

Molecular Mechanisms Involved in Peptidoglycan-induced Expression of Tumor Necrosis Factor- α in Monocytic Cells

Ji-Young Jeong, Yonghae Son, Bo-Young Kim and Koanhoi Kim*

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

Received September 3, 2019 / Revised October 8, 2019 / Accepted November 8, 2019

Peptidoglycan (PG) is found in atheromatous lesions of arteries, where monocytes/macrophages express inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α). This study investigated the effects of PG on TNF- α expression and examined possible cellular factors involved in TNF- α upregulation. The overall aim was to identify the molecular mechanisms underlying inflammatory responses to bacterial pathogen-associated molecular patterns in the artery. Exposure of human THP-1 monocytic cells to PG enhanced the secretion of TNF- α and induced its gene transcription. Inhibition of TLR-2/4 with OxPAPC significantly inhibited TNF- α gene expression, whereas inhibition of LPS by polymyxin B did not. The PG-induced expression of TNF- α was also significantly suppressed by pharmacological inhibitors that modulate activities of cellular signaling molecules; for example, U0126 (an ERK inhibitor), SB202190 (a p38 MAPK inhibitor), and SP6001250 (a JNK inhibitor) significantly attenuated PG-induced transcription of TNF- α and secretion of its gene product. TNF- α expression was also inhibited by rapamycin (an mTOR inhibitor), LY294002 (a PI3K inhibitor), and Akt inhibitor IV (an Akt inhibitor). ROS-regulating compounds, like NAC and DPI, also significantly attenuated TNF- α expression induced by PG. These results suggest that PG induces TNF- α expression in monocytes/macrophages by multiple molecules, including TLR-2, PI3K, Akt, mTOR, MAPKs, and ROS.

Key words : Gene expression, monocytic cells, peptidoglycan, signaling molecules, tumor necrosis factor- α

서 론

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 전신 염증과 관련된 사이토카인이며 주로 homotrimer로 배열된 212개의 아미노산의 type II 세포막 관통 단백질로 합성된다. 그리고 세포막에 결합한(membrane-bound) 형태의 TNF- α 가 metalloprotease TNF- α converting enzyme (TACE)에 의해 가수분해되어 soluble homotrimeric TNF (sTNF)로 분비된다[7]. TNF- α 는 두 가지의 수용체, 즉 TNF receptor type 1 (TNF-R1)과 type 2 (TNF-R2)와 결합, 작용함으로써 급성단계의 반응을 자극한다. TNF-R1는 대부분의 조직에서 발현되고 수용성 삼량체(soluble trimeric) 그리고 membrane-bound 형태의 TNF- α 에 의해 활성화되는 반면, TNF-R2는 면역계 세포에서만 발견이 되고 TNF homotrimer의 membrane-bound TNF- α 에 반응한다[23].

TNF- α 와 그 수용체 TNF-R1과의 결합은 죽상경화 촉진효

과로 이어지는 신호전달체계를 활성화시킨다. TNF- α 는 사이토카인과 CXCL3를 포함한 케모카인의 생산을 유도하고 T 림프구의 활성화와 혈관평활근세포의 확장 및 이동 그리고 내피세포의 접착물질 발현을 증가시켜 단핵구/대식세포의 혈관벽 접착과 동맥의 intima로의 침윤을 초래한다[7, 21]. 사람의 죽상경화 플라크에서 TNF- α 의 존재는 본 질환의 발병에 TNF- α 가 관련되어 있음을 뒷받침한다. TNF- α 는 모든 단계의 죽상경화 병변에서 발견된다[2, 18]. 또한, 동물 연구결과에 의하면 TNF- α 가 혈관질환과 연관되어 있다. ApoE 생쥐에서 TNF- α 의 결핍은 apoE-null (apoE^{-/-}) 생쥐보다 덜 진행된 죽상경화증을 보여 준다[4, 17]. 따라서 TNF- α 발현에 대한 연구 결과는 죽상경화의 발병 기전을 이해하는데 중요하다.

