

(E)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)pyrrolidine inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in RAW264.7 Macrophages Stimulated with Lipopolysaccharide

Gyo-Jeong Gu^{1,4}, Sang-Hoon Eom^{2,4}, Chang Won Suh³, Kwang Oh Koh³,
Dae Young Kim³ 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 Chemistry, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University,
Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea

Toll-like receptors (TLRs) play an important role for host defense against invading pathogens. TLR4 has been identified as the receptor for lipopolysaccharide (LPS), which is a cell wall component of gram-negative bacteria. The activation of TLR4 signaling by LPS leads to the activation of NF- κ B and the expression of pro-inflammatory gene products such as cytokines, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2). To evaluate the therapeutic potential of (E)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)pyrrolidine (NVPP), previously synthesized in our laboratory, NF- κ B activation and iNOS and COX-2 expression induced by LPS were examined. NVPP inhibited the activation of NF- κ B induced by LPS. NVPP also suppressed the iNOS expression induced by LPS but it did not suppress COX-2 expression induced by LPS. These results suggest that NVPP has the specific mechanism for anti-inflammatory responses.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Lipopolysaccharide; NF- κ B; Inducible nitric oxide synthase; (E)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)pyrrolidine

염증은 병원균이나 생체조직의 손상과 같은 해로운 자극에 대한 보호 반응으로 작용한다. 하지만 만성염증은 오히려 여러 질병을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Ferrero-Miliani et al., 2007). 염증은 여러 분자학적인 기전에 의해 유도되는데, 그 중에서 두 가지 효소가 염증 유발에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 하나는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의한 nitric oxide (NO) 생성이고, 다른 하나는 cyclooxygenase-2 (COX-2)에

의한 prostaglandins (PGs) 생성이다 (Moncada, 1999; Turini and DuBois, 2002). 선천성 면역 반응을 위해서 필요한 Toll-like receptors (TLRs)가 염증 반응에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Kawai and Akira, 2010). TLRs는 박테리아, 바이러스 등을 포함한 여러 병원균들이 가지고 있는 독특한 구조를 인식한다. TLRs는 이러한 병원균들에 대항하여 염증 반응 및 선천성 면역 (innate immunity) 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Kawai and Akira, 2010). 그러므로 TLRs 신호전달 시스템 조절 기전 규명은 염증 및 선천성 면역 반응에 대한 이해를 도울 뿐만 아니라, 여러 질병들을 예방하기 위하여 중요한 역할을 하게 될 것이다.

현재까지 포유동물에서 적어도 13개의 TLRs가 발견되었다 (Kawai and Akira, 2010). TLRs는 각각 서로 다른 아고니스트 (agonist)를 인식하여 신호전달 시스템을 유도

*Received: March 11, 2013 / Revised: March 25, 2013
Accepted: April 6, 2013

⁴Both authors 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

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

하는 것으로 알려져 있다. TLRs 중에서 특히 TLR4는 그람 음성 세균의 세포벽 구성 요소인 lipopolysaccharide (LPS)를 인식하는 수용체로 알려져 있다. LPS는 lipid A (endotoxin), core oligosaccharide, O-antigen으로 구성되어 있으며, TLR4는 특히 LPS의 lipid A를 인식한다 (Raetz and Whitfield, 2002). TLR4가 LPS를 인식하면 최초 반응으로 동종이합체 형성을 하며, 동종이합체 형성은 어댑터 분자 (adaptor molecule)인 myeloid differential factor 88 (MyD88) 또는 TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β (TRIF)를 유도한다 (Kawai and Akira, 2010). MyD88은 TLR3를 제외한 모든 포유동물에서 발견되는 어댑터 분자이며, IRAK (IL-1 receptor associate kinase)을

유도한다. IRAK은 TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)를 유도하며, TRAF6는 inhibitor of kappa B kinases (IKKs)를 활성화 시켜 전사 요소 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 활성화를 유도한다. NF- κ B 활성화는 결국 cytokine, iNOS, COX-2와 같은 염증 유전자 물질 (inflammatory gene products)을 유도하여 여러 질병을 유도하게 된다 (Akira and Takeda, 2004). 그러므로 TLRs를 통한 NF- κ B 활성화를 억제할 수 있다면 여러 병원균들로부터 유도되는 염증 반응이나 만성적인 질병들을 막거나 치유할 수 있게 되는 것이다.

