

Triptolide Suppresses the Expression of Cyclooxygenase-2 Induced by Toll-Like Receptor 3 and 4 Agonists

Gyo-Jeong Gu^{1,4}, Sang-Hoon Eom^{2,4}, In Soon Min^{3,†} and Hyung-Sun Youn^{1,2,†}

¹Departments of Medical Science, College of Medical Sciences, SoonChunHyang University, Chungnam, Asan 336-745, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, SoonChunHyang University, Chungnam, Asan 336-745 Korea

³Department of Healthcare Administration and Management, College of Medical Sciences, SoonChunHyang University, Chungnam, Asan 336-745, Korea

Toll-like receptors (TLRs) recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and regulate the activation of innate immunity. All TLR signaling pathways culminate in the activation of NF- κ B, leading to the induction of inflammatory gene products such as cyclooxygenase-2 (COX-2). Triptolide (TP), a natural component of *Tripterygium wilfordii* Hook. F, has been used as folk remedies to treat many chronic diseases for many years. In the present report, we present biochemical evidence that TP inhibits the NF- κ B activation induced by polyriboinosinic polyribocytidylic acid (Poly[I:C], TLR3 agonist) and lipopolysaccharide (LPS, TLR4 agonist). TP also inhibits COX-2 expression induced by Poly[I:C] and LPS. These results suggest that TP can modulate the immune responses regulated by TLR3 and TLR4 signaling pathways.

Key Words: Toll-like receptors, Triptolide, NF- κ B, COX-2, Polyriboinosinic polyribocytidylic acid

서 론

선천성 면역 반응은 거의 모든 생물체에 존재하는 숙주의 방어 체계로서, 병원균에 대항하기 위한 숙주의 최초 방어 체계라 할 수 있다. 병원균들이 특이하게 가지고 있는 분자 구조 (molecular patterns)를 Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP)이라고 부르며, PAMPs가 숙주

안에 들어오면 최초로 숙주 안에 있는 pattern recognition receptors (PRRs)가 인식하게 된다 (Takeda and Akira, 2005). Toll-like receptor (TLR), NOD-like receptor, RIG-like receptor 가 PRRs 역할을 하는 대표적인 수용체들로 알려져 있다 (Kumar et al., 2009). 특히 이 중에서도 TLRs가 중요한 PRR 역할을 한다고 알려져 있다. 현재까지 적어도 13개의 TLRs가 포유동물 세포 안에서 발견되었으며, 각각의 TLRs는 병원균들이 가지고 있는 각각의 PAMPs를 인식하는 것으로 알려져 있다 (Kawai and Akira, 2007).

TLRs는 커다랗게 myeloid differential factor 88 (MyD88) 과 Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF)를 통한 두 개의 신호 전달 경로를 가지고 있다 (Kawai and Akira, 2007). MyD88은 TLR3를 제외한 모든 TLRs의 TIR domain에 붙는 어댑터 분자이며, IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4)를 유도한다. IRAK-4는 IRAK-1의 인산화를 유도하며, 인산화된 IRAK-1은 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)를 유도한다. TRAF6는 I κ B kinases (IKK) complex의 활성화를 유도하여 전사 요소

*Received: March 11, 2013 / Revised: June 4, 2013
Accepted: June 7, 2013

⁴Gyo-Jeong Gu, Sang-Hoon Eom contributed equally to this work.

[†]Corresponding author: Hyung-Sun Youn. Department of Biomedical Laboratory Science College of Medical Sciences Soonchunhyang University 646 Eupnae-Ri, Shinchang-Myun, Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea.
Tel: +82-41-530-3086, Fax: +82-41-530-3085
e-mail: hyoun@sch.ac.kr

[†]Corresponding author: In Soon Min. Department of Healthcare Management, College of Medical Sciences, SoonChunHyang University, Chungnam, Asan 336-745, Korea.
Tel: +82-41-530-3045, Fax: +82-41-530-3085
e-mail: mis2519@sch.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

