

## 사람 망막색소상피에서 Toll-like Receptor (TLR) 발현양상과 TLR Agonist들에 의한 사이토카인 발현유도

연세대학교 원주의과대학 미생물학교실 · 기초의학연구소, 우리안과<sup>1</sup>

최선주<sup>†,\*</sup> · 이경호<sup>†</sup> · 박수정 · 박현숙 · 김종욱<sup>1</sup> · 김수기 · 박주영

### The Expression Pattern of Toll-like Receptor (TLR) and Cytokine Production to TLR Agonists in Human Retinal Pigment Epithelial Cells

Sun Ju Choi<sup>†,\*</sup>, Kyoung-Ho Lee<sup>†</sup>, Su Jung Park, Hyun Sook Park, Jongwook Kim<sup>1</sup>,  
Soo-Ki Kim and Joo Young Park

Department of Microbiology · Institute of Basic Medical Science, Yonsei University,  
Wonju College of Medicine, Il San Dong 162, <sup>1</sup>Woori Eye Clinic, Joongang Dong,  
Wonju, Gangwon-do 220-701, Korea

Received : May 9, 2007

Accepted : June 12, 2007

Retinal pigment epithelium (RPE) constituting the outer blood-retina barrier plays an important role in ocular defense mechanism. Many studies reported that RPE participates in ongoing immune responses in the retina. However, the exact mechanism is still uncertain. Toll-like receptors (TLRs) participate in the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMP), such as LPS, zymosan, lipoprotein, and dsRNA. The expression and function of TLRs in human RPE have not been established. In this study, we investigated TLRs expression in human fetal RPE and their recognition of PAMP to determine how human RPE participates in ocular defense mechanism against microbial component. RT-PCR and real time PCR revealed that TLR1 through 5 were constitutively expressed in human fetal RPE, and their expressions were slightly increased by LPS. We determined the TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 expression in human fetal RPE after treatment with LPS, zymosan, peptidoglycan, or poly I:C. RT-PCR demonstrated that LPS and poly I:C treatment increased the production of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in human fetal RPE. LPS showed more potent effects on TNF- $\alpha$  and IL-8 production. Peptidoglycan and zymosan did not induce the production of TNF- $\alpha$ . CD14, the co-receptor of LPS was weakly expressed and functioned in recognizing LPS in human fetal RPE. These results suggest that human RPE may participate in ocular defense mechanism against microbial component through toll-like receptors.

**Key Words:** Toll-like receptor; Pathogen-associated molecular pattern; Retinal pigment epithelium; Cytokine

## 서 론

눈은 면역관용지역 (immune privileged region)으로 혈관-눈

<sup>†</sup>These two authors equally contributed to this work.

\*교신저자: 최선주, 220-701 강원도 원주시 일산동 162,  
연세대학교 원주의과대학 미생물학교실 · 기초의학연구소  
Phone: +82-33-741-0325, Fax: +82-33-748-2709,  
e-mail: sun1116@yonsei.ac.kr

\*\*이 논문은 2005학년도 연세대학교 학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임.

장벽 (blood-ocular barrier)에 의해 주위조직과 분리되어 있다. 망막색소상피 (retinal pigment epithelium, RPE)는 혈관-눈 장벽을 구성하는 한층의 세포이다. 망막색소상피층은 혈관이 없는 neurosensory retina에 산소와 영양분을 제공하고, 광수용체층의 바깥분절에서 떨어져 나온 조직파편을 탐식하고 분해하며, 광수용체층을 지지하고 유지하는 역할을 한다 (27). 해부학적으로 망막색소상피세포는 여러 가지 감염원과 면역물질들에 노출되어 면역성염증반응이 일어나고 있다고 추정된다. 망막색소상피층 표면에는 고유면역과 항원특이면역에

관여하는 세포표면 수용체가 표현되고 있을 뿐 아니라 염증 물질로 자극받으면 사이토카인을 분비한다 (12). 망막색소상피에 표현되는 표면 수용체로는 CR3, CR4, CD68, CD36과 같이 고유면역계에 관여하는 것들과 CD16, HLA-DR, ICAM-1과 같이 항원특이면역반응을 매개하는 것들이 있다 (12). TNF- $\alpha$ 와 IL-1과 같은 염증매개 사이토카인들은 HLA-DR이나 ICAM-1 등의 세포표면 수용체를 증가시킬 뿐 아니라 TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-15 등의 사이토카인 분비를 증가시킨다 (9,12,20). 망막색소상피에서 분비되는 염증관련 물질들은 눈 질환 발병기전에도 관여할 것으로 생각되며, 이러한 망막색소상피의 특성은 눈의 방어기전에 중요할 것으로 생각된다 (28).

Toll-like receptor (TLR)는 고유면역계에 관여하는 수용체로서 외부에서 미생물이 침입한 경우에 미생물들이 공통적으로 가지고 있는 구조인 pathogen associated molecular patterns (PAMP)를 인식한다 (1,13). 사람에서 밝혀진 10가지의 TLR들은 각각 고유한 리간드를 인식함으로써 면역반응의 초기 단계에서 중요한 역할을 한다. 이 중에서 TLR4는 그람 음성 세균의 세포벽인 LPS를 인식하고 TLR2와 TLR6는 세균 세포벽 성분 중에서 lipoprotein과 진균 세포벽 성분인 zymosan을 인식하며 TLR3는 dsRNA 즉 바이러스 감염 인식에 중요한 역할을 한다 (3,16~18,26). TLR5는 세균의 편모를 인식하고 TLR9는 세균의 DNA를 인식한다 (25). TLR들은 여러 종류의 세포에 발현되어 있으며 세포의 종류마다 다양한 발현양상을 보인다. 특히 TLR4는 면역반응을 매개하는 대식세포나 단핵세포 증성구들에 발현되며 이외에도 혈관내피세포와 같이 외부의 항원과 만날 수 있는 조직에서도 여러 종류의 TLR들과 함께 발현되어 있다 (1,29).

