

Carbon Monoxide Inhibits PMA-induced Differentiation in Human Monocytic THP-1 Cells

Da Sol Kim¹, Mi Sun Lee¹, Han Sol Kim², Hye Yun Lee², Oh Yun Kim², Ye Rin Kang², Dong Hyun Sohn¹, Koanhoi Kim³ and Young Chul Park^{1*}

¹Department of Microbiology & Immunology, Pusan National University College of Medicine, Yangsan, Gyeongnam 50612, Korea

²Department of Premedicine, Pusan National University College of Medicine, Yangsan, Gyeongnam 50612, Korea

³Department of Pharmacology, Pusan National University College of Medicine, Yangsan, Gyeongnam 50612, Korea

Received November 25, 2016 / Revised December 21, 2016 / Accepted January 4, 2017

Carbon monoxide (CO), a reaction product of cytoprotective enzyme heme oxygenase-1 (HO-1), is a gaseous messenger with anti-proliferative, anti-apoptotic, and anti-inflammatory actions in many cell types. Here, we investigated the role of CO on the process of monocyte differentiation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in human monocytic THP-1 cells. CORM-2 (tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer, Ru₂Cl₄ (CO)₆), a CO-releasing compound, decreased a marked cell adherence with a slight reduction of proliferation in monocytic THP-1 cells treated with PMA. And, CORM-2 significantly inhibited expression of differentiation markers such as CD14, CD11b plus CD18 (macrophage-1 antigen, Mac-1 or complement receptor 3, CR3) and phagocytosis of carboxylate-modified red fluorescent latex beads, in PMA-stimulated THP-1 cells. For the further experiments, differentiation of PMA-treated cells was enhanced after the initial 2 days stimulus by removing the PMA-containing media then incubating the cells in fresh media for a another 4 days. And, we observed the secretion of inflammatory cytokines and phagocytosis in differentiated macrophages. Treatment with CORM-2 significantly abolished the secretion of IL-6, TNF- α and phagocytosis using fluorescence-conjugated *E. coli* (K-12 strain) bioparticles in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated differentiated macrophages. In conclusion, these results suggest that CO inhibits the differentiation of monocytic THP-1 cells as well as the activation of differentiated macrophages.

Key words : CO, differentiation, phagocytosis, PMA, THP-1 cells

서 론

Carbon monoxide (CO)는 heme oxygenase-1 (HO-1)의 대사산물의 하나로 다양한 스트레스로부터 세포와 조직의 손상을 막는 역할을 하는데, 이는 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 HO-1의 기능의 일부로 볼 수 있다[14, 29]. 또한, CO는 세포성장, 아포토시스, 염증과 관련된 다양한 유전자의 발현과 그 효소의 활성을 조절함으로써 강한 억제 효과를 가지는 것으로 보고되었다[21, 22, 33]. 최근의 연구에서 CO는 면역계에서도 중요한 생리적 기능을 가지고 있다는 보고가 있는데, 배양중인 T세포에 CO를 유리시키는 물질인 CORM-2의 처리는 CD3+CD28의 자극에 대한 T세포의 증식과 IL-2 분비를 감소시켰다[23]. 그리고 CO는 혈관계에서 pla-

telet aggregation을 억제함으로써 thrombosis (혈전증)을 강력하게 억제한다고 보고되었다[41]. 게다가, HO-1의 대사산물이 염증 부위로의 neutrophil을 포함한 백혈구의 이동(leukocyte rolling)과 부착(adhesion)을 감소시키는 것으로 보고되었다[5].

단핵구(monocyte)와 대식세포(macrophage)는 면역계와 혈관계에서 중요한 역할을 수행하는데, 순환하는 단핵구는 염증 신호에 반응하여 표현되는 세포막의 CD11a plus CD18로 구성되는 복합체 LFA-1같은 adhesion molecule에 의해 내피세포의 ICAM-1을 이용하여 부착하게 된다[12]. 부착한 단핵구는 화학주성 분자들의 영향 하에서 subendothelial space 안으로 이동하게 되고, 이곳에서 단핵구는 대식세포로 분화가 진행된다고 알려져 있다. 그러나 단핵구의 대식세포로의 분화의 정확한 기전과 관련된 인자들의 상호 관련성에 대해 아직도 완전히 밝혀져 있지 않다.

인간 단핵구세포주 THP-1은 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1,25-dihydroxyvitamin D₃, retinoic acid 같은 물질의 자극으로 화학적으로 대식세포로 분화를 유도할 수 있어 단핵구의 분화 및 대식세포의 활성화에 대한 연구에 유용하게 이용되고 있다[2, 15, 37]. 분화된 THP-1 대식세포는 숙주 방어

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8093, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : ycpark@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

와 면역질환에서 인간 대식세포의 정확한 역할을 규명하기 위하여 실험적 도구로 널리 사용되고 있다[12, 28, 38]. 최근의 몇몇 연구결과에 의하면, PMA는 THP-1과 RAW264.7 같은 단핵구/대식세포 계열의 세포주와 조직에 존재하는 대식세포에서 HO-1의 유전자 발현을 유도하였다[17, 18]. 그러나, HO-1의 대사산물인 CO가 PMA 같은 자극원에 의해 유도되는 단핵구의 대식세포로의 분화과정에서 역할은 보고된 바 없다.