펩티도글리칸(peptidoglycan)은 그람양성 세균의 세포벽을 구성하는 주요 물질이며 보통 사람의 소화관 및 다른 점막의 flora에 풍부하게 존재한다. 점막이 아닌 곳에서 선천면역계는 펩티도글리칸을 세균성 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)로 인지하고 Toll-like receptors (TLR)를 통하여 염증을 촉진한다[24, 26]. 또한 펩티도글리칸은 단핵구의 α M β 2-integrin의 발현을 유도하고 β 2-integrin-dependent 이동을 증가시킨다[16]. 펩티도글리칸은 내피세포에 의한 접착 물질의 발현과[6] 단핵구/대식세포에 의한 염증성 사이토카인과 케모카인을 높일 수 있다[12, 25]. 펩티도글리칸이 사람의 죽상경화증 병변, 특히 대식세포가 많은 부분에 존재하기 때문에

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8064, Fax : +82-51-510-8068

E-mail : koanhoi@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.

펩티도글리칸이 추가적인 염증성 요인으로 작용할 것이라 추정한다[11]. 그리고 펩티도글리칸이 염증반응을 유도하는 신호경로의 설명은 죽상경화에서 세균성 PAMPs의 역할을 규명하는데 중요하다. 그러나 펩티도글리칸이 TNF- α 발현을 유도하는 분자적 과정은 아직 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 펩티도글리칸이 단핵세포의 TNF- α 분비에 미치는 영향을 연구하였다. 실험적으로 펩티도글리칸이 단핵세포주인 THP-1 세포의 TNF- α 분비를 증가시키고 그리고 전사체를 양을 변화시키는지를 조사하였다. 그리고 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 TLR2, Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and reactive oxygen species (ROS)의 연관성을 규명하였다.

재료 및 방법

세포 및 시약

American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 인간 급성 monocytic leukemia THP-1 세포주를 구입하였고 ATCC에서 제안한 방법에 따라 유지하였다. *Staphylococcus aureus*에서 분리한 펩티도글리칸 그리고 polymyxin B와 oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonosyl-sn-phosphatidylcholine(OxPAPC)은 InvivoGen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Endotoxin-free bovine serum albumin (BSA), LY294002, diphenyleiodonium chloride (DPI), N-acetylcysteine (NAC), rapamycin, 그리고 SP600125는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. U0126, SB202190, 그리고 Akt inhibitor IV (Akti IV)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

세포의 처치

Inhibition 실험을 위해서, THP-1 세포에 상기 화학 물질을 1시간 동안 전 처리하였다. 화학 물질이 존재하는 상태에서 펩티도글리칸을(1 μ g/ml) 9시간 동안 처리하고 배지에 분비된 TNF- α 의 양을 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)로 측정하고 reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) 혹은 real-time PCR을 통하여 세포 내 TNF- α 유전자의 전사체를 조사하였다.

ELISA

ELISA kits (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분비된 TNF- α 의 양을 분석하였다. THP-1 세포를 0.1% BSA를 첨가한 RPMI medium 1640에 overnight incubation시키고, 펩티도글리칸을 처리하고 일정시간 후 세포배양 배지를 모았다. 세포배양 배지와 TNF- α 의 standard를 TNF- α 에 대한 단일클론 항체로 미리 코팅되어 있는 microtiter plate에 첨가하고, 2시간 배양 후에 plate를 세척하고 TNF- α 에 대한 특정

enzyme-conjugated polyclonal 항체와 함께 배양하였다. Plate를 여러 번 세척한 후 substrate를 첨가하고 색의 강도를 측정하였다. Standard curve를 만들고 이를 바탕으로 배지에 존재하는 TNF- α 의 양을 정하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

TRIzol™ Reagent를 사용하여 THP-1 세포로부터 Total RNAs를 얻고 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 이용하여 역 전사하였고, PCR은 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s 조건에서 25cycles를 수행하였다. TNF- α 의 primer는 5- CAGCCTCTT CTCCTTCCTGA-3 (forward)와 5-GGAAGACCCCTCCAGATAG-3 (reverse)이고, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 primer는 5-AAGCTCTGCGTACTGTCCT-3 (forward)와 5-GC TTGC TTCTTTTGGTT TGG-3 (reverse)이었다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동하여 분리하였고 ethidium bromide 염색을 이용하여 PCR 생산물을 확인하였다.

Quantitative Real-time PCR

Applied Biosystems Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) 장비를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 384-well plate의 각 well에 SYBR Green PCR Master Mix 와 TNF- α 및 GAPDH의 forward primer and reverse primer (각각 10 pM)를 넣고 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min 반응시킨 다음 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s 조건에서 40 cycles 을 수행하였다. TNF- α 의 primer는 5-ATGAGCACTGAAAGCATGATCC-3 (forward)와 5-GAG GGCTGATTAG AGAGAGGTC-3 (reverse)이고, GAPDH의 primer는 5-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3 (forward) 와 5-GGGGTCAT TGATGGCAACAATA-3 이었다.

