

All-trans retinoic acid가 면역세포의 Toll-like receptor 5 발현에 미치는 영향

김기형¹ · 박상준²¹CK치과병원, ²인제대학교 의과대학 부산백병원 구강악안면외과**Abstract** (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:481-9)

Effects of all-trans retinoic acid on expression of Toll-like receptor 5 on immune cells

Ki-Hyung Kim¹, Sang-Jun Park²¹CK Dental Hospital, ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Pusan Paik Hospital, College of Medicine, Inje University, Busan, Korea

Introduction: TLR-5, a member of the toll-like receptor (TLR) family, is a element of the type I transmembrane receptors, which are characterized by an intracellular signaling domain homolog to the interleukin-1 receptor. These receptors recognize microbial components, particularly bacterial flagellin. All-trans retinoic acid (atRA, tretinoin), a natural metabolite of vitamin A, acts as a growth and differentiation factor in many tissues, and is also needed for immune functions. In this study, THP-1 human macrophage-monocytes were used to examine the mechanisms by which atRA regulated the expression of TLR-5. Because the molecular mechanism underlying this regulation at the transcriptional level is also unclear, this study examined which putative transcription factors are responsible for TLR-5 expression by atRA in immune cells.

Materials and Methods: This study examined whether atRA induces the expression of TLR-5 in THP-1 cells using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and which transcription factors are involved in regulating the TLR-5 promoter in RAW264.7 cells using a reporter assay system. Western blot analysis was used to determine which signal pathway is involved in the expression of TLR-5 in atRA-treated THP-1 cells.

Results: atRA at a concentration of 10 nM greatly induced the expression of TLR-5 in THP-1 cells. Human TLR-5 promoter contains three Sp-1/GC binding sites around -50 bp and two NF- κ B binding sites at -380 bp and -160 bp from the transcriptional start site of the TLR-5 gene. Sp-1/GC is primarily responsible for the constitutive TLR-5 expression, and may also contribute to NF- κ B at -160 bp to induce TLR-5 after atRA stimulation in THP-1 cells. The role of NF- κ B in TLR-5 expression was further confirmed by inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) experiments, which greatly reduced the TLR-5 transcription by 70-80%.

Conclusion: atRA induces the expression of the human TLR-5 gene and NF- κ B is a critical transcription factor for the atRA-induced expression of TLR-5. Accordingly, it is conceivable that retinoids are required for adequate innate and adaptive immune responses to agents of infectious diseases. atRA and various synthetic retinoids have been used therapeutically in human diseases, such as leukemia and other cancers due to the antiproliferative and apoptosis inducing effects of retinoids. Therefore, understanding the molecular regulatory mechanism of TLR-5 may assist in the design of alternative strategies for the treatment of infectious diseases, leukemia and cancers.

Key words: Tretinoin, Toll-like receptor 5, Cellular immunity, NF-kappa B

[paper submitted 2010. 7. 27 / revised 2010. 11. 20 / accepted 2010. 12. 13]

I. 서 론

Toll-like receptor (TLR)는 원래 초파리의 발생과정에 관여하는 유전자로 처음 클로닝이 되었으며, 이후 많은 연구를 통하여 초파리의 innate immune response에도 관여한다는 사실이 밝혀졌다¹. 포유류에서도 Toll과 유사성을 가진

유전자를 찾게 되었으며, 사람에서 TLR가 1997년에 처음 클로닝 되어 현재까지 총 13종류의 TLR 유전자들을 발견하여 TLR family를 이루고 있다^{2,3}. TLR은 type I transmembrane signaling molecule로 innate immune system을 담당하는 세포에서 주로 발현된다. 이들 세포에서 TLR은 미생물의 특이적인 구조를 인식해서 면역반응을 일으키는 신호를 전달한다. TLR family에 속하는 수용체는 일반적으로 extracellular region에 leucine-rich repeat (LRR) motif가 있으며, interleukin (IL)-1 수용체와 구조가 비슷한 cytoplasmic domain이 존재한다. TLR은 extracellular domain을 통해서 pathogen-associated molecular patterns (PAMP)나 microorganism-associated molecular patterns (MAMP)를 인식하며, 그 결과 innate immune 세포에서 염증성 세포활성화를 유

박 상 준

614-735 부산광역시 부산진구 개금동 633-165

인제대학교 의과대학 부산백병원 구강악안면외과

Sang-Jun Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Pusan Paik Hospital,

College of Medicine, Inje University

633-165 Gaegum-dong, Busanjin-gu, Busan, 614-735, Korea

TEL: +82-51-890-6363 FAX: +82-51-895-9650

E-mail: ds5nki@hanmail.net

도한다⁴.

Vitamin A는 배발생(embryogenesis)의 조절 및 면역계의 활성 등을 포함하는 수많은 생물학적 효과들을 나타낸다^{5,6}. Vitamin A 유도체인 all-trans retinoic acid (atRA, RA or tretinoin)는 정상적인 세포성장, 분화, 발달, 재생산, 형태형성 그리고 항상성 유지와 같은 다양한 생물학적 과정에 작용하며⁷, 암세포의 무분별한 증식을 억제하고 분화를 유도하거나 세포자연사를 유발하여 암의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다⁸. 또한 면역계에 작용하여 면역활성을 증가시킨다고 알려져 있다. Israel 등⁹에 의하면 atRA를 제대혈에서 분리한 mononuclear cells과 polyclonal B-cell activator와 반응하여 IgM의 생산을 증가시킨다고 보고 하였다. 이와 같은 면역글로불린 분비의 증가는 T 및 B 세포에 대한 atRA의 효과에 의해 나타난다고 알려져 있다^{10,11}. 또한 vitamin A 결핍 생쥐에서 분리한 lymphocytes를 *in vitro*에서 자극하였을 때 interferon (IFN)- γ 의 생산을 증가시키는데 반하여 IL-4 및 IL-5의 생산은 감소시켰다¹². 이와는 반대로 vitamin A나 atRA는 IFN- γ 의 생산을 감소시키고 IL-5, IL-4 및 IL-10의 생산은 증가시킨다¹³. 이와 같이 vitamin A 결핍은 Th1 면역반응을 증가시키고, vitamin A 또는 retinoid의 처리는 Th2 반응을 증가시킨다고 알려졌다¹⁴. 이러한 atRA의 작용개념은 면역체계 전반에 특이적으로 작용하는 것으로 생각된다.

