

## 인간 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 유전자 발현에 있어 MAPK의 역할

고려대학교 의과대학 류마티스내과학교실<sup>1</sup>, 한양대학교 의과대학 류마티스병원<sup>2</sup>

지종대<sup>1</sup> · 이빛나라<sup>2</sup> · 김태환<sup>2</sup> · 우진현<sup>1</sup> · 최성재<sup>1</sup> · 이영호<sup>1</sup> · 송관규<sup>1</sup>

= Abstract =

### The Role of MAPK Signaling of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-induced CYP24 Expression in Activated Human Macrophages

Jong Dae Ji<sup>1</sup>, Bit-Na-Ra Lee<sup>2</sup>, Tae-Hwan Kim<sup>2</sup>, Jin-Hyun Woo<sup>1</sup>, Sung Jae Choi<sup>1</sup>,  
Young Ho Lee<sup>1</sup>, Gwan Gyu Song<sup>1</sup>

*Rheumatology, College of Medicine, Korea University<sup>1</sup>,  
The Hospital for Rheumatic Diseases, College of Medicine, Hanyang University<sup>2</sup>, Seoul, Korea*

**Objective:** Several important roles of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> have been recognized in the immune system. The availability of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> at the cellular level is significantly influenced by the relative abundance of enzymes to synthesize (CYP27B1) and catabolize (CYP24) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. In this study, we examined the effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on the expression of the CYP24 gene and the role of MAPK for the induction of CYP24 by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in activated human macrophages.

**Methods:** For obtaining human activated macrophages, we treated U937 cells with PMA and we cultured these cells for 24 hours to adhere. After 24 hours treatment with PMA, the differentiated cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), and then they were used for examining the effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on the expression of the CYP24 gene. The mRNA expressions of the vitamin-D<sub>3</sub> inducible genes were measured by real-time PCR, and the change of the protein expression by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> was measured by immunoblotting.

**Results:** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> significantly induced the expression of CYP24 in the U937 cells and the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-induced expression of CYP24 was strongly augmented in the PMA-differentiated U937 cells. The 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-induced expression of CYP24 was mediated by Erk1/2 and p38

<접수일 : 2010년 5월 15일, 수정일 (1차 : 2010년 6월 4일, 2차 : 2010년 6월 8일) 심사통과일 : 2010년 6월 9일 >

※통신저자 : 지 종 대

서울시 성북구 안암동 5가 126-1

고려대학교 의과대학 류마티스내과학교실

Tel : 02) 920-5489, Fax : 02) 922-5974, E-mail : jjdimesy@korea.ac.kr

본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 A084224).

MAPKs. Parallel to the induced expression of CYP24, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induced the expression and phosphorylation of the CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP  $\beta$ ).

**Conclusion:** In this study, we found that 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induced the expression of CYP24 via activation of MAPKs. These results suggest that MAPK inhibitors may be useful for the treatment of inflammatory conditions, in which active vitamin D<sub>3</sub> can be used as the therapeutic molecule, by increasing the availability of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

**Key Words:** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Macrophages, CYP24

## 서 론

1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)는 vitamin D<sub>3</sub>의 활성형으로 칼슘 항상성(calcium homeostasis)나 골 대사에 중요한 역할을 함이 알려져 있다. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 생물학적 작용은 비타민 D 수용체(vitamin D receptor, VDR)에 결합하여 나타나는데 최근 많은 연구에서 VDR이 림프구, 대식세포, 단핵구, 수지상세포를 포함한 면역계의 여러 세포에서 발현됨이 알려져 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 면역계에 작용하여 면역반응을 조절할 가능성이 제시되었다 (1). 실제로 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 직접적으로 T-helper-1 (Th1)이나 Th17 세포와 같은 염증성 T 림프구의 작용을 억제하고 CD4양성 T 림프구에서 IFN  $\gamma$  나 IL-2의 생성을 억제하며 B 림프구의 세포사멸을 유도하고 immunoglobulin의 생성을 억제한다. 또한 수지상세포의 분화 및 성숙을 억제하고 수지상세포에서 동시자극자 (costimulatory molecule)의 발현과 IL-12의 생성을 억제하며 조절 T 림프구(regulatory T cells, Treg)의 생성을 유도하는 tolerogenic DCs의 생성을 증가시킨다. 또한 류마티스관절염, 루푸스, 제1형 당뇨병, 다발성 경화증과 같은 자가면역질환의 동물 모델이나 실제 질환의 발병에 있어 vitamin D<sub>3</sub>의 결핍이 밀접한 연관이 있음이 보고되었고 vitamin D<sub>3</sub>의 투여에 의해 이들 질환의 발병 및 활성이 억제됨이 보고되었다 (2,3).