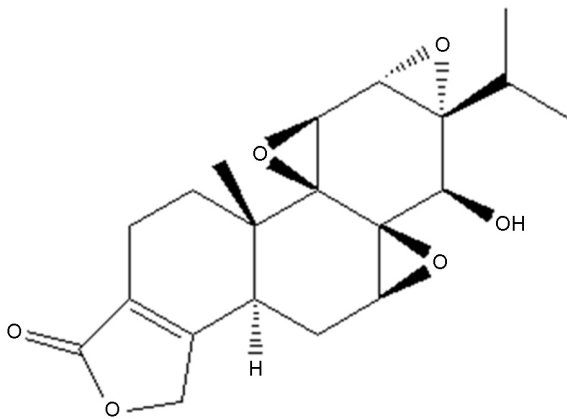


Fig. 1. The structure of triptolide (TP).

nuclear factor κ B (NF- κ B)를 활성화 시킨다. 활성화된 NF- κ B는 cytokine, cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 등과 같은 염증을 유발하는 유전자들을 유도하여 여러 질병을 유발하게 된다 (Takeda and Akira, 2005).

TLR3와 TLR4는 MyD88 대신에 어댑터 분자인 TRIF를 통하여 interferon (IFN) regulatory factor 3 (IRF3) 활성화를 유도한다 (Sato et al., 2003). TRIF는 TANK-binding kinase 1 (TBK1) 활성화를 유도하여 전사 요소 IRF3 활성화를 유도한다. 활성화된 IRF3는 IFN β 나 IFN α 에 의해서 유도되는 유전자들을 유도한다. 또한 TRIF의 C-말단 부분은 receptor interacting protein 1 (RIP1)과 반응하여 지연된 NF- κ B 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Meylan et al., 2004).

Tripterygium wilfordii Hook. F는 오래 전부터 동양의학에서 많이 사용되어 왔다. *T. wilfordii* Hook. F 추출물은 관절염 (rheumatoid arthritis), 사구체 신염 (nephritis), 전신성 홍반성 낭창 (systemic lupus erythematosus)와 같은 자가면역 (autoimmune), 항염증 (anti-inflammatory) 질병 치료제로써 사용되어 왔다 (Chen, 2001; Jiang, 1994; Tao et al., 1989). 현재까지 *T. wilfordii* Hook. F 안에서 300개 이상의 성분의 밝혀졌으며, triptolide (TP)가 (Fig. 1) 가장 효과적인 성분으로 알려져 있다. 여러 연구에 의하면 TP는 면역억제 (immunosuppressive), 항염증 (anti-inflammatory), 항증식 (anti-proliferative) 활성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다 (Chen, 2001; Qiu and Kao, 2003). TP는 대식세포 (macrophages), 인간 대장암 세포 (human colon cancer cells), 백혈병 세포 (leukemia cells)에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 발현을 억제하는 것으로

알려져 있다 (Kim et al., 2004; Tong et al., 2007). 또한 TP는 염증과 관련된 면역세포 안에서 여러 가지 cytokines이나 chemokines 생성을 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Jiao et al., 2008; Lu et al., 2005).

하지만 TP가 TLR3 agonist이며, 박테리아 double strand RNA (dsRNA)에 의해 유도된 TLRs 신호 전달 시스템을 조절하는지는 알려져 있지 않다. 그래서 우리는 이번 연구를 통해서 TP가 TLR3, TLR4 agonist에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화와 활성화된 NF- κ B에 의해서 유도되는 유전자인 COX-2 발현을 조절하는지 알아보았다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 TP는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터 구입하였다. LPS는 List Biological Lab (San Jose, CA, USA)로부터, polyriboinosinic polyribocytidylic acid (Poly[I:C])는 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA) 회사로부터 각각 구입하였다. COX-2, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. 그 밖의 다른 시약들은 Sigma-Aldrich 회사로부터 구입하였다.

세포 배양

RAW 264.7 cells (a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71)은 10% (v/v) FBS, 100 units/mL Penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였으며, 세포들은 5% CO₂/air를 포함하고 있는 37°C 배양기 안에서 배양하였다.

