

□ 원 저 □

FK506과 cyclosporin A가 기관지상피세포, 단핵구, 림프구 및 폐포대식세포에서 I κ B α 분해 및 IKK α 활성화에 미치는 효과*

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소

윤호일, 이창훈, 이희석, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규

=Abstract=

Effect of FK506 and Cyclosporin A on I κ B α Degradation and IKK α Pathway in Bronchial Epithelial Cells, Monocytes, Lymphocytes and Alveolar Macrophages

Ho Il Yoon, M.D., Chang-Hoon Lee, M.D., Hee-Seok Lee, M.D.,
Choon-Taek Lee, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.

*Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine,
Seoul National University College of Medicine, Clinical Research Institute,
Seoul National University Hospital, Lung Institute, Medical Research Center,
Seoul National University*

Background : Cyclosporin A(CsA) and tacrolimus(FK506) have been widely used as immunosuppressants. The effects of CsA, or FK506, on the I κ B/NF- κ B pathway have been shown to vary according to the cell type. However, their effects on the I κ B/NF- κ B pathway have not been reported in bronchial epithelial cells. In this study, the effects of CsA and FK506 on the I κ B/NF- κ B pathway in bronchial epithelial cells, monocytes, lymphocytes and alveolar macrophages were evaluated. The relationship between their effects on the I κ B/NF- κ B pathway and I κ B kinase(IKK) activity was also investigated.

Methods : BEAS-2B and A549 cells, pulmonary alveolar macrophages, peripheral blood monocytes and lymphocytes were used. The cells were pre-treated with CsA, or FK506, for various time periods, followed by stimulation with TNF- α , LPS or IL-1 β . The I κ B α expressions were assayed by Western blot analyses. The IKK activity was evaluated by an in vitro immune complex kinase assay, using

*본 연구는 2000년 서울대학교병원 일반연구비의 보조로 이루어졌음(04-2000-008-0).

Address for correspondence:

Chul-Gyu Yoo, M.D., Ph.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine,
Seoul National University Hospital, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, Korea.
Phone : 02-760-3760. Fax : 02-762-9662 E-mail : cgyoo@snu.ac.kr

GST-I κ B α as the substrate.

Results : Neither CsA nor FK506 affected the level of I κ B α expression in any of the cell types used in this study. CsA pre-treatment inhibited the TNF α -induced I κ B α degradation in bronchial epithelial cells. In contrast, the TNF α -induced I κ B α degradation was not affected by FK506 pre-treatment. However, FK506 suppressed the cytokine-induced I κ B α degradation in the pulmonary alveolar macrophages, peripheral blood monocytes and lymphocytes. The inhibitory effect of CsA, or FK506, on I κ B α degradation was not related to IKK.

Conclusions : CsA and FK506 suppressed the I κ B α degradation in bronchial epithelial cells, monocytes, lymphocytes and alveolar macrophages, so this may not be mediated through IKK. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2003, 54:449-458)

Keywords : cyclosporin , FK506, NF- κ B, I κ B α .

서 론

Cyclosporin A(이하 CsA)와 tacrolimus(이하 FK506)은 현재 임상에서 흔히 쓰이고 있는 강력한 면역억제제이다. CsA는 1976년 발견된 이래 장기 이식의 새 장을 열었다고 평가되며, FK506은 1987년에 발견되었다. 이 두 가지 약제는 모두 진균에서 분리되었으며, 비록 그 구조는 상이하지만 작용 기전에는 상당한 공통점이 있다. 이 두 가지 약제는 세포내에서 immunophilin이라 불리는 수용체와 결합하는데, CsA의 경우 cyclophilin, FK506의 경우에는 FK506-binding proteins(FKBPs)이 알려져 있다¹⁻³. 이 세포내 수용체들은 peptidyl-prolyl isomerase 활성을 가지고 있어서 세포내에서 단백질 사패론으로 작용한다. 즉, 약제와 immunophilin의 복합체는 calcineurin과 결합하여 calcineurin의 기질인 nuclear factor of activated T cells(NF-AT)의 탈인산화를 억제함으로써, NF-AT에 의한 각종 염증 유발성 사이토카인의 전사를 억제한다^{1,2}. 이처럼 CsA와 FK506은 주로 T 림프구에서 calcineurin의 작용을 억제하여 T 림프구의 활성화에 따른 NF-AT의 활성화를 방해하는 것을 주된

작용 기전으로 하지만^{2,4}, 이외에도 NK- κ B, AP-1, Oct/Oap, CREB 등의 전사인자들도 영향을 미치는 것으로 생각되고 있다^{5,6}. 최근에는 이 중 대부분의 염증 매개성 사이토카인의 전사에 관여하는 NK- κ B에 미치는 CsA와 FK506의 효과에 관심이 모아지고 있다.