Vitamin D<sub>3</sub>는 간에서 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>)로 대사되는데 25(OH)D<sub>3</sub>는 생물학적 활성이 없어 주로 신장에서 25(OH)D<sub>3</sub>-1- $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1)에 의해 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 대사된 후 생물학적 활성을 갖게 되며 24-hydroxylase (CYP24)에 의해 불활성화된다. 세포수준에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 효과는 prohormone인 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>)의 농도와, 1,25

(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 생성(CYP27B1)과 분해(CYP24)에 관여하는 효소의 상대적 양(the ratio of CYP24 to CYP27B1), VDR의 발현 정도 등에 의해 결정된다 (4). 신장세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 CYP27B1의 발현을 억제하지만 이 같은 CYP27B1의 발현억제에 의한 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 음성 되먹임(negative feedback) 조절작용은 대식세포에서는 보이지 않는 것으로 알려져 있다 (5). 또한 대식세포에서는 IFN  $\gamma$  나 TLR ligands와 같은 염증물질에 의해 CYP27B1의 발현이 유도됨이 보고되었다. CYP24의 발현은 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 유도되고 IFN  $\gamma$ 에 의해 억제된다. 세포수준에서 활성형 vitamin D<sub>3</sub>의 availability는 이들 효소들의 상대적인 양에 의해 결정되므로 CYP27B1의 발현이 증가되거나 CYP24의 발현이 억제된다면 활성형 vitamin D<sub>3</sub>의 availability는 증가하게 된다. 최근의 여러 연구에서 이들 효소의 발현에 ERK1/2, JNK와 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)가 세포의 종류에 따라 다르게 관여함이 보고되었다 (6-8). 류마티스관절염과 같은 염증성 질환에서 단핵구/대식세포는 염증의 만성화와 관절과괴 등, 병의 경과에 중요한 역할을 하며 따라서 단핵구/대식세포를 표적으로 하는 치료가 효과가 있음은 잘 알려져 있다 (9). 단핵구/대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 유도되는 CYP24발현의 기전을 밝혀 그 과정을 억제한다면 소량의 vitamin D<sub>3</sub>의 투여만으로도 이들 염증성 질환에서 의미 있는 면역조절 효과를 얻을 수 있을 것이다.

본 연구자들은 활성화된 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 CYP24 유도에 의한 음성 되먹임 조절작용을 밝히고 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 유도의 세포 내 기전을 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. U937 세포의 배양 및 활성화된 대식세포로의 분화

인간 단핵구 세포주(human monocyte cell line)인 U937 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA)로부터 구입하여 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. U937 세포에 20 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 24 시간 처리하여 대식세포로 분화시켰다. 분화된 대식세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 유전자 발현 분석

U937 세포에 PMA를 24시간 처리하여 분화시킨 대식세포에 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Sigma, St. Louis, MO)를 24 시간 처리한 후 RNeasy Mini kit (Qiagen)를 이용하여 total RNA를 얻었다. total RNA는 a First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, Hanover, MD)를 이용하여 cDNA로 만들었다. iQTM SYBR-GreenSupermix와 iCycler iQTM thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용한 real-time PCR법으로 CYP24, CD14와 cathelicidin (CAMP) 등과 같은 vitamin D<sub>3</sub>에 의해 발현이 유도되는 유전자와 IL-1 $\beta$ , VDR, C/EBP $\beta$  등의 유전자의 발현을 검사하였다. 검사한 유전자의 발현은 GAPDH의 발현과 비교하여 정량화하였다. real-time PCR법에 사용된 각각의 유전자 primer는 CYP24, CGC AGC GGC TGG AGA T와 CCG TAG CCT TCT TTG CGG TA이고 VDR, GCGCTCCAATGAGTCCTTCA와 CACGTCACGTGACG CGGTACTT이며 CAMP, TGGGCCTGGTGATGCCT와 CGAAGGACAGCTTCCTTGTAGC이며 CD14, TGGC GGCGGCAGGTGTG와 ATCTCGGAGCGCTAGGGTTT ACG며 IL-1 $\beta$ , TTCTTCGACACATTGGATAACG와 TG GAGAACACCACTTGTGTGCT이며 C/EBP $\beta$ 는 ACAG CGACGAGTACAAGATCC와 GCAGCTGCTGAACAA GTTCC이었다.

