의 불균형은 T와 B 임파구 세포의 성장 및 활성을 감소시켜 질병에 대한 면역반응을 억제시키는 결과를 초래하게 된다. 또한 과도한 산화적 스트레스가 AIDS로의 진행과정에서 형성되어 면역세포의 활성을 억제하고 자발적 세포고사(apoptosis)를 유발시킬 뿐만 아니라 퇴역임 작용에 의해 AIDS로의 진전을 더욱 가속화시키게 된다(4). 따라서 항산화물질의 투여에 의한 산화적 스트레스의 제거는 AIDS로의 진전 및 증상을 다소 완화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 최근에 이르러 HIV 감염 및 복제, 그리고 AIDS로의 진행과정에 있어 영양물질의 역할과 기작에 대한 연구가 여러 차례 진행되어 긍정적인 결과가 발표된 적이 있어 약물치료와 더불어 AIDS의 예방과 치료에 보조적인 역할이 강조되고 있다. 예를 들어 Lee 등(5)의 보고에 의하면 AIDS 동물모델에서 비타민과 미네랄의 부족은 과도한 자유기(free radicals)의 생성을 유도하여 premature death를 일으킨다고 하였다. 뿐만 아니라 AIDS 환자에게 나타나는 장내 영양물질 흡수 장애로 인한 영양부족 현상은 일반인과 달리 AIDS 환자들에 대한 기초 영양 요구성의 기준을 보다 높게 하여야 한다는 주장을 뒷받침하고 있는 것이다. 한편, nuclear factor-κB(NF-κB) 등의 transcriptional factor 활성화가 면역세포의 기능에 영향을 미치는 것으로 최근 알려지고 있고 HIV proliferation에 관여하는 Tat(transactivator)의 발현이 NF-κB에 의해 조절되는 것이 보고된 바 있다(6). 하지만, murine AIDS 모델에서 NF-κB의 활성이 cytokines의 발현에 영향을 미치는지 여부에 대해서

*Corresponding author: Jeongmin Lee, Department of Food and Nutrition, Nambu University, 864-1 Woolgae-dong, Gwangsan-gu, Gwangju 506-706, Korea
Tel: 82-62-970-0171
Fax: 82-62-970-0039
E-mail: az121899@empal.com
Received October 25, 2006; accepted November 9, 2006

는 아직 연구된 바가 없다.

Pycnogenol(Pyc)는 French maritime pine bark(*Pinus pinaster* Ait.)에서 추출한 물질로서 다량의 polyphenol을 함유하고 있다(7). 주성분으로서 catechin과 epicatechin을 단위로 하는 procyanidine으로 구성되어 있고 이외에 taxifolin과 여러 종류의 phenolic acids로 구성된 bioflavonoids를 함유하고 있다. 현재까지 알려진 Pyc 생리작용은 항산화제, 당뇨억제, 고혈압억제, 항염증 작용 등으로 요약될 수 있다(8-10). Lee 등(11)의 최근 보고에 의하면 Pyc는 nude mouse에서 2차 흡연으로 인한 폐의 손상과 장기조직에서 지질 및 염증 관련 cytokines의 발현을 억제한 것으로 보고하였고 24주간의 임상실험에서 혈액내의 백혈구에서 NF- κ B의 발현을 억제하였음을 보고하였다(12). 이러한 결과들은 Pyc가 유전자의 발현에 관여하고 있음을 언급하고 있다. 하지만 AIDS 유발 과정에서 발생하는 산화적 스트레스에 대한 항산화제로서의 Pyc의 역할은 아직 연구가 미비하고 산화적 스트레스로 인한 NF- κ B의 활성화에 대한 억제 효과 또는 역할에 대해서도 연구된 바가 아직 없다.