atRA의 세포 내 작용은 핵 내에 존재하는 수용체인 retinoic acid receptor (RAR)와 retinoid X receptor (RXR)에 의해서 매개된다¹⁵. 이들 RAR와 RXR는 steroid hormone receptor superfamily에 속하며 각각 3개의 subtype으로 RAR α , β , γ 와 RXR α , β , γ 가 있다¹⁶. 이들 수용체와 atRA의 결합은 선택적으로 이루어지는데, 9-cis retinoic acid와 atRA는 RAR와 결합하며, 13-cis retinoic acid는 RXR와 결합하여 작용한다¹⁷. 핵 내에서 atRA와 결합한 RA 수용체 복합체는 전사조절자로 작용하여 특정 유전자 부위인, retinoic acid response elements와 결합하여 여러 유전자의 발현을 증가 또는 감소시켜 세포성장을 조절한다. 아직까지 atRA의 작용기전에 대한 명확하게 밝혀지지 않았으며, 몇몇 연구자들에 의해서 activator protein (AP)-1의 활성화에 의해 세포성장억제가 유도된다고 보고된바가 있다¹⁸. 그러나 vitamin A 유도체가 이들 생물학적 작용의 조절에 관여하는 기작은 많은 부분에 있어서 불분명하다.

최근 연구에서 Liu 등¹⁹은 atRA가 primary human monocytes에서 TLR2의 발현을 감소시킨다고 보고하였다. 그러나 다른 TLR의 발현에 관여하는지, 그 작용기전에 관해서는 여전히 불분명하다.

따라서 본 연구에서는 human monocytic leukemia cell line (THP-1) 및 mouse leukemia monocyte macrophage cell line (RAW264.7) 면역세포주에 atRA를 처리하여 24시간 배양한 후 RNA를 분리하고, TLR 유전자들의 발현을 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하

여 측정하고, atRA에 의해 그 발현이 유도되는 TLR을 대상으로 atRA가 이들 유전자의 발현에 작용하는 신호전달경로 및 전사조절에 관여하는 조절인자를 밝히고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. atRA

atRA (Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA)를 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA)에 녹여 100 μ M stock solution으로 만들어 차광하여 -80°C에 보관하였다. Stock solution은 사용하기 직전에 0.5% fetal bovine serum (FBS) 배지에 원하는 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 세포주배양과 처리

사람과 생쥐의 면역세포주인 THP-1과 RAW264.7은 한국 세포주은행에서 구입하였다. 이들 세포주는 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지에 10% FBS와 antibiotics (Gibco BRL, Grand island, NY, USA)를 첨가하여, 37°C, 5% CO₂의 조건하에 배양기에서 배양하였다. 배지는 48시간마다 갈아주었다. 실험군 세포를 배양접시에 분주하고, 다음날 실험에 따라 적절한 농도의 atRA를 배지에 첨가하여 처리하였다. 제조군 세포에는 atRA 대신에 0.001% DMSO를 처리하였다.

3. RT-PCR

1) Primer 제작

Gene bank data를 기본으로 PCR Primer를 Table 1과 같이 주문제작하였다.

2) Total RNA 분리

각각의 조건에서 수확한 세포에 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 1 mL 씩 넣고 5분 동안 혼든 후 전체 양의 0.2 volume에 해당하는 chloroform을 첨가한 후 15초 동안 tube를 혼든 후 3분간 둔다. 이 혼합물을 4°C에서 15분간 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 취하여, 전체 양의 0.5 volume의 2-propanol을 첨가하고 이를 다시 4°C에서 15분간 두었다가 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 얻은 침전물에 70% ethanol 500 μ L을 넣어 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시키고 진공 건조하였다.

3) cDNA 합성

얻어진 RNA를 30 μ L의 diethyl pyrocarbonate-distilled water (DEPC-DW)에 용해시키고, 2 μ g의 RNA를 42°C에서

Table 1. Oligonucleotide primer sequence used in this study and products size of the amplified RT-PCR

Oligonucleotides	Sequence (5'→3')	Product size
hTLR-1	F : CGT AAA ACT GGA AGC TTT GCA AGA R : CCT TGG GCC ATT CCA AAT AAG TCC	889 bp
hTLR-2	F : GGC CAG CAA ATT ACC TGT GTG R : CCA GGT AGG TCT TGG TGT TCA	614 bp
hTLR-3	F : ATT GGG TCT GGG AAC ATT TCT CTT C R : GTG AGA TTT AAA CAT TCC TCT TCG C	319 bp
hTLR-4	F : CTG CAA TGG ATC AAG GAC CA R : TCC CAC TCC AGG TAA GTG TT	622 bp
hTLR-5	F : CAT TGT ATG CAC TGT CAC TC R : CCA CCA CCA TGA TGA GAG CA	445 bp
hTLR-6	F : TAG GTC TCA TGA CGA AGG AT R : GGC CAC TGC AAA TAA CTC CG	1108 bp
hTLR-7	F : AGT GTC TAA AGA ACC TGG R : CTT GGC CTT ACA GAA ATG	527 bp
hTLR-8	F : CAG AAT AGC AGG CGT AAC ACA TCA R : AAT GTC ACA GGT GCA TTC AAA GGG	637 bp
hTLR-9	F : TTA TGG ACT TCC TGC TGG AGG TGC R : CTG CGT TTT GTC GAA GAC CA	331 bp
hTLR-10	F : CAA TCT AGA GAA GGA AGA TGG TTC R : GCC CTT ATA AAC TTG TGA AGG TGT	659 bp
hGAPDH	F : TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG R : TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT	244 bp
mTLR-5	F : GCT CAA ACA CCT GGA TGC TCA R : TCC CAC CAC CAC CAC GAT GA	248 bp
mGAPDH	F : TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC R : GGC ATG GAC TGT GG TCAT GA	210 bp

(RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, TLR-5: Toll-like receptor-5, GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

1 μ L reverse transcriptase (TaKaRa, Shiga, Japan), 10 \times buffer 2 μ L, 10 mM dNTP 2 μ L (dNTP mix), oligo dT primer 1 μ L, RNase inhibitor 0.5 μ L, 25 mM MgCl₂ 4 μ L를 넣고 최종 반응량이 20 μ L 되게 조절하여 합성하였다.