본 연구에서는 단핵구의 대식세포로의 분화과정에서 CO의 영향을 인간 단핵구세포주 THP-1을 이용하여 조사하였다. 또한 분화된 THP-1 대식세포의 활성화 과정에서 CO의 효과에 대해서도 조사하였다.

재료 및 방법

시약

Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer (CORM-2, $\text{Ru}_2\text{Cl}_4(\text{CO})_6$), RuCl_3 , protease inhibitor cocktail, carboxylate-modified red fluorescent latex beads, trypan blue는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. HO-1, CD14, CD18, ICAM-1, β -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 그리고 CD11b에 대한 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA) 제품을 사용하였다. IL-6와 TNF- α 의 분비량을 측정하기 위한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. Fluorescence-conjugated *Escherichia coli* (K-12 strain) BioParticles은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA) 제품을 사용하였고, enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA) 제품을 사용하였다.

세포배양 및 분화의 유도

인간 단핵구세포주 THP-1는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. 세포는 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 10 mM HEPES, 10% heat-inactivated FBS를 포함하는 RPMI-1640 배양액에서 5% CO_2 조건에서 37°C incubator에서 $0.5\sim 5\times 10^5$ cells/ml 밀도로 유지하며 배양하였고, 모든 실험에서 plating 하고 3시간 동안 안정화시킨 후 사용하였다. 세포에 1, 10, 100 μM 의 농도로 CORM-2를 30분 동안 먼저 처리한 후 분화유도제 PMA (100 nM)로 분화를 유도하였다. 실험목적에 맞게 24 혹은 48시간 동안 배양한 후 세포를 얻어 세포성장, 부착능 및 Western blotting 등을 수행하였다. 또한, 충분히 분화된 대식세포를 얻기 위하여 PMA로 2일 동안 세포를 자극한 후 새로운 배양액으로 교환하고 4일간 더 배양시켜서 얻었다.

세포 생존율 및 부착능 측정

THP-1 세포를 24-well plate에 5×10^4 cells/well의 밀도로 분주하여 다양한 농도의 CORM-2와 PMA를 처리하였다. 48 시간 배양 후 부유 세포 및 0.01% trypsin-EDTA을 이용하여 dish에 부착한 세포를 각각 수확하여 trypan blue dye exclusion 방법으로 염색하여 EVE™ automatic cell counter (NanoEntek, Seoul, Korea)를 이용하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 측정하여 생존과 세포성장을 분석하였다. 세포의 부착능은 살아있는 세포의 전체 $[N(t)]$ 와 부착한 세포의 평균 $[N(a)]$ 을 이용하여 $[N(a)/N(t)]\times 100$ 으로 계산하여 세포수를 표현하였다.

Western blotting

THP-1 세포를 60-mm dish에 2×10^5 cells/ml의 농도로 분주하여 사용하였고, CORM-2 (1, 10, 100 μM)를 30분 동안 처리한 후 100 nM PMA로 세포를 자극하여 24시간 배양하였다. 배양액에 존재하는 부유 세포와 부착한 모든 세포를 수확하여 PBS로 세척한 후, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40에 protease inhibitor cocktail를 첨가한 lysis buffer를 이용하여 전체 단백질을 분리하였다. Bicinchoninic acid를 이용하여 정량한 후, 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 electroblotting apparatus (Bio-rad, Richmond, CA)를 이용하여 PVDF membrane에 이동시켰다. Membrane은 항체의 비특이적 부착을 막기 위하여 5% skim milk에 1시간 동안 두었고, 그 후 적당한 일차 항체 및 horse radish peroxidase (HRP)가 부착되어 있는 이차 항체를 반응시켰다. 부착된 면역복합체는 ECL kit를 이용하여 반응시킨 후 LAS-3000 Luminescent Image Analyzer (Fuji-film, Tokyo, Japan) 기기에서 단백질 발현을 분석하였다.

Phagocytosis (포식)의 분석

분화 유도한 THP-1의 포식작용은 평균 직경이 0.5 μm 인 carboxylate-modified red fluorescent latex beads (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 *E. coli* (K-12 strain) BioParticles (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)의 두가지를 이용하여 제조사가 공급한 protocols에 따라 실시하였다. 배양중인 각 well에 latex beads를 5 μl 첨가하고 4시간 동안 5% CO_2 incubator에서 배양시킨 후 PBS로 3번 조심스럽게 세포를 씻어준 다음 형광 현미경으로 관찰하였다. 그리고 6일간 분화된 대식세포에서의 포식기능을 측정하기 위하여, 세포에 *E. coli* BioParticles과 opsonizing reagent를 1:1로 섞어서 각 well에 첨가하고 2시간 동안 5% CO_2 incubator에서 배양시킨 후 사용하였다. 위와 같은 방법으로 잘 씻어준 다음 LSM 510 laser-scanning confocal microscope (Zeiss, Göttingen, Germany)를 사용하여 관찰하였다.