AIDS 연구에 있어서 임상연구의 어려움은 항상 존재해 왔는데 이것은 윤리적 또는 질병에 대한 인식의 차이로 피시험자를 충분히 확보하기가 힘들기 때문이다. 따라서 임상연구를 대체할 수 있는 동물모델의 필요성이 요구되어져 왔다. LP-BM5 leukemia retrovirus에 의해 유발되는 murine AIDS는 사람의 HIV 감염 및 AIDS로의 진행과정과 매우 유사한 증상 및 면역반응을 유발하는 것으로 알려져 있다(13). 이 AIDS 동물모델은 사람과는 달리 잠복기가 없이 매우 안정적인 AIDS 발현 빈도를 나타내는 장점을 지니고 있고 약 12주가 지나면 AIDS 증상을 나타내게 되는데 주로 splenomegaly, lymphadenopathy, 그리고 hypergammaglobulinemia을 유발시키고 더 진전하여 T와 B 림프구 세포의 기능을 억제하여 성장을 저해할 뿐만 아니라 Th1과 Th2 cytokines의 불균형을 초래하게 된다. 따라서 본 연구에서는 AIDS 유발된 생쥐의 splenocytes로부터 Th1과 Th2 cytokines의 유전자 발현에 NF- κ B의 관련성을 확인하고 Pyc의 NF- κ B를 통한 Th1과 Th2 cytokines의 발현조절 기작을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물군 분류, Pycnogenol 투여 및 LP-BM5 감염

4주령 된 C57BL/6 쥐를 Charles River Laboratories(Wilmington, DE, USA)로부터 구입하여 University of Arizona에 소재하고 있는 animal center에서 stainless wire lids가 있는 투명한 plastic cages(4마리/cage)에 넣어 보관하였다. 2주가 지난 뒤 C57BL/6 쥐를 정상대조군, Pyc 투여군, LP-BM5 감염군, 그리고 LP-BM5/Pyc 동시투여군으로 구분하여(8마리/실험군) 실험하였다. 실험 식이는 AIN93M synthetic mouse diet를 표준식으로 하여 1g Pyc/kg diet 비율로 Dyets Inc.(Bethlehem, PA, USA)에서 제조하여 사용하였고 식이와 식수는 임의로 취하도록 하여 12주간 실험하였다. Pyc는 Horphag Research Ltd(Guernsey, France)로부터 분양받아 사용하였다.

사육실은 20-22°C, 60-80% relative humidity, 그리고 12시간 light:dark cycle을 유지하도록 하였다. LP-BM5 retrovirus는 4.5 log₁₀ plaque forming unit(PFU) × 10⁻³/L으로 적정하여 생쥐의 복강내에 0.1 mL을 접종하였다. LP-BM5 retrovirus의 접종은 잠복기가 없이 접종 후 약 2주부터 증상이 나타나기 시작하여 murine AIDS로의 진행을 약 6-8주 정도까지 꾸준히 진행하게 된다. 12주후 C57BL/6 쥐를 ether로 마취시킨 후 간을 포함한 각 organ과

lymph node는 취하여 -80°C에 냉동보관하고 spleen은 채취 즉시 primary splenocytes를 제조하여 실험에 사용하였다.

Th1과 Th2 cytokines의 분비능력 측정

Th1과 Th2 cytokines의 분비능력 측정은 Lee 등(3)의 방법에 따라 수행하였다. 우선 mouse spleen으로부터 분리된 splenocytes 1 × 10⁵ cells/0.1 mL를 96 well plate에 분주하고 IL-2, IL-4, IL-10, INF- γ 의 생성을 위해 10 μ g/0.1 mL ConA 100 μ L를 각 well에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 IL-2와 IL-10는 24시간 후, IL-4는 48시간 후, 그리고 INF- γ 는 72시간 후 상층액을 수거하여 실험 때까지 -80°C에 동결하여 보관하였다. TNF- α 의 측정은 10 μ g/0.1 mL LPS 100 μ L를 각 well에 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하여 24시간 이후에 상층액을 조심스럽게 분리하여 ELISA immunoassay 방법으로 정량하였다.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Th1와 Th2 type cytokines을 측정하기 위해 상층액을 수거하고 남은 splenocyte를 수집하여 RNeasy extraction kit로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하였다. cDNA의 합성을 위해 5 μ g의 total RNA에 200 unit의 MLV-RT reverse transcriptase와 500 ng oligo-dT primer를 첨가하여 42°C에서 60분간 수행하였다. PCR 반응을 위해 사용한 primer pair sequence는 Table 1에서 표기하였고 internal control로서 GAPDH를 이용하였다. PCR을 위한 혼합액은 2 μ L의 cDNA, 1.25 unit의 Taq DNA polymerase, 0.2 mM dNTP, 10 × reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primers를 섞어 95°C에서 5분간 hot start한 후 94°C에서 30초간, 55°C에서 1분, 72°C에서 30초간 35 cycling으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 polishing step을 거쳐 PCR product를 얻었다. 5 μ L PCR product를 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 EtBr로 20분간 염색한 후 UV에서 band를 확인하였다.