트랜스펙션 (transfection)과 발광효소 유전자 분석 (luciferase reporter gene assay)

NF- κ B와 COX-2 luciferase plasmid, Heat shock protein (HSP) 70- β -galactosidase plasmid 등 transfection을 위한 모든 DNA는 EndoFree Plasmid Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 준비되었다. NF- κ B, COX-2 발광효소 유전자 분석은 선행연구에서 사용한 방법에 의하여 분석하였다 (Youn et al., 2006c). 발광효소 plasmid와 HSP70- β -galactosidase plasmid는 Superfect transfection 시약 (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 세포 안으로 transfection 시켰다. 발광효소의 활성화는 luciferase assay system (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였

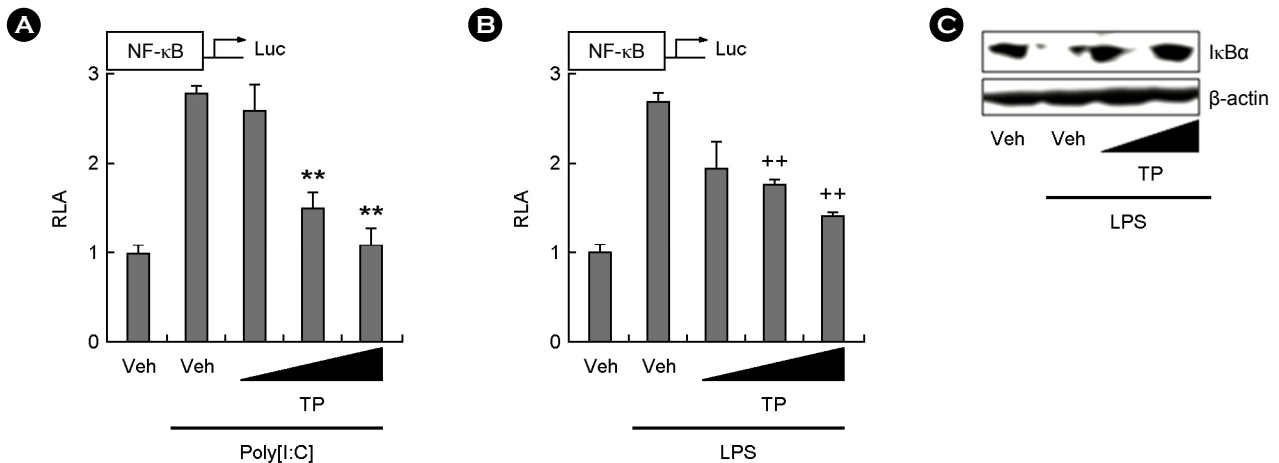


Fig. 2. TP suppressed the NF-κB activation induced by Poly[I:C] and LPS. (A, B) RAW264.7 cells were transfected with NF-κB luciferase reporter plasmid and pre-treated with TP (10, 50, 100 nM) for 1 hr and then treated with Poly[I:C] (10 μg/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) (B) for an additional 8 hrs. Cell lysates were prepared and luciferase and β-galactosidase enzyme activities were measured as described in "Materials and Methods". Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β-galactosidase activity. Values are mean ± SEM (n=3). *, Significantly different from Poly[I:C] alone, P<0.01 (**). +, Significantly different from LPS alone, P<0.01 (++) (B). (C) RAW264.7 cells were pretreated with TP (50, 100 nM) for 1 h and then further stimulated with LPS (10 ng/mL) for 30 min. Cell lysates were analyzed for IκBα and β-actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; TP, triptolide.

다. 발광효소 활성화는 β-galactosidase 활성화를 측정하여 표준화시켰다.

면역압 (immunoblotting)방법

Western blotting은 선행연구의 방법에 의하여 분석하였다 (Youn et al., 2006a; Youn et al., 2006b). 단백질 추출물들은 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이전되었으며, Membrane은 0.1% Tween 20와 5% 탈지 건조된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline을 가지고 blocking 하였다. Membrane은 1차 항체를 가지고 blotting하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, ECL western blot detection 시약 (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA)을 사용하여 단백질을 규명하였다.

데이터 분석

각각의 데이터 값은 세 개가 하나의 실험으로 얻어졌으며, mean ± standard error mean (SEM)으로 표현되었다.

결과 및 고찰

TP의 TLR3, TLR4 agonists에 의해 유도된 NF-κB 활성화 억제

먼저 우리는 TP가 TLR3, TLR4 agonists에 의해 유도된 NF-κB 활성을 억제하는지 알아보았다. Poly[I:C] (TLR3 agonist)와 LPS (TLR4 agonist)는 TLR3, TLR4에 의해 각각 인식하게 되면 MyD88-, TRIF-dependent 신호 전달 시스템을 통하여 NF-κB 활성화를 유도하게 된다. 우리는 NF-κB 활성화 측정을 위해서 발광효소 유전자 분석법을 사용하였다. TP는 Poly[I:C], LPS에 의해 유도된 NF-κB 활성을 억제시켰다 (Figs. 2A, B). 또한 TP는 LPS에 의해서 유도된 IκBα 분해를 억제시켰다 (Fig. 2C). 이것은 TP가 TLRs 신호 전달 시스템을 조절하여 NF-κB 활성을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