4) PCR

RT-PCR에서 얻어진 1 μ L의 cDNA를 조건설정 후 증폭시켰다. PCR의 조건은 다음의 기본조건을 기준으로 i) 94°C에서 5분(initial denaturation), ii) 94°C에서 30초(denaturation), 58°C에서 30초 annealing), 72°C에서 30초(extension), iii) 72°C에서 7분(final extension)으로 수행하였으며, 2단계를 30회 반복 증폭하였다. 또한 예상 PCR 산물의 크기에 따라 extension 시간을 조절하였다.

5) Real-time PCR

얻어진 total RNA에 RNase-free DNase (RQ1 DNase, Promega, Madison, WI, USA)를 처리하여 genomic DNA를 제거한 후 RNA를 정량하였다. First-strand cDNA 합성은 SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 합성하였으며, Real-time RT-PCR은 SYBR Supermix kit 와 iCycler system (both from Bio-Rad iCycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 manufacturer's instructions에 따라 수행하였다.

6) 전기영동(electrophoresis)

Ethidium bromide 1 μ g/mL을 함유하는 1.5% agarose gel에 10 μ L의 reaction mixture를 전기영동하여 자외선조사로 확인하였다.

4. Western blot

Six well plates에 90% confluence를 이룬 THP-1 세포를 떼어내 원심분리하여 세포를 회수 하였다. 이 세포침전물에 100 μ L의 lysis buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 3 μ g/mL aprotinin, 2 μ g/mL pepstatin, 1 μ g/mL leupeptin)를

첨가한 후 4°C에서 20분간 lysis시켰다. 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 Bradford dye-binding assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질 농도를 결정하였다. 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel에 50 µg의 단백질을 전기영동하고, semidry blotter를 이용하여 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)에 이동시켰다. 그리고 비특이적인 결합을 줄이기 위하여, 1시간 동안 차단용액으로 반응시키고, 각각의 특이적인 항체인 ERK, JNK, p38 MAPK 및 phospho-ERK, JNK, p38 MAPK를 사용하여 반응시켰다. 각각의 단백질들은 HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:4,000)으로 탐지하였다. Membranes은 반응사이에 0.05% Tween 20이 함유된 Tris-buffered saline (10 mM Tris, 150 mM NaCl)으로 세척하였다. Chemiluminescence의 양은 LAS-3000 SYSTEM (Fuji Photo Film, Fuji, Japan)으로 측정한다.

5. Promoter constructs 제조

THP-1 세포에서 DNeasy Tissue Kit (Qiagen, GmH, Germantown, MD, USA)를 이용하여 human genomic DNA를 분리하였다. Genomic DNA로부터 표적 유전자를 PCR로 증폭하였고 증폭된 fragment는 TA-vector로 cloning하였다. TLR-5의 Promoter region에서 크기가 다른 promoter region을 적당한 제한효소를 이용하여 luciferase reporter vector인 pGL3 basic vector에 cloning 하였다. Construct의 제작에 사용된 primer sequence는 다음과 같다.

hTLR-5PF1: 5'-CCGGTACCGTCTGGAAGGCTCCTCTCT-3';

hTLR-5PF2: 5'-CCGGTACCACTGTGGCTCCCAGCTCTT-3';

hTLR-5PF3: 5'-CCGGTACCCAGCTCCCAAACATAT-3';

hTLR-5PF4: 5'-CCGGTACCACTGTGGAAGTCTGCAGAG-3';

hTLR-5PR: 5'-CCAAGCTTGCTCCTCCCGACGCAAAA-3'.

TLR-5 유전자의 5'-비전사 promoter 영역 내 전사인자 결합영역은 GenomeNet (<http://motif.genome.jp>)의 sequence motif search program을 이용하여 분석하였다.

6. Transient transfection과 luciferase assay

Plasmid DNA는 QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, GmH, Germantown, MD, Germany)를 이용하여 준비하였다. 24 well plate에 RAW264.7 세포를 60-70% confluence가 되게 배양한다. Plasmid DNA 0.8 µg과 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) 2 µL를 각각 Opti-MEM (GIBCO, NY, USA) 50 µL에 희석한다. 그리고 희석된 DNA와 Lipofectamine 2000을 혼합한 뒤, 상온에서 30분 반응시킨다. 세포가 배양된 plates는 serum-free medium으로 씻어주고 Opti-MEM 400 µL를 넣어준 후, 희석된 혼합액을 세포에 넣어준다. 37°C, 6시간 배양 후, 배지를 제거하고 10% FBS

가 들어있는 신선한 배지를 넣어주고, atRA를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Promega assay system (Promega, WI, USA)의 passive lysis buffer를 이용하여 세포를 lysis하고 dual luciferase reporter assay (Promega, WI, USA) 방법으로 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase assays는 Wallac 1420 multilabeling counter (Perkin Elmer, CT, USA)를 사용하여 결과를 얻었다.