Cytokine (사이토카인)의 정량

분비된 사이토카인의 측정은 상품화된 capture-ELISA kit 를 사용하였고, 제조사 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)이 공급한 protocol에 따라 실시하였다. 이미 IL-6와 TNF- α 에 대한 특이 항체가 붙어 있는 ELISA plate의 각 well에 세포로부터 얻은 상층액을 첨가하고 2시간 상온에서 반응시킨다. 각 well을 washing 용액으로 씻어준 다음 IL-6와 TNF- α 에 대한 HRP가 부착된 2차 항체를 첨가하여 1시간 반응시킨다. 씻어준 후, hydrogen peroxide와 tetramethylbenzidine의 1:1로 비율로 만든 substrate 용액을 각 well에 첨가하고 20분 동안 상온에서 반응시킨다. Stop 용액으로 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

통계

실험은 적어도 세 번 반복하였으며, 결과는 means \pm standard deviations (SD)로 표현하였다. 모든 실험결과는 one way ANOVA test를 이용하여 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

결 과

PMA로 분화 유도한 단핵구세포 THP-1의 부착능에서 CO의 효과

단핵구의 대식세포로의 분화 과정의 지표로 가장 먼저 나타나는 현상은 세포의 부착능의 증가와 더불어 세포 모양의 형태학적 변화이다. 우선적으로 PMA로 THP-1 세포의 분화 유도과정에서 세포의 부착능 및 형태학적 변화에 CO가 미치는 영향을 조사하였다. 배양중인 THP-1 세포에 다양한 농도(1, 10, 100 μ M)의 CO를 유리시키는 물질인 CORM-2를 30분 동안 전처리 후 100 nM PMA로 48시간 동안 분화를 유도하였다. CORM-2는 고농도에서도 세포의 viability에는 영향을 주지

않았고 증식에는 약한 감소를 나타내었으나(Fig. 1A), 부착능에는 농도의존적으로 큰 감소를 나타내었다(Fig. 1B). 부착된 세포는 납작하며 amoeboid 형태같은 대식세포와 유사한 모습을 관찰할 수 있었다.

자극한 THP-1 세포의 막표면 분화인자의 발현에서 CO의 효과

다음으로, 대식세포로 분화하는 과정에서 수반되는 막표면 단백질의 변화에서 CO의 역할을 조사하였다. 다양한 농도(1, 10, 100 μ M)의 CORM-2를 30분 동안 전처리 후 100 nM PMA로 THP-1 세포의 분화를 자극하였다. 분화 과정 초기의 막표면 분화인자의 변화를 보기 위하여, PMA로 자극하고 24시간 후에 부유 세포와 부착한 모든 세포를 수확하여 단백질을 얻고 Western blotting을 이용하여 관찰하였다. PMA로 자극한 THP-1 세포에서 CD14, CD11b, CD18 및 ICAM-1의 발현이 크게 증가하였다. 하지만 CORM-2를 전처리한 세포에서는 CD14, CD11b 및 CD18의 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 대식세포의 활성화에 기여하는 CD14와 포식 기능을 담당하는 macrophage-1 antigen (Mac-1) 혹은 complement receptor 3 (CR3)의 구성성분인 CD11b와 CD18의 발현의 감소는 CO가 PMA에 의한 THP-1 세포의 대식세포로의 분화를 억제한다는 것을 의미한다.

자극한 THP-1 세포의 latex beads의 uptake 과정에서 CO의 효과

포식 기능은 대식세포의 가장 주요한 특징이기 때문에, PMA 자극에 의해 단핵구의 대식세포로의 분화 동안 CO에 의한 phagocytic activity의 변화를 조사하였다. CORM-2를 30분 동안 전처리 후 100 nM PMA로 THP-1 세포의 분화를 자극하였다. 48시간 후, 배양중인 세포에 carboxylate-modified red fluorescent latex beads를 첨가하여 4시간 동안 반응시키고

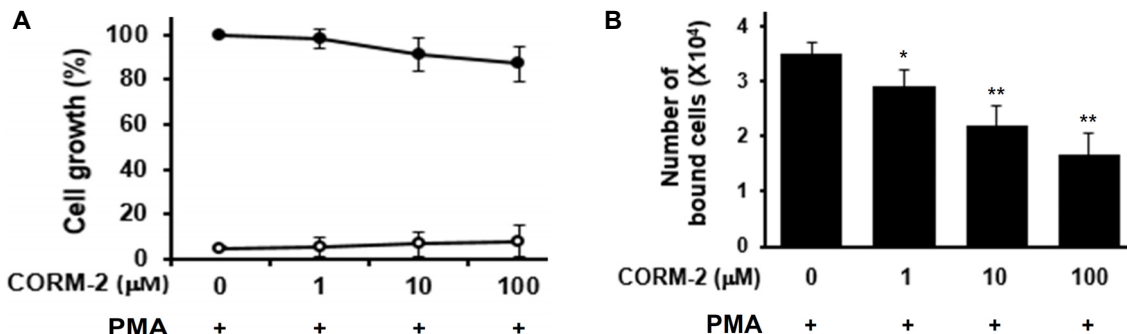


Fig. 1. Effects of CORM-2 on cell proliferation and adherence. Monocytic THP-1 cells were plated at 5×10^4 cells per 24-well plate, and the cells were pretreated with different concentrations of CORM-2 (1, 10 or 100 μ M) for 30 min and then incubated with 100 nM PMA for 48 hr. (A) Cells were analyzed for viability using the trypan blue dye exclusion assay (live cells, \bullet ; dead cells, \circ). (B) Cell adherence was analyzed as described in "Materials and Methods", and data shown represent relative cell adherence. The results are presented as the means of \pm SDs of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. the untreated control cells.

