

## 사람 망막색소상피에서 Poly I:C가 Toll-like Receptor3와 사이토카인 발현에 미치는 영향

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

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

### The Expression of TLR3 and Cytokines Induced by Poly I:C in Human Retinal Pigment Epithelial Cells

Sun Ju Choi, Jongwook Kim<sup>1</sup>, Su Jung Park, Hyun Sook Park, Kyoung-Ho Lee, 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, Republic of Korea

Received : September 2, 2007

Accepted : September 20, 2007

In this study, we examined the expression of Toll-like receptor3 (TLR3) by human retinal pigment epithelial cells (RPE) and determined whether exposure to the TLR3 agonist polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) would induced the expression of cytokines in these cells. RT-PCR revealed that TLR3 was constitutively expressed in human RPE, and its expression was increased by treatment with poly I:C. After treatment with poly I:C, we determined the expression levels of pro-inflammatory cytokines in human RPE using RT-PCR and ELISA. We demonstrated that poly I:C treatment increased the production of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in human RPE. Upon exposure to poly I:C, human RPE initiated antiviral response resulting in the induction of IFN- $\beta$  mRNA expression and 2',5'-oligoadenylate synthetase mRNA expression. These results suggest that human RPE may participate in ocular defense mechanism against viral infection through TLR3.

**Key Words:** Toll-like receptor3; Poly I:C; Viral infection; Retinal pigment epithelium; Interferon

## 서 론

면역관용지역 (immune privileged region)으로 알려진 눈에서도 감염체에 대한 방어기전이 제한적으로 나타나는 데 대표적인 세포가 각막과 망막의 상피세포이다. 망막은 안구의 후안부에 위치하고 있으며, 망막색소상피세포 (retinal pigment epithelial cell; RPE)는 혈관 망막 장벽

(blood retina barrier)을 구성하고 있다 (28). 망막색소상피세포는 지리적으로 항원과 접촉하는 부위에 위치하므로 외부 항원에 대한 방어기전에 관여한다고 생각된다 (9). 특히 herpes simplex virus type I이나 cytomegalovirus 등의 바이러스는 각막과 망막의 상피세포를 감염시키며 망막이 감염된 경우에는 치료가 잘 되지 않아서 실명을 초래할 수 있다 (4).

Toll-like receptor (TLR)들은 미생물의 성분 중 잘 보존된 부분인 pathogen associated molecular pattern (PAMP)을 인식하여 선천면역반응에 관여한다 (1,11,20,26,27). 알려진 PAMP로는 LPS, lipoprotein, peptidoglycan, flagellin, zymosan, double stranded RNA (dsRNA), single stranded RNA (ssRNA), bacterial DNA 등이 있다. 사람에서 11가지 종류

\*교신저자: 박주영. 220-701, 강원도 원주시 일산동 162, 연세대학교 원주의과대학 미생물학교실 · 기초의학연구소  
Phone: +82-33-741-0322, Fax: +82-33-742-5034  
e-mail: joopark@yonsei.ac.kr

\*\*이 논문은 2004학년도 연세대학교 학술연구비 (신임교수연구비)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

의 TLR들이 밝혀져 있으며, 이 중에서 TLR1, 2, 4, 5, 6는 lipoprotein, peptidoglycan, LPS, flagellin과 같은 세균 성분을 인식하고, TLR9은 unmethylated DNA를 인식한다 (1,11,12,18,27). TLR3는 dsRNA와 유사한 polyinosine-polycytidylic acid (poly I:C)를 인식하므로 바이러스 감염에 대한 방어기전에 중요하다 (19). TLR3와 연관된 신호 전달 과정은 MyD-88 비의존적으로 NF- $\kappa$ B와 interferon regulatory factor (IRF)가 활성화되어 일어난다 (24).