우리는 생물학적으로 중요하고 nitrovinyl-phenyl과 pyrrolidine을 함유하고 있는 (*E*)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)

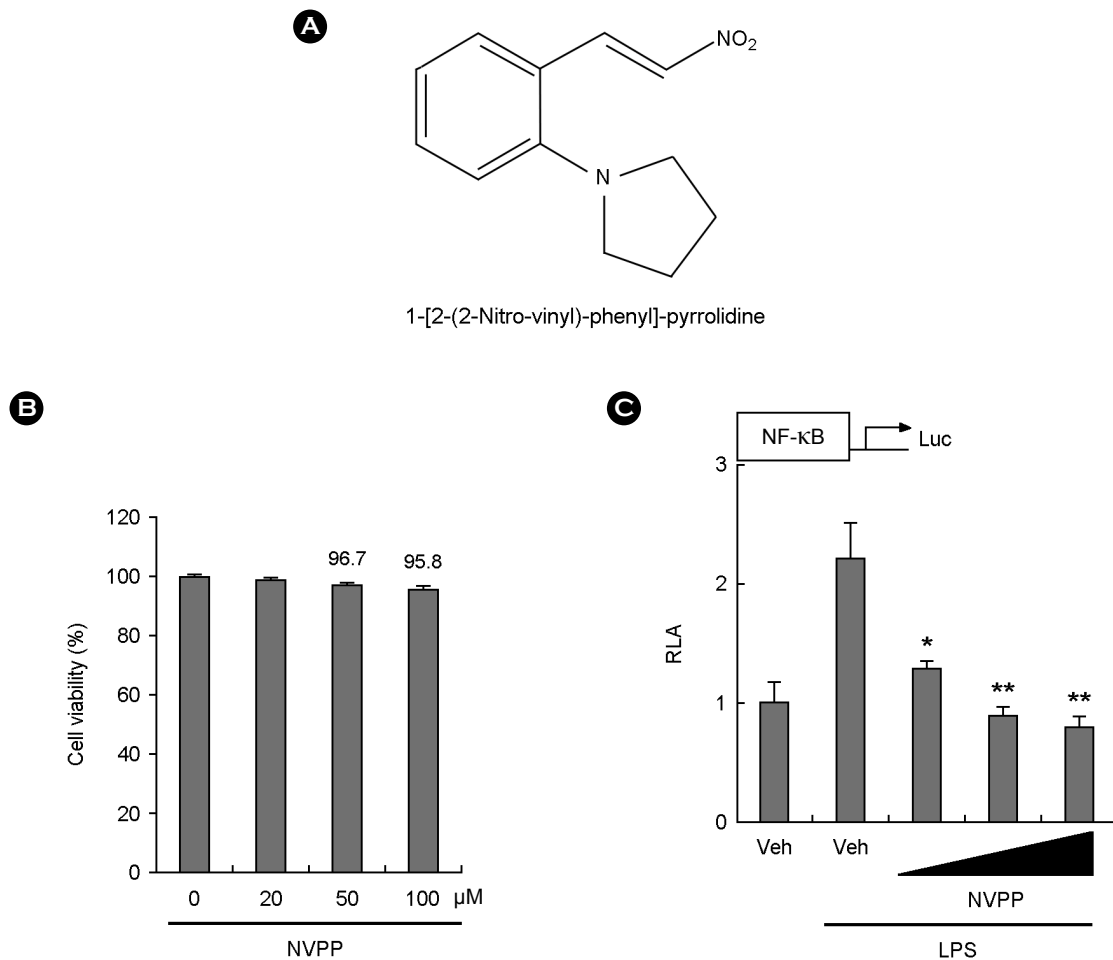


Fig. 1. NVPP inhibits NF- κ B activation induced by LPS. (A) The structure of (*E*)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)pyrrolidine (NVPP). (B) RAW264.7 cells were treated with NVPP (20, 50, 100 μ M) for 4 h. Twenty microliters of the CellTiter 96 AQ_{ueous} One Solution Reagent was added directly to culture wells. The plate was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 4 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The absorbance was recorded at 490 nm with a 96-well plate reader. (C) RAW264.7 cells were transfected with NF- κ B luciferase reporter plasmid and pretreated with NVPP (20, 50, 100 μ M) for 1 h and then treated with LPS (10 ng/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n=3$). *, Significantly different from LPS alone, $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**). Veh, vehicle; NVPP, (*E*)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)pyrrolidine.