통계처리

통계학적 GraphPad PRISM, version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하였고, $p < 0.05$ 는 통계학적으로 유의미한 것으로 처리하였다.

결 과

펩티도글리칸에 의해 TNF- α 발현의 증가

펩티도글리칸이 단핵세포의 TNF- α 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, TNF- α 유전자의 전사 정도를 조사하였다(Fig. 1A, Fig. 1B). THP-1 세포는 TNF- α 유전자의 전사체를 발현하였고 펩티도글리칸에 의하여 TNF- α 전사체가 증가하였다. TNF- α 전사의 유도는 펩티도글리칸 처리 후 3시간째부터 관찰되었고 9시간까지 유지되었다. TNF- α 전사체의 발현은 펩티도글

리칸 10 ng/ml이 있을 때부터 유도되었고, 100과 1,000 ng/ml 일 때 더 분명히 유도되었다. 또한 펩티도글리칸이 TNF- α 단백질의 분비에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다(Fig. 1C). THP-1 세포가 계속적으로 적은 양의 TNF- α 를 분비하였고 펩티도글리칸이 TNF- α 분비를 상당히 증가시켰다. 펩티도글리칸이 없는 상태에서 배양된 대조군 세포와 비교하여 볼 때, 분비된 TNF- α 의 양이 100 ng/ml일 때 2.8배, 1000 ng/ml일 때 15.6배 증가하였다. 또한 real-time PCR 결과에 의하면 펩티도글리칸의 농도에 비례하여 TNF- α 전사체의 양이 증가하였다(Fig. 1D).

펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 TLR2/4의 억제자 미치는 영향

TLRs이 TNF- α 발현을 매개하는지 조사하기 위해 TLR2/4 억제제인 OxPAPC를 사용하였다. OxPAPC 존재 하에서 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 의 분비는 대조군 세포만큼 거의 완벽히 차단되고 또한 유도된 TNF- α 전사체의 발현 역시 OxPAPC 존재 하에 억제되었다. 펩티도글리칸을 준비할 때 염증성 사이토카인과 케모카인의 분비를 증가시키는 LPS에 오염될 수 있다. 그러므로, LPS 억제제로 알려진 polymyxin B를 사용하여 LPS가 TNF- α 의 증가에 영향을 주는지 조사해보았다. Poly-

myxin B는 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 분비와 전사체 발현을 약화시키지 않았다(Fig. 2A, Fig. 2B).

펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 mTOR과 Akt의 역할

펩티도글리칸은 인산화를 통하여 Akt pathway를 활성화시킨다[13]. 그러므로 LY294002와 Akti IV, 두 가지 억제제를 사용하여 TNF- α 발현에 Akt가 관여하는지 조사하였다(Fig. 3A, B). LY294002는 phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks)의 reversible 억제제이고 Akti IV는 Akt protein kinase의 저해제이다. Akti IV와 LY294002 둘 다 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 유전자 발현을 약화시키고 TNF- α 분비를 저해하였다. 특히 Akti IV를 처리하였을 때 TNF- α 의 분비가 완전히 차단되었다.

Akt는 mTOR의 활성화를 통해 효과를 나타낸다[8]. 그러므로 mTOR의 저해제로 알려진 rapamycin을 이용하여 TNF- α 발현에 mTOR가 관여하는지 실험하였다(Fig. 4A, Fig. 4B). 펩티도글리칸으로 인한 TNF- α 분비 및 유전자 전사는 rapamycin이 존재할 때 현저히 감소하였다.