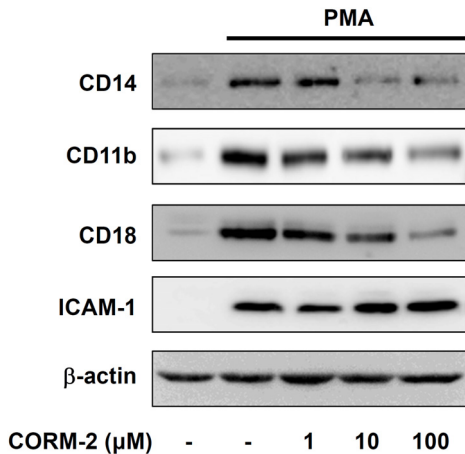


Fig. 2. Effect of CORM-2 on the expression of macrophage differentiation markers. THP-1 cells were treated with 100 nM PMA for 24 hr in the absence or presence of CORM-2, as indicated. Whole cell lysates were analyzed by Western blotting using specific antibodies against CD14, CD11b, CD18, and ICAM-1. β -actin was used as an internal control to monitor equal protein loading.

형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 3). PMA 자극에 의해 THP-1 세포는 형태학적으로는 대식세포와 유사한 모습을 보이지만, CORM-2가 처리된 세포는 농도의존적으로 fluorescence intensity가 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다. 또한, 부착한 세포와 부착하지 않은 세포 모두를 수거하여 fluorescence intensity를 flow cytometry로 측정된 결과, control 세포는 2.7%, PMA 단독 처리한 세포는 48.0%에 비해 CORM-2를 1, 10, 100 μ M 처리한 세포에서는 각각 43.2%, 39%, 21.2%로 감소함을 관찰할 수 있었다.

THP-1 세포로부터 분화 유도된 대식세포의 LPS 자극에 의한 inflammatory cytokines 분비에서 CO의 효과

PMA 처리 후 6일 동안 분화가 유도된 대식세포에 LPS 자극에 의해 inflammatory cytokines인 IL-6와 TNF- α 의 분비에

미치는 CO의 영향을 조사하였다. 대식세포에 CORM-2와 CORM-2의 positive control로 사용되는 RuCl₃를 30분 동안 전처리 후 100 ng/ml LPS로 자극하여 24시간 동안 incubator에서 배양하였다. 상층액을 수거하여 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 ELISA 방법을 사용하여 분석하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, CORM-2는 LPS 자극에 의한 대식세포의 inflammatory cytokines의 분비를 현저히 억제함을 알 수 있었다.

THP-1 세포로부터 분화 유도된 대식세포의 LPS 자극에 의한 phagocytosis 과정에서 CO의 효과

다음으로, 충분히 분화가 유도된 대식세포의 phagocytic activity에 있어서 CO의 역할을 조사하였다. 제조사가 공급한 protocol에 따라 분화된 대식세포에 *E. coli* (K-12 strain) Bio Particles와 opsonizing reagent를 포함한 용액을 첨가하여 4시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 대식세포에 CORM-2를 전처리 하고 100 ng/ml LPS로 자극하여 laser-scanning confocal microscope를 사용하여 세포를 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, CORM-2를 처리한 세포에서는 농도의존적으로 *E. coli*의 fluorescence intensity의 현저한 감소를 관찰할 수 있었다. 이는 CORM-2가 대식세포의 주요 기능의 하나인 미생물을 포함한 외부 물질에 대한 phagocytic activity를 현저히 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

고 찰

항산화 효소로 알려진 HO는 다양한 산화적 스트레스(oxidative stress) 환경에 의해 유도되고[6, 11, 35], 인체의 생리적인 기능뿐만 아니라 병리적인 면에서도 중요한 조절자로 역할을 한다[13, 26]. HO-1의 발현은 일차적으로 전사단계에서 조절되며 전사인자 Nrf2에 의해 이루어지고, JNK, ERK 및 p38이 포함되어 있는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)에 의해서도 HO-1의 유전자 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다[31, 42]. HO-1은 heme을 분해하여 biliverdin,

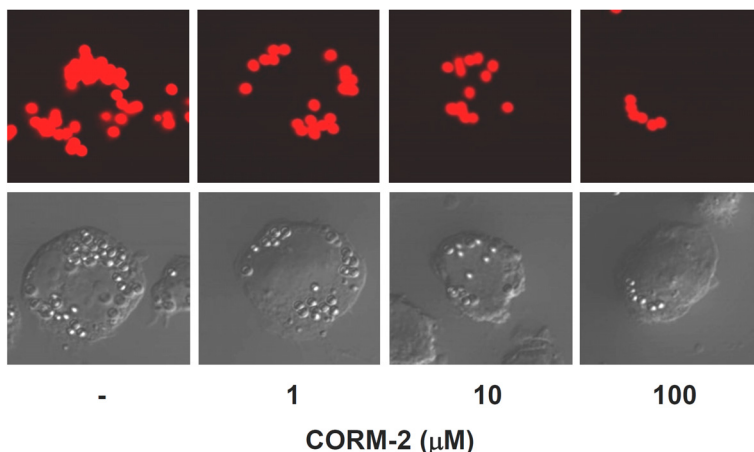


Fig. 3. Effect of CORM-2 on the phagocytosis of latex beads. THP-1 cells treated with CORM-2 and/or PMA were challenged with carboxylate-modified polystyrene latex beads. Cells were washed three times with PBS, and the efficiency of bead uptake was analyzed by fluorescence microscope.

