

The Role of Ref-1 in the Differentiation Process of Monocytic THP-1 Cells

Da Sol Kim¹, Kang Mi Kim¹, Koanhoi Kim² and Young Chul Park^{1*}

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

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

Received March 22, 2024 / Revised April 12, 2024 / Accepted April 17, 2024

Redox factor (Ref)-1, a ubiquitously expressed protein, acts as a modulator of redox-sensitive transcription factors and as an endonuclease in the repair pathway of damaged DNA. However, the function of Ref-1 in the differentiation of monocytes into macrophages has not been defined. In this study, we investigated the effects of Ref-1 on the monocyte differentiation process using the human monocytic cell line THP-1. The differentiation agent PMA increased cell adhesion over time and showed a significant increase in phagocytic function but decreased the intracellular amount of Ref-1. Ref-1 inhibitor E3330 and Ref-1 knockdown using the siRNA technique reduced cell adhesion and the expression of differentiation markers, such as CD14, ICAM-1, and CD11b, by PMA stimulation. This means that the role of Ref-1 is absolutely necessary in the initial process of differentiating THP-1 cells stimulated by PMA. Next, the distribution of Ref-1 was examined in the cytoplasm and nucleus of THP-1 cells stimulated with PMA. Surprisingly, PMA stimulation resulted in the rapid translocation of Ref-1 to the nucleus. To prove that movement of Ref-1 to the nucleus is required for monocyte differentiation, a Ref-1 vector with the nuclear localization sequence (NLS) deleted was used. As a result, overexpression of Δ NLS Ref-1, which restricted movement to the nucleus, suppressed the expression of differentiation markers and notably reduced phagocytic function in PMA-stimulated THP-1 cells. In conclusion, these data suggest that the differentiation of monocytic THP-1 cells requires Ref-1 nuclear translocation during the initial process of biochemical events following stimulation from PMA.

Key words : Differentiation, phagocytosis, PMA, Ref-1, THP-1 cells

서 론

말초 혈액을 순환하는 단핵구(monocyte)는 혈관내막에서 다양한 염증 신호에 반응하여 lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 같은 다양한 adhesion molecules과 화학주성 분자들의 상호작용에 의해 조직으로 이동하게 되며 대식세포(macrophage)로 빠르게 분화하게 된다[15, 26]. 활성화된 대식세포는 주요 기능인 포식기능(phagocytosis)을 획득하는 동시에 염증성 cytokines, 반응성 활성산소종(reactive oxygen species), 용해소체 효소(lysosomal enzymes)를 합성하여 면역학적 역할을 수행한다[2, 12, 29]. 하지만 단핵구의 비정상적 거품세포(foam cell)로의 전환이나 정확히 조절되지 않는 대식세포의 과도한 활성화는 혈

관계의 병리적 상태를 초래하게 된다[11, 22]. 그러므로 단핵구의 대식세포로의 분화 및 대식세포의 활성화 과정의 정확한 기전과 관련된 인자들의 상호관련성의 이해가 필요하다.

Redox factor (Ref)-1은 apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease로 DNA repair에 관여하는 핵단백질로 알려져 있으며[3, 20], 최근 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), AP-1, p53 같은 redox-sensitive transcription factors의 DNA 부착을 촉진하는 역할을 한다고 밝혀졌다[8, 13, 31]. 게다가 Ref-1은 endothelial cells, hepatocytes, thyroid cells을 포함하는 다양한 유형의 세포의 cytoplasm에서 관찰되었고[1, 27], 대사적으로 아주 활발한 spermatocytes와 hippocampal cells의 cytoplasm에서도 존재함이 보고되었다[4, 10]. Ref-1은 hypoxia, radicals, ionizing radiation, DNA-damaging drugs 같은 oxidative stress에 직면하면 발현이 증가하며, 대식세포의 활성화 과정에도 관여함이 보고되었다[18, 24, 31]. 대식세포의 기능을 규명하기 위해 흔히 사용되는 RAW 264.7 세포주에 lipopolysaccharide (LPS)로 자극하여 활성화를 유도한 경우, Ref-1이 NF- κ B의 핵으로의 이동을 증대하여 inducible nitric ox-

*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.

ide synthase의 발현을 유도함이 밝혀졌다[19]. 또한 RAW 264.7 세포주에 Ref-1을 과발현시킨 후 LPS로 자극하면 NF- κ B의 핵이동이 저해되어 대식세포의 활성이 억제됨이 보고되었다[32]. 하지만 새롭게 밝혀진 Ref-1의 cytoplasm에서의 기능과 더불어 cytoplasm과 핵 간의 이동 shuttle에 관여하는 인자들과 기전에 대하여 정확하게 밝혀지지 않은 실정이다.