바이러스 감염에 대한 방어기전에 interferon (IFN)의 역할이 중요한데 바이러스는 IFN- $\alpha$ - $\beta$ 와 interferon-inducible gene을 활성화한다. 바이러스 감염에 의해서 유도된 IFN은 2',5'-oligoadenylate synthetase (2',5'-OAS)를 비롯한 항바이러스 물질 합성을 유도하고 IFN- $\beta$ 는 TLR3를 증가시킨다 (15). 눈에서 TLR3에 관한 연구는 제한되어 있으며, 이 중에서 망막에 관한 대부분의 연구는 동물이나 성인 사람 조직으로 이루어져 왔다 (14). 망막의 경우는 사망한 후에만 채취가 가능하기 때문에 성인 망막색소상피세포의 경우 채취자의 연령이 높은 경우가 많다. 따라서 성인 조직에서는 지속적인 항원자극에 의해서 항원에 대한 민감성이 변화하거나, 노화로 인한 조직변화가 나타날 수 있다.

본 연구에서는 사람 태아의 망막색소상피세포에서 TLR3과 연관된 항바이러스 작용을 알아보고자 TLR3 ligand가 염증매개 사이토카인과 항바이러스 사이토카인에 미치는 영향을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사람 태아 망막색소상피세포의 분리과 배양

치료 목적으로 임신이 중단된 18주에서 23주 사이의 태아의 안구를 적출하여 망막색소상피층을 분리하였고 조직 및 세포분리 과정은 연세대학교 원주의과대학의 임상시험심사위원회의 규정에 따라 시행하였다. 망막색소상피세포의 분리는 기존의 방법을 이용하였다 (3). 간략히 기술하면, 적출된 안구에서 공막 주위의 결체조직과 외안근을 깨끗이 박리한 후 전안부 조직과 수정체를 제거하였다. 망막과 남아있는 유리체를 제거한 후 망막색소상피층을 분리하였다. 트립신을 이용하여 망막색소상피세포를 분리하였고 15% 우태아 혈청과 glutamine (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), HEPES (Life Technologies), 페니실린과 스트렙토마이신 (Life Technologies)이 함유된

DMEM에 부유시킨 후에 5% CO<sub>2</sub>가 함유된 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포의 순수성은 anti-pancytokeratin antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용한 간접면역형광 염색법으로 확인하였다. 모든 실험은 서로 다른 개체를 이용하여 3번 이상 반복하였다. U937 세포 (ATCC No. CRL-1593.2, Manassas, VA, USA)는 10%의 우태아 혈청이 함유된 RPMI 1640 (Life Technologies)을 이용하여 배양하였다.

### 2. LPS 혹은 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 떼어내고  $1 \times 10^6$ 개의 세포를 6 well plate에 넣어주고 나서 15% 우태아 혈청이 함유된 DMEM에서 24~48시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 혈청이 없는 DMEM 배지에 poly I:C (Amersham, Little Chalfont, UK, 50  $\mu$ g/ml)를 첨가하여 적절한 시간 동안 배양한 후 RNA를 분리하였다. LPS (Sigma)로 처리하는 경우에는 10% 우태아 혈청이 함유된 DMEM 배지를 사용하였다.

### 3. RNA 분리 및 cDNA 합성

전체 RNA는 Trizol 용액 (Life Technologies)을 이용하여 분리하였다. 간략히 기술하면, 배양세포를 PBS로 세척하고 Trizol 용액을 넣어 세포를 깬 후 chloroform 추출과 isopropanol 침전 과정을 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<sub>2</sub>를 혼합하여 20  $\mu$ l의 반응액을 만들었다. 이 반응액을 42°C에서 30분간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 두어 효소를 불활성화시키고 5°C에서 10분간 두었다가 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

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

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), TLR-3, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\beta$ , 2'5'-OAS에 대한 primer를 사용

**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	TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCTC	
TLR3	Forward	GATCTGTCTCATAATGGCTTG	304 bp
	Reverse	GACAGATTCCGAATGCTTGTC	
IFN- $\beta$	Forward	GTGTCAGAAGCTCCTGTGGC	456 bp
	Reverse	CTTCAGTTTCGGAGGTAACC	
2',5'-OAS	Forward	CAATCAGCGAGGCCAGTAATC	447 bp
	Reverse	CTTGACGATTTTGTGCCGCTC	