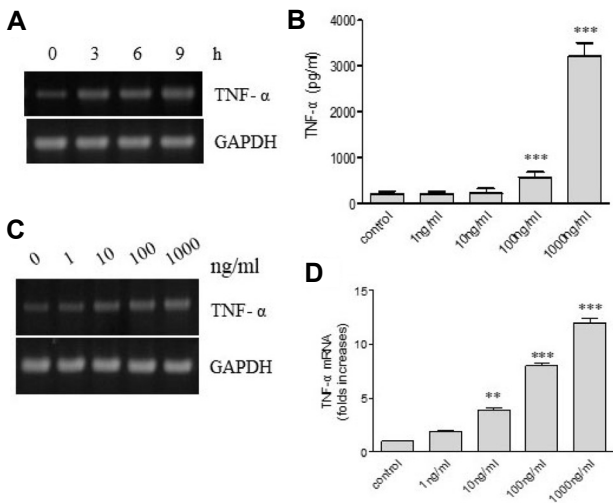


Fig. 1. Expression of TNF- α at the messenger and protein levels in response to peptidoglycan (PG). THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated for indicated time periods with 1 μ g/ml PG (A) or for 9 hr with indicated amount of PG (B), and TNF- α gene transcripts were amplified by RT-PCR. Following stimulation of THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) for 9 hr with or without (control) the indicated concentration of PG, the amount of TNF- α released into the medium and levels of TNF- α transcripts within cells were assessed by ELISA (C) and real-time PCR (D), respectively. Data are expressed as mean \pm SD (n=3 replicates/group). ** $p < 0.01$ vs. control; *** $p < 0.001$ vs. control.

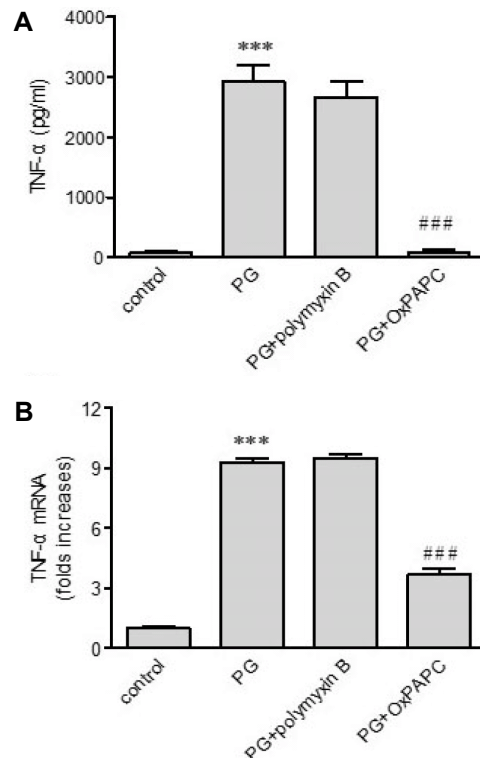


Fig. 2. Effects of OxPAPC and polymyxin B on peptidoglycan (PG)-mediated up-regulation of TNF- α . THP-1 cells were stimulated for 9 hr with or without PG (1 μ g/ml) in the presence or absence of OxPAPC (30 μ g/ml) and polymyxin B (10 mg/ml). The amount of TNF- α released into the medium and TNF- α gene transcripts were assessed by ELISA (A) and real-time PCR (B), respectively. Data are expressed as mean \pm SD (n=3 replicates/group). *** $p < 0.001$ vs. control; ### $p < 0.001$ vs. PG.

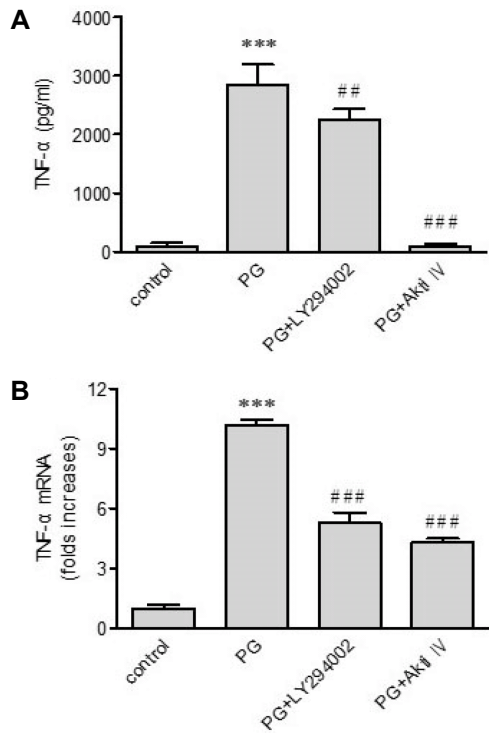


Fig. 3. Effects of LY294002 and Akti IV on peptidoglycan (PG)-mediated up-regulation of TNF- α . Following stimulation of THP-1 cells for 9 hr with PG (1 μ g/ml) in the absence or presence of LY294002 and Akti IV (10 μ M each), the amount of TNF- α released into the medium and TNF- α gene transcripts were assessed by ELISA (A) and real-time PCR (B), respectively. Data are expressed as mean \pm SD (n=3 replicates/group). *** P <0.001 vs. control; ## p <0.01 vs. PG; ### p <0.001 vs. PG.

펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 MAPKs의 역할

펩티도글리칸이 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK, 그리고 c-jun N-terminal kinase (JNK)를 인산화시키므로[13], MAPKs가 TNF- α 발현에 관여하는지 조사하기 위하여 다음과 같은 억제제들을 사용하였다: SB202190 (p38 MAPK 억제제), SP600125 (JNK 억제제), 그리고 U0126 (ERK 억제제) 세가지 억제제는 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 분비를 현저히 줄였고, 또한 TNF- α 유전자 전사 역시 약화시켰다(Fig. 5A, Fig. 5B).

펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 ROS의 역할

ROS가 TNF- α 발현에 역할을 하는지 조사하기 위해, NAC와 DPI를 이용하였다(Fig. 6A, Fig. 6B). DPI는 NADPH oxidase의 저해제로 펩티도글리칸에 의해 유도된 TNF- α 유전자 전사를 약화시킬 뿐만 아니라 펩티도글리칸으로 인한 TNF- α 의 분비를 상당히 저해시켰다. ROS의 direct scavenger NAC도 역시 단백질 단계에서 TNF- α 발현에 영향을 주고, 펩티도글리칸 인한 TNF- α 전사를 상당히 약화시켰다.

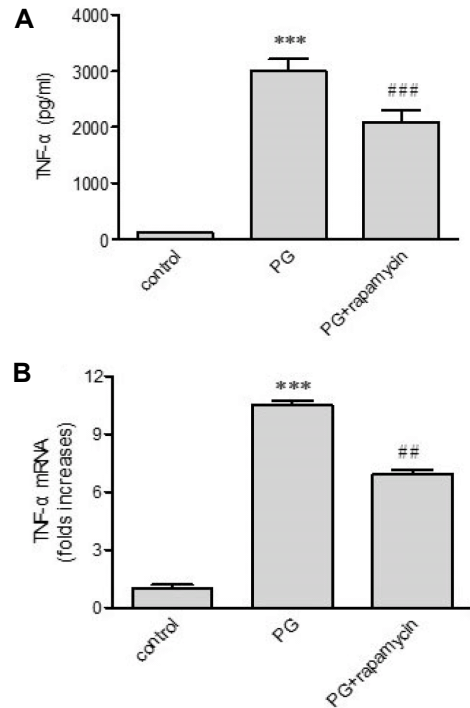


Fig. 4. Effects of rapamycin on peptidoglycan (PG)-mediated up-regulation of TNF- α . After stimulation of THP-1 cells for 9 hr with PG (1 μ g/ml) in the absence or presence of with rapamycin (100 nM), the amount of TNF- α released into the medium and TNF- α gene transcripts were assessed by ELISA (A) and real-time PCR (B), respectively. Data are expressed as mean \pm SD (n=3 replicates/group). *** p <0.001 vs. control; ## p <0.01 vs. PG; ### p <0.001 vs. PG.

고 찰

본 연구에서는 죽상경화 병변에 존재하는 성분인 펩티도글리칸이 사람의 THP-1 세포주에서 TNF- α 의 발현을 전사와 단백질 단계에서 증가시킨다는 것을 밝혔다. 이 연구 결과는 ribonuclease protection assay를 이용하여 인간 혈액 단핵구에서 펩티도글리칸과 LPS이 염증성 사이토카인을 유도한다고 보고한 연구와 일관되는 결과이다. LPS가 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 관여하는지 조사하기 위해 이번 연구에서는 LPS와 결합하여 LPS의 생물학적 효과를 저해한다고 알려진 polymyxin B를 이용하였다[5]. Polymyxin B는 전사와 단백질 수준 모두에서 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 영향을 끼치지 않는다는 것을 밝혔고 이는 이번 연구에서 관찰된 TNF- α 의 증가는 펩티도글리칸에 의해 유도되었다는 것을 나타낸다.