pyrrolidine (NVPP) (Fig. 1A)을 Rabong et al. 합성방법에 따라서 합성하였다 (Rabong et al., 2008). 그래서 이번 연구를 통하여 NVPP가 TLR4 아고니스트인 LPS에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화와 NF- κ B 활성화에 의해서 유도되는 유전자인 iNOS와 COX-2에 대한 효과를 알아보았다.

먼저 NVPP의 세포독성을 확인하기 위해서 MTS assay 방법을 사용하여 세포 생존율을 측정하였다 (Shin et al., 2013). NVPP는 50 μ M의 농도에서 96.7%, 100 μ M 농도에서 95.8% 세포 생존율을 보여주었다 (Fig. 1B). 그래서 앞으로의 모든 실험은 NVPP 100 μ M 농도까지 사용하여 실험하였다.

NVPP가 TLR4 아고니스트인 LPS 의해서 유도된 NF- κ B 활성화에 어떤 영향을 미치는지 발광효소 유전자 분석법 (luciferase assay)을 통해서 알아보았다 (Shin et al., 2013). NVPP는 LPS에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제하였다 (Fig. 1C).

다음 실험으로 NVPP가 NF- κ B 활성화에 의해서 유도되는 유전자 중 하나인 iNOS의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. NO는 대기중의 가장 풍부한 질소와 산소 두 기체의 1:1 조합물이다. 오늘날에는 포유동물 세포가 아미노산 L-arginine으로부터 NO를 만들고, 이 NO는 세포에서 다른 세포 사이의 신호전달을 위해 사용된

다고 알려져 있다 (Hanafy et al., 2001). NO는 3개의 NOS isoforms인 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS)에 의해서 유도된다고 알려져 있다 (Vallance, 2003). eNOS, nNOS는 항상 발현되지만, iNOS는 감염이나 염증성 인자 (proinflammatory stimuli)에 의해서 유도되는 효소이다 (Vallance, 2003). iNOS는 LPS 또는 다양한 pro-inflammatory cytokines (interleukin-1, interferon- γ , tumor necrosis factor- α)의 자극에 의해서 발현되는 것으로 알려져 있다 (Green et al., 1990; Palmer et al., 1993). 먼저 iNOS 발광효소 유전자 분석법에 의하면 NVPP는 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현을 억제시켰다 (Fig. 2A). 또한 NVPP는 LPS에 의해 유도된 iNOS 단백질 발현을 억제시키는 것을 Western blotting 방법을 통하여 확인하였다 (Fig. 2B).

다음 실험으로 NVPP가 NF- κ B 활성화에 의해서 유도되는 유전자 중 다른 하나인 COX-2 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. COX-2 발광효소 유전자 분석법과 Western blotting 방법을 통해서 NVPP가 LPS에 의해 유도된 COX-2 발현을 억제하지 않는 것을 알아내었다 (Figs. 3A, B).

TLR4는 MyD88 (myeloid differential factor 88)과 TRIF (Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN- β) 두