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-6: interleukin-6, IL-8: interleukin-8, TLR: toll-like receptor, IFN: interferon, 2',5'-OAS: 2',5'-oligoadenylate synthetase

하여 cDNA를 증폭하였다 (Table 1). PCR을 수행하기 위하여 cDNA 2  $\mu$ l, 10 X PCR buffer 5  $\mu$ l, 0.2 mM dNTP, 1.25 U Taq polymerase (Takara, Otsu, Shiga, Japan), 25 pmole primer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>를 넣어서 50  $\mu$ l의 반응액을 만든 후 94°C에서 30초, 55~60°C사이의 annealing temperature에서 30초, 72°C에서 1분간 25~30 cycle 동안 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 않는 혼합액을 사용하였으며, 각 시료에 대한 PCR은 triplicate로 수행하였다. PCR 결과를 Rotor-Gene6 software (Corbett Research)를 이용하여 분석하였다.

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

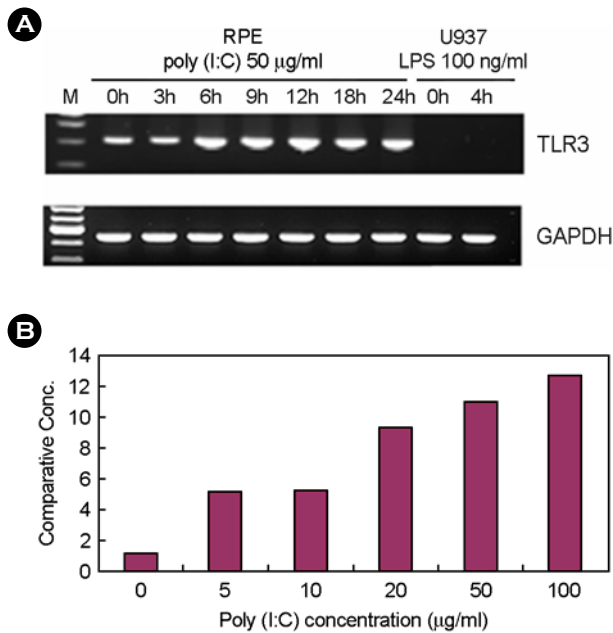
배양된 색소망막상피세포를 poly I:C가 함유된 배지에 넣고 나서 24시간 배양한 후 배양액을 수거하여 미세 원

심관에 옮겨 담았다. 미세 원심관을 원심분리하여 배양액내에 함유된 세포들을 침전시킨 후 상층액을 수거하여 ELISA를 시행하였다. 간략히 기술하면, ELISA plate에 IL-6에 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-6 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 두었다. 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. 표준시약을 이용하여 측정된 IL-6를 정량하였다.

## 결 과

1. 사람 망막색소상피세포에서 TLR3 발현 및 poly I:C 처리에 의한 발현 증가

망막색소상피세포로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR로 TLR3 발현을 측정한 결과, 망막색소상피세포는 TLR3를

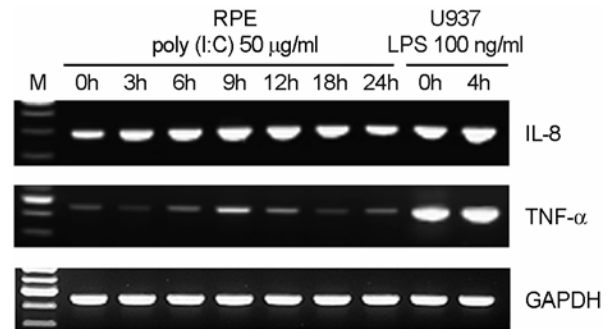


**Figure 1.** The effect of poly I:C on TLR3 expression in human fetal RPE. **(A)** After treatment with 50 µg/ml of poly I:C, total RNA was isolated and RT-PCR was performed. **(B)** After poly I:C treatment for 7h with various concentrations, real time PCR was performed using primer sets of GAPDH, and TLR3. Comparative expression levels were calculated.

