

1-Furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone의 TNF- α 유도성 MCP-1과 IL-8의 발현 억제를 통한 장 상피세포 염증 억제효과

김경진 · 김종태 · 이웅석 · 이종숙 · 김정애[#]

영남대학교 약학대학

(Received August 8, 2008; Revised September 29, 2008)

1-Furan-2-yl-3-Pyridine-2-yl-Propenone Inhibits TNF- α -induced Intestinal Inflammation via Suppression of MCP-1 and IL-8 Expressions in HT-29 Human Colon Epithelial Cells

Kyoung-Jin Kim, Jong Tae Kim, Eung-Seok Lee, Jong Suk Lee and Jung-Ae Kim[#]

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract — Previously, we have shown that 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone (FPP-3) has an anti-inflammatory activity in a rat paw-edema model. In the present study, we investigated an inhibitory effect of FPP-3 on the tumor necrosis factor (TNF)- α -induced inflammatory cytokine response in HT-29 human colon epithelial cells. Treatment with FPP-3 significantly prevented the TNF- α -induced attachment of leukocytes to HT-29 colon epithelial cells, which is one of the pathologic hallmarks in colon inflammation. The effect of FPP-3 was markedly superior than that of 5-aminosalicylic acid (5-ASA), a commonly used drug for the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). The pretreatment with FPP-3 inhibited TNF- α -induced monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, interleukin (IL)-8 mRNA expressions. In addition, FPP-3 significantly suppressed TNF- α -induced nuclear factor (NF)- κ B transcription activity. These results demonstrate that FPP-3 modulates intestinal inflammation via suppressing the NF- κ B dependent expressions of MCP-1 and IL-8, and suggest that FPP-3 may be a valuable agent for the treatment of IBD.

Keywords □ 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone, inflammatory bowel disease, monocyte chemoattractant protein-1, interleukin-8, 5-aminosalicylic acid

염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 출혈성 설사, 극심한 허복부 통증, 체중감소 등을 주요 증세로 한 소화기계의 만성적 염증 질환이다. 주요 발병 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만, nuclear factor(NF)- κ B의 활성화에 의한 염증 관련 chemokine들의 증가가 IBD의 유발이나 지속에 중요한 역할을 한다는 것이 최근의 연구에 의하여 잘 밝혀졌다.¹⁾

Monocyte chemoattractant protein(MCP)-1과 interleukin (IL)-8은 염증 부위로 각종 면역 관련 세포들의 부착을 유도하는 주요 chemokine들로서, IBD의 염증 병변을 악화시키는 것으로 알려져 있다. MCP-1은 단핵구와 T 림프구를 염증 부위로 유인하는 역할을 하는 β chemokines의 일종으로, IBD 환자와 동물

모델에서 얻어진 장점막 조직에서 그 발현이 증가함이 확인되었다. IL-8은 α chemokine의 일종으로 MCP-1과 마찬가지로 단핵구와 T 림프구, macrophage 등을 염증 부위로 유인하는 역할을 한다. 특히 IBD 환자의 장점막 조직에서 발현이 증가하며, 그 발현의 정도는 IBD 질환의 염증 정도와 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다.²⁾

NF- κ B는 염증 상황에서 중요한 역할을 하는 전사인자로, 염증 관련 유전자의 발현 유도를 매개하는 것으로 널리 알려져 있다. 특히 NF- κ B는 IBD에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor(TNF)- α 에 의해 증가하는 MCP-1과 IL-8의 mRNA 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 따라서 NF- κ B 활성 억제 작용을 통한 MCP-1과 IL-8의 발현을 억제하는 물질의 개발은 IBD 환자의 염증증상을 치료하는데 크게 기여할 수 있을 것이다.

1-Furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone(FPP-3)는 propenone

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2816 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) jakim@yu.ac.kr

유도체로서 이미 COX/5-LOX dual inhibitor 작용과 anti-invasive 활성이 보고된 바 있다.^{4,5)} 본 연구에서는 TNF- α 로 유도 되어진 *in vitro* 장염증 모델에서 FPP-3의 NF- κ B 활성 억제 작용을 통한 MCP-1과 IL-8의 발현 억제 정도를 조사하였다.