III. 연구 결과

1. 면역세포에서 atRA에 의한 TLR 유전자의 발현분석

atRA가 TLR의 발현을 유도하는 기전을 조사하기 위하여 사람 monocyte-macrophage 계통 세포인 THP-1 세포를 이용하였다. THP-1 세포는 기본적으로 10종의 TLR을 다양한 농도로 발현하고 있었다.(Fig. 1. A) 이 세포에 10⁻⁸ M (10 nM) 농도의 atRA를 24시간 처리한 후 TLR의 발현변화를 RT-PCR로 확인하였다. atRA는 TLR-5와 -10의 발현을 크게 유도하는 반면에 TLR-2의 발현은 억제하였으며, 나머지 TLR의 발현에는 크게 영향을 주지 않았다.(Fig. 1. A) atRA에 의한 TLR-2 발현의 감소는 Liu 등¹⁹이 보여주었던 결과와 유사하였다. TLR-5의 발현을 Real-time PCR을 이용하여 정량분석한 결과 atRA가 처리되었을 때 그 발현이 7 배 이상 증가되었음을 확인할 수 있었다.(Fig. 1. B)

2. 사람면역 및 암세포들에서 atRA에 의한 TLR-5의 발현 분석

THP-1세포를 이용한 선행연구에서 atRA가 TLR-5의 발현을 크게 유도하였기 때문에 이 결과가 모든 세포에서 공통적으로 일어나는가를 확인하기 위하여 다양한 사람세포에 atRA를 처리하여 보았다. TLR-5는 사람면역세포(Molt4, EBV-B, Raji, U937)와 암세포(Huh7, HepG2, SKBR3, HBL-100, Hela, 293T, A549, A431, Colo201)들은 기본적으로 TLR-5를 다양한 농도로 발현하고 있었다.(Fig. 2) 이들 세포를 10⁻⁸ M 농도의 atRA로 24시간 동안 처리한 후 RT-PCR 분석한 결과 TLR-5의 발현은 면역세포인 EBV-B 및 U937에서 소량 증가하였다. 그러나 나머지 암세포주에서는 TLR-5의 발현에 영향을 주지 않았다.(Fig. 2) 이 결과에서 atRA는 주로 면역세포에 작용하여 TLR-5의 발현을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

3. 생쥐면역세포에서 TLR-5의 발현분석

atRA에 의한 TLR-5의 발현이 이종간에도 동일한 현상을 나타내는지 확인하기 위하여 생쥐 monocyte-macrophage 계통 면역세포인 RAW264.7 세포에 동일한 조건으로 처리하였다. atRA로 처리한 RAW264.7 세포는 THP-1 세포와

유사하게 생쥐 TLR-5의 발현을 유도하였다.(Fig. 3. A) 이 결과는 사람 THP-1 세포와 생쥐 RAW264.7 세포에 atRA 처리 시 동일한 전사조절이 이루어지고 있음을 의미한다. atRA 처리 시 활성화되는 전사조절인자를 예측하기 위하여 NF- κ B, CRE, AP-1, SRE, c-Jun 및 c-Myc 전사조절인자 결합 부위를 포함하는 luciferase 벡터를 RAW264.7 세포에

트랜스펙션(형질전환)시킨 후 atRA를 처리하여 발현정도를 측정하여 보았다. atRA는 NF- κ B 결합 부위를 포함하는 plasmid의 발현을 3배 이상 증가시켰다. 또한, SRE와 c-Myc을 포함하는 plasmid의 발현을 2배 이상 증가시켰으나, CRE, AP-1, c-Jun을 포함하는 plasmid의 발현에는 크게 영향이 없었다.(Fig. 3. B) 이 결과는 atRA에 의한 TLR-5 유전

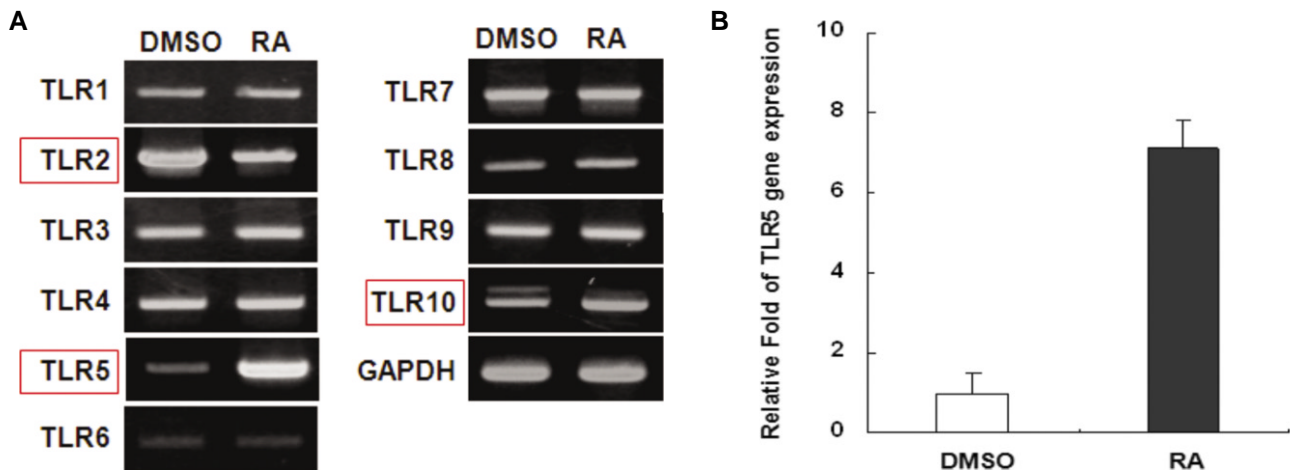


Fig. 1. Effect of all-trans retinoic acid on the expression of Toll-like receptors in THP-1 cells. A. THP-1 cells were stimulated with a 10^{-8} M concentration of RA for 24 hours. Total RNAs were isolated from the cells and analyzed for human TLR mRNA expression by RT-PCR. B. Gene expression of human TLR-5 was analyzed at the same condition by real-time PCR. (DMSO: dimethyl sulfoxide only, RA: retinoic acid, TLR: Toll-like receptor, GAPDH: glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, THP: human monocytic leukemia cell line, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction)