눈에서도 PAMP와 연관된 면역반응이 일어나는데 특히 각막과 같이 외부에 노출된 곳에서 일어나며 이는 포도막염의 발병과 연관될 수 있다 (23). 망막색소상피도 혈관-눈 장벽을 통해서 항원과 접촉하므로 PAMP를 인식할 가능성이 높으나 기존의 연구들은 노화나 항원자극의 영향을 많이 받을 수 있는 세포주나 성인세포를 이용한 것들일 뿐만 아니라, 상충된 결과를 보인다 (4,8,15). 본 연구에서는 사람 태아의 망막색소상피에서 TLRs 발현양상을 확인하고 LPS를 비롯한 PAMP에 의해서 발현이 조절되는지 알아보았다. 또한 사람 태아의 망막색소상피가 PAMP에 의해서 활성화되는지 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사람 태아 망막색소상피세포의 분리와 배양

치료 목적으로 임신이 중단된 18주에서 23주 사이의 태아

의 안구를 적출하여 망막색소상피층을 분리하였고 조직 및 세포분리 과정은 연세대학교 원주의과대학 임상시험심사위원회의 규정에 따라 시행하였다. 먼저 적출된 안구에서 공막 주위의 결체조직과 외안근을 깨끗이 박리하였다. 그 다음 안구를 각막 윤부 근처의 거상연 주위에서 360도 절개 후 전안부 조직과 수정체를 제거하였다. 후안부 조직은 공막과 망막 그리고 망막색소상피층에 모두 한꺼번에 사사분면 이 완절개를 가한 후 인산완충식염수를 넣은 페트리접시 (petri dish)에서 나머지 조작을 하였다. 망막과 남아있는 유리체를 제거한 후 망막색소상피층을 분리하였다. 분리한 망막색소상피세포를 0.25%의 trypsin (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies)에 넣고 5% CO<sub>2</sub>가 함유된 37°C 배양기에 두었다. 1시간 후 15% 우태아 혈청 (Hyclone, Logan, UT, USA)이 포함된 DMEM을 첨가한 후 1,200 g로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 세포침전물을 15% 우태아 혈청과 glutamine (Life Technologies), HEPES (Life Technologies), 페니실린과 스트렙토마이신 (Life Technologies)이 함유된 DMEM에 부유시킨 후에 24 well plate (Corning, Cambridge, MA, USA)의 한 well에 넣고 5% CO<sub>2</sub>가 함유된 37°C 배양기에서 배양하였다. 1주 후에 trypsin을 처리하여 75 cm<sup>2</sup> culture flask에서 계대 배양하였다. 배양액은 1주에 두 번씩 갈아주었고 1~2주에 한 번씩 계대 배양하였다.

세포의 순수성은 anti-pancytokeratin antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용한 간접면역형광염색법으로 확인하였다. 사용한 세포들은 계대 배양세대 2대부터 6대까지의 세포들로서 실험결과에 있어서 배양세대간의 차이는 없었다. 모든 실험은 서로 다른 개체를 이용하여 3번 이상 반복하였다. U937은 10%의 우태아 혈청이 함유된 RPMI 1640 (Life Technologies)을 이용하여 배양하였다.

### 2. LPS, peptidoglycan, zymosan, poly I:C를 이용한 사람 태아 망막색소상피세포의 자극

배양된 사람 태아 망막색소상피세포를 trypan blue로 염색하여 90% 이상의 세포가 살아있는 것을 확인하고 실험에 사용하였다. 세포에 trypsin을 처리하여 세포를 떼어낸 후 적절한 수의 세포를 6 well plate에 넣어주고 15% 우태아 혈청이 함유된 DMEM에서 24~48시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 10% 우태아 혈청이 함유되거나 혹은 혈청이 없는 DMEM으로 교환한 뒤 LPS (Sigma), peptidoglycan (Sigma, St. Louis, MO, USA), zymosan (Aldrich, St. Louis, MO, USA), poly I:C (Amersham, Little Chalfont, UK)를 첨가하여 적절한 시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

**Table 1.** Primer Sequences for RT-PCR

Target		Sequence	Size
GAPDH	Forward	ACCACAGTCCATGCATCAC	452 bp
	Reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	
TNF- $\alpha$	Forward	GAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCA	443 bp
	Reverse	GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCCAGAC	
IL-6	Forward	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC	628 bp
	Reverse	GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG	
IL-8	Forward	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	292 bp
	Reverse	TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC	
TLR1	Forward	CTATACACCAAGTTGTCAGC	219 bp
	Reverse	GTCTCCAACCTCAGTAAGGTG	
TLR2	Forward	GCCAAAGTCTTGATTGATTGG	346 bp
	Reverse	TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG	
TLR3	Forward	GATCTGTCTCATAATGGCTTG	304 bp
	Reverse	GACAGATTCCGAATGCTTGTG	
TLR4	Forward	TGGATACGTTTCCTTATAAG	506 bp
	Reverse	GAAATGGAGGCACCCCTTC	
TLR5	Forward	CTAGCTCCTAATCCTGATG	437 bp
	Reverse	CCATGTGAAGTCTTTGCTGC	
CD14	Forward	GGTGCCGCTGTGTAGGAAAGA	450 bp
	Reverse	GGTCCTCGAGCGTCAGTTCCT	

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-6: interleukin-6, IL-8: interleukin-8, TLR: toll-like receptor

### 3. RNA 분리 및 cDNA 합성

전체 RNA는 Trizol 용액 (Life Technologies)을 이용하여 분리하였다. 간략히 기술하면, 배양접시를 PBS로 세척하고 Trizol 용액을 넣어 세포를 깬 후 chloroform 추출과 isopropanol 침전과정을 거쳐서 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 diethylpyrocarbonate로 처리한 증류수에 녹인 후 분광광도계를 이용하여 정량하였다. cDNA를 합성하기 위하여 1~2  $\mu$ g의 RNA와 완충용액, 500 ng의 oligo-dT primer, 15 U의 avian myeloblastosis virus 역전사효소 (Promega, Madison, WI, USA), 20 U의 RNase inhibitor (Promega), 1 mM의 dNTP, 5 mM의  $MgCl_2$ 를 혼합하여 20  $\mu$ l의 반응액을 만들었다. 이 반응액을 42°C에서 30분간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 두어 효소를 불활성화 시키고 5°C에서 10분간 두었다가 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

### 4. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), TLR1,

TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, CD14에 대한 primer를 사용하여 cDNA를 증폭하였다 (Table 1). PCR을 수행하기 위하여 cDNA 2  $\mu$ l, 완충용액, 0.2 mM dNTP, 1.25 U Taq polymerase (Takara, Otsu, Shiga, Japan), primer, 2 mM  $MgCl_2$ 를 넣어서 50  $\mu$ l의 반응액을 만든 후 94°C에서 30초, 55~60°C 사이의 annealing temperature에서 30초, 72°C에서 1분간 반응시켰다.