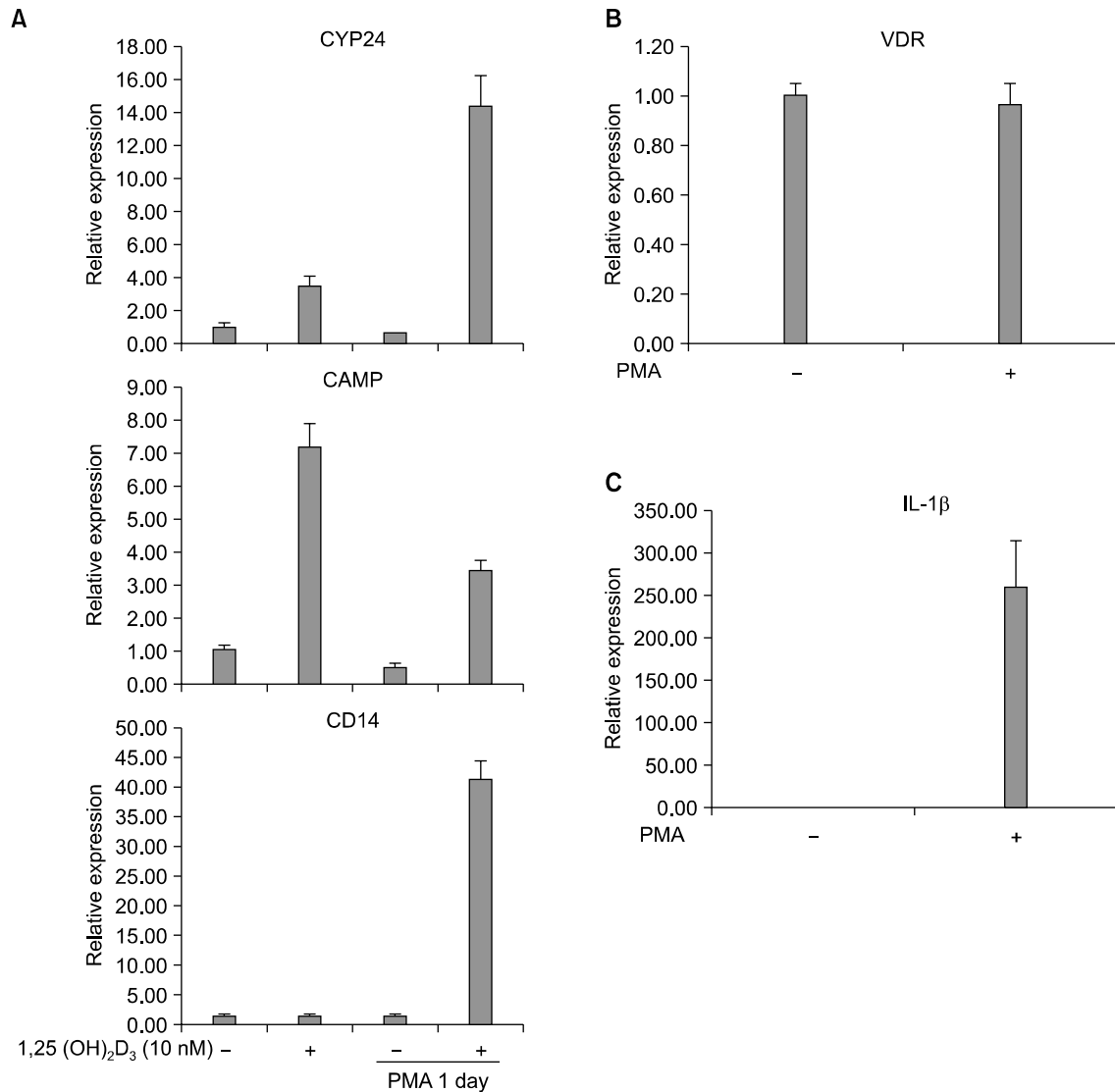
### 3. 단백질 발현의 분석

31.25 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 1% SDS and 2.5%  $\beta$ -mercaptoethanol을 포함한 lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford assay (Biorad, Hercules, CA)를 이용하여 정량하였다. Immunoblotting을 위하여 추출한 단백질 10  $\mu$ g을 7.5% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)에서 전기영동 한 후 polyvinylidene fluoride membranes (Millipore, Billerica, MA)으로 이동시켰다. 이 membrane을 rabbit anti-phospho-C/EBP $\beta$  antibody, rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody, rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody, rabbit anti-phospho-p38 MAPK antibody, rabbit anti-p38 MAPK antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 zrabbit anti-C/EBP $\beta$  antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)와 반응시킨 후 chemiluminescence법을 이용하여 특정 단백질의 발현을 측정하였다.