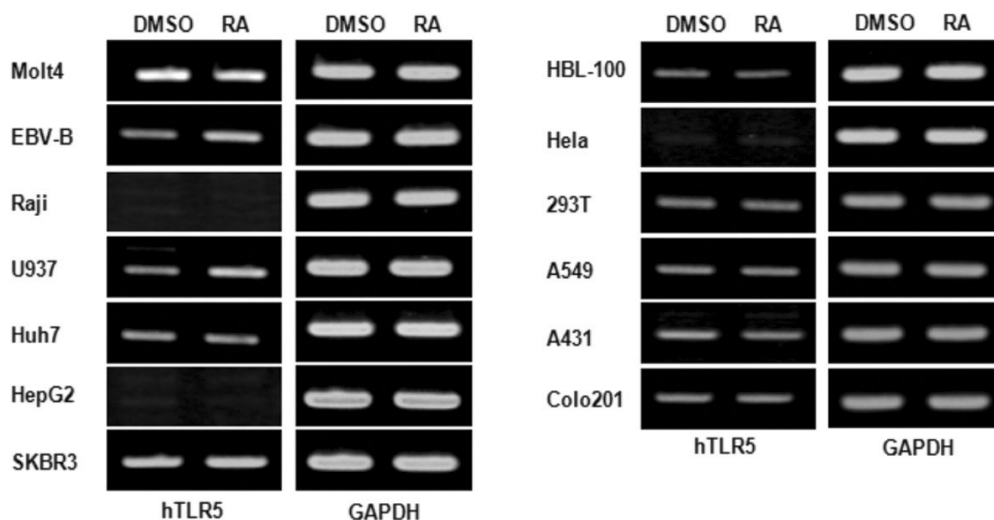


Fig. 2. Effects of all-trans retinoic acid on the expression of human TLR-5 gene on the various human cell lines. The various human immune and cancer cell lines including Molt4, EBV-B, Raji, U937, Huh7, HepG2, SKBR3, HBL-100, Hela, 293T, A549, A431, Colo201 cell were stimulated with a 10^{-8} M concentration of atRA for 24 hours. Total RNAs were isolated from the cells and analyzed for human TLR-5 mRNA expression by RT-PCR. (DMSO: dimethyl sulfoxide only, RA: retinoic acid, GAPDH: glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, TLR: Toll-like receptor, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction)

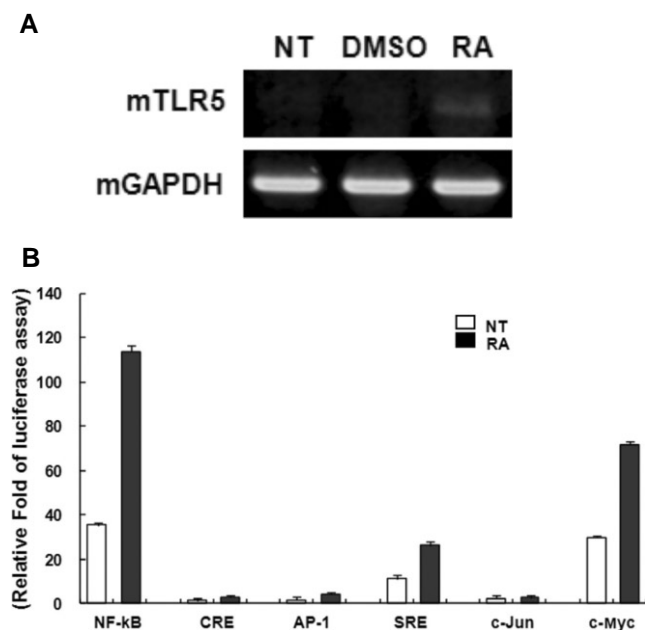


Fig. 3. All-trans retinoic acid (atRA) induces the expression of mouse TLR-5 gene on RAW264.7 cells. A. The mouse RAW264.7 cells were stimulated with a 10^{-8} M concentration of atRA for 24 hours. Total RNAs were isolated from the cells and analyzed for mouse TLR-5 mRNA expression by RT-PCR. B. Raw264.7 cells were transiently co-transfected with various promoter constructs luciferase vector such as NF-kB, CRE, AP-1, SRE, c-Jun, and c-Myc with pRL CMV. After 6 hours of transfection, the cells were left untreated or treated with 10^{-8} M atRA for the last 24 hours. Relative luciferase activity was determined as described in materials and methods. Results are represented as means \pm SD of a representative experiment performed in triplicate. (DMSO: dimethyl sulfoxide only, RA: retinoic acid, GAPDH: glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, TLR: Toll-like receptor, RAW: mouse leukemia monocyte macrophage cell line, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, CMV: cytomegalovirus, SD: standard deviation)

자의 발현에 NF-kB, SRE, c-Myc 전사조절인자가 단독 또는 공동으로 작용할 가능성을 보여준다.

4. TLR-5 발현에 관여하는 신호전달인자 분석

atRA에 의한 TLR-5 유전자의 발현에 NF-kB, SRE, c-Myc 전사조절인자 중 어떤 인자가 관여하는지 알아보기 위하여 다양한 종류의 신호전달 저해제(signal inhibitor: PDTC (NF-kB inhibitor), SP: SP600125 (JNK inhibitor), PD: PD98059 (ERK inhibitor), SB: SB203580 (p38 inhibitor), LY: LY294002 (PI3K inhibitor), AG: AG490 (JAKII inhibitor))를 전처리한 후 atRA에 의한 TLR-5의 발현을 조사하였는데, atRA에 의해 유도된 TLR-5의 발현은 NF-kB 저해제인