### 5. Quantitative Real-time PCR

Real time PCR을 수행하기 위하여 RG-3000 (Corbett research, Sydney, Australia)을 사용하였다. 100 ng의 cDNA, 2.5 pM의 primer, 2배 농도의 QuantiTect SYBR, Green PCR master mix (Qiagen, Mainz, Germany)를 넣어 혼합액을 만들었다. PCR을 하기 위해 95°C에서 15분 동안 둔 후 95°C에서 15초, 60°C에서 60초간 35 cycle을 반응시켰다. 음성대조군으로는 cDNA를 넣지 않은 mixture를 사용하였으며 각 시료에 대한 PCR은 triplicate로 수행하였다. PCR 결과를 Rotor-Gene6 software (Corbett research)를 이용하여 분석하였다.

## 6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

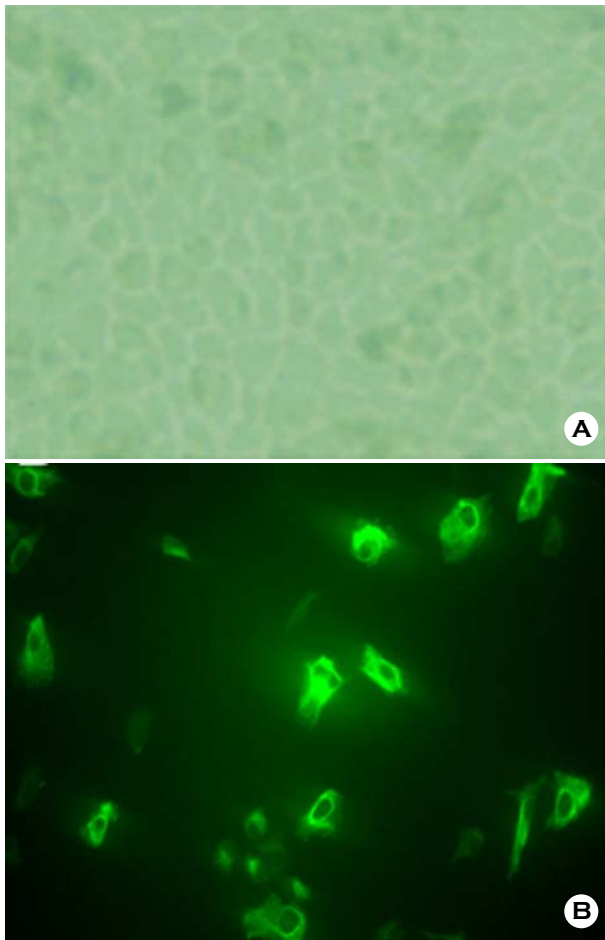
배양된 색소망막상피세포를 LPS가 함유된 배지에 넣고 나서 24시간 배양한 후 배양액을 수거하여 미세 원심관에 옮겨 담았다. 미세 원심관을 원심분리하여 배양액내에 함유된 세포들을 침전시킨 후 상층액을 수거하여 ELISA를 시행하였다. 간략히 기술하면 ELISA plate에 IL-8에 대한 capture antibody (R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 coating한 후 실온에서 하루밤 동안 방치하였다. 우혈청 알부민 (bovine serum albumin)을 이용하여 blocking을 시행하고 나서 각 well에 수거해둔 배양액을 넣고 실온에서 2시간 동안 방치하였다. Plate를 세척한 후 biotinylated anti-IL-8 antibody (R & D systems)를 넣고 실온에 2시간 동안 반응시킨 후 세척하였다. Streptavidin-HRP를 넣고 20분간 반응시킨 후 세척하고 나서 *o*-phenyldiamine (OPD) 용액을 넣고 어두운 곳에 두었

다. 10분이 지난 후 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣고 잘 섞어준 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 시약을 이용하여 측정된 IL-8를 정량하였다.