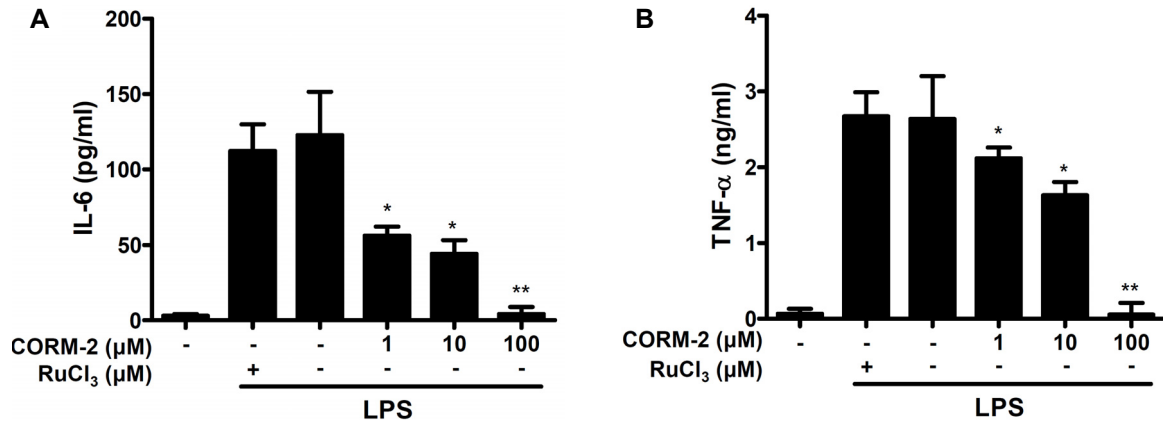


Fig. 4. Effect of CORM-2 on the secretion of inflammatory cytokines by macrophages. Differentiated THP-1 cells were treated with LPS (100 ng/ml) in the absence or presence of CORM-2 or RuCl₃, as indicated. The amount of IL-6 (A) and TNF-α (B) secreted by macrophages was measured with an ELISA after 24 hr of incubation. The results are presented as the means of ± SDs of three experiments. **p*<0.05 and ***p*<0.01 vs. the untreated macrophages.

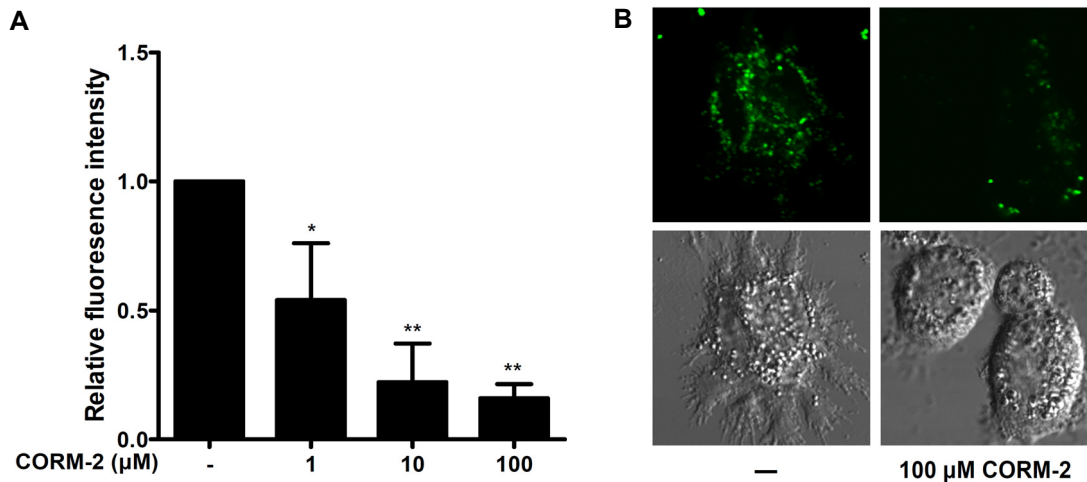


Fig. 5. Effect of CORM-2 on the phagocytosis of *E. coli* by macrophages. latex beads. Differentiated THP-1 cells treated with CORM-2 were challenged with *E. coli* (K-12 strain) BioParticles. Cells were washed three times with PBS, and the efficiency of *E. coli* BioParticles uptake was analyzed by confocal microscope. (A) Relative fluorescence intensity was determined from the numbers of green cells per 25 cells in a randomly selected area. (B) Fluorescence images. The results are presented as the means of ± SDs of two experiments. **p*<0.05 and ***p*<0.01 vs. the untreated macrophages.

ferrous iron 및 CO의 대사산물을 생산한다. Biliverdin은 biliverdin reductase에 의해 강력한 항산화 인자로 알려져 있는 bilirubin으로 뒤이어 전환되고, 이는 HO-1의 세포내 redox (reduction-oxidation) 균형을 유지하는 항산화 인자로서의 역할에 크게 기여한다[36]. 다른 대사산물인 CO는 세포내 그리고 세포간의 신호전달물질로서 세포와 조직의 성장, 항상성 유지 및 방어에 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀지고 있다[7, 9, 16].