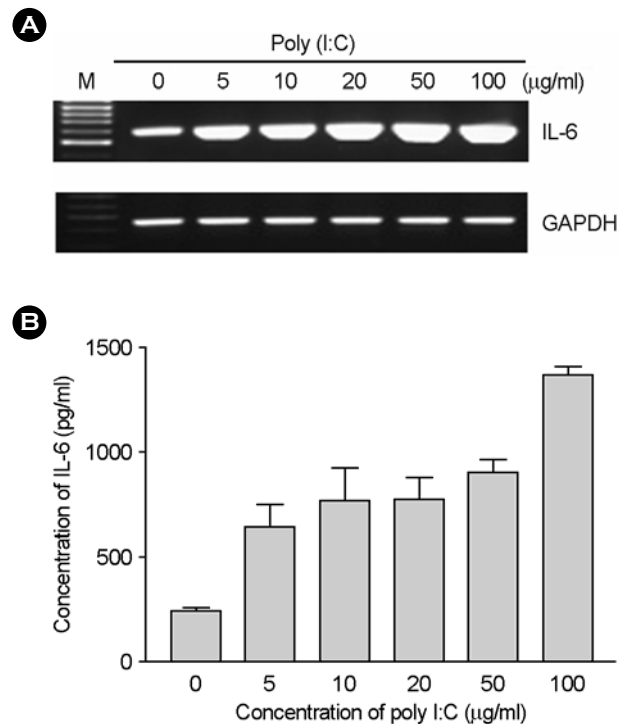
발현하고 있었는데 비해, histiocytic lymphoma에서 기원된 U937 세포에서는 TLR3가 발현되지 않았다 (Fig. 1A). 망막색소상피세포에서의 TLR3의 발현은 poly I:C 처리에 의해서 증가하였으며, 이는 50 µg/ml을 처리한 경우에 처리 후 6시간부터 증가하여 24시간까지 지속되었다 (Fig. 1A). Poly I:C가 TLR3 발현에 미치는 영향을 정확히 확인하기 위해서 real-time RT-PCR을 사용하였다. Poly I:C를 5 µg/ml부터 100 µg/ml의 농도까지 처리하였을 때 TLR3 발현이 지속적으로 증가하였다 (Fig. 1B).

2. TLR3 ligand가 사람 망막색소상피세포에서 pro-inflammatory cytokine들의 발현에 미치는 영향

TLR3와 연관된 면역반응을 측정하고자 TLR3 ligand인 poly I:C를 이용하여 망막색소상피세포를 자극한 후 TNF-α, IL-6, IL-8 발현을 RT-PCR 또는 ELISA로 측정하였다. 망막색소상피세포를 6 well plate에 배양하고 나서 5 µg/ml부터 100 µg/ml까지 처리한 후 7시간이 지난 후에 RNA를 분리하였다. Poly I:C를 처리한 군에서는 대조군에 비해서 TNF-α, IL-6, IL-8이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 2, Fig. 3A). 그러나 TNF-α 발현은 LPS 처리군에

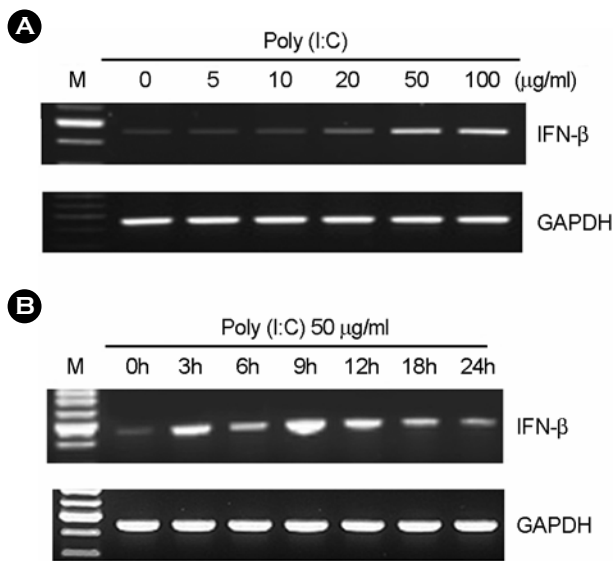


**Figure 2.** The effect of poly I:C on TNF-α and IL-8 expression. The human fetal RPE was treated with 50 µg/ml of poly I:C. At different time intervals, total RNAs were isolated. Then, mRNA levels of TNF-α **(A)**, and IL-8 **(B)** were analyzed using RT-PCR.