본 연구에서는 단핵구의 대식세포로의 분화과정에서 Ref-1의 역할을 인간 단핵구세포주 THP-1을 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

시약

Protease inhibitor cocktail, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), trypan blue, (2E)-2-[(4,5-dimethoxy-2-methyl-3,6-dioxo-1,4-cyclohexadien-1-yl)methylene] undecanoic acid (E3330)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. CD14, ICAM-1, CD11b, β -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였다. ProteoJET™ cytoplasmic/nuclear protein extraction kit는 Fermetas (Waltham, MA, USA) 제품을 구입하였고, enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA) 제품을 사용하였다.

세포배양 및 분화의 유도

인간 단핵구세포주 THP-1는 한국세포주은행에서 구입하였고, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10 mM HEPES, 10% heat-inactivated FBS를 포함하는 RPMI-1640 배양액으로 5% CO₂ 조건의 37°C incubator에서 0.5–5 \times 10⁵ cells/ml 밀도로 유지하였고, 모든 실험에서 plating 하고 3시간 동안 안정화시킨 후 사용하였다. 분화유도제 PMA의 농도는 100 nM로 사용하였고, 실험목적에 맞게 24에서 96시간 동안 배양한 후 세포를 얻어 세포성장, 부착능, 포식기능 및 western blotting 등을 수행하였다. 또한, Ref-1 억제제인 E3330은 배양중인 세포에 2시간 동안 먼저 처리한 후 PMA로 자극하였다.

Phagocytosis(포식기능)의 분석

배양중인 THP-1 세포에 PMA를 처리하여 분화를 유도한 다음, 24, 48, 72시간 경과한 시점에서 분화된 세포의 포식기능을 분석하였다. 평균 직경이 0.5 μ m인 carboxylate-modified red fluorescent latex beads (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 제조사가 공급한 protocols에 따라 실시하였다. 세포를 배양중인 각 well에 latex beads를 5 μ l씩 첨가하고 4시간 동안 정상 조건의 CO₂ incubator에서

배양시킨다. 그 후, PBS로 세포를 조심스럽게 씻어준 다음 형광현미경으로 관찰하였다.

Western blotting

배양 세포를 60-mm dish에 2 \times 10⁵ cells/ml의 농도로 분주하여 사용하였고, 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 cocktail을 첨가한 lysis buffer를 이용하였다. 분리된 전체 단백질은 bicinchoninic acid 방법으로 정량한 후, 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 electroblotting apparatus (Bio-rad, Richmond, CA)를 이용하여 PVDF membrane에 이동시켰다. 일차 항체 및 horse radish peroxidase (HRP)가 부착되어 있는 이차 항체를 반응시키고, 면역복합체는 ECL kit를 이용하여 LAS-3000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan) 기기에서 분석하였다.

세포 생존율 및 부착능 측정

세포를 24 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well의 밀도로 분주하여 다양한 농도의 E3330과 PMA를 처리하였다. 48시간 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 100으로 계산하여 세포수를 표현하였다.

Small interfering RNA (siRNA)의 transfection

인간 Ref-1 mRNA를 특이적으로 방해하도록 설계한 21-nucleotide duplex siRNA (AA-N19 mRNA target sequence 5'-CUUCGAGCCUGGAUUAAGA-3')를 Dharmacon Inc. (Lafayette, CO, USA)에 'ready-to-use' 상태로 주문하여 사용하였다. THP-1 세포를 1 \times 10⁵ cells/ml의 농도로 60-mm dish에 분주한 뒤 12시간 배양한 후, Ref-1 siRNA를 Amaxa Biosystems (Cologne, Germany) 제품인 Nucleofector를 이용하여 제조사가 추천하는 protocol에 따라 transfection 하였다.