## 결 과

### 1. 활성화된 인간 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24의 발현 증가

PMA를 처리하지 않은 U937 세포와 PMA를 처리하여 대식세포로 분화시킨 U937 세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24, CAMP, CD14의 발현 유도를 비교하였다. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 CYP24의 발현이 유도되었고 이 세포를 PMA로 분화시켰을 경우 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24의 발현은 현저히 증가되었다(그림 1A). CYP24의 발현과는 반대로 PMA를 처리하지 않은 세포와 비교하여 PMA에 의해 분화된 U937 세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 유도된 CAMP의 발현은 감소하였다. PMA를 처리하지 않은 세포에서 CD14의 발현은 유의하게 증가하지 않았지만 PMA에 의해 분화된 U937 세포에서는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 현저히 증가하여 대식세포 분화를 유도하는 염증 물질인 PMA의 영향에 의해 vitamin D<sub>3</sub>에 의해 유도되는 각각의 유전자 발현이 차이가 남을 보였다. 분화시키지 않은 U937 세포에 비해 PMA로 분화된 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현 증가가 VDR

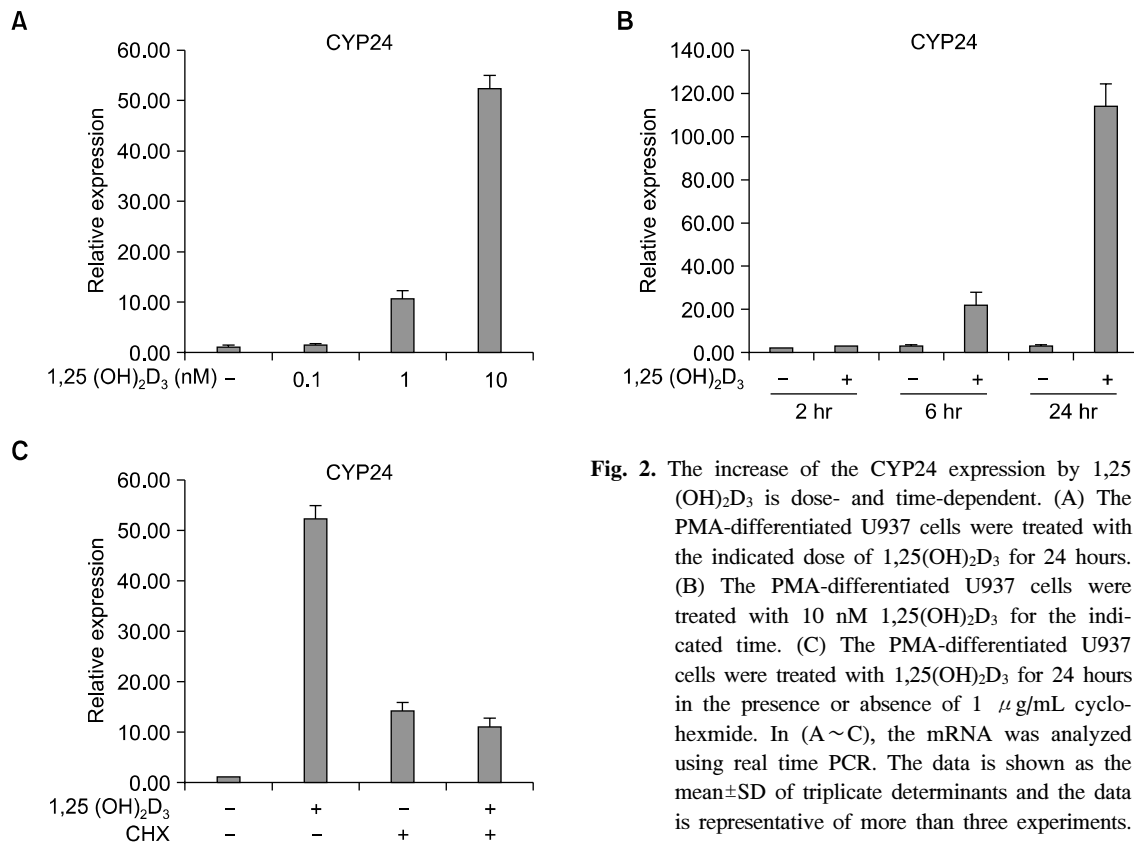


**Fig. 1.** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> increases the production of CYP24 in the human monocyte cell line. (A) Fresh or PMA-differentiated U937 cells were cultured for 24 hours in the presence or absence of 10 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (B, C). U937 cells were cultured for 24 hours in the presence or absence of PMA. In (A~C), the mRNA was analyzed using real time PCR. The data is shown as the mean $\pm$ SD of triplicate determinants and the data is representative of more than three experiments.