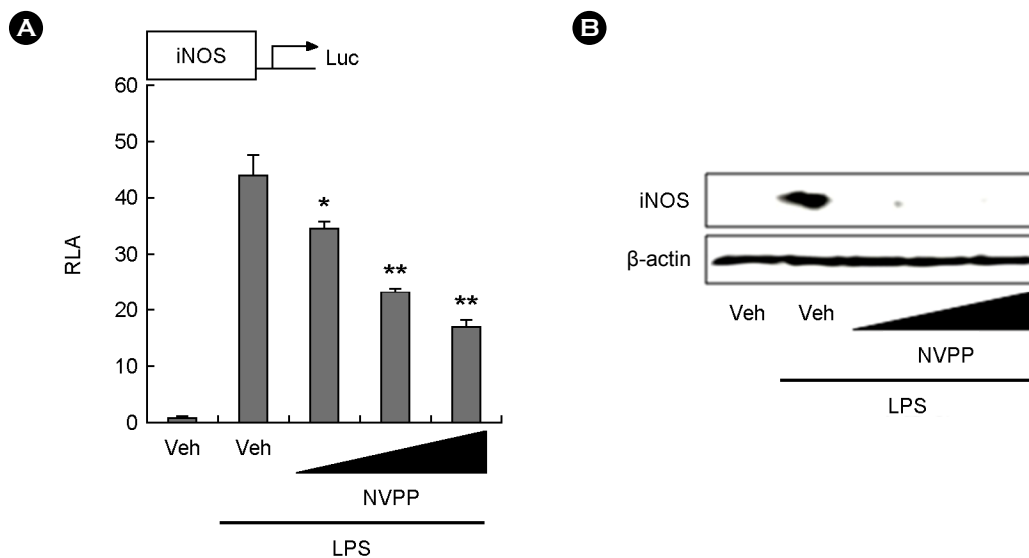


Fig. 2. NVPP inhibits iNOS expression induced by LPS. (A) RAW264.7 cells were transfected with iNOS luciferase reporter plasmid and pretreated with NVPP (20, 50, 100 μ M) for 1 h and then treated with LPS (10 ng/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values represent the mean \pm SEM ($n=3$). *, Significantly different from LPS alone, $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**). (B) RAW264.7 cells were pretreated with NVPP (20, 50, 100 μ M) for 1 h and then further stimulated with LPS (10 ng/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were analyzed for iNOS and β -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; NVPP, (E)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)pyrrolidine.

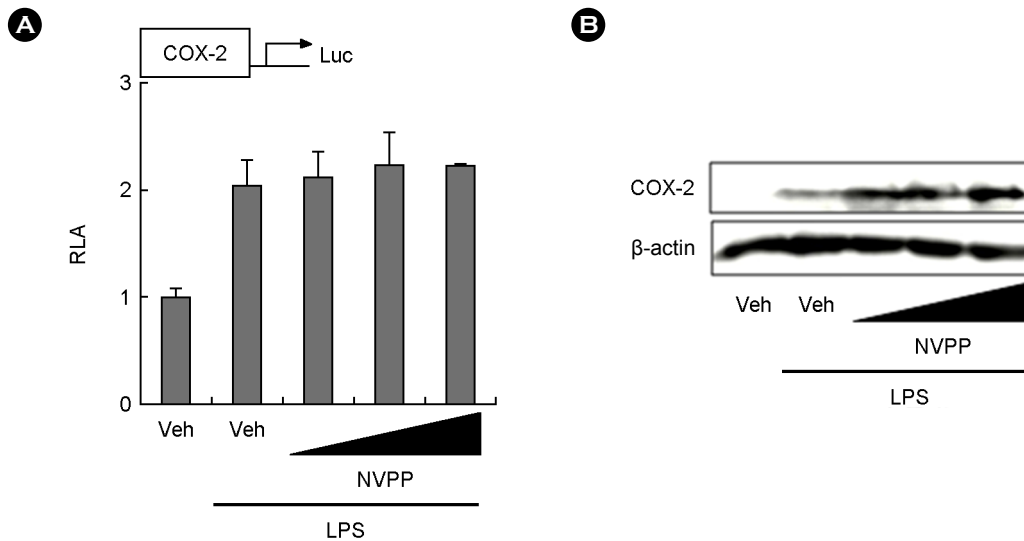


Fig. 3. NVPP inhibits COX-2 expression induced by LPS. (A) RAW264.7 cells were transfected with COX-2 luciferase reporter plasmid and pretreated with NVPP (20, 50, 100 μ M) for 1 h and then treated with LPS (10 ng/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were prepared and luciferase enzyme activities were determined. Values represent the mean \pm SEM ($n=3$). (B) RAW264.7 cells were pretreated with NVPP (20, 50, 100 μ M) for 1 h and then further stimulated with LPS (10 ng/ml) for an additional 8 h. Cell lysates were analyzed for COX-2 and β -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; NVPP, (*E*)-1-(2-(2-nitrovinyl)phenyl)pyrrolidine.