실험재료 및 방법

시약

실험에 사용한 fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin(PS), RPMI1640 배지는 Hyclone사(South Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES), sodium pyruvate, sodium bicarbonate, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), 2,7-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester(BCECF-AM)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. TNF- α 는 Biosource사(Camarillo, CA, USA)에서 구입하였다. Trizol reagent는 Invitrogen사(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, Taq DNA polymerase는 Takara사(Otsu, Shiga, Japan)에서 구입하였다. Dual-Luciferase Reporter Assay Kit는 Promega사(Madison, WI, USA)에서 구입하였고, GeneJammer transfection reagent은 Stratagene사(La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다.

세포배양(Cell culture)

사람 대장 상피세포주인 HT-29 세포와 사람 단핵구 세포주인 U937 세포를 염증성 장질환의 세포모델로 사용하였다. 두 세포 모두 37°C, 5% CO₂의 배양 조건 하에서 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin/streptomycin(PS), 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES), 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/l sodium bicarbonate을 함유한 RPMI1640 배지를 사용하여 배양하였다. 2~3일에 한번씩 배지를 교체해 주었으며, 배양 flask에 80% 이상 자라게 되면 1:5의 비율로 계대 하였다.

세포 독성 실험(MTT assay)

HT-29 세포를 96 well plate에 4×10^4 cells/cm²의 농도로 배양한 뒤 FBS는 없이 1% PS만을 함유한 배지에서 FPP-3를 1, 10, 20 μ M 농도로 1시간 동안 전처리 하였다 그 다음 10 ng/ml TNF- α 를 처리하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 첨가하였다. 4시간의 반응 후 배지를 모두 제거하고 DMSO를 첨가하여 남아있는 formazan 결정을 모두 용해 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

부착능 실험(Adhesion assay)

HT-29 세포를 48 well plate에 2×10^5 cells/cm²의 농도로 배양하여 1% PS만 함유된 FPP-3를 1, 10, 20 μ M 농도로 1시간 동안 전처리 하였다. 그 다음 10 ng/ml TNF- α 를 처리하여 37°C에서 3시간 동안 반응시키고 반응이 끝나면 화합물이 처리된 HT-29 세포의 배지를 제거하고 PBS로 1회 씻어 주었다. 그 후 37°C에서 30분 동안 10 μ g/ml BCECF-AM로 처리하여 반응시킨 U937 세포를 HT-29 세포와 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 부착되지 않은 U937 세포를 제거하기 위하여 PBS로 1회 씻어 주었다. 세포용해를 위하여 0.1% Triton X-100 in 0.1 M Tris를 처리하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후, Fluostar optima microplate reader(BMG Labtechnologies, Germany)을 사용하여 형광을 측정하여 정량하였다.

RT-PCR

Trizol reagent를 이용하여 total cellular RNA를 추출한 다음, Ready-To-Go T-primed First Strand Kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후 0.5 U Taq DNA polymerase를 사용하여 MCP-1, IL-8, GAPDH primer로 PCR을 수행하였으며 그 sequence는 아래와 같다. human MCP-1(5'-ATG AAA GTC TCT GCC GCC CTT-3', 3'-TGG GTT TGA GGC TTC TGA ACT-5); IL-8(5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3', 3'-CTC TTC AAA AAC TTC TCC CGA CTC T-5); GAPDH(5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG-3', 3'-CCA GTA GGT ACT GTT GAA AC-5). PCR 산물은 0.5 μ g/ml ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에 전기영동을 수행

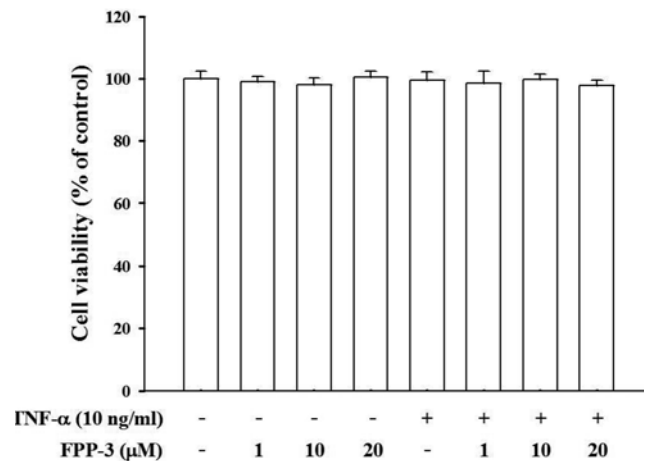


Fig. 1 – The effects of FPP-3 and TNF- α on the viability of HT-29 cells. Cells were treated with various concentrations of FPP-3 for 1 h, and then the cells were further incubated in the absence or presence of TNF- α (10 ng/ml) for 3 h. The cell viability was measured by MTT assay. The data represent the means \pm SEM of three independent experiments.