의 발현 증가에 의한 것인지 확인하기 위하여 VDR의 발현을 비교하였다. PMA 처리에 의해 VDR의 발현의 변화는 보이지 않아 VDR의 발현 증가가 PMA로 분화시킨 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현 증가의 기전이 아님을 보았다(그림 1B). PMA로 분화시킨 U937 세포에서 대표적인 염증성 사이

토카인인 IL-1 $\beta$ 의 발현이 현저히 증가됨을 확인하여 PMA에 의해 분화된 대식세포가 활성화된 대식세포임을 보았다(그림 1C).

대식세포에서 CYP24의 발현은 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 처리 농도를 증가시키기에 따라 증가하였고(그림 2A) 처리 시간을 증가시키기에 따라 비례하여 증가되었다



**Fig. 2.** The increase of the CYP24 expression by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is dose- and time-dependent. (A) The PMA-differentiated U937 cells were treated with the indicated dose of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 24 hours. (B) The PMA-differentiated U937 cells were treated with 10 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for the indicated time. (C) The PMA-differentiated U937 cells were treated with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 24 hours in the presence or absence of 1  $\mu$ g/mL cycloheximide. In (A~C), the mRNA was analyzed using real time PCR. The data is shown as the mean $\pm$ SD of triplicate determinants and the data is representative of more than three experiments.

(그림 2B). 단백질의 생성을 억제하는 cycloheximide (CHX)를 전처리한 경우 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현 유도도가 현저히 억제됨을 확인하여 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현 유도에 새로운 단백질의 생성이 필요함을 확인 하였다(그림 2C).

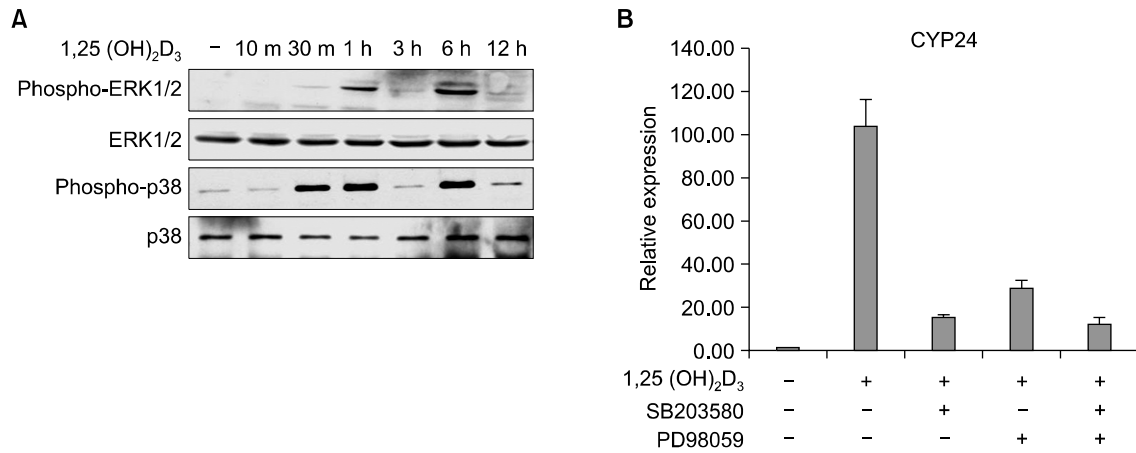
## 2. 활성화된 인간 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 MAPK의 활성화와 CYP24 발현유도에서의 역할

PMA로 분화시킨 U937 세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현 유도 기전을 규명하고자 하였다. 활성화된 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 ERK1/2와 p38 MAPK의 인산화를 증가시켰다(그림 3A). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 ERK1/2와 p38 MAPK의 인산화는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 처리 후 30분에서 1시간 사이에 증가하였다가 3시간 후 감소하였고 다시 6시간 후에 재유도됨이 관찰되었다. p38 MAPK 억제제인 SB203580 (Sigma, St. Louis, MO)과 MEK-ERK억제제인 PD98059 (Sigma,