세포내 NF- κ B 활성 및 I- κ B 분해 측정

SDS-PAGE와 immunoblot analysis는 Lee 등(14)의 방법에 따라 실험에 적합하도록 변형하여 수행하였다. 먼저 primary splenocytes를 수집하여 PBS 용액으로 2차 세척하여 800 g에서 5분간 원심 분리하여 수거한 세포를 50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM sodium chloride, 0.2% SDS, 1% NP-40, 5 mM sodium fluoride, and protein inhibitor cocktail(Roche, Penzberg, Germany)를 포함한 lysis buffer로 처리한 후 12,000 × g에서 30분간 원심분리하여 total protein을 추출하고 40 μ g의 total protein을 12% SDS PAGE로 전기영동하여 단백질을 PVDF membrane으로 transfer 시키고 nonfat dry milk로 blocking시켰다. TBST(25 mM Tris, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% tween-20, pH 8.0)로 2번 세척하고 anti-NF- κ B(phospho-p65) 단클론 항체(1:200, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 또는 anti-I- κ B 단클론항체(1:200, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 처리하여 2시간 상온에서 반응시키고 10분씩 3회 TBST로 세척한다. Horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG secondary antibody를 처리하여 1시간 반응시키고 chemiluminescence를 위해 1 mL ECL solution(Amersham, Piscataway, NJ, USA)을 blot에 처리하여 즉시 발현 정도를 확인하였다. 세포내 단백질 발현 표준비교군으로서 β -actin을 측정하여 NF- κ B와 I- κ B의 발현 정도를 비교 분석하였다.

통계처리

두 그룹간의 통계적 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하

Table 1. Primer sequences used for PCR amplification of cytokines

Cytokine and primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')	PCR product (bp)
IL-2		
Sense	ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TC	502
Antisense	GGC TTG TTG AGA TGA TGC TTT GAC A	
IFN-γ		
Sense	GCA TCT TGG CTT TGC AGC TC	445
Antisense	CGA CTC CTT TTC CGC TTC CT	
IL-4		
Sense	ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT	339
Antisense	GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC	
IL-10		
Sense	ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA	237
Antisense	CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A	
TNF-α		
Sense	AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CCA A	446
Antisense	ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T	
GAPDH		
Sense	CGG ATT TGG CCG TAT TGG GC	518
Antisense	TGA TGG CAT GCA CTG TGG TC	

였고 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였다($p < 0.05$). 모든 결과는 triplicate부터 얻어진 mean \pm SD로 표기하였다.

결과 및 고찰

Pyc 섭취량 및 체중 변화

정상대조군의 표준식이 섭취량은 3.43 ± 0.42 g/mouse/day였으며 Pyc투여군의 경우 3.28 ± 0.36 g/mouse/day로 나타났다(Table 2). 따라서 식이에 포함된 Pyc의 함량을 고려할 경우 생쥐가 하루동안 섭취한 실질적인 Pyc의 양은 약 150 mg/kg body weight 되었다. 한편, LP-BM5 감염군에 있어서의 식이섭취량도 유의적 변화를 나타내지 않았다. 이것은 Pyc로 인한 생쥐의 식이섭취량 변화는 없었음을 보여 주고 있다. 정상대조군의 체중은 12주만에 걸쳐 자연적 증가를 보였다. Pyc투여군의 경우 정상대조군에 비교해서 유의적인 체중의 변화는 없었고 적출한 장기의 무게도 큰 차이를 나타내지는 않았다(Table 2). 하지만 LP-BM5 retrovirus 감염군의 경우 정상대조군에 비해 약간의 체중감소와 함께 유지되는 경향을 보인 반면 spleen과 lymph node의 무게가 유의성 있게 증가하였다. 이것은 LP-BM5 감염 후 murine AIDS로의 진행이 정상적으로 이루어졌음을 의미하는 것이다(3). LP-BM5/Pyc 동시투여군의 경우 정상대조군에 비해 체중의 변화에서 유의적 차이가 나타나지 않았고 spleen과 lymph node의 크기도 LP-BM5 감염군에 비해 크게 감소한 것을 확인하였다.