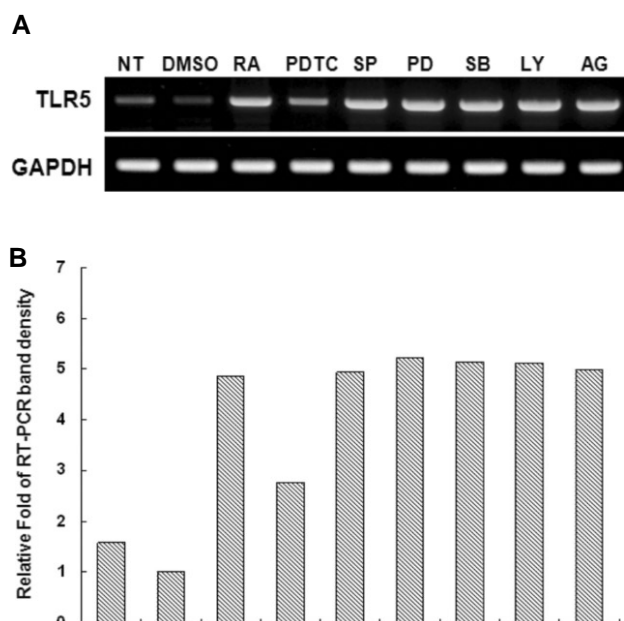


Fig. 4. Effect of various signaling inhibitors on all-trans retinoic acid (atRA)-induced TLR-5 expression. A. THP-1 cells were pretreated for 0.5 hour with the indicated inhibitors and then stimulated with 10^{-8} M atRA in the presence or absence of the same inhibitor for an additional 24 hours. Total RNAs were prepared and analyzed by RT-PCR for TLR-5 or β -actin.

(NT: no treatment, DMSO: dimethyl sulfoxide only, PDTC: pyrrolidine dithiocarbamate (NF-kB inhibitor), SP: SP600125 (JNK inhibitor), PD: PD98059 (extracellular signal-regulated kinase inhibitor), SB: SB203580 (p38 inhibitor), LY: LY294002 (PI3K inhibitor), AG: AG490 (JAKII inhibitor), GAPDH: glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, TLR: Toll-like receptor, THP: human monocytic leukemia cell line, RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction)

pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)의 처리에 의해서만 감소되었다.(Fig. 4) 이 결과는 TLR-5의 유전자 발현에 전사조절인자 NF-kB가 중요하게 작용하고 있음을 보여주는 것이다. 세포를 수확하여 ERK, JNK 및 p38 MAPK의 활성을 분석하여 보았다. atRA는 ERK를 120분에서 phosphorylation 시켰다. 또한 JNK도 15분에 활성화되어 120분까지 내 신호전달경로를 분석하기 위하여 atRA 처리 후 주어진 시간단위별로 지속적으로 phosphorylation을 증가시켰으나 p38 MAPK의 활성화에는 영향을 미치지 않았다.(Fig. 5) 이 결과에서 tumor necrosis factor (TNF)- α 나 Fas ligand (FasL)와 같은 사이토카인이 초기(약 15분)에 ERK와 JNK를 최대로 활성화 시키는데 반해 atRA는 120분에 최대 활성을 보여 후반부에 작용함을 알 수 있었다.

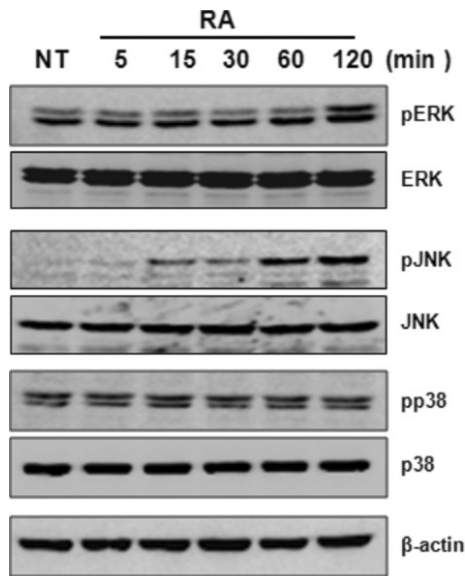


Fig. 5. Effects of all-trans retinoic acid (atRA) on the activation of ERK, JNK, and p38 MAPK in THP-1 cells, THP-1 cells were serum-starved for 12 hours, stimulated with atRA (10^{-8} M) for the indicated times, and then lysed. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE and then subjected to Western blotting with an antibody against phosphorylated ERK, JNK, and p38 MAPK. The same membrane was stripped and reprobed with anti-ERK, anti-JNK, anti-p38 MAPK, and anti-actin antibody.

(THP: human monocytic leukemia cell line, NT: no treatment, RA: retinoic acid, ERK: extracellular signal-regulated kinase, JNK: MAPK: SDS-PAGE:)

5. 사람 TLR-5 프로모터의 재조합 및 특성 분석

atRA에 의해 발현이 유도되는 사람 TLR-5 유전자 발현의 중요한 전사조절인자를 밝히기 위하여 TLR-5 유전자의 5' 상위 프로모터 지역을 분석하여 보았다. TLR-5 promoter 1.3-kb 단편을 사람 genomic DNA로 부터 PCR을 통해 증폭하여 얻었고, luciferase reporter plasmid인 pGL3 basic vector로 재조합하였다. RAW264.7 세포에 TLR-5 promoter construct와 pRL CMV plasmid를 함께 형질전환하여 Luciferase assay로 promoter 활성을 측정하였다. Promoter 활성은 atRA (10 nM)를 24시간 동안 처리한 후 측정하였고, 처리하지 않은 형질전환체와 비교하였다. TLR promoter 염기서열을 -1,300 및 -1,200을 포함하는 construct들은 atRA 처리 시 luciferase gene 활성이 대략 2배 높게 유도되었다. -360을 포함하는 construct는 atRA 처리 시 luciferase gene 활성이 대략 2.5배 높게 유도되었으나 -150을 포함하는 construct는 1.5 배로 감소시켰다.(Fig. 6. A) 그러므로 TLR-5 promoter 부위에는 -380과 -160에 atRA에 의해 유도된 전사조절인자의 결합 부위가 존재할 것으로 사료되며, THP-1에서 atRA에 의한 TLR-5의 활성화에 중요한 전사조절인자일 것으로