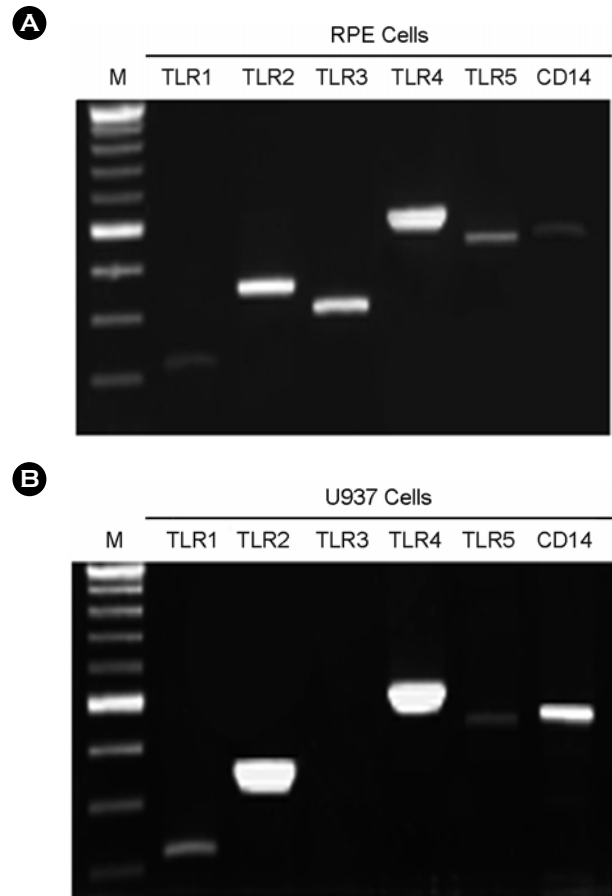
## 결 과

### 1. 사람 망막색소상피세포의 배양 및 TLR 발현

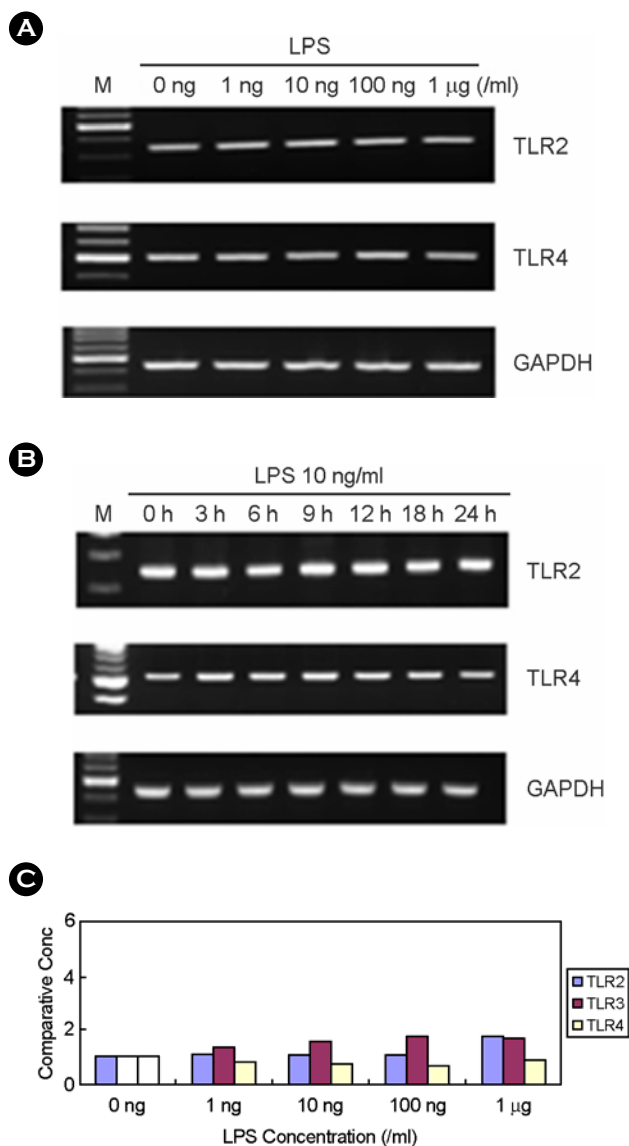
분리한 망막색소상피세포를 배양한지 1주일 후부터 플라스크 바닥에 검은 색소들이 침착된 것을 육안과 현미경으로 관찰할 수 있었다. 세포는 바닥에 붙어 있었으며 위상차현미경 관찰 시에 대부분의 세포는 육각형 모양을 하고 있었고 (Fig. 1A), trypsin을 처리하였을 때 세포의 pellet이 검은색을 띄고 있었다. 세포를 anti-pancytokeratin antibody를 이용하여 염색하였을 때 95% 이상의 세포에서 양성으로 나타났다 (Fig. 1B).



**Figure 1.** Culture of human fetal RPE. (A) Phase contrast microscope  $\times 100$  (B) Indirect immunostaining of pan-cytokeratin in primarily cultured human fetal RPE.



**Figure 2.** The expression of TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, and CD14 in human fetal RPE and U937. (A) The human fetal RPE were cultured in DMEM containing 10% serum. Total RNA was isolated and RT-PCR was performed. (B) The U937 cells were cultured in RPMI 1640 containing 10% serum. Total RNA was isolated and RT-PCR was performed.



**Figure 3.** The effect of LPS on TLR2, TLR3, and TLR4 expression in human fetal RPE. (A) After LPS treatment for 7h at variable dosages, total RNA was isolated and RT-PCR was performed. (B) After treatment with 10 ng/ml of LPS, total RNA was isolated and RT-PCR was performed. (C) After LPS treatment for 7h at variable dosages, real time PCR was performed using primers of GAPDH, TLR2, TLR3, and TLR4. Comparative expression levels were calculated.

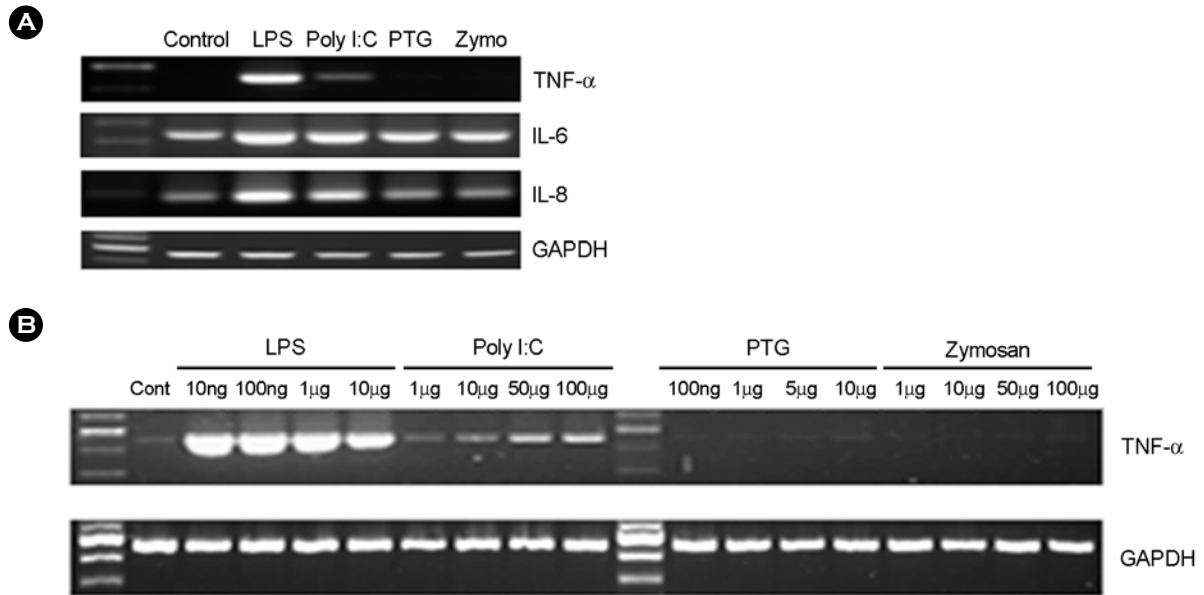
배양된 세포로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR로 TLR들과 CD14의 발현을 조사하였다 (Fig. 2). 망막색소상피에서 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5가 발현되고 있었고 U937에 비교해서 TLR3가 많이 발현되고 있었다. 망막색소상피에서 CD-14 분자도 발현되고 있으나 U937에 비해서 매우 낮은 수준이었다.