**Figure 3.** The effect of poly I:C on IL-6 production. **(A)** The human fetal RPE was treated with various doses of poly I:C for 7h. Total RNAs were isolated and mRNA levels of IL-6 was analyzed using RT-PCR. **(B)** The human fetal RPE was incubated with poly I:C for 24h and culture supernatants were then harvested. The levels of IL-6 in the culture supernatants were measured using ELISA.

비해서는 적게 유도되었다. IL-6 분비를 측정하기 위하여 ELISA 법을 이용하였다. 망막색소상피세포를 24 well plate에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 교환하고 나서 24시간 동안 poly I:C로 처리하였다. 배양액을 수거하여 IL-6에 대한 ELISA를 수행한 결과, poly I:C 5 µg/ml부터



**Figure 4.** The effect of poly I:C on IFN- $\beta$  expression in human fetal RPE. **(A)** After poly I:C treatment for 7h at variable dosages, total RNA was isolated and RT-PCR was performed. **(B)** After treatment with 50  $\mu$ g/ml of poly I:C, total RNA was isolated and RT-PCR was performed.

IL-6 분비가 증가되었고 이는 100  $\mu$ g/ml에서 최고치에 달했다 (Fig. 3B).

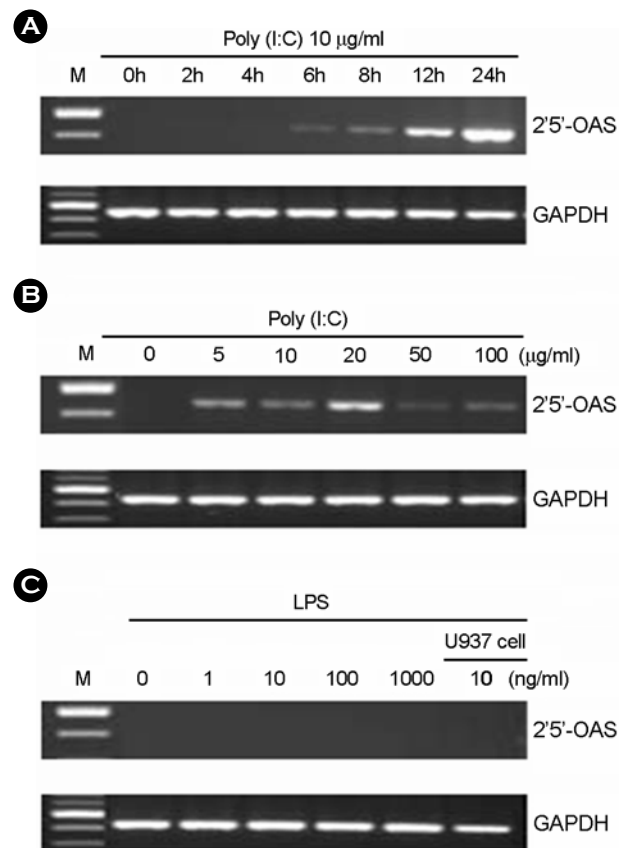
### 3. TLR3 ligand가 망막색소상피세포에서 IFN, 2',5'-OAS 발현에 미치는 영향

망막색소상피세포를 poly I:C로 처리한 후 IFN- $\beta$  발현 변화를 RT-PCR로 측정하였다. Poly I:C 처리 후 3시간부터 IFN- $\beta$  발현이 증가되었고, 이 효과는 50  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 군에서 현저하게 나타났다 (Fig. 4). 망막색소상피세포에 poly I:C를 처리한 후에 RNA를 분리하여 2',5'-OAS 발현을 측정하였다. Poly I:C 처리 후 8시간 이후부터 2',5'-OAS 발현이 증가하였다 (Fig. 5A, 5B). 2',5'-OAS 발현은 LPS에 의해서 유도되지 않았다 (Fig. 5C).