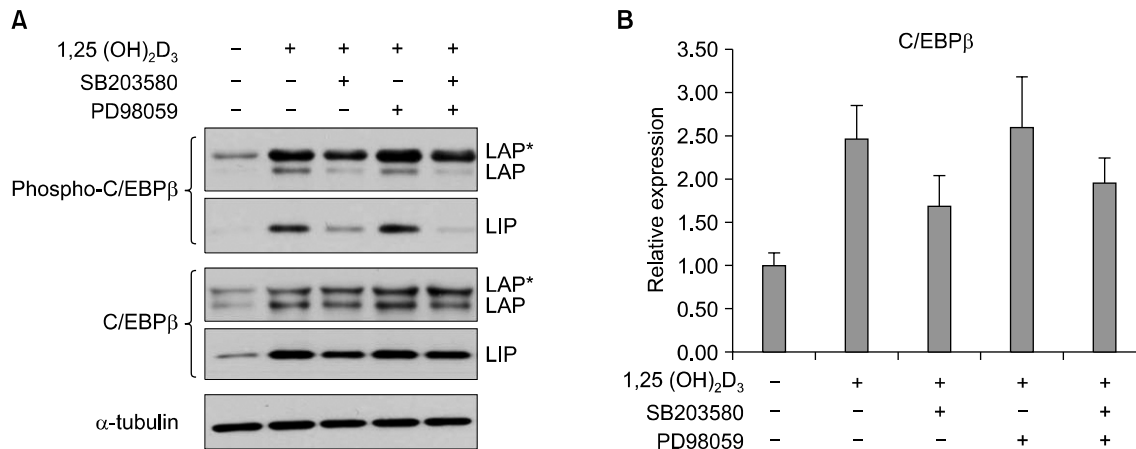
St. Louis, MO)를 전처리하여 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현이 현저히 억제됨을 확인하여 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현유도에 ERK1/2와 p38 MAPK가 관여함을 확인하였다(그림 3B).

## 3. 활성화된 인간 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 C/EBP $\beta$ 발현 유도 및 활성화

C/EBP  $\beta$ 는 세포의 성장 및 분화, 염증반응에 관여하는 CCAAT enhancer binding protein family에 속하는 전사인자이다. 쥐의 신장 세포와 골아세포(osteoblast)를 이용한 최근의 연구에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 C/EBP  $\beta$ 의 발현을 증가시키고 증가된 C/EBP  $\beta$ 가 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현 유도에 중요한 역할을 함이 보고되었다 (10). 본 연구자들은 C/EBP  $\beta$ 가 PMA로 분화시킨 대식세포에서도 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24 발현 유도에 관여하는가를 규명하고자 하였다. PMA로 분화시킨 U937 세포에도 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>를 처리한



**Fig. 3.** The increase of the CYP24 expression by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is mediated by ERK1/2 and p38 MAPKs. (A) The PMA-differentiated U937 cells were treated with 10 nM 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for the indicated time. The whole cell lysates were analyzed by immunoblotting. The data is representative of more than three experiments. (B) The PMA-differentiated U937 cells were treated with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 24 hours in the presence or absence of 20  $\mu$ M PD98059 and/or 20  $\mu$ M SB203580. The mRNA was isolated and then analyzed using real time PCR. The data is shown as the mean $\pm$ SD of triplicate determinants and the data is representative of more than three experiments.



**Fig. 4.** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> increases the expression and phosphorylation of C/EBP $\beta$  in the human macrophages derived from U937 cells. The PMA-differentiated U937 cells were treated with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> for 24 hours in the presence or absence of 20  $\mu$ M PD98059 and/or 20  $\mu$ M SB203580. (A) The whole cell lysates were analyzed by immunoblotting. The data is representative of more than three experiments. (B) The mRNA was isolated and then analyzed using real time PCR. The data is shown as the mean $\pm$ SD of triplicate determinants and the data is representative of more than three experiments.

경우 쥐의 신장 세포 및 골아세포와 유사하게 C/EBP $\beta$ 의 mRNA 및 단백질 발현이 증가하였고 C/EBP $\beta$ 의 인산화도 증가됨을 보였다(그림 4A, B). p38 MAPK

억제제인 SB203580를 전처리한 경우 C/EBP $\beta$ 의 단백질 발현 및 인산화가 유의하게 감소됨을 보여 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 C/EBP $\beta$ 의 단백질 발현 및 인산

화 유도에 p38 MAPK가 관여함을 보았다(그림 4A). 한편 PD98059를 전 처치 한경우는 C/EBP $\beta$ 의 단백질 발현 및 인산화에 변화가 없어 ERK1/2 MAPK는 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의한 C/EBP $\beta$ 의 단백질 발현 및 인산화 유도에 관여하지 않음을 알 수 있었다(그림 4A). 단백질 발현에 대한 결과와 유사하게 C/EBP $\beta$ 의 mRNA 발현의 경우도 SB203580에 의해 부분적으로 감소됨을 보았다(그림 4B).