본 실험에서 Pyc의 섭취량은 모든 실험군에서 유의적 차이가 없는 것으로 확인되었는데 이 결과는 Lee 등(11)의 보고와도 일치하고 있다. Crinelli 등(15)의 AIDS 감염된 생쥐의 면역체계에 관한 연구결과에 의하면 200 mg/kg body weight 이상의 Pyc를 투여할 경우에도 독성이 나타나지 않았는데 이 결과는 본 연구에서 실험생쥐가 섭취한 Pyc 농도보다 높게 나타난 것이다. 따라서, 본 실험에서 Pyc섭취에 따른 결과들이 Pyc 독성에 의한 결과가 아님을 확인시켜 주고 있다. LP-BM5 retrovirus 감염군에서 체중이 감소하지 않고 유지되는 것으로 나타난 원인은 실험을 수행한 기간과 관련이 있는 것으로 여겨지는데 Lee 등(5)과 Liang 등(13)의 murine AIDS 연구에 따르면 LP-BM5 retrovirus의 감염이 있을 경우 생쥐의 체중은 감소하는 것으로 나타났으며 관련 논문의 경우 실험기간이 대체로 16-24주에 걸쳐 실험되었다. 따라서 본 연구에서 수행된 12주간의 실험은 cytokines의 변화를 유발시키기에는 적절하였으나 직접적인 체중감소를 유도하기에는 다소 짧은 기간이라 여겨진다.

Th1과 Th2 cytokines의 발현 조절

Cytokines의 발현은 항원제공세포(antigen presenting cell; APC)에 의해 활성화된 CD4⁺ T helper 세포에 의해 조절받게 된다. CD4⁺ T helper 세포는 크게 Th1 type 과 Th2 type으로 구분되며 Th1 세포에 의해 분비되는 IL-2와 IFN-γ는 macrophage 및 T 림프구 세포의 활성화에 관여하고 있다(19). 한편, Th2 세포에 의해

Table 2. Body and tissue weight and amount of Pyc consumption in C57BL/6 mice with or without LP-BM5 infection

Treatment		Body weight (g)	Spleen (g)	Lymph node (g)	Food Intake (g/mouse/day)
LP-BM5	Pyc				
-	-	21.7 \pm 1.14	0.048 \pm 0.021	0.007 \pm 0.002	3.43 \pm 0.42
-	+	21.3 \pm 1.25	0.047 \pm 0.019	0.007 \pm 0.007	3.28 \pm 0.36
+	-	18.2 \pm 0.78 ^a	0.22 \pm 0.041 ^a	0.092 \pm 0.024 ^a	3.24 \pm 0.54
+	+	20.7 \pm 1.55 ^b	0.127 \pm 0.032 ^{a,b}	0.038 \pm 0.018 ^{a,b}	3.37 \pm 0.67

^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at $p < 0.05$.

^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at $p < 0.05$.

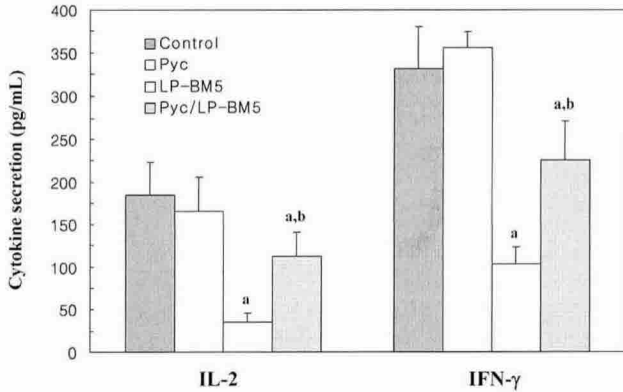


Fig. 1. Effect of Pyc administration on Th1 cytokine secretion from mitogen-stimulated splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection. Data was mean \pm SD of triplicate. ^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at $p < 0.05$. ^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at $p < 0.05$.