CO는 세포내 cyclic GMP (cGMP)의 생성을 강력하게 증가시키는 nitric oxide (NO)와는 달리 soluble guanylate cyclase (sGC)를 약하게 활성화시킨다[27]. 생쥐를 이용한 연구에서 CO는 p38 MAPK를 활성화시켜 IL-10 합성을 유도하고, 반대

로 IL-1β, TNF-α, MIP-1β 같은 inflammatory cytokines의 생산을 억제한다[21]. 또한 CO는 mitochondria로부터 reactive oxygen species (ROS)의 방출을 자극하여 NF-κB를 활성화시키며[8], 상반된 결과로 CO는 NADPH oxidase를 불활성화하여 ROS의 생산을 억제시킨다는 보고도 있다[19, 34]. 그러므로 CO의 생성뿐만 아니라 그 활성은 작용하는 세포내 타깃이 다른 신호전달물질과 교차하는 점과 연구의 대상과 실험의 조건에 따라 크게 달라질 수 있는 점 등이 CO의 이용 및 치료적 접근에 어려움을 주고 있다.

단핵구의 분화과정과 활성화는 인체의 항상성과 방어 측면에서 실로 중요한 역할을 담당하고 있으나, 그 상세한 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않은 실정이다. 단핵구 THP-1과 인

간 peripheral blood mononuclear cell (PBMC)를 PMA로 분화를 유도하면 그 과정에 HO-1의 발현이 증가됨이 밝혀졌다 [17, 18]. 그러나, 생성된 HO-1이 단핵구의 분화과정에 필수적인지 혹은 활성화에 관여하는지는 밝혀진 바가 없다. 선행 연구결과에서, HO-1의 강한 유도 물질로 알려진 cobalt protoporphyrin (CoPP)은 THP-1 세포의 분화를 유도하였다[32]. 그 기전은 CoPP가 세포내 항산화 인자인 redox factor-1의 세포질내 양을 감소시키고, 이는 NADPH oxidase 활성의 증가에 따른 세포내 redox status의 변화에 기인하는 것으로 보인다. 반면에, HO의 활성을 억제하는 물질로 사용되는 iron chelator desferrioxamine (DFO)이 THP-1 세포를 대식세포로 분화를 유도한다는 보고도 있다[30]. 그러므로, 단핵구의 대식세포로의 분화와 활성화에서 HO-1과 그 대사산물의 역할을 규명하는 것은 염증을 포함한 선천면역의 분자기전을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 본다.

단핵구의 대식세포로의 분화과정에는 많은 막표면 단백질의 변화가 수반되는데 그 중 CD14은 대식세포에 주로 발현되며 단핵구의 대식세포로의 분화의 지표로 사용된다. 이는 LPS와 lipoteichoic acid 등의 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)를 인식하여 TLR-4, MD-2에 신호를 전달하여 대식세포 활성화의 개시 신호를 전달한다[10, 24]. 대식세포의 주요 기능인 포식 기능에 관여하는 인자로 complement receptor (보체 수용체)라고 불리는 막단백질 CR1, CR3, CR4 등이 있고, 이들은 미생물, 죽은 세포 및 암세포를 제거하는 역할을 한다[1, 25]. CR3는 CD11b와 CD18로 CR4는 CD11c와 CD18의 복합체로 구성되며 포식 기능의 측면에서는 유사하며[3, 4, 20], CR3는 Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)의 기능을 가지고 있는 점이 특징이다[39, 40].

CO-releasing compound인 CORM-2는 PMA로 분화를 자극한 THP-1 세포의 성장과 세포 부착능의 약한 감소를 보였고, 막표면 분화 인자인 CD14, CD11b 및 CD18의 발현을 현저히 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 fluorescence-conjugated latex beads를 이용한 포식작용의 실험에서, CORM-2는 PMA 단독으로 처리한 세포에 비해 포식작용이 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다. 대식세포의 활성화에 CO의 영향을 더 알아보기 위하여, 배양중인 THP-1 세포를 PMA로 2일 동안 자극한 후 이어 4일간 배양을 하면서 완전히 분화된 대식세포를 만들었다. 분화된 대식세포에서 CORM-2는 LPS로 자극한 세포로부터 분비되는 inflammatory cytokines인 IL-6와 TNF- α 의 분비를 감소시켰다. 게다가, 대식세포에 fluorescence-conjugated *E. coli* K-12 bioparticles를 이용하여 포식작용을 측정된 결과 CORM-2를 처리한 세포에서는 *E. coli*의 포식작용이 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이들 결과를 종합해보면, CORM-2가 분화에 필수적인 막단백질의 발현을 저해함으로써 단핵구의 분화과정을 억제하고, 분화된 대식세포의 inflammatory cytokines의 분비와 포식 기능을 저해함으로써 활

성화 과정도 억제한다는 것을 시사한다.

감사의 글

이 과정은 2012학년도 부산대학교 교수국외장기파견지원비에 의하여 연구되었음.