TP의 TLR3, TLR4 agonists에 의해 유도된 COX-2 발현 억제

TLR3, TLR4가 agonists를 인식하여 신호를 아래로 전달하면, NF-κB 활성화를 유도하고, 활성화된 NF-κB는 cytokine, COX-2와 같은 염증 유전자들 발현을 유도한다. 숙주에 침입한 병원체들의 계속된 자극과 이러한 과정들이 반복됨으로써 여러 질병이 발생하게 된다. 다음 실험

으로 COX-2 발광효소 유전자 분석법과 western blotting 방법을 사용하여 COX-2 발현이 TP에 의해 억제되는지 알아보았다. TP는 Poly[I:C]와 LPS에 의해 유도된 COX-2

발현을 억제시켰다 (Figs. 3, 4). 이것은 TP가 염증 유전자들을 조절하는 항염증 효과에 대한 중요한 역할을 가진다는 것을 의미한다고 할 수 있겠다.

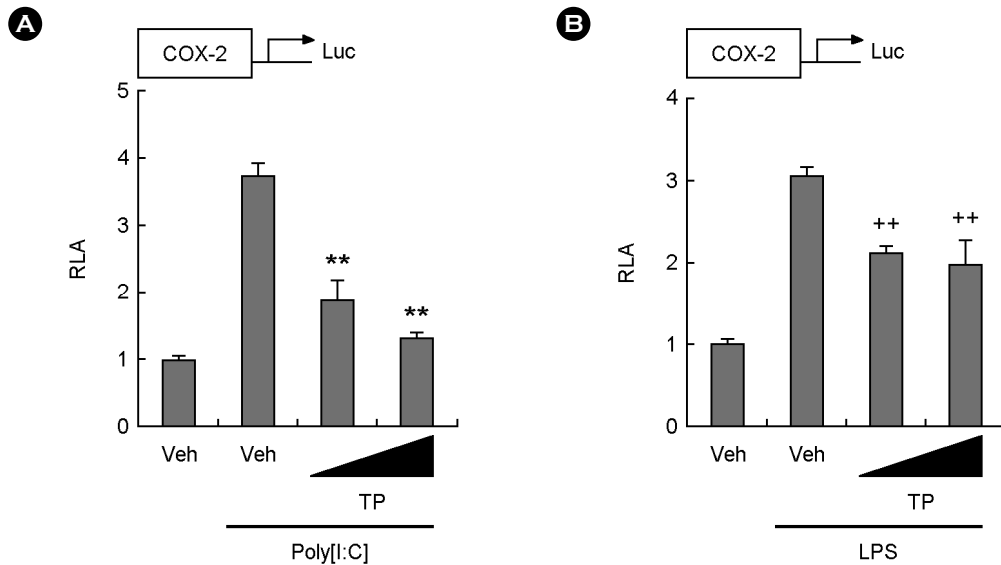


Fig. 3. TP suppressed the COX-2 expression induced by Poly[I:C] and LPS. (A, B) RAW264.7 cells were transfected with COX-2 luciferase reporter plasmid and pre-treated with TP (50, 100 nM) for 1 hr and then further stimulated with Poly[I:C] (10 μ g/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) (B) for an additional 8 hrs. Cell lysates were prepared and luciferase and β -galactosidase enzyme activities were measured as described in "Materials and Methods". Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β -galactosidase activity. Values are mean \pm SEM ($n=3$). *, Significantly different from Poly[I:C] alone, $P<0.01$ (**). (A). ++, Significantly different from LPS alone, $P<0.01$ (++) (B). Veh, vehicle; TP, triptolide.