## 2. LPS가 TLR2, TLR4 발현에 미치는 영향

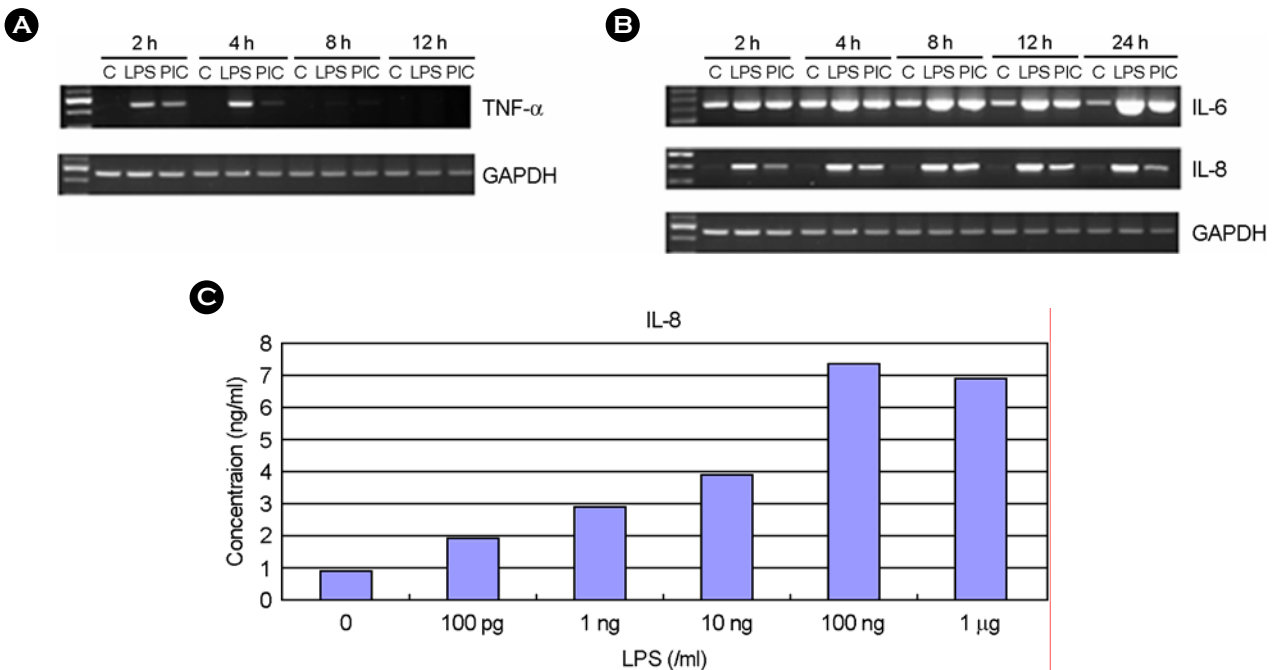
망막색소상피에서 세균 세포벽 성분인 LPS가 TLR2 혹은 TLR4 발현을 변화시키는지 RT-PCR로 살펴보았다. 자극 받지 않은 망막색소상피에서 TLR2와 TLR4는 일정하게 발현되고 있었으며, LPS 농도를 1 ng/ml부터 1 µg/ml까지 증가시켜서 7시간 동안 처리하였을 때 발현이 변화되지 않았다 (Fig. 3A). 또한 10 ng/ml의 LPS를 첨가한 후 3시간부터 24시간까지 확인하였을 때도 TLR2와 TLR4 발현은 변화되지 않았다 (Fig. 3B). LPS가 TLR를 발현에 미치는 영향을 정확히 확인하기 위해서 real-time RT-PCR을 사용하였다. LPS를 1 ng/ml부터 1 µg/ml의 농도까지 처리하였을 때 TLR4의 발현 양에 현저한 변화는 보이지 않았으며, TLR2와 TLR3는 약간 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 3C).

## 3. 미생물 성분들이 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 유전자 발현에 미치는 영향

세균 성분인 LPS, peptidoglycan과 진균 성분인 zymosan, 바이러스 성분인 poly I:C를 이용하여 망막색소상피를 자극한 후 RT-PCR을 이용하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8의 발현을 분석하였다. 6 well plate에 배양된 각 망막색소상피에 50 ng/ml의 LPS, 100 µg/ml의 poly I:C, 10 µg/ml의 peptidoglycan, 100 µg/ml의 zymosan을 첨가한 후 3시간이 지난 후에 RNA를 분리하였다. TNF- $\alpha$  발현은 LPS를 처리한 세포에서 현저히 증가하였고 poly I:C 처리군에서도 약간 증가하였다 (Fig. 4A). Peptidoglycan이나 zymosan을 처리한 경우에는 TNF- $\alpha$  발현이 유도되지 않았다. IL-6와 IL-8 발현도 LPS와 poly I:C 처리에 의해서 약간 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 4A). 각 미생물 성분을 다양한 용량으로 3시간 동안 처리한 후 TNF- $\alpha$  발현을 RT-PCR로 측정하였다. LPS로 처리한 경우에 10 ng/ml부터 10 µg/ml까지 용량을 증가하였을 때 TNF- $\alpha$  발현이 현저하게 증가하였으나 10 ng/ml과 100 ng/ml의 효과가 고용량에 비해서 더 큰 것으로 나타났다 (Fig. 4B). Poly I:C로 처리한 경우에는 10 µg/ml부터 TNF- $\alpha$  발현이 유도되었으며 이는 용량 의존적이었다 (Fig. 4B). Peptidoglycan를 처리한 경우에는 100 ng/ml부터 10 µg/ml까지 다양한 용량에서도 TNF- $\alpha$  발현이 유도되지 않았다. Zymosan으로 처리한 경우에도 1 µg/ml부터 100 µg/ml의 용량에서 TNF- $\alpha$  발현이 유도되지 않았다 (Fig. 4B). LPS로 처리하거나 poly I:C로 처리하였을 때 TNF- $\alpha$ 의 증가는 자극한 후 2시간에서 4시간 사이에 가장 많은 증가를 보였다 (Fig. 5A). IL-6는 자극하지 않은 상태에서도 발현되고 있었고 LPS와 poly I:C 처리에 의해서 발현이 증가하였는데 이 효과는 24시간까지 지속되었다 (Fig. 5B). IL-8은 LPS, poly I:C 처리에 의해서 발현이 증가하였고 이