References

1. Carroll, M. C. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 545-568.
2. Chen, Q. and Catharine, R. A. 2004. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. *Exp. Cell Res.* **297**, 68-81.
3. Dupuy, A. G. and Caron, E. 2008. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *J. Cell Sci.* **121**, 1773-1783.
4. Erdei, A., Kohler, V., Schafer, H. and Burger, R. 1992. Macrophage-bound C3 fragments as adhesion molecules modulate presentation of exogenous antigens. *Immunobiology* **185**, 314-326.
5. Freitas, A., Alves-Filho, J. C., Secco, D. D., Neto, A. F., Ferreira, S. H., Barja-Fidalgo, C. and Cunha, F. Q. 2006. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **149**, 345-354.
6. Keyse, S. M. and Tyrrell, R. M. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblast by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 99-103.
7. Kim, H. P., Ryter, S. W. and Choi, A. M. 2006. CO as a cellular signaling molecule. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**, 411-449.
8. Kim, H. S., Loughran, P. A., Rao, J., Billiar, T. R. and Zuckerman, B. S. 2008. Carbon monoxide activates NF-kappaB via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G146-152.
9. Kirkby, K. A. and Adin, C. A. 2006. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, F563-571.
10. Kitchens, R. L. 2000. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Immunol.* **74**, 61-82.
11. Lee, P. J., Jiang, B. H., Chin, B. Y., Iyer, N. V., Alam, J., Semenza, G. L. and Choi, A. M. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 5375-5381.
12. Linton, M. F. and Fazio, S. 2001. Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 489-495.
13. Maines, M. D. 1988. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.*

- 2, 2557-2568.
14. Mazzola, S., Forni, M., Albertini, M., Bacci, M. L., Zannoni, A., Gentilini, F., Lavitrano, M., Bach, F. H., Otterbein, L. E. and Clement, M. G. 2005. Carbon monoxide pretreatment prevents respiratory derangement and ameliorates hyperacute endotoxic shock in pigs. *FASEB J.* **19**, 2045-2047.
 15. McCarthy, D. M., San Miguel, J., Freake, H. C., Green, P. M., Zola, H., Catowsky, D. and Goldman, J. 1983. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits proliferation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL-60 and normal human bone marrow cells. *Leuk. Res.* **7**, 51-55.
 16. Motterlini, R., Mann, B. E. and Foresti, R. 2005. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin. Investig. Drugs* **14**, 1305-1318.
 17. Muraosa, Y. and Shibahara, S. 1993. Identification of a *cis*-regulatory element and putative *trans*-acting factors responsible for 12-O tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-mediated induction of heme oxygenase expression in myelomonocytic cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7881-7891.
 18. Naidu, S., Wijayanti, N., Santoso, S., Kietzmann, T. and Immenschuh, S. 2008. An atypical NF- κ B-regulated pathway mediates phorbol ester-dependent heme oxygenase-1 gene activation in monocytes. *J. Immunol.* **181**, 4113-4123.
 19. Nakahira, K., Kim, H. P., Geng, X. H., Nakao, A., Wang, X., Murase, N., Drain, P. F., Wang, X., Sasidhar, M., Nabel, E. G., Takahashi, T., Lukacs, N. W., Morita, K. and Choi, A. M. 2006. Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J. Exp. Med.* **203**, 2377-2389.
 20. Oliva, C. R., Swiecki, M. K., Griguer, C. E., Lisanby, M. W., Bullard, D. C., Turnbough Jr, C. L. and Kearney, J. F. 2008. The integrin Mac-1 (CR3) mediates internalization and directs *Bacillus anthracis* spores into professional phagocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 1261-1266.
 21. Otterbein, L. E., Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Lu, T. H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A. and Choi, A. M. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* **6**, 422-428.
 22. Pae, H. O., Choi, B. M., Oh, G. S., Lee, M. S., Ryu, D. G., Rhew, H. Y., Kim, Y. M. and Chung, H. T. 2004. Roles of heme oxygenase-1 in the antiproliferative and antiapoptotic effects of nitric oxide on Jurkat T cells. *Mol. Pharmacol.* **66**, 122-128.
 23. Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., Kim, Y. M., Chung, K. R. and Chung, H. T. 2004. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J. Immunol.* **172**, 4744-4751.
 24. Ranoa, D. R., Kelley, S. L. and Tapping, R. I. 2013. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J. Biol. Chem.* **288**, 9729-9741.
 25. Rosen, H. and Law, S. K. 1990. The leukocyte cell surface receptor(s) for the iC3b product of complement. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **153**, 99-122.
 26. Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* **86**, 583-650.
 27. Ryter, S. W. and Otterbein, L. E. 2004. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* **26**, 270-280.
 28. Sakamoto, H., Aikawa, M., Hill, C. C., Weiss, D., Taylor, W. R., Libby, P. and Lee, R. T. 2001. Biochemical strain induces class a scavenger receptor expression in human monocyte/macrophages and THP-1 cells: a potential mechanism of increased atherosclerosis in hypertension. *Circulation* **104**, 109-114.
 29. Sarady, J. K., Zuckerbraun, B. S., Bilban, M., Wagner, O., Usheva, A., Liu, F., Ifedigbo, E., Zamora, R., Choi, A. M. and Otterbein, L. E. 2004. Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *FASEB J.* **18**, 854-856.
 30. Seo, G. S., Lee, S. H., Choi, S. C., Choi, E. Y., Oh, H. M., Choi, E. J., Park, D. S., Kim, S. W., Kim, T. H., Nah, Y. H., Kim, S., Kim, S. H., Yoo, S. H. and Jun, C. D. 2006. Iron chelator induces THP-1 cell differentiation potentially by modulating intracellular glutathione levels. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1502-1512.
 31. Shan, Y., Lambrecht, R. W., Donohue, S. E. and Bonkovsky, H. L. 2006. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* **20**, 2651-2653.
 32. Song, J. D., Lee, S. K., Park, S. E., Kim, K. M., Kim, K., Park, Y. M. and Park, Y. C. 2011. Cobalt protoporphyrin induces differentiation of monocytic THP-1 cells through regulation of cytoplasmic Ref-1-related NADPH oxidase activity. *Int. J. Mol. Med.* **28**, 841-845.
 33. Song, R., Mahidhara, R. S., Zhou, Z., Hoffman, R. A., Seol, D. W., Flavell, R. A., Billiar, T. R., Otterbein, L. E. and Choi, A. M. 2004. Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J. Immunol.* **172**, 1220-1226.
 34. Srisook, K., Han, S. S., Choi, H. S., Li, M. H., Ueda, H., Kim, C. and Cha, Y. N. 2006. CO from enhanced HO activity or from CORM-2 inhibits both O₂- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 307-318.
 35. Taketani, S., Kohno, H., Yoshinaga, T. and Tokunaga, R. 1989. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett.* **245**, 173-176.
 36. Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid, R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 748-755.
 37. Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. and Tada, K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* **42**, 1530-1536.
 38. Ueki, K., Tabeta, K., Yoshie, H. and Yamazaki, K. 2002. Self-heat shock protein 60 induces tumor necrosis factor- α in monocyte-derived macrophages: possible role in