한 후 gel documentation system(UVP, Cambridge, UK)를 이용하여 각각의 밴드를 관찰하였다.

Reporter gene 발광효소 실험(Reporter gene luciferase assay)

50~60% 자란 HT-29 세포를 PBS로 2회 씻은 후, PS를 함유

하지 않고 10% FBS를 함유한 RPMI1640 배지 6.5 ml와 transfection mixture 700 μ l를 넣고 37°C 조건 하에서 3시간 동안 반응시켰다. FBS와 PS가 없는 700 μ l의 RPMI1640 배지에 35 μ l GeneJammer transfection reagent와 0.24 μ g/ml NF- κ B luciferase construct(firefly luciferase) 그리고 0.2 μ g/ml pRL-TK(renilla luciferase)를 넣어 실온에서 7분간 반응시켜 transfection mixture

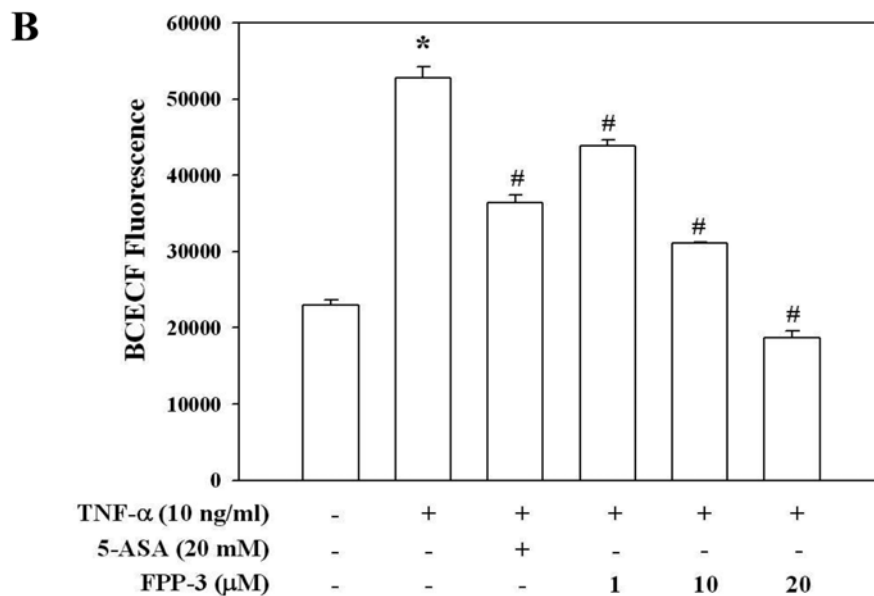
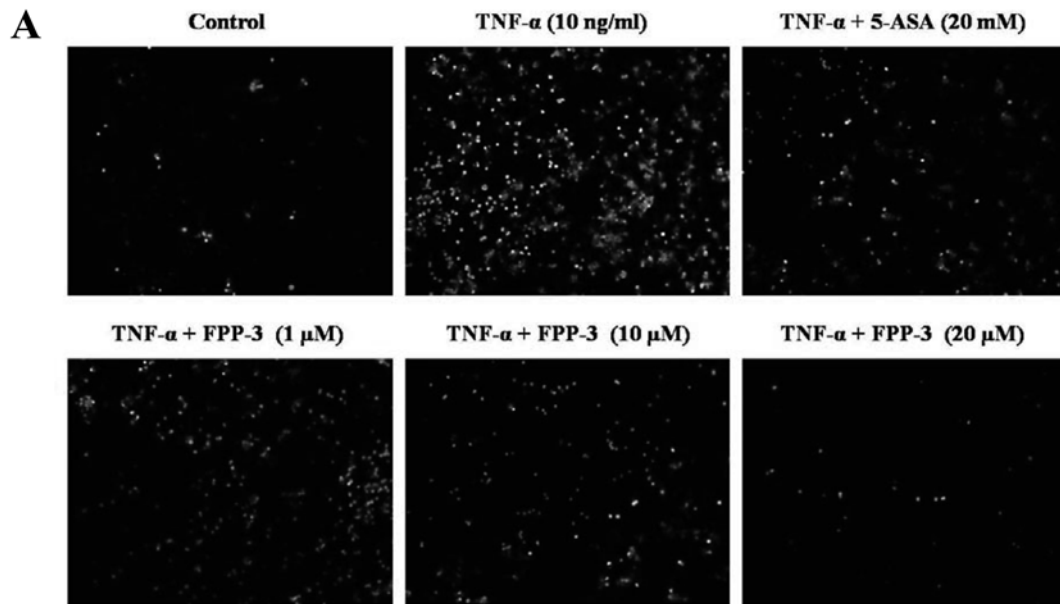