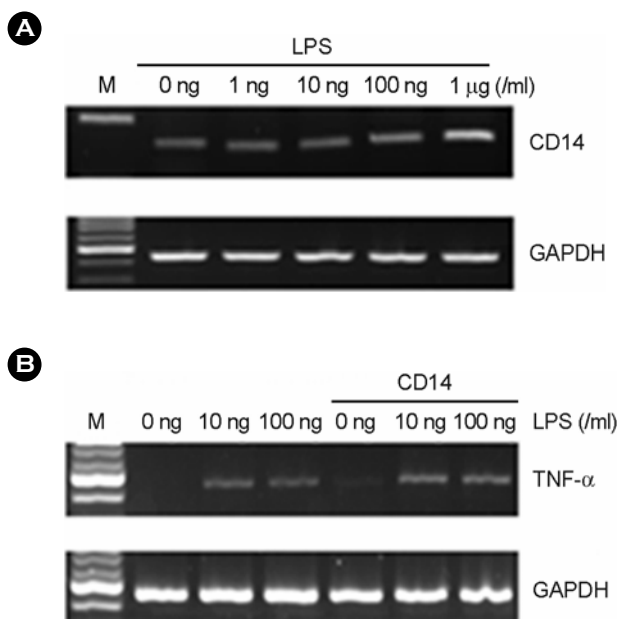
**Figure 4.** The effect of microbial components on cytokine expression in human fetal RPE. **(A)** The human fetal RPE was cultured in the presence or absence of LPS (10 ng/ml), poly I:C (50 μg/ml), peptidoglycan (100 ng/ml), or zymosan (100 μg/ml) for 3h. Total RNA was isolated and mRNA levels of TNF-α, IL-6, and IL-8 were analyzed by RT-PCR. **(B)** The human fetal RPE was treated with variable dosages of LPS, poly I:C, peptidoglycan, or zymosan for 3h. The levels of TNF-α mRNA were analyzed by RT-PCR. PTG; peptidoglycan, Zymo; zymosan.



**Figure 5.** The effect of LPS and poly I:C on TNF-α, IL-6, IL-8 expression. The human fetal RPE was incubated in the presence or absence of LPS (10 ng/ml) or poly I:C (50 ng/ml). At different time interval, total RNAs were isolated. Then, mRNA levels of TNF-α **(A)**, IL-6 and IL-8 **(B)** were analyzed using RT-PCR. **(C)** The cultures were incubated with LPS for 24h and culture supernatants were then harvested. The levels of IL-8 in the culture supernatants were measured using ELISA. PIC; poly I:C

효과는 LPS의 경우에는 2시간부터 나타나서 24시간까지 지속되었고 poly I:C는 2시간부터 나타나서 8시간에 최고치를

보였다 (Fig. 5B). LPS에 의한 IL-8의 분비를 측정하기 위하여 ELISA를 사용하였다. 세포를 24 well plate에 24~48시간



**Figure 6.** The effect of serum and soluble CD14 on LPS induced TNF- $\alpha$  expression in human fetal RPE. **(A)** After LPS treatment for 7h at variable dosages, total RNA was isolated and RT-PCR was performed. **(B)** The human fetal RPE was cultured in serum-free DMEM. After LPS treatment alone or with soluble CD14 (0.1 ng/ml) for 3h, total RNA was isolated. Then, mRNA levels of TNF- $\alpha$  were analyzed by RT-PCR.

동안 배양한 후 LPS를 첨가하고 나서 24시간이 지난 후에 배양액을 수거하였다. 배양액을 이용하여 IL-8에 대한 ELISA를 수행한 결과 LPS 100 pg/ml부터 IL-8 분비가 증가되었고 이는 100 ng/ml에서 최고치에 달했다 (Fig. 5C).

#### 4. 혈청과 soluble CD14 분자가 LPS에 의한 TNF- $\alpha$ 발현에 미치는 영향

TLR4와 함께 LPS를 인식하는 수용체인 CD14 분자의 발현이 LPS에 의해서 조절되는지 RT-PCR로 확인하였다. 망막색소상피에 LPS를 1 ng/ml부터 1  $\mu$ g/ml까지 용량을 변화하여 처리하였을 때 CD14 발현은 1  $\mu$ g/ml을 처리한 세포에서만 약간 증가하였다 (Fig. 6A). 혈청과 soluble CD14가 LPS에 의한 TNF- $\alpha$  발현에 미치는 영향을 보기 위하여 망막색소상피에 혈청이 없는 배지를 넣은 후 3시간 동안 LPS로 처리하고 나서 TNF- $\alpha$  발현을 RT-PCR로 측정하였다. 혈청 없는 배지에 배양된 망막색소상피에 LPS를 처리한 경우에 TNF- $\alpha$  발현은 유도되었으나 증가 정도는 미미하였다 (Fig. 6B). 혈청 없는 배지에 CD14를 0.1 ng/ml 농도로 첨가하고 나서 LPS를 처리하였다. CD14 첨가에 의해서 TNF- $\alpha$  발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 6B).

## 고찰

망막색소상피세포를 일차 배양할 때 관찰되는 현미경상의 특징은 육각형 혹은 다각형의 세포 모양과 멜라닌 형성에 의한 검은 색소의 침착이다. 안구에서 멜라닌을 형성할 수 있는 조직은 포도막, 홍채모양체, 망막색소상피이다. 18주에서 23주 사이에 임신이 중단된 태아의 안구로부터 망막색소상피세포를 분리, 배양한 결과 검은 색소가 침착된 육각형 모양의 세포가 관찰되었으며 cytokeratin에 대한 면역염색에서 95% 이상이 양성이었다. Cytokeratin은 대부분의 상피세포에 특이성을 보이는 표지분자 (marker)로 눈에서는 결막과 각막, 수정체 상피와 망막색소상피에서 볼 수 있다. 결막과 각막 그리고 수정체의 상피는 망막색소상피세포의 분리과정 중 제거되고, 박리과정 중 오염의 가능성이 있는 망막과 맥락막의 세포들은 cytokeratin에 염색되지 않으므로 순수한 망막색소상피세포가 분리, 배양된 것을 확인하였다. 망막색소상피에 관한 기존의 연구들은 세포주로 확립된 세포나 사망한 성인에서 분리 배양된 세포를 이용하였다. 본 실험의 망막색소상피세포는 노화의 영향과 항원자극을 받지 않은 상태를 반영할 것으로 생각한다.