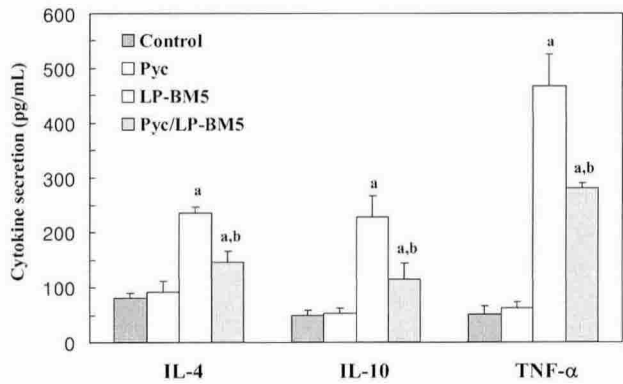


Fig. 2. Effect of Pyc administration on Th2 cytokine and TNF- α secretion from mitogen-stimulated splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection. Data was mean \pm SD of triplicate. ^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at $p < 0.05$. ^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at $p < 0.05$.

분비되는 IL-4와 IL-10는 B 임파구 세포를 활성화시킨다. 이러한 Th1과Th2 cytokines의 발현은 IL-10과 IFN- γ 에 의해 상호보완적으로 조절하여 면역 균형을 유지하게 된다. LP-BM5 retrovirus는 B cell tropic한 성질을 가지고 있으며 B 세포에 감염 시 B세포를 활성화시켜 일정기간 B lymphoma 및 B 임파구 세포와 관련된 Th2 cytokines의 발현이 급증하게 되어 T세포 활성화에 필요한 Th1 cytokines의 발현을 억제시키는 이전현상(shifting)이 일어나게 된다(16). 본 실험에서 splenocytes로부터 분비되는 cytokines을 ELISA 방법에 의해 측정된 결과 정상대조군에 비교할 때 LP-BM5 retrovirus의 감염이 IL-2와 IFN- γ 의 발현을 억제시키고(Fig. 1) IL-4, IL-10, 및 TNF- α 의 발현은 증가시킨 것으로 나타났다(Fig. 2). 이 결과는 LP-BM5의 감염 후 murine AIDS로의 진행이 이루어졌음을 나타내며 기존의 다른 연구 결과와도 동일한 경향을 나타내었다(3,5). 한편, LP-BM5/Pyc 동시투여군에서는 IL-2와 IFN- γ level이 감염대조군에 비해 유의적 증가를 보였고 IL-4, IL-10, 및 TNF- α 의 발현증가가 억제되었음을 알 수 있었다. IL-2는 중요한 T 임파구 세포의 활성촉진 인자로 작용한다. 즉 IL-2의 감소는 CD3⁺/CD4⁺ T 임파구 세포의 수와 기능에 영향을 미쳤을

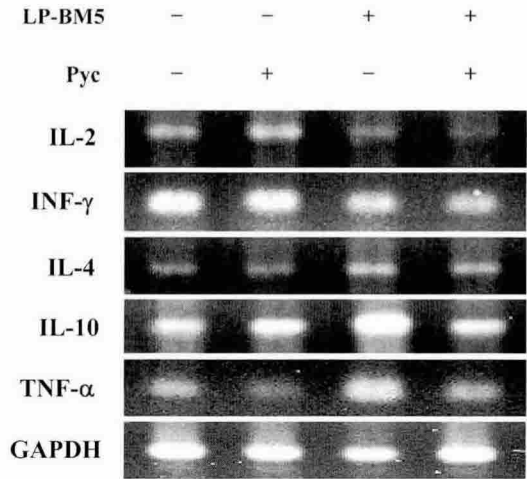


Fig. 3. Effect of Pyc administration on mRNA expression of Th1 and Th2 cytokines from mitogen-stimulated splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection. mRNAs were determined by RT-PCR and 1 μ g of PCR product was applied for each lane on 1% agarose gel. DNA bands were visualized by EtBr staining after electrophoresis. GAPDH was used as an internal control.