- chronic inflammatory peritoneal disease. *Clin. Exp. Immunol.* **127**, 72-77.
39. van Spruiel, A. B., van Ojik, H. H., Bakker, A., Jansen, M. J. and van de Winkel, J. G. 2003. Mac-1 (CD11b/CD18) is crucial for effective Fc receptor-mediated immunity to melanoma. *Blood* **101**, 253-258.
40. Vignali, D. A., Bickle, Q. D., Crocker, P. and Taylor, M. G. 1990. Antibody-dependent killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula in vitro by starch-elicited murine macrophages. Critical role of the cell surface integrin Mac-1 in killing mediated by the anti-Mr 16,000 mAb B3A. *J. Immunol.* **144**, 4030-4037.
41. Wagner, C. T., Durante, W., Christodoulides, N., Hellums, J. D. and Schafer, A. I. 1997. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 589-596.
42. Yu, R., Chen, C., Mo, Y. Y., Hebbar, V., Owuor, E. D., Tan, T. H. and Kong, A. N. 2000. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **275**, 39907-39913.

초록 : 단핵구세포주 THP-1의 대식세포로의 분화 및 활성화에서 CO의 억제 효과

김다솔¹ · 이미선¹ · 김한솔² · 이혜윤² · 김요윤² · 강예린² · 손동현¹ · 김관희³ · 박영철^{1*}

(¹부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실, ²부산대학교 의과대학 의예과, ³부산대학교 의과대학 약리학교실)

Carbon monoxide (CO)는 세포 보호의 기능을 가지는 항산화 효소인 heme oxygenase-1 (HO-1)의 대사산물로 세포성장, 아폽토시스, 염증에 대한 억제 효과를 보이는 것으로 보고가 이어지고 있고, 이에 관련된 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 본 연구에서는 CO가 단핵구의 대식세포로의 분화 및 그 활성화 과정에 미치는 영향을 인간 단핵구세포주 THP-1을 이용하여 조사하였다. CO-releasing compound인 CORM-2는 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)로 자극한 THP-1 세포에서 viability와 증식에는 큰 영향을 주지 않았으나 부착능의 뚜렷한 감소를 보였다. 그리고, CORM-2는 대식세포의 막표면 분화 인자인 CD14, CD11b 및 CD18의 발현과 latex beads를 이용한 포식 기능을 현저히 억제하였다. 다음으로, 배양중인 THP-1 세포를 PMA로 6일 동안 대식세포로 분화시킨 후 inflammatory cytokines의 분비와 포식 기능을 조사하였다. CORM-2의 처리는 lipopolysaccharide (LPS)로 자극한 대식세포로부터 분비되는 IL-6와 TNF-α의 분비를 감소시켰다. 또한, 분화된 대식세포에 *E. coli* (K-12 strain) bioparticles를 이용하여 포식 기능을 측정할 결과 CORM-2를 처리한 세포에서는 현저히 감소되는 경향을 보였다. 이를 종합해 볼 때, CO는 항원 인식과 포식 기능에 관여하는 막단백질의 발현을 저해함으로써 단핵구의 분화과정을 억제하였고, 분화된 대식세포의 inflammatory cytokines의 분비 및 포식 기능을 저해함으로써 활성화 과정도 억제하는 것으로 보인다.