펩티도글리칸이 TNF- α 발현을 유도한다는 것은 사실이지만, TNF- α 발현과 관련된 세포 인자는 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구는 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 역할을 하는 세포 요소를 밝히는 실험을 수행하였다. 펩티도글리칸은 염증

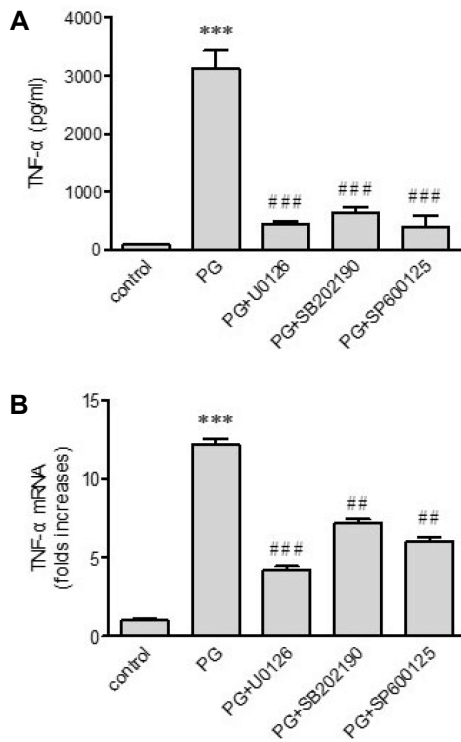


Fig. 5. Effects of inhibitors of MAPKs on peptidoglycan (PG)-mediated up-regulation of TNF- α . THP-1 cells were stimulated for 9 hr with or without PG (1 μ g/ml) in the absence or presence of the indicated MAPKs inhibitors (10 μ M each). The amount of TNF- α released into the medium and TNF- α gene transcripts were assessed by ELISA (A) and real-time PCR (B), respectively. Data are expressed as mean \pm SD (n=3 replicates/group). *** p <0.001 vs. control; ## p <0.01 vs. PG; ### p <0.001 vs. PG.

성 반응으로 이어지는 신호전달 경로의 활성화를 유도하는 TLR2에 의해 인지되는 세균성 PAMP이므로[1, 10, 24] TLR2/4의 저해제인 OxPAPC를 이용하여 TNF- α 발현에 영향을 주는 지 조사하였다. OxPAPC는 TNF- α 의 분비와 유전자의 전사를 완벽하게 저해하였다. Polymyxin B에 의해서는 아니지만 OxPAPC에 의한 TNF- α 발현의 완벽한 저해는 TLR2가 펩티도글리칸에 의해 유도된 TNF- α 발현에 책임이 있음을 의미한다.

펩티도글리칸은 Akt를 인산화시키는데[13], 이는 펩티도글리칸에 의하여 kinase가 활성화됨을 의미한다. 그러므로 Akt와 Akt의 activator인 PI3K가 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 연관이 있는지 조사하였다[14]. Akt inhibition은 TNF- α 분비를 완벽히 차단하였으며 유전자의 전사 역시 저해하였다. PI3K inhibition 또한 TNF- α 발현의 약화를 초래하였다. 이러한 결과들은 PI3K와 Akt 모두 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 필요하다는 것을 의미한다.

Akt는 세포질에서 주로 발견되는 mTOR를 포함하여 protein kinase targets를 통해 생물학적 효과를 가진다[8]. 본 연구에서 mTOR가 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 관련이 있

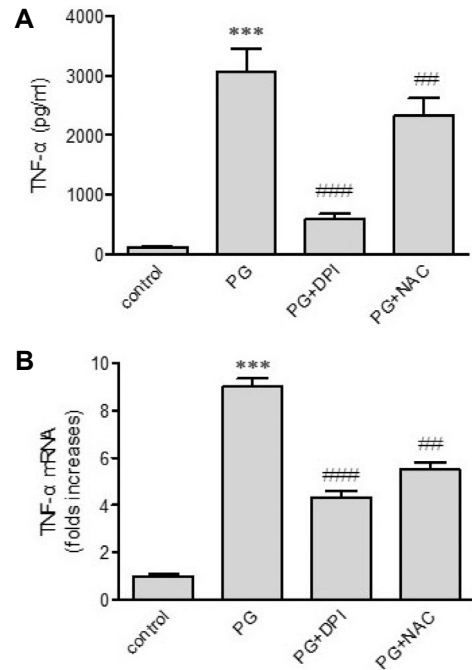


Fig. 6. Effects of ROS quenchers on peptidoglycan (PG)-mediated up-regulation of TNF- α . THP-1 cells were stimulated for 9 hr with or without PG (1 μ g/ml) in the absence or presence of DPI (10 μ M) and NAC (5 mM), after which The amount of TNF- α released into the medium and TNF- α gene transcripts were assessed by ELISA (A) and real-time PCR (B), respectively. Data are expressed as mean \pm SD (n=3 replicates/group). *** p <0.001 vs. control; ## p <0.01 vs. PG; ### p <0.001 vs. PG.