것으로 추정된다. 또한 IL-4는 B 임파구 세포의 활성을 촉진하는 중요 인자로 알려져 있다. LP-BM5 감염으로 인한 IL-4의 증가는 B 임파구 세포의 항체생성능력과 항원인지능력에 영향을 미쳤을 것으로 여겨지며 결론적으로 장기적인 murine AIDS 진행에 따른 B 면역세포의 숫자를 감소시켜 면역반응의 민감성을 떨어뜨리는 것으로 인식되고 있다. 또한 AIDS에서 IL-4의 역할은 IL-4 gene knockout mouse를 통해 알 수 있는데 IL-4 유전자 결핍으로 인한 Th2 cytokines의 발현 억제는 murine AIDS의 진행 및 면역결핍현상을 지연시킨 것으로 나타났다(17). 또 다른 연구에서도 anti-IL-4를 투여할 경우에도 murine AIDS의 진행이 지연되는 유사한 결과를 확인하였다(18). LP-BM5 retrovirus에 의해 감염된 Th2 세포는 TNF- α 를 분비하여 감염의 징후로 증가하게 되는데 이것은 특히 macrophage에 작용하여 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 및 activator protein-1(AP-1)을 활성화시켜 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2) 등의 여러 가지 면역 관련 유전자의 발현을 조절할 뿐만 아니라 LP-BM5 retrovirus의 replication을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(14). 결과적으로 Pyc 투여에 따른 이러한 Th1과 Th2 cytokine shifting의 억제는 murine AIDS로의 진행을 억제하는데 도움이 될 것으로 여겨진다. IFN- γ 의 감소는 직접적으로 Th2 cytokines인 IL-4와 IL-10의 증가를 유도하였을 것으로 여겨지며 cytotoxic T 임파구 세포 등의 활성을 억제하여 면역저항성을 약화시키게 된다. 그러므로, Pyc의 투여로 인한 IFN- γ 의 증가는 Th1과 Th2 cytokine의 면역균형을 유지하는 데 역할을 할 것으로 생각된다.

Pyc의 Th1과 Th2 cytokines의 발현조절이 translation 또는 transcription 단계에서 발생하는지 여부를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 흥미롭게도 Th1 cytokine의 발현은 영향을 받지 않은 반면 Th2 cytokines의 발현은 감염대조군에 비해 억제되었음을 확인하였다(Fig. 3). 이것은 Pyc의 조절능력이 Th2 cytokines의 발현에만 제한됨을 암시하고 있으며 또한 cytokines의 분비 경로 또는 translation 단계보다는 mRNA transcription 단계에 작용하는 것으로 추정된다. 그럼에도 불구하고, Th1 cytokines의 분비가 영향을 받은 것으로 나타난 이유는(Fig. 1) Pyc가 Th1 cytokines의

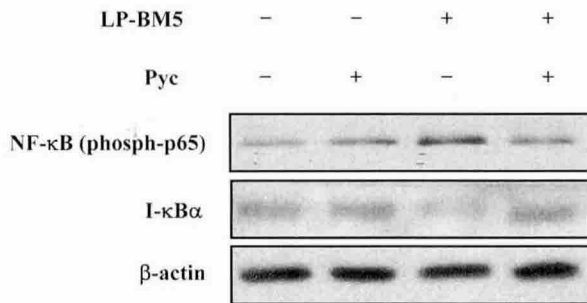


Fig. 4. Effect of Pyc administration on NF- κ B activation and the cytosolic I- κ B α degradation. The amount of total protein from primary cultured splenocytes was determined by Bradford method. Cell extract was assayed for p65 subunit and cytosolic I- κ B α by western blot analysis. Twenty micrograms of total protein was applied on 12% PAGE and the β -actin was detected as an internal control.

발현에 직접적으로 영향을 미쳤다고는 Th2 cytokines, 특히 Th1 cytokines 억제자인 IL-10의 발현을 감소시킴에 따라 상대적으로 Th1 cytokines의 농도가 증가하였을 것으로 추정된다.

NF- κ B 및 I- κ B의 측정

NF- κ B는 염증반응의 시작에 관여하는 transcription factor로 알려져 있는데 I- κ B 단백질과 결합하여 비활성화된 상태로 세포질에 존재한다. 외부의 자극에 의해 활성화가 유도되면 I- κ B의 인산화를 거쳐 ubiquitination이 일어나 NF- κ B(p50/p65 heterodimer)는 I- κ B로부터 유리되어 핵으로 이동하게 되어 cyclooxygenase-2(Cox-2)와 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 등의 관련 유전자의 발현을 조절하게 된다(14). 최근에 이르러 NF- κ B의 활성이 암세포의 성장과 관련이 있을 뿐만 아니라 HIV의 복제에도 관여하는 것으로 보고되고 있다. NF- κ B의 활성화를 위해 주로 lipopolysaccharide와 tumore necrosis factors 등이 알려져 있는데 일반적으로 IKK(I- κ B kinase) 또는 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달체계를 통해 활성화되는 것으로 알려져 있다(19). 본 실험에서는 다른 연구 결과와 마찬가지로 LP-BM5 retrovirus의 감염은 splenocytes의 NF- κ B 활성화를 촉진시킨 반면, Pyc 투여는 NF- κ B의 활성을 억제시킨 것으로 나타났다(Fig. 4). 하지만 본 실험에서는 IKK 및 MAPK 신호전달체계 중 어떤 경로를 거치는지에 대한 확인을 하지 않았으며 상위 신호전달 체계 중 어떤 신호전달 물질이 활성화되었는지를 판독하는 것은 향후 연구의 중요한 부분을 차지할 것으로 여겨진다.