TLR들은 미생물의 성분 중 잘 보존된 부분인 PAMP를 인식하여 면역반응에 관여한다 (1,25,26). 알려진 PAMP로는 LPS, lipoprotein, peptidoglycan, flagellin, zymosan, dsRNA, ssRNA, bacterial DNA 등이 있다. 사람에서 10가지 종류의 TLR들이 밝혀져 있으며 이 중에서 TLR2는 lipoprotein, peptidoglycan, zymosan을 인식하고, TLR4는 LPS를 인식하며 TLR3는 dsRNA를 인식한다 (1,25,26). TLR 발현은 세포마다 다르며 TLR4는 대식세포, 단핵세포를 비롯한 여러 세포들에서 발현되는 반면 TLR3는 혈액세포 중 수지상세포에 우세하게 발현된다 (19,29). 본 실험결과 배양한 사람 태아 망막색소상피세포에서는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5가 발현되고 있었고 U937과 비교할 때 TLR2와 TLR4 발현은 낮았으나 TLR3 발현은 현저하게 높은 결과는 사람 성인 망막색소상피를 대상으로 한 연구와 유사한 결과였다 (15). TLR3가 높게 발현되는 것은 사람 망막색소상피세포가 바이러스 감염에 대한 방어기전에 참여할 가능성을 제시하며, 이는 망막색소상피세포가 cytomegalovirus를 비롯한 바이러스 감염의 표적세포인 것과 연관이 있을 것으로 생각된다 (6).

LPS는 LPS binding protein과 결합한 후 대식세포 표면에 있는 TLR4-CD14에 결합하고 이후 MD2를 통한 signal pathway를 거쳐서 대식세포를 활성화시킨다 (24,25). TLR4는 LPS와 같은 외인성 미생물 성분뿐만 아니라 heat shock protein을 비롯한 내인성 인자들도 인식할 수 있어서 고유면역과정에

서 방어기전 외에 기타 염증성 질환과도 연관된다 (21). 눈에서는 각막, 포도막, 망막에서 TLR4가 발현된다 (5). 망막 색소상피 세포표면의 TLR4는 photoreceptor outer segment 탐식에 참여하므로, 망막에서 내인성 인자가 TLR4에 인식되어 활성산소대사물이나 염증매개 물질의 분비를 유도하여 포도막염이나 연령관련 황반변성, 증식성 망막염 등을 유발할 가능성이 제시되었다 (14). 실제로 최근의 연구에서는 TLR4의 특정한 변이형이 연령관련 황반변성의 위험을 높인다는 보고도 있었다 (30). 그러나 망막색소상피가 TLR4를 발현하는지, LPS를 인식하는지에 관해서는 상반된 보고들이 존재한다. 망막색소상피에서 ICAM-1, IL-6은 IL-1, TNF- $\alpha$ 에 의해서 증가되었으나 LPS에 의해서 영향받지 않았다는 결과 (9, 20)가 있는 반면, CD14와 TLR4가 협력하여 LPS를 인식하고 그 결과로 IL-8을 분비한다는 결과도 있다 (7,8). 망막색소상피에서 TLR4가 표현되어 LPS를 인식한다는 보고와는 달리 Chang 등 (4)은 성인 사람의 안구에서 조직염색을 시행해 보았을 때 각막, 포도막, 망막의 상피세포는 TLR4-MD2 protein complex가 형성되지 않아서 눈의 면역관용상태를 유지할 것으로 보고하였다. 이런 상반된 결과는 사용된 조직의 차이에 기인할 수도 있고 실험 방법의 차이나 세포배양 유무에 따라 나타날 수 있다.

본 실험에서 사람 태아 망막색소상피에 LPS 처리는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 발현을 유도 혹은 증가시켰는데 특히 TNF- $\alpha$  발현이 현저하게 증가하였다. 이는 세균이 침입하였을 때 망막색소상피가 자극되어 염증매개 사이토카인과 chemotactic factor들을 분비하여 염증반응을 유발하는 결과를 가져올 수 있다. LPS에 의한 사이토카인의 증가는 기존의 성인 사람의 망막색소상피세포를 대상으로 한 결과와 일치하였다 (8). 그 반응의 강도는 현저히 낮았는데, 사용된 태아 망막색소상피가 미성숙해서 나타났거나 성인 망막색소상피가 과반응을 보였을 가능성이 있다. 본 실험에 사용된 조직은 임신 18주에서 23주 사이의 조직으로서 망막색소상피에 색소형성이 잘 되고 다각형 모양을 형성한 것으로 보아 일정 수준의 분화가 끝난 상태로 추정된다. 기존의 연구에 사용된 성인 망막색소상피의 경우 제공자의 연령이 높은 경우가 많은데 이는 망막의 경우는 사망한 후에만 제공이 가능하기 때문이다. 태아조직과 성인조직 간에 실험 결과의 차이는 성인조직에서는 지속적인 항원자극에 의해서 LPS에 대한 민감성이 증가했거나, 노화로 인한 조직변화로 인해서 나타났을 가능성이 있다. 성인 망막색소상피에서는 LPS에 의해서 TLR4가 증가하였으나 (8) 본 실험의 태아 망막색소상피에서는 LPS에 의한 feedback이 일어나지 않은 결과로 태아 망막색소상피에서는 성인에 비해서 LPS에 대한 반응성이 낮을 가능성을 제시한다.

LPS에 대한 세포활성화 기전에는 막에 부착된 CD14 분자가 필요하며 세포막에 CD14 분자가 없는 경우에는 혈청에서 제공되는 soluble CD14 분자가 필요하다. 본 연구에서 망막색소상피는 혈청이 없는 배지에서도 LPS에 반응하여 TNF- $\alpha$ 를 생성하였는데, 사람 성인의 망막색소상피에서 CD14 분자가 표현되어 기능한다는 결과에 부합되는 것이다. 그러나 성인세포에 비해서 태아세포는 TNF- $\alpha$  발현의 정도가 혈청이 포함된 배지를 사용하는 경우에 비하여 매우 낮았고 soluble CD14를 첨가한 경우에는 증가되어 태아 망막색소상피에서는 성인조직에 비해서 CD14 분자가 충분히 발현되지 않을 가능성을 보여준다.