Fig. 6. Promoter constructs and delineation of human TLR-5 promoter region. A. THP-1 cells were transiently cotransfected with various promoter constructs or empty luciferase vector with pRL CMV to compare transfection efficiencies. After transfection for 6 hours the cells were left untreated or treated with 10^{-8} M atRA for the last 24 hours. Relative luciferase activity was determined as described in materials and methods. Results are represented as means \pm SD of a representative experiment performed in triplicate. B. Nucleotide sequence of the promoter region of human TLR-5 gene. The 1,300 bp sequence of the 5'-flanking region of TLR-5 is shown. The putative transcription start site is indicated by +1 as shown mRNA sequences from GenBank accession number NM_003268. The arrow indicates the transcription start site. Underlined sequences are possible transcription factor binding sites, as predicted by GenomeNet.

(THP: human monocytic leukemia cell line, NT: no treatment, RA: retinoic acid, TLR: Toll-like receptor, CMV: cytomegalovirus, SD: standard deviation)

판단되었다. Promoter 분석 프로그램인 GenomeNet의 sequence motif search를 이용하여 TLR-5 유전자의 5' 상위 프로모터 지역을 분석한 결과 -380과 -160 사이에는 NF- κ B/Rel 결합 부위가 존재하는 것으로 밝혀졌으며(Fig. 6. B), 이 결과는 NF- κ B construct 및 inhibitor PDTC 처리 결과와 잘 일치함을 알 수 있었다.

IV 고찰

Vitamin A와 그 대사체인 atRA나 9-cis-retinoic acid는 광범위한 면역강화효과(immunopotentiating effects)를 가지고 있기 때문에 매우 유용한 물질로 간주되어왔다²⁰⁻²². 많은 연구들은 atRA가 T 및 B 세포의 활성화에 특히 효과가 있는 것으로 보고하고 있다^{11,23,24}. B-cell Ig의 생산에 atRA의 면역조

절효과들은 T 세포^{11,25}나 다른 세포들^{23,26,27}에 의해 생산된 사이토카인과 같은 soluble factors에 의해 나타난다는 보고도 있다. 그러나 atRA가 면역세포에 직접 작용하여 TLR-2의 활성을 억제한다는 보고도 있다¹⁹. 이 연구에서는 atRA가 면역세포에 작용하여 유전자 발현을 유도하는 기전을 이해하기 위하여 사람 monocytes-macrophages 계통의 THP-1 세포에서 TLR의 발현에 미치는 영향을 확인하고 그 작용기작을 밝히고자 하였다. atRA를 면역세포인 THP-1에 처리하였을 때 TLR-2의 발현은 현저히 감소하였다. 이는 Lui 등¹⁹이 수행해서 얻은 결과와 일치하였다. 또한 atRA는 TLR-5 및 -10의 발현을 크게 유도하였으며, 나머지 TLR의 발현에는 영향이 없었다. 동일한 유도기작이 다양한 세포에서 공통적으로 일어나는 기작인지 확인하기 위하여 사람면역세포 및 암세포에 동일한 방법으로 처리한 결과 면역세포계통에서만 유사한 발현유도가 발생됨을 알 수 있었다. atRA가 THP-1세포에서 TLR-5 유전자의 발현을 7배 이상 유도하였기 때문에 TLR-5 유전자를 대상으로 atRA의 작용기작을 분석하고자 하였다. THP-1 세포에 TLR-5 promoter constructs를 다양한 transfection reagent로 형질전환하였으나 그 효율이 5%에도 미치지 않아 동일한 monocytes-macrophages 계통의 생쥐 RAW264.7 세포를 이용하였다. RAW264.7 세포에 atRA를 처리한 결과 THP-1 세포와 동일하게 TLR-5 유전자 발현이 유도됨을 확인할 수 있었으며, 형질전환 효율도 30%에 달하는 것으로 확인되었다. TLR-5의 promoter 부위를 검색한 결과 -1,100 bp 부위에 RAR-related orphan receptor α 2 결합 부위가 존재함을 확인하고 이 부위가 atRA의 작용에 중요하게 작용할 것으로 예상하였다. 그러나 RAW264.7 세포에 -1,300 bp의 construct를 이용한 전사조절실험에서 이 부위는 전사조절에 크게 작용하지 않는 것으로 확인되었다. 이를 해결하기 위하여 기존에 알려진 다양한 promoter construct (NF-kB, CRE, AP-1, SRE, c-Jun, c-Myc)를 형질전환시킨 후 atRA를 처리하였을 때 NF-kB의 활성을 3배 이상 유도함을 확인할 수 있었다. 또한 NF-kB의 inhibitor인 PDTC를 처리하였을 때 TLR-5 유전자의 발현을 현저히 감소시켰다. 이 자료를 근거로 TLR-5의 promoter 부위를 검색한 결과 NF-kB 결합 부위가 2곳이 존재함을 확인할 수 있었다. 이 자료를 근거로 각각의 promoter construct를 제작하고 전사조절 실험을 한 결과 전사개시 부위에서 -380 bp에 존재하는 NF-kB 부위는 atRA에 영향이 없었으며, -160 bp 지역에 위치한 NF-kB 결합 부위가 중요하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 -50 bp 이내에 존재하는 Sp-1/GC 부위 및 NF-kB 부위가 TLR-5 유전자의 basal level 발현에 중요할 것으로 생각된다. Chen 등²⁸에 의하면 atRA는 THP-1 세포에서 수용체인 RXR- α 및 RAR- α 의 발현을 저해한다고 하였으며, 이 연구의 예비실험에서도 유사한 결과를 보여주었다. 이 자료를 기초로 THP-1 세포에 존재하는 atRA 유도 신호전달경로를 분석하기 위하여 ERK, JNK 및 p38 MAPK의 활성을 분석하여 보

았다. atRA는 ERK 및 JNK의 활성을 120분에 최대활성을 보여 TNF- α 나 FasL와 같은 사이토카인이 초기에 ERK와 JNK를 최대로 활성화시키는 것과는 다른 결과를 보이고 있어 후기에 작용함을 알 수 있었다. 이상의 결과를 확증하기 위하여 추가적으로 TLR-5 protein의 세포표면 발현 및 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 통한 NF-kB의 실질적인 결합을 증명하여야 할 것이다.