세포질 및 핵 단백질 분리

ProteoJET™ cytoplasmic/nuclear protein extraction kit를 이용하였는데 간단히 언급하면, PBS로 세척한 세포를 protease inhibitor cocktail을 포함한 200 μ l hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9; 10 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂)에서 resuspension 시킨 후, 2.5% NP-40을 25 μ l 첨가

하여 파괴시킨다. 부드럽게 vortexing 후, 세포질 분획과 핵을 얻고, 핵 단백질은 extraction buffer (10 mM HEPES, pH 7.9; 100 mM NaCl; 1.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA and 0.1 mM DTT)를 이용하여 분리하였다. Cell fractionation의 모든 과정은 4°C에서 수행하였다.

Ref-1 expression vector의 준비와 transfection

Nuclear localization signal (NLS) 부위인 N말단의 35 amino acids 잔기를 제거한 cytoplasmic Ref-1 (Δ NLS) vectors는 미국 Johns Hopkins 의과대학의 Kaikobad Irani 교수로부터 공급받았다[9]. THP-1 세포를 1×10⁵ cells/ml의 농도로 60-mm dish에 분주한 뒤 12시간 배양한 후, cytoplasmic Ref-1 (Δ NLS)과 control vector를 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 제품인 Lipofectamin 2000 reagent를 이용하여 제조사가 추천하는 protocol에 따라 transfection 하였다.

통계

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

결 과

단핵구세포주 THP-1의 분화와 Ref-1의 감소

PMA는 단핵구를 대식세포로 분화를 유도하기 위해 가장 널리 사용되는 물질이다. 분화 과정의 지표로 가장 먼저 나타나는 현상은 다양한 막표면 분자들의 발현과 더불어 세포 부착능의 증가이고, 성숙한 분화과정을 거친 대식세포는 포식기능을 획득하게 된다. 우선적으로, 분화 과정에 따른 포식기능(phagocytic activity) 획득과 Ref-1의 발현을 조사하기 위하여, 배양중인 THP-1 세포에 100 nM

PMA를 처리하여 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. PMA 자극에 의해 시간이 경과하면서 THP-1 세포의 포식기능은 증가함을 나타내었다(Fig. 1A). 놀랍게도, Ref-1의 발현은 48시간이 지나면서 급격하게 감소하는 경향을 western blotting을 이용하여 관찰하였다(Fig. 1B). 이는 완전한 분화과정을 거친 대식세포에서는 Ref-1이 존재하지 않는다는 것을 의미한다.

PMA에 의한 분화 유도에서 Ref-1 억제 효과

단핵구 분화과정의 초기에 Ref-1의 역할을 조사하기 위하여, Ref-1의 활성 및 발현을 억제한 후 PMA로 단핵구의 분화를 유도하였다. 먼저, Ref-1 활성억제제인 E3330을 다양한 농도에서 세포독성 실험을 한 후(Fig. 2A), 세포 생존율에는 영향을 주지 않는 100 μ M E3330을 2시간 동안 전처리 후 PMA로 THP-1 세포의 분화를 자극하였다. E3330은 PMA 자극에 의한 분화 과정의 지표인 세포의 부착능을 크게 감소시켰다(Fig. 2B). 다음으로, siRNA 기법을 사용하여 세포에 존재하는 Ref-1 knockdown도 세포 부착능의 감소를 보였다(Fig. 3). 이는 대식세포로 완전히 분화한 성숙한 세포는 Ref-1이 존재하지 않지만, PMA 자극에 의한 THP-1 세포의 분화 초기과정에는 Ref-1이 절대적으로 필요하다는 것을 의미한다.

PMA 자극에 의한 Ref-1의 핵 이동

Ref-1은 단핵구 분화 초기에 중요한 역할을 수행하기 때문에, PMA로 자극한 단핵구 세포주에서 Ref-1의 세포 내 이동의 변화를 조사였다. PMA로 24시간 동안 자극한 세포로부터 핵과 세포질 단백질을 분리하여 western blotting으로 확인하였다. 흥미롭게도, PMA로 자극한 THP-1 세포주에서 Ref-1은 세포질에서 핵으로 이동함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