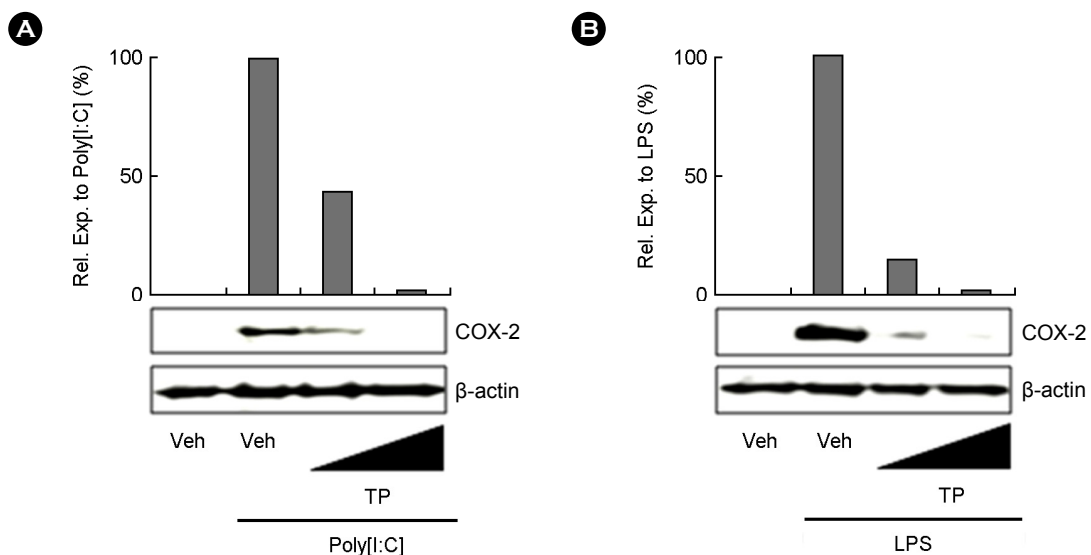


Fig. 4. TP suppressed the COX-2 protein induced by Poly[I:C] and LPS. (A, B) RAW264.7 cells were pretreated with TP (50, 100 nM) for 1 hr and then further stimulated with with Poly[I:C] (10 μ g/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) (B) for 8 hrs. Cell lysates were analyzed for COX-2 and β -actin protein by immunoblots. The blots were subjected to densitometric analysis (upper panel). Densitometric units were normalized to β -actin. Veh, vehicle; TP, triptolide.

우리는 이번 연구에서 TP가 TLR3 agonist인 Poly[I:C]와 TLR4 agonist인 LPS에 의해 유도된 NF- κ B 활성화와 COX-2 발현을 억제시킬 수 있다는 것을 알아내었다. TP는 선천성 면역과 염증에 관련된 NF- κ B 활성을 억제하여 COX-2 발현을 조절하는 효과를 가지는 염증 억제제로써도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 미래에는 TP가 TLRs 신호 전달 시스템을 어떻게 조절하여 염증 인자 또는 염증 유전자를 억제하는지 정확한 분자학적인 타겟이 밝혀질 것으로 기대한다.

염증 (inflammation)은 여러 분자학적인 기전에 의해서 유도되는데, 그 중에서도 COX-2에 의한 prostaglandins (PGs)의 생성이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Moncada, 1999; Turini and DuBois, 2002). COX는 적어도 두 개의 isoforms인 COX-1과 COX-2로 존재한다고 알려져 있다. COX-1은 거의 모든 세포나 조직에서 항상 발현되며 신장 (kidney)에서 위장관 세포보호작용 (gastrointestinal cytoprotection), 전해질 항상성 (electrolyte homeostasis)과 같은 중요한 생리적 과정을 조절하는 것으로 알려져 있지만, COX-2는 염증을 유발하는 요소에 의해서 커다랗게 증가되어 여러 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Vane et al., 1998). 1971년 Vane이 aspirin과 관련된 약들이 PG 합성을 억제하여 항염증 효과를 가지고 있다는 것을 발견한 이래로 많은 물질들이 PG 합성을 위한 항염증 억제제로써 탐구되었다 (Vane, 1971). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)에 의한 독성효과 중에서 많은 것은 COX-1 억제에 의해서 유도되지만, 치료효과는 COX-2 억제에 의해서 유도된다고 알려져 있다 (Grzanna et al., 2005). 이러한 사실은 많은 제약회사들에게 NSAID 개발에 있어서 COX-2 억제제를 개발하도록 유도하였으며, 현재까지 많은 COX-2 억제제가 개발되어 항염증제로써 사용되고 있다. 특히 많은 파이토케미칼이 COX-2 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다 (Khanna et al., 2007; Surh, 2003; Surh et al., 2001).