활성화 산소로 인한 산화적 스트레스는 생리학적 및 병리학적 변화를 유발시킬 뿐만 아니라 NF- κ B의 활성화에도 밀접하게 관여하고 있다(20). 특히, LP-BM5 retrovirus의 감염은 간조직에서의 vitamin E 등의 세포내 항산화제 함량을 감소시켜 상대적으로 산화적 스트레스를 과도하게 유발시키게 된다. 이렇게 생성된 활성화 산소는 NF- κ B를 활성화시켜 LP-BM5 및 HIV의 replication을 증가시켜 AIDS 및 murine AIDS로의 진행을 가속화시키는 것으로 보고된 바 있다(21). NF- κ B의 활성은 cytokines의 불균형을 초래할 뿐 아니라 retrovirus의 CD4⁺ 면역세포내로의 투입을 용이하게 하는 표면 단백질의 발현에도 관여하고 있기 때문에 산화적 스트레스의 억제는 murine AIDS의 진행을 지연시키는 역할을 하게 된다. Pyc는 강력한 항산화제로서의 생리 기능성이 이미 보고된 바 있다(8). 특히 LDL의 산화를 억제시켜 동맥경화 및 고혈압 완화에 도움을 주며 췌장의 Langerhans' islets에 있는 β -cell을

활성화 산소로 인한 손상으로부터 막아 insulin의 분비를 원활히 함으로써 제 1형 당뇨병에 효과적인 것으로 보고되고 있다(22). 따라서 본 실험에서 얻어진 Pyc의 NF- κ B 활성화 억제효과가 직접적인 NF- κ B promoter에 작용하지 않고 LP-BM5 retrovirus 감염으로 인한 산화적 스트레스를 억제함에 나타난 간접적인 효과의 가능성에 대해서도 배제할 수는 없을 것으로 생각된다. 따라서 향후 보다 정확한 Pyc의 작용 기작을 확인하기 위해서는 NF- κ B 유전자를 luciferase 또는 β -galactosidase 등의 표지자와 함께 splenocytes에 transient transfection시킨 다음 발현도를 측정하여 직접 또는 간접적인 효과가 있는 지 확인할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

요 약

HIV 감염 후 AIDS로의 진행과정에서 cytokines의 변화는 필수적인 결과로서 나타나게 된다. 본 연구에서는 AIDS 동물모델을 사용하여 Pyc의 cytokines발현에 미치는 영향과 조절 매개체로서 NF- κ B의 관련성 및 작용 기작 확인에 초점을 두었다. LP-BM5 retrovirus에 감염된 C57BL/6 생쥐를 이용하여 12주간에 걸친 실험에서 Pyc 투여는 Th1과 Th2 cytokines의 혈중농도를 조절하여 murine AIDS로의 진행을 억제하는 데 역할을 하는 것으로 사료된다. 특히 Th2 cytokines의 mRNA 발현을 억제함에 따라 Th1 cytokines의 혈중농도는 상대적으로 증가한 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Pyc가 Th2 cytokines을 선택적으로 transcription level에서 조절하고 있음을 의미하고 있다. 또한 Th2 cytokine mRNA 발현 조절은 NF- κ B의 활성화에 의한 것으로 추정된다. 본 연구는 AIDS 동물모델에서 NF- κ B의 조절을 통한 cytokines의 발현 조절의 가능성을 제시함과 동시에 Pyc의 역할에 대해 자료를 제시하고 있다. 또한 향후 murine AIDS 진행 억제제로서의 Pyc의 기작에 대한 일면을 보인 것에 의의를 두고자 한다.