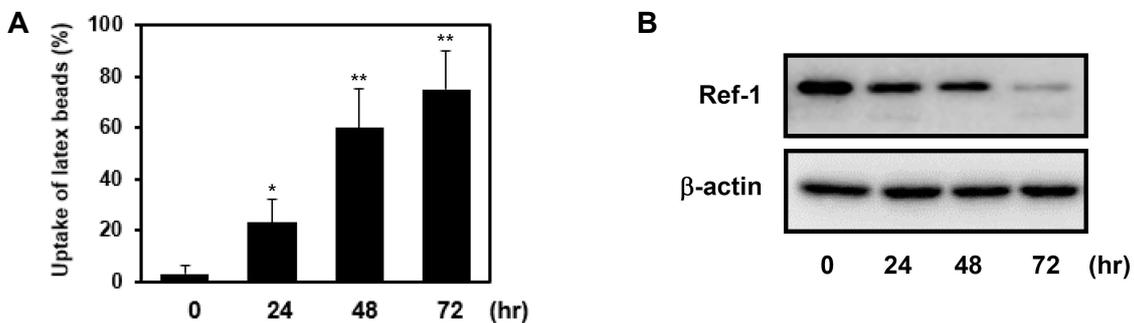


Fig. 1. Change of Ref-1 on PMA-stimulated differentiation of monocytic cells. THP-1 cells were incubated with 100 nM PMA for up to 72 hr. (A) Cells were challenged with carboxylate-modified polystyrene latex beads. Three independent experiments were performed and values are the means of \pm SDs obtained from triplicate experiments. **p*<0.05 and ***p*<0.01 vs. the untreated macrophages. (B) Whole cell lysates were analyzed by western blotting to detect expression level of Ref-1. β -actin was used as an internal control to monitor equal protein loading.

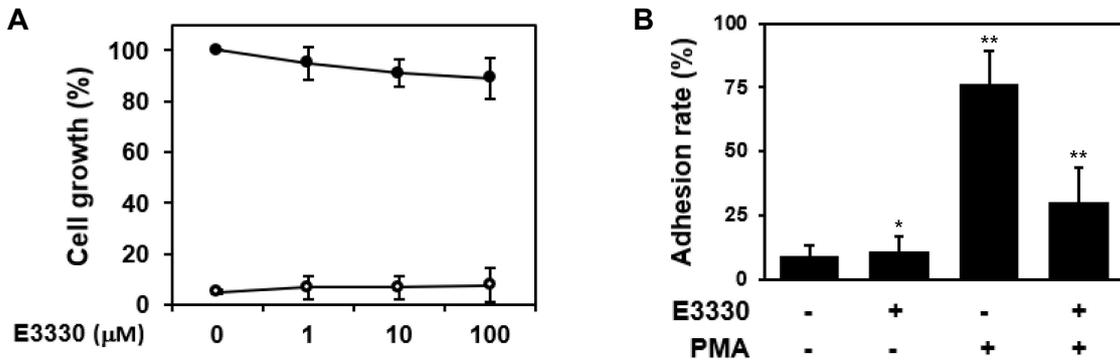


Fig. 2. Effect of Ref-1 inhibitor E3330 on cell viability and adherence. THP-1 cells were plated at 5×10^4 cells per 24-well plate, and the cells were pretreated with different concentrations of E3330 (1, 10 or 100 μ M) for 30 min and then incubated with 100 nM PMA for 48 hr. (A) Cells were analyzed for viability using the trypan blue dye exclusion assay (live cells, ●; dead cells, ○). (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.