## 고 찰

본 연구 결과 사람 망막색소상피세포에서 TLR3 ligand인 poly I:C는 TLR3 발현을 증가시킴을 확인할 수 있었다. 또한 poly I:C는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8을 비롯한 염증매개 사이토카인 발현과 분비를 증가시켰을 뿐만 아니라 IFN- $\beta$ 와 2',5'-OAS 발현을 증가시켰다.

면역관용지역인 눈에서 각막과 망막의 상피세포는 외



**Figure 5.** The effect of poly I:C on 2',5'-OAS expression in human fetal RPE. **(A)** After poly I:C treatment for 7h with various concentrations, total RNA was isolated and RT-PCR was performed. **(B)** After treatment with 10  $\mu$ g/ml of poly I:C, total RNA was isolated and RT-PCR was performed. **(C)** After treatment with various concentrations of LPS, total RNA was isolated and RT-PCR was performed.

부 항원에 대한 일차방어선을 형성하며 감염체에 대한 방어기전을 가지고 있다. 망막색소상피세포는 면역에 관여하는 세포표면 수용체를 표현하며 염증물질로 자극받으면 사이토카인을 분비한다 (6,9). 망막색소상피세포에서 표현되는 표면 수용체로는 CR3, CR4, CD68, CD36과 같이 선천면역에 관여하는 것들과 CD16, HLA-DR, ICAM-1과 같이 항원특이 면역반응을 매개하는 것들이 있다 (9).

TLR family는 PAMP를 인식하여 일차적으로는 선천면역반응을 유도하고 이차적으로는 항원특이 면역반응을 유발한다 (20). TLR family들은 각각 고유한 PAMP를 인식하는데 대표적으로 TLR4은 LPS를, TLR1, 2, 6는 lipoprotein을, TLR5는 flagellin을 인식한다 (26,27). 또한 TLR3과 TLR7은 RNA를 인식하는 수용체로서 TLR3는 dsRNA를, TLR7은 ssRNA를 인식한다 (7,8,12,16). 눈에서도 TLR

family가 발현되어 기능한다고 보고되었는데 각막상피세포와 망막색소상피에서 TLR4가 발현되어 LPS를 인식한다는 보고와 TLR3가 발현되어 poly I:C 형태의 dsRNA를 인식한다는 보고가 있었다 (2,4,5,14,25). 기존의 연구들은 동물조직이나 사람성인의 세포를 사용하여 이루어졌는데, 성인조직의 경우는 지속적 항원자극과 노화로 인해 면역현상이 왜곡되어 나타날 수 있다. 본 연구에서는 임신 18주에서 23주 사이의 조직을 사용하였고, 배양된 세포에서는 망막색소상피세포의 특징인 멜라닌 색소형성과 다각형의 세포모양이 관찰되었다. 또한 anti-pancytokeratin 항체로 염색하였을 때 95% 이상의 세포가 양성반응을 보여 망막색소상피세포가 순수하게 분리된 것을 확인하였다. 먼저 망막색소상피세포에서 TLR3이 발현되고 있는 것을 RT-PCR로 확인하였고, 이는 지난 연구에서 확인한 바와 일치하였다 (3). TLR들은 세포에 따라 다르게 발현되는데, TLR3를 발현하는 세포는 매우 제한되어 있어 면역세포 중에서는 수지상세포에서만 발현되어 분화를 유도하며, 그 외에 대식세포, 다형백혈구, T 세포, B 세포, NK 세포 등에서는 발현되지 않는다 (21,29). TLR3 발현되는 조직으로는 태반, 췌장, 폐장, 간, 심장, 뇌 등이 있다 (22). TLR3가 dsRNA를 인식하면 IFN- $\beta$ 가 유도될 수 있고, 증가된 IFN- $\beta$ 는 TLR3 발현을 증가시키는 작용을 하여 항바이러스 반응이 증폭된다 (19). 본 연구에서 사용한 태아 망막색소상피세포에서 TLR3가 높게 발현되는 것은 성인 망막색소상피를 대상으로 한 연구와 유사한 결과였다 (14). 이 결과는 사람 망막색소상피세포가 바이러스 감염에 대한 방어기전에 참여할 가능성을 제시하며, 이는 망막색소상피세포가 herpes simplex virus type I과 cytomegalovirus를 비롯한 바이러스 감염의 표적세포인 것과 연관이 있을 것으로 생각된다.