Fig. 2 – FPP-3 inhibits U937 monocyte adhesion to HT-29 cells. The cells were pretreated with various concentrations of FPP-3 for 1 h, followed by 10 ng/ml of TNF- α for 3 h. Then, BCECF/AM-prelabeled U937 cells were co-incubated with HT-29 cells for 30 min. Non-adhering U937 cells were removed, and fluorescence-emitting from the remaining cells (A) was imaged by inverted fluorescence microscopy (TE2000-U; Nikon, Japan). In a different set of experiment (B), the fluorescence from the remaining cells was measured by a fluorescence-detecting microplate reader (Fluostar optima; BMG Labtech GmbH, Germany) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm. Data are shown as means \pm SEM from three independent experiments. *P<0.05, compared to untreated control and #P<0.05, compared to TNF- α -treated group.

을 만든 후 사용하였다. 3시간 transfection 반응 후, 10% FBS와 1% PS를 함유한 RPMI1640 배지를 7 ml 넣어주고 37°C에서 24시간 배양시켰다. NF- κ B가 transfection 된 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells/cm²이 되게 배양하고 FPP-3를 1시간 동안 전처리 한 후, 10 ng/ml TNF- α 를 처리하고 3시간 동안 37°C에서 반응시켰다. PBS로 2회 씻은 후 24시간 동안 -70°C에서 freezing 시키고, 그 후 세포들을 모은 다음 kit에 포함되어 있는 LAS, stop & Glow buffer를 첨가하여 TD20/20 luminometer(Turner Biosystems, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구실에서 앞서 진행된 FPP-3에 대한 연구의 결과, 20 μ M의 농도에서 세포 독성이 적으면서 유효한 효과가 있음을 확인

하였으므로,⁵⁾ 이를 기초로 하여 본 실험에서는 FPP-3의 1, 10, 20 μ M의 cell viability를 측정하였다. 그 결과, FPP-3를 단독으로 처리한 군과 TNF- α 를 같이 처리한 군에서 모두 세포 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1).

TNF- α 에 의해 유도된 장 상피 세포에 U937이 부착하는 현상에 대한 억제능력을 조사한 결과, Fig. 2과 같이 TNF- α 에 의해 유도된 장 상피 세포와 U937의 부착이 FPP-3에 의해 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다. 특히 현재 임상적으로 염증성 장질환 치료에 많이 쓰이고 있는 약물인 sulfasalazine의 활성 대사체인 5-ASA의 유효농도인 20 mM과 비교할 때, TNF- α 가 처리되지 않은 대조군의 수준으로 억제하는 FPP-3의 유효농도는 10 μ M~20 μ M인 것으로 나타났다. 이는 FPP-3가 5-ASA보다 약 1000배 낮은 농도에서도 더 우수한 효과를 보인다는 것을 의미하는 것으로 FPP-3가 염증성 장질환과 관련된 염증 반응을