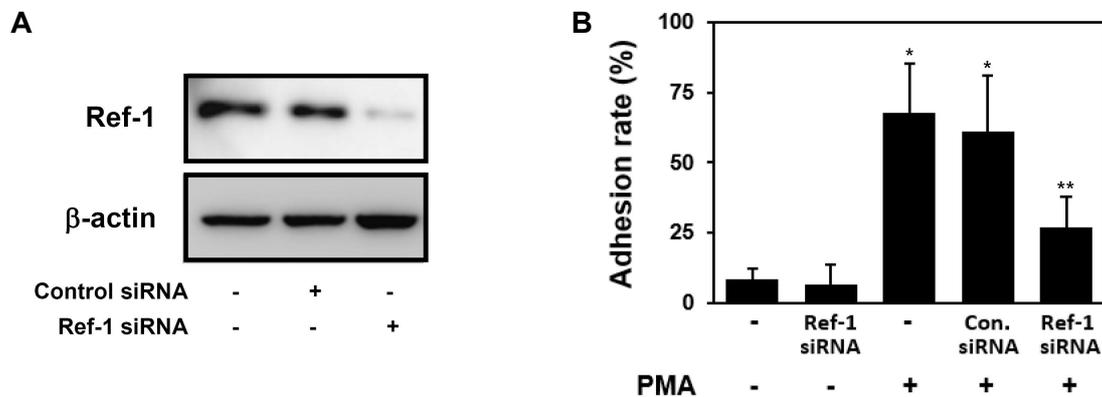


Fig. 3. Effect of Ref-1 siRNA on PMA-stimulated adhesion of monocytic THP-1 cells. Cells were transfected with siRNA for the silencing of the Ref-1 gene, and were treated with 100 nM PMA for 48 hr. (A) The efficiency of Ref-1 silencing was analyzed by western blotting using specific Ref-1 antibody. (B) 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.

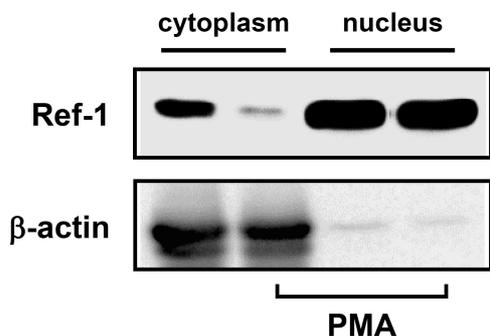


Fig. 4. Nuclear localization of Ref-1 in PMA-stimulated THP-1 cells. Cells were treated with 100 nM PMA for 24 hr. Then, cytoplasmic and nuclear proteins were isolated and used for western blotting to detect expression level of Ref-1. β-actin was used as an internal control to monitor equal protein loading.

단백구 분화에서 cytoplasmic Ref-1 과발현의 영향

다음으로, 단백질 분화과정에서 Ref-1의 핵으로의 이동이 수반되어야 한다는 가설을 증명하기 위하여, 단백질의 핵으로의 이동에 필요한 서열인 N말단에 존재하는 NLS를 제거한 Ref-1 vector를 이용하여 조사하였다. 그 결과, 핵으로의 이동이 제한된 ΔNLS Ref-1의 과발현은 PMA 자극에 의해 분화과정에 발현하는 막표면 단백질인 CD14, ICAM-1, CD11b의 발현 억제를 나타내었다(Fig. 5A). 또한, ΔNLS Ref-1가 과발현된 세포에 PMA의 자극은 PMA 단독으로 처리한 세포와 비교하여 carboxylate-modified latex beads의 포식기능도 현저한 감소를 보였다(Fig. 5B).

고 찰

인체에서 산소분자의 대사는 superoxide (O_2^-), perox-

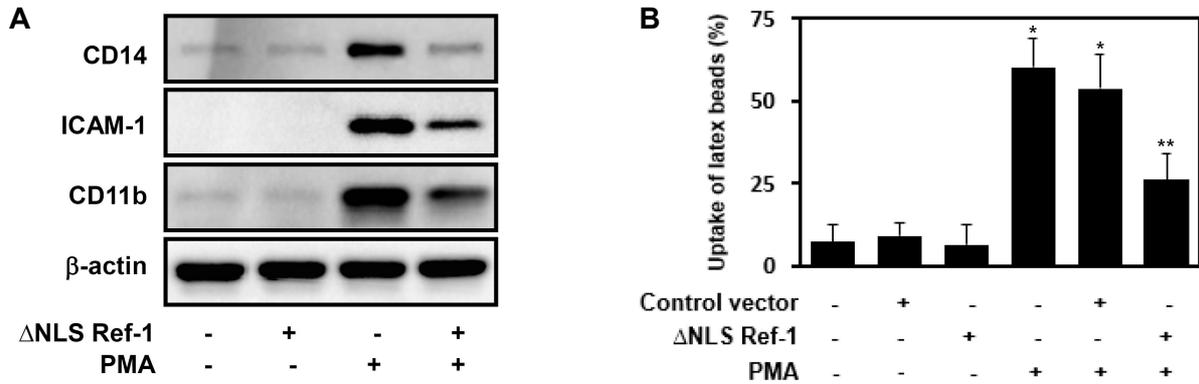


Fig. 5. Effect of ΔNLS Ref-1 overexpression on PMA-stimulated differentiation of monocytic cells. Cells were transfected with ΔNLS Ref-1 expression vector, incubated for 24 hr, treated with 100 nM PMA for 48 hr. (A) The expression of macrophage differentiation markers was analyzed by western blotting using specific antibodies against CD14, ICAM-1, and CD11b. β-actin was used as an internal control to monitor equal protein loading. (B) Cells were challenged with carboxylate-modified polystyrene latex beads. The results are presented as the means of ± SDs of three experiments. **p*<0.05 and ***p*<0.01 vs. the untreated macrophages.