TLR3와 연관된 염증성 사이토카인 발현 유도를 알아보기 위하여 poly I:C를 사용하였다. Poly I:C는 합성된 dsRNA 분자로서 TLR3에 결합한다 (27). 망막색소상피세포에 poly I:C 처리는 TLR3 발현을 증가시켰고, 이는 용량 의존적으로 나타났다. 또한 poly I:C 처리는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8과 같은 염증매개 사이토카인 생성을 증가시켰다. IL-6는 대식세포와 T 세포의 분화와 활성화를 유도하는 사이토카인으로 세균과 바이러스 감염 및 다른 사이토카인에 의해서 유도된다 (9). 망막색소상피세포도 IL-1이나 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인으로 자극받으면 IL-6를 분비한다 (6). IL-8은 CXC family에 속하는 사이토카인으로

로 neutrophil을 모으들게 하는데, 망막색소상피세포에서는 LPS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 에 의해서 유도된다. 즉, 염증매개 사이토카인은 국소부위로 백혈구와 대식세포들을 비롯한 면역세포를 모으들게 하여 염증반응을 활성화하는데 망막색소상피에서는 염증매개 사이토카인 분비가 기저면(basal side)으로 편향되게 일어나서 면역관용이 유지되도록 한다 (10). 망막색소상피세포에 poly I:C를 처리하였을 때 IFN- $\beta$ 가 증가하였다. IFN- $\beta$ 는 type I IFN으로, type I IFN은 바이러스 감염의 초기단계에 증가하여 항바이러스 면역반응을 유도하는 사이토카인이다 (15). Type I IFN을 유도하는 가장 강력한 자극은 dsRNA이며, dsRNA와 TLR3가 결합하면 세포내 IRF가 활성화되어 IFN- $\beta$ 를 생성한다 (23). 망막색소상피세포에 poly I:C를 5  $\mu$ g/ml에서 100  $\mu$ g/ml까지의 다양한 농도로 처리하였을 때 IFN- $\alpha$ 는 발현 변화가 없었으나 (data not shown) IFN- $\beta$ 는 발현이 증가되었고, 이 효과는 50  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml에서 가장 높게 나타났다. 이는 각막상피세포에서 TLR3 ligand가 염증매개 사이토카인과 IFN 발현을 증가시킨다는 결과와 성인망막색소상피에서 TLR3 ligand가 IFN 발현을 증가시킨다는 결과와 일치하였다 (13,14). TLR3 발현 증가는 IFN- $\beta$ 에 의해서 유도되는 것으로 알려져 있으므로 망막색소상피세포에서 poly I:C에 의한 TLR3 발현 증가도 IFN- $\beta$ 에 의해서 유도된 것으로 생각된다. IFN- $\beta$ 에 의해서 유도되는 분자들은 2'5'-OAS와 myxovirus resistance gene와 같이 항바이러스 기전을 가지고 있는 것들이다. 2'5'-OAS는 바이러스 유전자의 복제 및 합성을 억제하는 분자로서 2'5'-OAS가 활성화되면 RNase L을 활성화한다. 활성화된 RNase L은 바이러스의 RNA를 분해하여 단백질합성을 억제한다 (17,23,30). 2'5'-OAS는 herpes virus, picornavirus, hepadna virus를 비롯한 바이러스 감염과 전파를 효과적으로 차단하는 것으로 알려져 있다. 안구조직 중에서는 각막상피세포에서 TLR3 ligand가 2'5'-OAS를 증가시킨다고 보고된 바 있으나 (13), 망막에서는 연구 결과가 보고된 바가 없다. 본 연구에서 망막색소상피에 poly I:C를 5  $\mu$ g/ml에서 100  $\mu$ g/ml까지의 다양한 농도로 처리한 경우에 2'5'-OAS가 증가되었으며, 이 효과는 20  $\mu$ g/ml에서 가장 높게 나타났다. LPS를 처리한 경우에는 2'5'-OAS는 증가되지 않았다. 사람 망막색소상피세포에서 poly I:C에 의해서 유도된 2'5'-OAS는 바이러스 감염에 대한 방어기전에 역할을 할 것으로 생각된다.