는지 조사하였고, mTOR의 저해제인 rapamycin은 TNF- α 유전자 전사를 약화시킬 뿐만 아니라 TNF- α 의 분비를 상당히 감소시키는 확인하였다. 이 결과는 rapamycin이 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현을 단백질 수준과 전사 수준에서 저해시킴을 나타낼 뿐만 아니라 mTOR이 단백질 생성에 책임이 있다는 사실과 부합한다[19]. 본 연구의 결과와 기존의 보고를 종합해보면 PI3K 의존적인 Akt/mTOR 경로가 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 증가에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

MAPKs는 세포 외 자극들에 반응하고 다양한 세포 활성을 조절하는 serine/threonine-specific protein kinases로 펩티도글리칸에 의해 활성화 된다[13]. MAPKs는 TLR-2, -4, -9의 활성화에 대한 반응으로 케모카인을 생성하도록 한다[22]. 이러한 사실은 TNF- α 발현에서 kinases의 관련을 시사한다. 따라서 MAPKs가 TNF- α 의 발현에 중요한 역할을 하는지 조사하였고, ERK, p38 MAPK, JNK의 선택적 저해가 단백질 및 유전자 수준에서 TNF- α 발현을 현저하게 약화시킴을 증명하였다. 이는 TNF- α 발현에 위 kinases가 적극적으로 관여함을 의미한다. 이러한 사실들을 종합하면 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 ERK, p38 MAPK, 그리고 JNK의 활성이 필수적임을 알 수 있다.

펩티도글리칸은 TLR2를 통해 백혈구에서 ROS 생산을 증가시킨다[9]. 이것은 ROS가 TLR2 아래의 신호 전달 분자 중 하나라는 것을 나타낸다. 따라서 본 연구에서는 DPI와 NAC를 이용하여 ROS가 TNF- α 발현에 연관이 있는지를 조사하였다. DPI는 ROS를 생산하는 NADPH의 저해제로 ROS의 형성을 억제한다[15]. 세포 내 glutathione의 증축을 위한 cysteine source로 작용하는 thiol 복합체인 NAC는 ROS의 direct scavenger로 작용한다[20]. 본 연구결과에 의하면 DPI와 NAC는 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 의 증가를 상당히 약화시켰다. 이러한 사실을 종합하면 ROS가 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 증가에 적극적으로 관여하고 있다는 것을 의미한다.

본 연구에서는 THP-1 세포가 펩티도글리칸에 노출되면 TNF- α 분비가 증가하고 TNF- α 유전자의 전사가 유도된다는 결과를 보여주었고, 그리고 이 과정에 TLR2, PI3K, Akt, mTOR, ERK, p38 MAPK, JNK, 그리고 ROS가 관여한다는 것을 밝혔다. 그러나 이번 연구는 이러한 분자들이 TNF- α 발현에 독립적으로 또는 협동적으로 역할을 하는지 정확하게 밝혀내지 못했다. 따라서 위에서 거론된 신호전달 물질들 간의 관련성이나 가능한 crosstalk의 유형을 밝히는 연구가 필요하다.