nytnite (ONOO⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), nitric oxide (NO) 등 다양한 반응성 산소 대사물(reactive oxygen species, ROS)을 생성한다[6, 30]. 정상적인 생리적 환경에서 ROS는 세포의 성장과 분화과정에서 중요한 신호전달 인자로서 작용하며, oxidants의 생성속도와 제거속도가 균형을 이루어 redox (reduction-oxidation, 산화환원) 평형 상태를 유지한다. 하지만 유해한 환경인자나 감염 등에 의해 발생하는 산화적 스트레스(oxidative stress)는 조직과 세포의 항상성과 자기방어 기능을 약화시켜 다양한 염증관련 질환과 노화뿐만 아니라 암을 야기하는 주요 인자로 인식되고 있다[5, 14]. 그러므로 조직과 세포에 치명적인 산화적 스트레스뿐만 아니라 산화된 단백질과 산화된 cholesterol (oxysterols) 등을 제거하기 위해 다양한 radical scavenger 역할을 하는 항산화물질과 항산화효소를 포함한 항산화계(antioxidant system)의 역할이 중요하다고 할 수 있다[7, 17, 19].

활성화된 대식세포의 작용기전은 phagolysosome 내 다양한 분해효소의 합성 외에도 직접적으로 ROS를 이용한다. 또한 ROS는 redox-sensitive한 전사인자들을 활성화시켜 IL-1와 TNF-α 같은 염증성 cytokines의 발현을 유도한다. 또한 혈관에 존재하는 단핵구의 CD11a plus CD18 분자가 내피세포의 ICAM-1에 부착하는 과정과 조직 내로 이동 후 대식세포로의 분화과정에서 수많은 인자들의 상호작용에 다양한 ROS가 관여함이 밝혀지고 있다[2, 21, 23]. 단핵구의 대식세포로의 분화와 활성화과정의 이해는 인체의 생리 및 면역 측면에서 실로 중요하지만, 그 상세한 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않는 실정이다. 그러므로 항산화물질의 작용기전 뿐만 아니라 glutathione (GSH) synthetase, GSH reductase, GSH peroxidase (GPx), thioredoxin (Trx) reductase, superoxide dismutase (SOD),

catalase, heme oxygenase (HO), Ref-1 같은 항산화과정에 관여하는 항산화효소들의 연구도 최근 활발히 이루어지고 있다[16, 28, 33].

Ref-1은 처음 암세포주 HeLa의 핵분획에서 분리되었고 DNA repair에 관여하는 핵단백질로 알려져 있었으나, spermatocytes, hippocampal cells 같은 대사가 활발한 세포임에도 불구하고 세포질 발현 경향을 보인다. 다양한 세포에서 Ref-1은 조금씩 다른 subcellular expression pattern을 보이고, 핵과 세포질을 오가며 다양한 생화학적 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다. RAW 264.7 대식세포주를 이용한 선행 연구결과에서, Ref-1은 AKT를 이용해 NADPH oxidase의 조립을 조절함으로써 활성화의 지표로 사용되는 nitric oxide (NO) synthase의 발현에 필요한 NF-κB의 핵이동을 중재한다는 사실을 밝혔다[24]. 또한, Ref-1의 세포내 과발현은 lipopolysaccharide로 자극한 RAW 264.7 세포주의 NO 생성을 억제하였다. 인간 단핵구세포주 THP-1을 이용한 대식세포로의 분화과정 실험에서, Ref-1은 NADPH oxidase의 세포질 인자인 p47^{PHOX} subunit과 상호작용하여 NADPH oxidase 활성을 조절함으로써 대식세포 표현형 막단백질의 발현과 세포부착에 관여하였다[25]. 하지만, 단핵구의 대식세포로의 분화과정에서 Ref-1의 정확한 기전 및 다른 분화 조절인자들의 상호관련성과 핵으로의 이동 등에 관한 정보는 부족한 실정이다.