개의 신호전달 시스템을 활성화 시킨다 (Takeda and Akira, 2005). TLR4가 아고니스트인 LPS를 인식하게 되면 신호 전달 시스템이 활성화 되고, 이렇게 활성화된 신호들은 전사 요소 NF- κ B와 interferon regulatory factors (IRFs)의 활성화를 유도하여 cytokine, iNOS, COX-2와 같은 염증을 유발하는 유전체들을 유도하여 암이나 질병을 유발하게 된다 (Takeda and Akira, 2005).

NVPP가 TLR4 아고니스트인 LPS에 의해 유도된 NF- κ B 활성화를 억제시켰으므로, iNOS와 COX-2 발현을 모두 억제시킬 것이라고 기대하였다. 그러나 NVPP는 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현만을 억제하였다. 이러한 결과는 iNOS와 COX-2 유전자들이 다른 메커니즘에 의해 조절된다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 미래에는 iNOS와 COX-2 조절 기전 연구를 통하여 작용 메커니즘을 규명하고자 한다.

LPS에 의해 유도된 대다수의 유전자들은 TRIF-dependent 신호전달 시스템을 통하여 조절되는 것으로 알려져 있다 (Bjorkbacka et al., 2004). 또한 LPS에 의해 유도된 iNOS 발현의 대부분은 TRIF-dependent 신호전달 시스템에 의해 조절된다고 보고되었으며 (Gao et al., 1998), COX-2 발현의 대부분은 MyD88-dependent 신호전달 시스템에 의해 조절된다고 보고되었다 (Hwang et al., 1997). LPS는 MyD88-과 TRIF-dependent 양쪽 신호전달 시스템

을 이용하여 NF- κ B 활성화를 유도할 수 있다. 이 모든 결과들을 종합해 볼 때 NVPP가 TLRs의 TRIF-dependent 신호전달 시스템만을 조절할 수 있다는 가능성을 보여준다고 할 수 있겠다. 미래에는 NVPP가 TRIF-dependent 신호전달 시스템을 어떻게 조절하여 NF- κ B 활성화와 iNOS 발현을 억제하는지 그 작용 기전을 규명하고자 한다.

우리는 처음으로 NVPP가 TLR4 아고니스트인 LPS에 의해 유도된 NF- κ B 활성화와 iNOS 발현을 억제하지만, COX-2 발현은 억제하지 않는다는 것을 밝혀내었다. 이러한 결과들은 항염증 및 신약 개발에 있어서 새로운 패러다임을 제공할 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교 학술연구비의 일부 지원으로 수행하였으므로 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004. 4: 499-511.
- Bjorkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, Li X, Gregory JA, Lee MA, Ordija CM, Dowley NE, Golenbock DT, Freeman MW. The induction of macrophage gene expression by LPS predom-

- inantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol Genomics*. 2004. 19: 319-330.
- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol*. 2007. 147: 227-235.
- Gao JJ, Filla MB, Fultz MJ, Vogel SN, Russell SW, Murphy WJ. Autocrine/paracrine IFN- α mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Immunol*. 1998. 161: 4803-4810.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol*. 1990. 144: 278-283.
- Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit*. 2001. 7: 801-819.
- Hwang D, Jang BC, Yu G, Boudreau M. Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF- κ B signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol*. 1997. 54: 87-96.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010. 11: 373-384.
- Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*. 1999. 92: 164-169.
- Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993. 193: 398-405.
- Rabong C, Hametner C, Mereiter K, Kartsev VC, Jordis U. Scope and limitation of T-reaction employing some functionalized C-H-acids and naturally occurring secondary amines. *Heterocycles*. 2008. 75: 799-838.
- Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002. 71: 635-700.
- Shin HJ, Shon DH, Youn HS. Isobavachalcone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase induced by Toll-like receptor agonists. *Int Immunopharmacol*. 2013. 15: 38-41.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005. 17: 1-14.
- Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*. 2002. 53: 35-57.
- Vallance P. Nitric oxide: therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003. 17: 1-10.