오늘날 염증 치료제로써 통증을 완화시키는 NSAIDs들이 개발되었다. NSAIDs의 대표적인 약물로는 aspirin, ibuprofen과 naproxen 등이 있지만, 이러한 NSAIDs는 많은 문제를 일으키는 부작용 때문에 오늘날 많은 연구자들은 염증 치료를 위해서 자연에서 얻어진 물질에 보다 높은 관심을 가지기 시작하였다 (Harris et al., 2005; Naesdal and Brown, 2006). 이번 연구에서는 자연에 존재하는 물질인 *Tripterygium wilfordii* Hook. F의 추출물 TP가

면역시스템 조절을 위해서 중요한 역할을 하는 TLRs 신호 전달 시스템을 어떻게 조절하여 항염증 효과를 가지고 있는지 알아보았다. 우리는 TP가 TLR3, TLR4 agonists에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화와 COX-2 발현을 억제하는 것을 알아내었다. 특히 TLR3 agonist인 Poly[I:C]는 viral dsRNA이다. 이것은 TP가 바이러스에 의해 유도되는 염증 반응이나 여러 질병을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다. 앞으로 우리는 TP가 TLR3 신호 전달 시스템을 통해서 유도되는 어떤 유전자나 단백질질을 조절하는지, 그리고 TP의 정확한 분자학적인 타겟을 알아내고자 한다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교 학술연구비 지원으로 수행하였으므로 이에 감사를 드립니다 (과제번호 20090164).

REFERENCES

- Chen BJ. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F. Leuk Lymphoma. 2001. 42: 253-265.
- Flower RJ. The development of COX2 inhibitors. Nat Rev Drug Discov. 2003. 2: 179-191.
- Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. J Med Food. 2005. 8: 125-132.
- Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). Oncol Rep. 2005. 13: 559-583.
- Jiang X. Clinical observations on the use of the Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook for the treatment of nephrotic syndrome. Pediatr Nephrol. 1994. 8: 343-344.
- Jiao J, Xue B, Zhang L, Gong Y, Li K, Wang H, Jing L, Xie J, Wang X. Triptolide inhibits amyloid-beta1-42-induced TNF-alpha and IL-1beta production in cultured rat microglia. J Neuroimmunol. 2008. 205: 32-36.
- Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. Trends Mol Med. 2007. 13: 460-469.
- Khanna D, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. Curr Opin Pharmacol. 2007. 7: 344-351.

- Kim YH, Lee SH, Lee JY, Choi SW, Park JW, Kwon TK. Triptolide inhibits murine-inducible nitric oxide synthase expression by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of nuclear factor-kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase. *Eur J Pharmacol.* 2004. 494: 1-9.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009. 388: 621-625.
- Lu Y, Fukuda K, Nakamura Y, Kimura K, Kumagai N, Nishida T. Inhibitory effect of triptolide on chemokine expression induced by proinflammatory cytokines in human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005. 46: 2346-2352.
- Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol.* 2004. 5: 503-507.
- Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med.* 1999. 92: 164-169.
- Naesdal J, Brown K. NSAID-associated adverse effects and acid control aids to prevent them: a review of current treatment options. *Drug Saf.* 2006. 29: 119-132.
- Qiu D, Kao PN. Immunosuppressive and anti-inflammatory mechanisms of triptolide, the principal active diterpenoid from the Chinese medicinal herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f. *Drugs R D.* 2003. 4: 1-18.
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2003. 171: 4304-4310.
- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer.* 2003. 3: 768-780.
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res.* 2001. 480: 243-268.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005. 17: 1-14.
- Tao XL, Sun Y, Dong Y, Xiao YL, Hu DW, Shi YP, Zhu QL, Dai H, Zhang NZ. A prospective, controlled, double-blind, crossover study of tripterygium wilfordii hook F in treatment of rheumatoid arthritis. *Chin Med J (Engl).* 1989. 102: 327-332.
- Tong X, Zheng S, Jin J, Zhu L, Lou Y, Yao H. Triptolide inhibits cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human colon cancer and leukemia cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007. 39: 89-95.
- Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med.* 2002. 53: 35-57.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998. 38: 97-120.
- Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Auranofin, as an anti-rheumatic gold compound, suppresses LPS-induced homodimerization of TLR4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006a. 350: 866-871.
- Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol.* 2006b. 72: 850-859.
- Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol.* 2006c. 72: 62-69.