본 연구에서 Ref-1의 단핵구 분화과정에 미치는 영향을 인간 단핵구세포주 THP-1을 이용하여 조사하였다. 가장 널리 사용되고 있는 분화제인 PMA를 처리하면 시간이 경과함에 따라 막표면 단백질의 변화와 부착능이 증가하고 대식세포의 주요 기능인 포식기능을 획득하게 된다. 하지만, 분화가 진행됨에 따라 Ref-1의 발현은 48시간이 지나면서 급격하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1). 이는

완전한 분화과정을 거친 대식세포에서는 Ref-1이 존재하지 않는다는 것을 의미한다. 하지만 Ref-1의 억제제인 E3330과 Ref-1 siRNA를 이용한 실험에서, Ref-1이 PMA 자극을 받은 THP-1 세포의 분화 초기과정에 절대적으로 필요하다는 것을 밝혔다(Fig. 2, 3). Ref-1은 오랜 기간 핵 단백질로 알려져 있었으나, 최근 많은 연구자들에 의해 Ref-1이 세포질에 존재하며 다양한 기능을 가진다는 보고가 이어지고 있다. THP-1 세포주에서 Ref-1은 세포질과 핵에 모두 존재하며 다양한 기능을 하는 것으로 여겨진다. PMA로 자극한 THP-1 세포주에서 Ref-1은 세포질에서 핵으로 분화초기에 이동하기 때문에(Fig. 4), 핵으로의 이동에 필요한 서열인 N말단에 존재하는 NLS를 제거한 Δ NLS Ref-1 vector를 이용하여 가설을 증명하였다. 결론적으로, Ref-1이 분화제 자극에 의한 분화 초기과정에 핵으로 이동하여 다양한 전사인자의 활성화에 관여하는 것으로 여겨진다. 하지만, 염증반응을 포함한 oxidative stress (산화적 스트레스) 상황에서 Ref-1은 항산화 효과를 나타내기 위하여 증가하게 된다. 이는 세포질에서의 양적 증가를 초래하게 되기 때문에 단핵구의 분화와 활성화 과정에서 상호작용의 이해를 위한 연구가 절실하다고 여겨진다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Angkeow, P., Deshpande, S. S., Qi, B., Liu, Y. X., Park, Y. C., Jeon, B. H., Ozaki, M. and Irani, K. 2002. Redox-factor-1: an extra-nuclear role in the regulation of endothelial oxidative stress and apoptosis. *Cell Death Differ.* **9**, 717-725.
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. Demple, B., Herman, T. and Chen, D. S. 1991. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 11450-11454.
4. Duguid, J. R., Eble, J. N., Wilson, T. M. and Kelley, M. R. 1995. Differential cellular and subcellular expression of the human multifunctional apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme. *Cancer Res.* **55**, 6097-6102.
5. Finkel, T. and Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing *Nature* **408**, 239-247.
6. Forman, H. J., Ursini, F. and Maiorino, M. 2014. An overview of mechanisms of redox signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **73**, 2-9.
7. Hunyadi, A. 2019. The mechanism(s) of action of antioxidants: From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites. *Med. Res. Rev.* **39**, 2505-2533.
8. Jayaraman, L., Murthy, K. G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S. and Prives, C. 1997. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.* **11**, 558-570.
9. Jeon, B. H., Gupta, G., Park, Y. C., Qi, B., Haile, A., Khanday, F. A., Liu, Y. X., Kim, J. M., Ozaki, M., White, A. R., Berkowitz, D. E. and Irani, K. 2004. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone. *Circ. Res.* **95**, 902-910
10. Kakolyris, S., Kaklamanis, L., Giatromanolaki, A., Koukourakis, M., Hickson, I. D., Barzilay, G., Turley, H., Leek, R. D., Kanavaros, P., Georgoulas, V., Gatter, K. C. and Harris, A. L. 1998. Expression and subcellular localization of human AP endonuclease 1 (HAP1/Ref-1) protein: a basis for its role in human disease. *Histopathology* **33**, 561-569.
11. Lusis, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241.
12. 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.
13. Mitomo, K., Nakayama, K., Fujimoto, K., Sun, X., Seki, S. and Yamamoto, K. 1994. Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF-kappa B *in vitro*. *Gene* **145**, 197-203.
14. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. and Malik, A. B. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1126-1167
15. Mosser, D. M. and Edwards, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958-969.
16. 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.
17. Nakamura, H., Nakamura, K. and Yodoi, J. 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 351-369.
18. Ramana, C. V., Boldogh, I., Izumi, T. and Mitra, S. 1998. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 5061-5066.