감사의 글

이 과정은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Barath, P., Fishbein, M. C., Cao, J., Berenson, J., Helfant, R. and Forrester, J. S. 1990. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am. J. Cardiol.* **65**, 297-302.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L. and Wolfson, M. F. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**, 729-33.
- Branen, L., Hovgaard, L., Nitulescu, M., Bengtsson, E., Nilsson, J. and Jovinge, S. 2004. Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2137-2142.
- Cardoso, L. S., Araujo, M. I., Goes, A. M., Pacifico, L. G., Oliveira, R. R. and Oliveira, S. C. 2007. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb. Cell Fact.* **6**, 1.
- Dobrina, A., Nardon, E., Vecile, E., Cinco, M. and Patriarca, P. 1995. *Leptospira icterohemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* **63**, 2995-2999.
- Getz, G. S. 2005. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Immune function in atherogenesis. *J. Lipid Res.* **46**, 1-10.
- Hahn-Windgassen, A., Nogueira, V., Chen, C. C., Skeen, J. E., Sonenberg, N. and Hay, N. 2005. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 32081-32089.
- Kavoosi, G., Ardestani, S. K. and Kariminia, A. 2009. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania* major phosphoglycans (PGs). *Parasitology* **136**, 1193-1199.
- Kawai, T. and Akira, S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13**, 816-825.
- Laman, J. D., Schoneveld, A. H., Moll, F. L., van Meurs, M. and Pasterkamp, G. 2002. Significance of peptidoglycan, a proinflammatory bacterial antigen in atherosclerotic arteries and its association with vulnerable plaques. *Am. J. Cardiol.* **90**, 119-123.
- Langer, M., Malykhin, A., Maeda, K., Chakrabarty, K., Williamson, K. S. and Feasley, C. L. 2008. *Bacillus anthracis* peptidoglycan stimulates an inflammatory response in monocytes through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *PLoS One* **3**, e3706.
- Lee, S. A., Kim, S. M., Son, Y. H., Lee, C. W., Chung, S. W., Eo, S. K. and Kim, K. 2011. Peptidoglycan enhances secretion of monocyte chemoattractants via multiple signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 132-138.
- Manning, B. D. and Cantley, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274.
- Miesel, R., Sanocka, D., Kurpisz, M. and Kroger, H. 1995. Anti-inflammatory effects of NADPH oxidase inhibitors. *Inflammation* **19**, 347-362.
- Nijhuis, M. M., Pasterkamp, G., Sluis, N. I., de Kleijn, D. P., Laman, J. D. and Ulfman, L. H. 2007. Peptidoglycan increases firm adhesion of monocytes under flow conditions and primes monocyte chemotaxis. *J. Vasc. Res.* **44**, 214-222.
- Ohta, H., Wada, H., Niwa, T., Kirii, H., Iwamoto, N. and Fujii, H. 2005. Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* **180**, 11-17.
- Rus, H. G., Niculescu, F. and Vlaicu, R. 1991. Tumor necrosis factor- α in human arterial wall with atherosclerosis. *Atherosclerosis* **89**, 247-254.
- Shaw, R. J. and Cantley, L. C. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424-430.
- Spagnuolo, G., D'Anto, V., Cosentino, C., Schmalz, G., Schweikl, H. and Rengo, S. 2006. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials* **27**, 1803-1809.
- Tedgui, A. and Mallat, Z. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* **86**, 515-81.
- Thobe, B. M., Frink, M., Hildebrand, F., Schwacha, M. G., Hubbard, W. J. and Choudhry, M. A. 2007. The role of MAPK in Kupffer cell toll-like receptor (TLR) 2-, TLR4-, and TLR9-mediated signaling following trauma-hemorrhage. *J.*

- Cell. Physiol.* **210**, 667-675.
23. Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. 2003. *Cell Death Differ.* **10**, 45-65.
24. Wang, Q., Dziarski, R., Kirschning, C. J., Muzio, M. and Gupta, D. 2001. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect. Immun.* **69**, 2270-2276.
25. Wang, Z. M., Liu, C. and Dziarski, R. 2000. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 20260-20267.
26. Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R. and Golenbock, D. 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**, 1-5.

초록 : 펩티도글리칸에 의한 단핵세포의 Tumor necrosis factor- α 발현 기전 연구

정지영 · 손용해 · 김보영 · 김관희*
(부산대학교 의과대학 약리학교실)

본 연구에서는 펩티도글리칸이 단핵세포의 TNF- α 발현에 미치는 영향을 조사하였고, 또한 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 발현에 관련된 세포의 요소들을 연구하였다. 사람의 단핵세포주인 THP-1 세포를 펩티도글리칸에 노출시키는 경우 TNF- α 분비 증가뿐만 아니라 TNF- α 유전자 전사를 유도하는 결과를 가져왔다. TLR-2/4의 억제제인 OxPAPC은 펩티도글리칸에 의한 TNF- α 의 발현을 저해하였다. 그리고 U0126, SB202190, SP6001250, LY294002, Akti IV, rapamycin, NAC, DPI 같은 약리학적 저해제 또한 TNF- α 발현을 유전자/단백질 수준에서 상당히 약화시켰다. 그러나 polymyxin B는 TNF- α 발현에 영향을 주지않았다. 따라서 펩티도글리칸이 TLR-2, PI3K, Akt, mTOR, MAPKs, ROS 등을 통하여 단핵세포의 TNF- α 발현을 증가시킴을 확인하였다.