문 헌

1. Gasparis AP, Tassiopoulos AK. Nutritional support in the patient with HIV infection. *Nutrition* 17: 981-982 (2001)
2. Meanwell NA, Kadow JF. Inhibitors of the entry of HIV into host cells. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 6: 451-461 (2003)
3. Lee J, Jiang S, Liang B, Inserra P, Zhen Z, Solkoff D, Watson RR. Antioxidant supplementation in prevention and treatment of immune dysfunction and oxidation induced by murine AIDS in old mice. *Nutr. Res.* 18: 327-339 (1998)
4. Gulow K, Kaminski M, Darvas K, Suss D, Li-Weber M, Krammer PH. HIV-1 transactivator of transcription substitutes for oxidative signaling in activation-induced T cell death. *J. Immunol.* 174: 5249-5260 (2005)
5. Lee J, Park CS, Chung MY, Cho DH, Watson RR. Reduced micronutrient intake accentuates premature death caused by immune dysfunction in leukemia retrovirus-infected C57BL/6 mice. *Nutr. Res.* 25: 401-412 (2005)
6. Lee YW, Hirani AA, Kyprianou N, Toborek M. Human immunodeficiency virus-1 Tat protein up-regulates IL-6 and IL-8 expression in human breast cancer cells. *Inflamm. Res.* 54: 380-389 (2005)
7. Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Wurthwein G, Rohdewald P. Pycnogenol, French maritime pine bark extract, improves endothelial function of hypertensive patients. *Life Sci.* 74: 855-862 (2004)
8. Grimm T, Schafer A, Hogger PF. Antioxidant activity and inhibition of matrix metallo-proteinase by metabolites of maritime pine bark extract. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 811-822 (2004)
9. Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schonlau F, Rohdewald P, Jialal I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma

- lipoprotein profile. *Lipids* 37: 931-934 (2002)
10. Veurink G, Liu D, Taddei K, Perry Gm Smith MA, Robertson TA, Hone E, Groth DM, Atwood CS, Martins RN. Reduction of inclusion body in ApoE-deficient mice fed a combination of anti-oxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 34: 1070-1077 (2003)
 11. Lee J, Hwang KT, Lee JM, Kim SH, Watson RR, Park KY. Supplementation of French maritime pine bark extract prevents lung injury and lipid peroxidation in nude mice exposed to side-stream cigarette smoke. *J. Food Sci. Nutr.* 9: 65-70 (2003)
 12. Saeed H, Lee J, Watson RR. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 154-169 (2001)
 13. Liang B, Jiang S, Zhang G, Inserra P, Lee J, Solkoff D, Watson RR. Anti-inflammatory effects of theophylline: modulation of immune functions during murine leukemia virus infection. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 23: 307-317 (2001)
 14. Lee J, Kim N, Cho DH, Chung MY, Hwang KT, Kim HJ, Jun W, Park CS. Ethanol extract of *Oenanthe javanica* modulates inflammatory response by inhibiting NF- κ B mediated COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 303-307 (2006)
 15. Crinelli R, Bianchi M, Gentilini L, Magnani M, Hiscott J. Activation of the ubiquitin proteolytic system in murine acquired immunodeficiency syndrome affects I-kappa B alpha turnover. *Eur. J. Biochem.* 263: 202-211 (1999)
 16. Parasad AS. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J. Infect. Dis.* 182: s62-s68 (2000)
 17. Kanagawa O, Vaupel BA, Gayma S, Koehler G, Kopf M. Resistance of mice deficient in IL-4 to retrovirus-induced immunodeficiency syndrome (MAIDS). *Science* 62: 240-242 (1993)
 18. Wang Y, Ardestani SK, Liang B, Bechham C, Watson RR. Anti-IL-4 monoclonal antibody and interferon-gamma administration retards development of immune dysfunction and cytokine dysregulation during murine AIDS. *Immunol.* 83: 384-389 (1994)
 19. Huang WC, Chen JJ, Chen CC. c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKKbeta is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Biol. Chem.* 278: 9944-9952 (2003)
 20. Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid. Redox Signal* 7: 395-403 (2005)
 21. Victoriano AF, Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Barzaga NG, Okamoto T. Inhibition of HIV-1 replication in latently infected cells by a novel I- κ B kinase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 547-555 (2006)
 22. Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins JB. Effect of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17: 193-199 (2003)