19. Reyk, D. M. V., Brown, A. J., Hultén, L. M., Dean, R. T. and Jessup, W. 2006. Oxysterols in biological systems: sources, metabolism and pathophysiological relevance. *Redox Rep.* **11**, 255-262.
20. Robson, C. N. and Hickson, I. D. 1991. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5519-5523.
21. 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.
22. Ross, R. 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am. Heart J.* **138**, S419-420.
23. 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.
24. Song, J. D., Lee, S. K., Kim, K. M., Kim, J. W., Kim, J. M., Yoo, Y. H. and Park, Y. C. 2007. Redox factor-1 mediates NF- κ B nuclear translocation for LPS-induced iNOS expression in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Immunology* **124**, 58-67.
25. 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.
26. Tang, N., Sun, B., Gupta, A., Rempel, H. and Pulliam, L. 2016. Monocyte exosomes induce adhesion molecules and cytokines via activation of NF- κ B in endothelial cells. *FASEB J.* **30**, 3097-3106.
27. Tell, G., Crivellato, E., Pines, A., Paron, I., Pucillo, C., Manzini, G., Bandiera, A., Kelley, M. R., Di Loreto, C. and Damante, G. 2001. Mitochondrial localization of APE/Ref-1 in thyroid cells. *Mutat. Res.* **485**, 143-152.
28. Thiele, M. and Bernhagen, J. 2005. Link between macrophage migration inhibitory factor and cellular redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 1234-1248.
29. 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.
30. Vara, D. and Pula, G. 2014. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. *Curr. Mol. Med.* **14**, 1103-1125.
31. Yao, K. S., Xanthoudakis, S., Curran, T. and O'Dwyer, P. 1994. Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5997-6003.
32. Yoo, Y. H., Lim, Y. J., Park, S. E., Kim, J. M. and Park, Y. C. 2004. Overexpression of redox factor-1 negatively regulates NO synthesis and apoptosis in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett.* **556**, 39-42.
33. 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 분화과정에서 Ref-1의 역할

김다솔¹ · 김강미¹ · 김관희² · 박영철^{1*}

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

Redox factor (Ref)-1은 세포질과 핵을 오가며 산화환원(redox) 환경에 민감한 transcription factors의 조절과 손상된 DNA의 교정 등 다양한 기능을 수행하는 단백질이다. 하지만, 단핵구(monocyte)의 대식세포(macrophage)로의 분화과정에서 Ref-1의 역할은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 인간 단핵구세포주 THP-1을 이용하여 Ref-1의 단핵구 분화과정에 미치는 영향을 조사하였다. 분화제 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)는 시간이 지날수록 세포의 부착능을 증가시키고 포식기능의 현저한 증가를 보이지만, Ref-1의 세포 내 양을 현저히 감소시켰다. Ref-1의 억제제인 E3330와 siRNA 기법을 이용한 Ref-1 knock-down은 PMA에 의한 세포 부착능과 막표면 분화인자의 발현을 현저히 감소시켰다. 이는 PMA에 자극을 받은 THP-1 세포의 분화 초기과정에는 Ref-1의 역할이 절대적으로 필요하다는 것을 의미한다. 단핵구 분화과정에서 Ref-1의 작용기전을 조사하기 위하여, PMA로 자극한 THP-1 세포의 세포질과 핵에서 Ref-1의 분포를 조사하였다. 놀랍게도, PMA 자극은 Ref-1을 빠르게 핵으로 이동하는 결과를 나타내었다. Ref-1의 핵으로의 이동이 단핵구 분화에 필요함을 증명하기 위하여, nuclear localization sequence (NLS)가 제거된 Ref-1 vector를 사용하였다. 그 결과, 핵으로의 이동이 제한된 Δ NLS Ref-1의 과발현은 PMA 자극에 의한 막표면 단백질의 발현 억제와 포식기능의 현저한 감소를 보였다. 이를 종합하면, Ref-1은 분화제 자극에 의한 분화 유도 초기과정에 핵으로 이동하여 다양한 분화인자의 발현에 관여하는 것으로 보인다.