Peptidoglycan은 세균 세포벽 성분으로 TLR2에 의해서 인식되는 것으로 알려져 왔으나 최근의 연구에서는 PAMP를 인식하는 또 다른 수용체인 nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)에 의해서 인식된다고 알려져 있다 (2,11,25). LPS와는 달리 peptidoglycan으로 처리된 사람 태아 망막색소상피에서는 TNF- $\alpha$  발현이 유도되지 않은 결과는 사람 망막색소상피에서 NOD가 표현되지 않거나 기능하지 않을 가능성을 제시한다. 또한 진균 세포벽 성분인 TLR2 agonist인 zymosan으로 처리한 경우에도 TNF- $\alpha$  발현이 유도되지 않았다. Zymosan은 TLR2/TLR6 heterodimer에 의해서 인식되는데 사람 태아 망막색소상피세포에서 TLR2 뿐만 아니라 TLR6는 발현되고 있으나 발현양이 U937에 비해서 적었다 (data not shown). 따라서 사람 망막색소상피에서 TLR2는 기능하지 않을 것으로 추정된다. 최근의 연구에서 zymosan은 TLR2 뿐만 아니라 또 다른 PAMP 수용체인 dectin-1에 의해서도 인식될 수 있다고 밝혀져 (10) 사람 망막색소상피에서는 dectin-1 역시 기능하지 않을 가능성이 있다.

사람 태아 망막색소상피에 TLR3 agonist인 poly I:C를 처리하였을 때 TNF- $\alpha$  발현은 증가하였으나 LPS를 처리한 경우에 비해서는 미미하였다. Poly I:C는 IL-6, IL-8의 발현을 증가시켰으므로 망막색소상피세포에 표현된 TLR3가 세포활성화 기능을 매개하는 것으로 생각된다. 바이러스에 흔히 노출되는 망막색소상피는 항바이러스 기전을 가지고 있을 것으로 생각되므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구에서 사람 망막색소상피에서는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, CD14가 발현되고 있었다. 특히 TLR3 agonist와 TLR4 agonist인 double stranded RNA와 LPS에 의하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8이 증가하였다. TLR들과 연관된 사이토카인 증가는 그람 음성세균과 바이러스에 대한 방어기전에 중요할 것이며, 또한 포도막염이나 연령관련 황반변성과 같은 질병의 발생과도 연관될 수 있어 TLR들의 기능에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.



## 참 고 문 헌

- 1) **Akira S**: Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin immunol* **15**: 5-11, 2003.
- 2) **Bourhis LL, Werts C**: Role of Nods in bacterial infection. *Microbes Infect* **9**: 629-636, 2007.
- 3) **Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL**: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* **285**: 732-736, 1999.
- 4) **Chang JH, McCluskey P, Wakefield D**: Expression of toll-like receptor 4 and its associated lipopolysaccharide receptor complex by resident antigen-presenting cells in the human uvea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 1871-1878, 2004.
- 5) **Chang JH, McCluskey PJ, Wakefield D**: Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. *Br J Ophthalmol* **90**: 103-108, 2006.
- 6) **Detrick B, Rhame J, Wang Y, Nagineni CN, Hooks JJ**: Cytomegalovirus replication in human retinal pigment epithelial cells. Altered expression of viral early proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**: 814-825, 1996.
- 7) **Elnor VM, Elnor SG, Bian ZM, Kindezelskii AL, Yoshida A, Petty HR**: RPE CD14 immunohistochemical, genetic, and functional expression. *Exp Eye Res* **76**: 321-331, 2003.
- 8) **Elnor SG, Petty HR, Elnor VM, Yoshida A, Bian ZM, Yang D, Kindezelskii AL**: TLR4 mediates human retinal pigment epithelial endotoxin binding and cytokine expression. *Trans Am Ophthalmol Soc* **103**: 126-135, 2005.
- 9) **Elnor VM, Scales W, Elnor SG, Danforth J, Kunkel SL, Strieter RM**: Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* **54**: 361-368, 1992.
- 10) **Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM**: Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**: 1107-1117, 2003.
- 11) **Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ**: Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**: 8869-8872, 2003.
- 12) **Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF**: Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes. *Prog Retin Eye Res* **20**: 29-48, 2001.
- 13) **Janeway CA Jr, Medzhitov R**: Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* **10**: 349-350, 1998.
- 14) **Kindezelskii AL, Elnor VM, Elnor SG, Yang D, Hughes BA, Petty HR**: Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments. *J Gen Physiol* **124**: 139-149, 2004.
- 15) **Kumar MV, Nagineni CN, Chin MS, Hooks JJ, Detrick B**: Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol* **153**: 7-15, 2004.
- 16) **Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT**: Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* **274**: 33419-33425, 1999.
- 17) **Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T**: Toll-like receptor 3: A link between Toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* **48**: 147-154, 2004.
- 18) **Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA**: A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397, 1997.
- 19) **Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A**: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* **164**: 5998-6004, 2000.
- 20) **Nagineni CN, Kutty RK, Detrick B, Hooks JJ**: Inflammatory cytokines induce intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA synthesis and protein secretion by human retinal pigment epithelial cell cultures. *Cytokine* **8**: 622-630, 1996.
- 21) **Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H**: Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* **164**: 558-561, 2000.
- 22) **Sen GC, Sarkar SN**: Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 1-14, 2005.
- 23) **Song PI, Abraham TA, Park Y, Zivony AS, Harten B**,

- Edelhauser HF, Ward SL, Armstrong CA, Ansel JC:** The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and Toll-like receptor 4 in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 2867-2877, 2001.
- 24) **Takeda K, Akira S:** TLR signaling pathways. *Semin Immunol* **16**: 3-9, 2004.
- 25) **Takeda K, Kaisho T, Akira S:** Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376, 2003.
- 26) **Ulevitch RJ, Tobias PS:** Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **11**: 19-22, 1999.
- 27) **Young RW, Bok D:** Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* **42**: 392-403, 1969.
- 28) **Young RW:** Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* **31**: 291-306, 1987.
- 29) **Zarembler KA, Godowski PJ:** Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* **168**: 554-561, 2002.
- 30) **Zareparsari S, Buraczynska M, Branham KE, Shah S, Eng D, Li M, Pawar H, Yashar BM, Moroi SE, Lichter PR, Petty HR, Richards JE, Abecasis GR, Elnor VM, Swaroop A:** Toll-like receptor 4 variant D299G is associated with susceptibility to age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* **14**: 1449-1455, 2005.
-