## 고 찰

최근의 많은 연구에서 vitamin D $_3$ 가 면역계에 작용하여 염증 및 면역반응을 조절함이 밝혀졌고 류마티스관절염, 루푸스, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 건선 등의 만성 염증성 질환에서 vitamin D $_3$ 의 결핍이 병의 발병 및 진행에 중요한 역할을 함이 보고되어 vitamin D $_3$ 를 이용한 자가 면역질환의 새로운 치료방법 개발의 가능성이 제시 되고 있다. 세포 수준에서 vitamin D $_3$ 의 availability는 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 대사에 관여하는 CYP24의 발현에 의해 조절되며 따라서 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 세포 내 생물학적 기능에 대한 negative feedback 조절 기전으로 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의한 CYP24 발현 유도가 중요하다 (4). 여러 종류의 세포를 이용한 기존의 연구에서 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의한 CYP24 발현 유도는 ERK1/2, JNK와 p38 MAPK 등에 의해 조절됨이 보고되었다 (6-8). 본 연구자들은 만성 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 대식세포에서도 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의해 CYP24 발현이 증가함을 보았고 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의한 CYP24 발현 유도에 ERK1/2와 p38 MAPK가 관여함을 관찰하였다. 본 연구에서는 PMA를 처리하여 대식세포로 분화시킨 U937 세포에서 PMA를 처리하지 않은 세포에 비해 염증성 사이토카인 중 하나인 IL-1 $\beta$ 의 발현이 현저히 증가됨을 보았고 PMA에 분화된 대식세포에서 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의한 CYP24의 발현이 현저히 증가됨을 보여 염증성 질환에서 염증 물질에 의해 vitamin D $_3$ 에 의해 유도된 CYP24의 발현이 과도하게 증가되어 vitamin D $_3$ 의 availability가 상대적으로 감소 할 가능성을 시사하였다. 실제로 많은 만성 염증성 질환에서 vitamin D $_3$ 의 결핍이 보고되는데 본 연구의 결과로 유추해 볼 때 염증성 질환에서 vitamin D $_3$ 의 양적인 감소에 더하

여 CYP24의 과도한 발현유도에 의한 활성형 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 증가된 대사가 vitamin D $_3$ 의 기능을 억제할 것으로 생각된다. 따라서 만성 염증성 질환에서 CYP24의 과도한 발현을 억제한다면 활성형 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 availability를 증가시킴으로써 vitamin D $_3$ 의 면역조절 작용을 강화할 수 있을 것이다. 최근 염증성 질환의 치료에 있어 MAPK등 세포 내 신호전달 과정을 억제하는 물질 등을 이용하려는 연구가 진행되고 있다 (11). 류마티스관절염이나 염증성 장염 등의 만성 염증성 질환에서 VX-702, SCIO-469와 ARRY-797 등의 p38 억제제를 이용한 연구가 보고되었다 (11-13). 따라서 류마티스관절염과 같은 만성 염증성 질환에서 기존에 연구되고 있는 p38 억제제와 함께 vitamin D $_3$ 를 투여한다면 vitamin D $_3$ 의 availability를 증가시켜 소량의 투여만으로도 vitamin D $_3$ 의 생물학적 효과를 얻을 수 있을 것이다.

1,25(OH) $_2$ D $_3$ 는 일반적으로 VDR에 결합하여 그 기능을 나타낸다. VDR은 retinoid X receptor (RXR)과 heterodimer를 형성하는데 이 heterodimer가 vitamin D $_3$  target gene의 promoter부위에 있는 vitamin D response element (VDRE)에 결합하여 전사를 유도한다. 본 연구자들은 활성화된 대식세포에서 보이는 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의한 CYP24 발현 유도가 새로운 단백질 합성을 필요로 함을 관찰하였다. 최근 Dhawan 등의 연구에서 CYP24 유전자의 promoter부위에 C/EBP $\beta$  binding site가 있음이 보고하였고 쥐의 신장 세포 및 골아세포에서 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의한 CYP24 발현유도에 있어 C/EBP $\beta$ 가 VDR과 함께 중요한 역할을 함이 관찰되었다 (10). 본 연구자들도 대식세포에서 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 에 의해 C/EBP $\beta$ 의 발현 및 활성화가 증가함을 관찰하였고 C/EBP $\beta$ 의 발현 및 활성화에 p38 MAPK가 관여함을 확인하였다. C/EBP $\beta$ 는 basic leucine zipper domain을 가지는 전사인자 family의 하나로 IL-1, IL-6, IFN $\gamma$ , lipopolysaccharide (LPS) 등의 염증성 물질에 의해 활성화 및 발현이 유도되고 염증 및 면역반응에 관여하는 IL-1 $\beta$ , COX2 등의 발현에 관여한다 (14-17). Dhawan 등의 연구 결과와 본 연구의 결과로 미루어 염증성 질환에서 IL-1 $\gamma$ 나 IL-6와 같은 염증 물질에 의해 유도된 C/EBP $\beta$ 가 CYP24의 발현을 증가시켜 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 의 availability를 감소시킬 가능성을 생각할 수 있으며 본 연구에서 보았던 p38 MAPK

억제제에 의한 C/EBP $\beta$ 의 활성화 및 발현억제 결과는 염증성 질환에서 p38 MAPK 억제제를 이용한 C/EBP $\beta$ 의 활성화 및 발현억제가 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 availability를 증가시켜 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 면역조절 효과를 증가시킬 가능성을 시사한다.