본 연구 결과 사람 망막색소상피세포는 TLR3를 발현

하고 있었으며, 이는 TLR3 ligand인 poly I:C에 의해서 증가되었다. 사람 망막색소상피세포에서 poly I:C는 염증매개 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 발현을 유도하였을 뿐 아니라 항바이러스 효과를 갖는 IFN- $\beta$ 와 2',5'-OAS 발현을 유도하였다. 이 결과는 망막색소상피에서 바이러스 감염에 대한 방어기전에 TLR3이 매개되어 작용할 가능성을 제시한다. 이는 바이러스성 망막감염에 대한 치료 전략 수립에 도움이 될 것으로 생각하며 이에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

### 참 고 문 헌

- 1) Akira S: Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**: 5-11, 2003.
- 2) 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.
- 3) Choi SJ, Lee KH, Park SJ, Kim J, Kim SK, Park JY: The Expression Pattern of Toll-like receptor (TLR) and Cytokine production to TLR Agonists in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Bacteriol Virol* **37**: 119-128, 2007.
- 4) 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.
- 5) Elnor SG, Petty HR, Elnor VM, Yoshida A, Bian Z-M, Yang DL, Kinzelzelskii AL: TLR4 mediates human retinal pigment epithelial endotoxin binding and cytokine expression. *Trans Am Ophthalmol Soc* **103**: 126-137, 2005.
- 6) 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.
- 7) Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**: 196-200, 2002.
- 8) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**: 740-745, 2000.
- 9) 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.
- 10) Holtkamp GM, Van Rossem M, De Vos AF, Willekens B, Peek R, Kijlstra A: Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol* **112**: 34-43, 1998.
- 11) Janeway CA Jr, Medzhitov R: Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* **10**: 349-350, 1998.
- 12) Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S: Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**: 499, 2002.
- 13) Kumar A, Zhang J, Yu FS: Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology* **117**: 11-21, 2006.
- 14) 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.
- 15) Le Bon A, Tough DF: Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* **14**: 432-436, 2002.
- 16) Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB: Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6646-6651, 2003.
- 17) Li XL, Blackford JA, Judge CS, Liu M, Xiao W, Kalvakolanu DV, Hassel BA: RNase-L-dependent destabilization of interferon-induced mRNAs. A role for the 2-5A system in attenuation of the interferon response. *J Biol Chem* **275**: 8880-8888, 2000.
- 18) 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.
- 19) Matsumoto M, Funami K, Oshimi H, Seya T: Toll-like receptor 3: A link between Toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* **48**: 147-154, 2004.
- 20) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr: A human homologue of the Drosophila Toll protein signals

- activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397, 1997.
- 21) **Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P and others**: 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.
  - 22) **Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JFA**: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 588-593, 1998.
  - 23) **Samuel CE**: Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**: 778-809, 2001.
  - 24) **Sen GC, Sarkar SN**: Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 1-14, 2005.
  - 25) **Song PI, Abraham TA, Park YM, 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.
  - 26) **Takeda K, Akira S**: TLR signaling pathways. *Semin Immunol* **16**: 3-9, 2004.
  - 27) **Takeda K, Kaisho T, Akira S**: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376, 2003.
  - 28) **Young RW, Bok D**: Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* **42**: 392-403, 1969.
  - 29) **Zarembek 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) **Zhou A, Hassel BA, Silverman RH**: Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* **72**: 753-765, 1993.
-