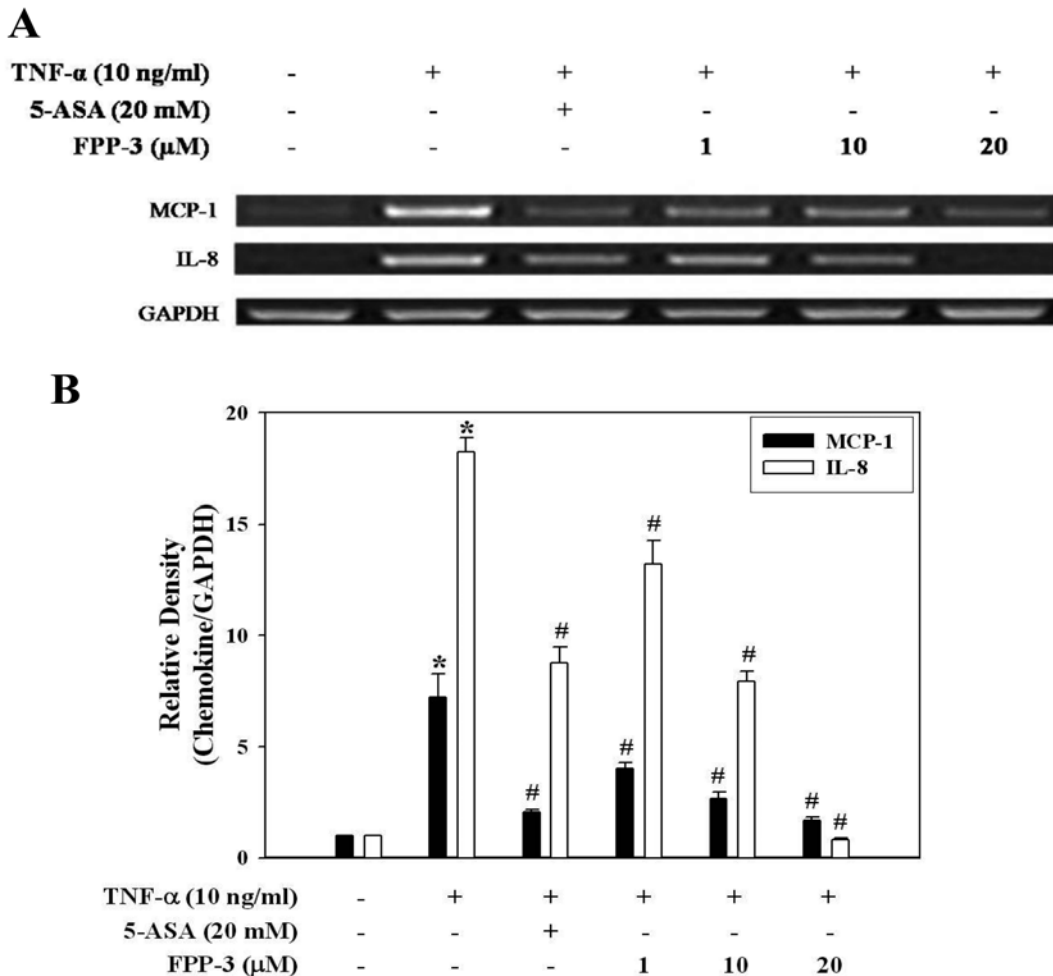


Fig. 3 – FPP-3 suppresses the TNF- α -induced MCP-1 and IL-8 mRNA expression. The cells were pretreated with various concentrations of FPP-3 for 1 h, followed by 10 ng/ml of TNF- α for 3 h. The MCP-1 and IL-8 mRNA expression level was measured by RT-PCR. The PCR products of MCP-1, IL-8, and GAPDH were separated in 2% agarose gel (A). The expressions of MCP-1 and IL-8 mRNA were statistically analyzed relative to GAPDH by densitometry (B). Data are shown as means \pm SEM from three independent experiments. *P<0.05, compared to untreated control and #P<0.05, compared to TNF- α -treated group.

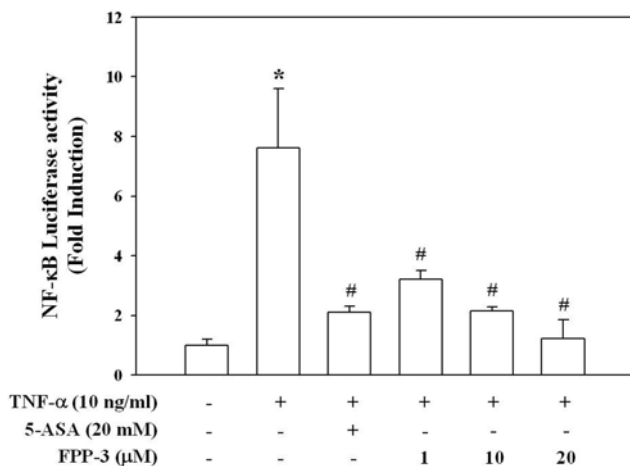


Fig. 4 – FPP-3 suppresses the TNF- α -induced NF- κ B gene transcription activity. The NF- κ B gene transcription activity was measured by a luciferase assay kit (Dual Luciferase Activity assay system; Promega) in the cells transfected with NF- κ B plasmid in the presence of GeneJammer (Stratagene). Data are means \pm SEM from three independent experiments. * P <0.05, compared to untreated control and # P <0.05, compared to TNF- α -treated group.