V. 결 론

이 연구에서 atRA는 면역세포인 THP-1에 작용하여 TLR-5 및 TLR-10의 발현을 크게 유도하였으며, TLR-2의 발현은 억제하였으나 나머지 TLR에는 영향이 없었다. TLR-5 유전자 발현을 유도하는 전사조절인자의 분석에서 atRA는 NF-kB의 활성을 유도하여 TLR-5 유전자의 발현을 유도함을 확인할 수 있었다. 또한 신호전달분석에서 atRA는 ERK와 JNK를 활성화 하였으며, 활성화시간은 사이토카인에 의한 유도시간보다는 늦게 나타났다. TLR-5의 promoter 염기서열 분석에서 -160 bp 부위에 위치한 NF-kB가 atRA에 의한 유전자의 활성화에 중요하며, -50 bp 전후에 위치한 Sp-1/GC 부위가 TLR-5 유전자의 기본 활성화에 중요할 것으로 사료된다.

이 결과는 면역활성을 유도하는 vitamin A 유도체의 임상 활용 및 TLR-5의 ligand인 flagellin을 이용한 면역활성연구에 유용한 정보를 줄 것으로 예상된다.

References

1. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988;52:269-79.
2. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
3. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:979-87; quiz 988.
4. Lee SJ, Lee S. Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:181-91.
5. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *N Engl J Med* 1984;310:1023-31.
6. Lotan R. Immunomodulatory effects of retinoids. *J Nutr Growth Cancer* 1986;3:57-65.
7. Lotan R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J* 1996;10:1031-9.
8. Hofmann C, Eichele G. Retinoids in development. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. *The retinoids: biology, chemistry and medicine*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press; 1994: 387-442.
9. Israel H, Odziemiec C, Ballow M. The effects of retinoic acid on immunoglobulin synthesis by human cord blood mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;59:417-25.
10. Wang W, Ballow M. The effects of retinoic acid on *in vitro* immunoglobulin synthesis by cord blood and adult peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol* 1993;148:291-300.
11. Ballow M, Wang W, Xiang S. Modulation of B-cell immunoglobulin synthesis by retinoic acid. *Clin Immunol Immunopathol*

- 1996;80:S73-81.
12. Cantorna MT, Nashold FE, Hayes CE. In vitamin A deficiency multiple mechanisms establish a regulatory T helper cell imbalance with excess Th1 and insufficient Th2 function. *J Immunol* 1994;152:1515-22.
13. Racke MK, Burnett D, Pak SH, Albert PS, Cannella B, Raine CS, *et al.* Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis IL-4 production correlates with improved disease course. *J Immunol* 1995;154:450-8.
14. Stephensen C, Rasooly R, Jiang X, Ceddia M, Weaver C, Chandraratna R, *et al.* Vitamin A enhances *in vitro* Th2 development via retinoid X receptor pathway. *J Immunol* 2002;168:4495-503.
15. Lee HY, Dohi DF, Kim YH, Walsh GL, Consoli U, Andreeff M, *et al.* All-trans retinoic acid converts E2F into a transcriptional suppressor and inhibits the growth of normal human bronchial epithelial cells through a retinoic acid receptor-dependent signaling pathway. *J Clin Invest* 1998;101:1012-9.
16. Sun SY, Yue P, Lotan R. Implication of multiple mechanisms in apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2000;19:4513-22.
17. Wan YJ, Cai Y, Magee TR. Retinoic acid differentially regulates retinoic acid receptor-mediated pathways in the Hep3B cell line. *Exp Cell Res* 1998;238:241-7.
18. Agadir A, Shealy YF, Hill DL, Zhang X. Retinyl methyl ether down-regulates activator protein 1 transcriptional activation in breast cancer cells. *Cancer Res* 1997;57:3444-50.
19. Liu PT, Krutzik SR, Kim J, Modlin RL. All-trans Retinoic acid down-regulates TLR2 expression and function. *J Immunol* 2005;174:2467-70.
20. Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. *The retinoids: biology, chemistry and medicine*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press; 1994:443-50.
21. Ross AC, Stephensen CB. Vitamin A and retinoids in antiviral responses. *FASEB J* 1996;10:979-85.
22. Ross AC, Hämmerling UG. Retinoids and the immune system. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. *The retinoids: biology, chemistry and medicine*. 2nd ed. New York, NY: Raven Press; 1994:521-43.
23. Ballow M, Xiang S, Wang W, Brodsky L. The effects of retinoic acid on immunoglobulin synthesis: role of interleukin 6. *J Clin Immunol* 1996;16:171-9.
24. Ballow M, Wang W. Retinoic acid (RA) induced enhancing effects on immunoglobulin (Ig) synthesis of human B-cells. *Pediatr Res* 1993;33:151A.
25. Ballow M, Xiang S, Greenberg SJ, Brodsky L, Allen C, Rich G. Retinoic acid-induced modulation of IL-2mRNA production and IL-2 receptor expression on T Cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:167-9.
26. Matikainen S, Serkkola E, Hurme M. Retinoic acid enhances IL-1 β expression in myeloid leukemia cells and in human monocytes. *J Immunol* 1991;147:162-7.
27. Blomhoff HK, Smeland EB, Erikstein B, Rasmussen AM, Skrede B, Skjønberg C, *et al.* Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells. *J Biol Chem* 1992;267:23988-92.
28. Chen Q, Ross AC. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. *Exp Cell Res* 2004;297:68-81.