## 결 론

본 연구에서는 활성화된 대식세포에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 CYP24의 발현이 현저히 증가됨을 관찰하였고 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24의 발현 증가는 ERK1/2와 p38 MAPK에 의해 매개됨을 확인하였다. 또한 염증 물질에 의해 유도되며 CYP24의 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자인 C/EBP $\beta$ 의 발현 및 활성화가 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해 유도됨을 관찰하였고 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 C/EBP $\beta$ 의 발현 및 활성화에 p38 MAPK가 관여함을 확인하였다. 본 연구의 결과로 미루어 염증성 질환에서 IL-1 $\beta$ 나 IL-6와 같은 염증 물질에 의해 C/EBP $\beta$ 의 발현 및 활성화가 증가되고 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의해서도 C/EBP $\beta$ 의 발현 및 활성화가 증가되어 증가된 C/EBP $\beta$ 의 발현 및 활성화가 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의한 CYP24의 발현을 더욱 유도하여 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 availability를 감소시킬 가능성을 생각 할 수 있다.

본 연구의 결과는 만성 염증성 질환에서 MAPK 억제제가 CYP24 발현 유도를 억제하여 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 availability를 증가시킬 가능성을 시사하며 따라서 류마티스 관절염과 같은 만성 염증성 질환에서 관찰되는 vitamin D<sub>3</sub>의 결핍과 그 영향을 교정함에 있어 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 MAPK 억제제의 동시 사용과 같은 새로운 치료 방침의 이론적 토대를 제공할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- 1) Kang SW. Vitamin D and immune responses. J Korean Rheum Assoc 2010;17:16-22.
- 2) Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. Ann Rheum Dis 2007;66:1137-42.
- 3) Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. Scand J Immunol 2008;68:261-9.
- 4) Adams JS, Chen H, Chun R, Ren S, Wu S, Gacad M, et al. Substrate and enzyme trafficking as a means of regulating 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis and action: the human innate immune response. J Bone Miner Res 2007;22:V20-4.
- 5) van Etten E, Stoffels K, Gysemans C, Mathieu C, Overbergh L. Regulation of vitamin D homeostasis: implications for the immune system. Nutr Rev 2008;66:S125-34.
- 6) Cui M, Zhao Y, Hance KW, Shao A, Wood RJ, Fleet JC. Effects of MAPK signaling on 1,25-dihydroxyvitamin D-mediated CYP24 gene expression in the enterocyte-like cell line, Caco-2. J Cell Physiol 2009;219:132-42.
- 7) Nutchey BK, Kaplan JS, Dwivedi PP, Omdahl JL, Ferrante A, May BK, et al. Molecular action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phorbol ester on the activation of the rat cytochrome P450C24 (CYP24) promoter: role of MAP kinase activities and identification of an important transcription factor binding site. Biochem J 2005;389:753-62.
- 8) Ordonez-Moran P, Larriba MJ, Palmer HG, Valero RA, Barbachano A, Dunach M, et al. RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. J Cell Biol 2008;183:697-710.
- 9) Kinne RW, Stuhlmuller B, Burmester GR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. Arthritis Res Ther 2007;9:224.
- 10) Dhawan P, Peng X, Sutton AL, MacDonald PN, Croniger CM, Trautwein C, et al. Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hydroxylase. Mol Cell Biol 2005;25:472-87.
- 11) Sweeney SE, Firestein GS. Primer: signal transduction in rheumatic disease—a clinician's guide. Nat Clin Pract Rheumatol 2007;3:651-60.
- 12) Damjanov N, Kauffman RS, Spencer-Green GT. Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. Arthritis Rheum 2009;60:1232-41.
- 13) Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. J Biol Chem 2005;280:14981-8.



- 14) Caivano M, Gorgoni B, Cohen P, Poli V. The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) and C/EBP delta transcription factors. *J Biol Chem* 2001;276:48693-701.
- 15) Poli V. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem* 1998;273:29279-82.
- 16) Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 2002;365:561-75.
- 17) Yang Z, Wara-Aswapati N, Chen C, Tsukada J, Auron PE. NF-IL6 (C/EBPbeta) vigorously activates il1b gene expression via a Spi-1 (PU.1) protein-protein tether. *J Biol Chem* 2000;275:21272-7.