효과적으로 억제할 수 있음을 암시하고 있다.

다음으로 U937의 장 상피세포 부착을 매개하는 MCP-1과 IL-8의 발현 증가에 대한 FPP-3의 영향을 조사하였다. 그 결과, Fig. 3와 같이 FPP-3가 TNF- α 에 의해 유도된 MCP-1과 IL-8의 mRNA 발현 증가를 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. 특히 IL-8은 염증성 장질환에서 특이적으로 높게 발현되는 것으로 알려져 있는데, FPP-3를 20 μ M 농도로 처리 하였을 때 IL-8의 mRNA 발현이 TNF- α 가 처리되지 않은 대조군과 유사한 수준으로까지 억제함을 확인하였다.

뿐만 아니라 MCP-1과 IL-8의 발현조절에 공통적으로 관련된 전사인자인 NF- κ B에 대한 FPP-3의 영향을 조사하기 위해 NF- κ B luciferase reporter gene constructs가 transfection된 장 상피 세포에 TNF- α 를 처리하였을 때, NF- κ B의 활성이 유의적으로 증가되었고, 이러한 증가는 FPP-3가 처리된 실험군에서 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 4). 또한 Fig. 3의 결과와 비교해보면 MCP-1의 경우, 본 실험의 결과와 거의 일치하는 경향을 보였으나, IL-8의 경우에는 그 발현 억제 경향이 NF- κ B의 활성 억제 경향과 약간의 차이를 보였다. 이는 IL-8의 발현 조절이 NF- κ B를 경유한 경로를 통해서 뿐만 아니라 NF- κ B에 비의존적인 경로를 통해서도 이루어질 수 있기 때문인 것⁶⁾으로 판단된다.

결 론

FPP-3 화합물이 TNF- α 로 유도되는 소장 상피 세포의 염증 상태에 미치는 영향을 조사한 결과, TNF- α 에 의해 유도 되어진 단

핵구의 장 상피 세포 부착현상을 FPP-3가 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다. 또한 TNF- α 에 의한 단핵구의 부착 현상과 깊은 관련이 있으며, 소장의 염증 병변을 악화시키는 주요 chemokine인 MCP-1과 IL-8의 발현 증가 및 이들의 발현 조절인자인 NF- κ B의 활성화도 FPP-3에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. 특히 임상적으로 널리 쓰이는 약물인 sulfasalazine의 활성 대사체인 5-ASA의 농도와 비교하였을 때, FPP-3는 100배 낮은 농도에서 우수한 효과를 나타내었다. 위의 결과로 미루어 봤을 때, FPP-3는 TNF- α 로 유도된 장 상피 세포의 염증을 강력하게 억제함으로 염증성 장질환 치료제 개발의 선도물질이 될 수 있을 것이다.

감사의 말씀

이 연구는 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. R11-2007-040-02004-0).

참고문헌

- Ito, R., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Kita, M., Ueda, Y., Iwakura, Y., Kataoka, K., Okanoue, T. and Mazda, O. : Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **46**, 330 (2006).
- Banks, C., Bateman, A., Payne, R., Johnson, P. and Sheron, N. : Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Pathol.* **199**, 28 (2003).
- Dijkstra, G., Moshage, H. and Jansen, P. L. : Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease. *Scand J. Gastroenterol. Suppl.* **236**, 37 (2002).
- Lee, E. S., Park, B. C., Paek, S. H., Lee, Y. S., Basnet, A., Jin, D. Q., Choi, H. G., Yong, C. S. and Kim, J. A. : Potent analgesic and anti-inflammatory activities of 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone with gastric ulcer sparing effect. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 361 (2006).
- Park, B. C., Thapa, D., Lee, Y. S., Kwak, M. K., Lee, E. S., Choi, H. G., Yong, C. S. and Kim, J. A. : 1-Furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone inhibits the invasion and migration of HT1080 human fibrosarcoma cells through the inhibition of proMMP-2 activation and down regulation of MMP-9 and MT1-MMP. *Eur. J. Pharmacol.* **567**, 193 (2007).
- Moon, Y., Yang, H. and Park, S. H. : Hypo-responsiveness of interleukin-8 production in human embryonic epithelial intestine 407 cells independent of NF-kappaB pathway: new lessons from endotoxin and ribotoxic deoxynivalenol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **15**, 231 (2008).