NF- κ B는 처음에는 쥐의 B 림프구에서 kappa light-chain 발현을 조절하는 전사인자로 발견되었으며⁷, 후에 다양한 세포들에서 면역 및 염증반응에서 중요한 역할을 하는 범발적인(ubiquitous) 전사인자임이 확인되었다⁸⁻¹⁰. 특히 외부자극에 의해 발생하는 면역반응의 초기단계에 중추적인 역할을 한다는 사실이 잘 알려져 있다. NF- κ B와 관련하여 특이한 점은 그 활성이 세포 내에서의 분포(subcellular localization)로 결정된다는 점이다. NF- κ B는 세포질 내에서 억제 인자인 I κ B단백질과 결합한 비활성화 형태(dormant complex)로 존재하다가, 여러 가지 다양한 세포 외의 자극에 의하여 활성화되어 I κ B가 분해되고, 그 결과 유리된 NF- κ B는 복합체의 형태로 핵 내로 이동하여 NF- κ B에 결합하는 특이 DNA sequence(κ B motif)에 결합함으로써 목표유전자(target gene)

의 전사를 조절하게 된다^{11,12}.

T 림프구에서 세포 외의 자극에 의한 NK- κB 의 활성화가 CsA와 FK506 전처치로 억제됨이 알려져 있고^{13,14}, 그 기전은 $I\kappa B$ 의 분해를 막기 때문이라는 실험적 연구 결과들이 보고된 바 있다¹⁵⁻¹⁷. 반면 FK506은 림프구에서는 세포 외 자극에 의한 $I\kappa B$ 의 분해를 억제하는 한편, 림프구가 아닌 세포 (murine fibroblast, mouse mesangial cells)에서는 오히려 $I\kappa B$ 의 분해를 촉진시키는 역할을 한다는 보고가 있어^{18,19} 세포 종류에 따른 차이를 보이고 있다. 아직까지 기관지 상피세포, 폐포대식세포에서 CsA와 FK506이 $I\kappa B$ 에 미치는 효과에 관해서는 알려져 있지 못한 실정이다. 본 연구에서는 비염 증세포인 기관지상피세포와 염증세포인 말초혈액 단핵구, 림프구, 폐포대식세포에서 각각 CsA와 FK506이 $I\kappa B$ 의 분해에 미치는 영향을 평가하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

정상 사람의 기관지 상피세포인 BEAS-2B 세포주와, 제2형 폐포세포주인 A549를 사용하였다. BEAS-2B는 KGM배지(Clonetics, Walkersville, MD)에서, 그리고 A549는 10% FBS, 60 $\mu g/ml$ penicillin, 100 $\mu g/ml$ streptomycin이 포함된 RPMI 1640를 이용하여 37°C하에 5%CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. 시 약

Recombinant human TNF- α , IL-1 β , LPS는 R&D System(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고 phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 후 여러 개로 나누어 사용할 때까지 -70 °C에 보관하였다. Rabbit의 polyclonal anti-human $I\kappa B\alpha$ 항체,

anti-IKK α 항체, 재조합(GST)- $I\kappa B\alpha$ 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 에서 구입하였다.

3. 말초혈액 단핵구 및 림프구의 분리

헤파린을 첨가한 주사기에 말초혈액을 채취한 후 말초혈액 단핵구를 Ficoll-Hypaque(Sigma Diagnostics, St.Louis, U.S.A.)을 사용한 density sedimentation method를 이용하여 분리한 후, RPMI1640(GibcoBRL, Grand island, NY)으로 두 번 세척하고, 5% PHS(pooled human serum)과 5% FCS(fetal calf serum)으로 재부유하였다. 0.1% trypan blue를 사용하여 세포수를 확인한 후 5-10 $\times 10^6/ml$ 로 세포수를 맞추어 1ml PHS로 처리한 tissue culture dish에 5ml씩 넣어 37°C 배양기에 1시간동안 배양하였다. 비부착세포를 씻어내고 2-5ml의 HBSS(GibcoBRL, Grand island, NY)를 넣어 4°C 냉장고에 20-30분간 넣어둔 후 cell scraper로 부착세포를 분리하여 1% glutamine, 2% HEPES buffer, 5% 자가혈청을 함유한 RPMI1640 배양액으로 세포수를 1 $\times 10^6/ml$ 로 맞추었다. 이렇게 분리된 단핵구를 round botton 96 well plate에 100(1씩 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에 밤새 배양하였다. 비부착세포를 5% 자가혈청을 함유한 RPMI1640 배양액에 재부유하여 밤새 배양하였다.

4. 기관지폐포세척술과 폐포 대식세포의 분리

기관지내시경을 3 혹은 4분절 기관지에 고정시키고 37°C로 데운 무균 생리식염수 30ml로 5회 세척하였다. 회수된 용액을 세 장의 무균 거즈를 통과시켜 점액을 걸러내고 RPMI1640 배양액으로 3회 세척한 후 총 세포수를 측정하고, Wright염색법으로 구성세포를 확인하여 1% glutamine, 2% HEPES buffer, 5% 자가혈청을 함유한 RPMI1640

배양액으로 폐포 대식세포가 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 세포수를 맞추었다. 이렇게 분리된 폐포 대식세포를 round bottom 96 well plate에 $100 \mu\text{l}$ (세포수 1×10^5) 씩 넣어 37°C , 5% CO_2 배양기에 밤새 배양하였다.

5. 단백질의 추출

총단백질을 추출하는 방법은 주로 Dejardin 등이 사용한 방법을 이용하였다²⁰. 먼저 “Western” Lysis Buffer를 0.1% NP-40(nonidet, Sigma 사), 5 mM EDTA, 50 mM Tris Hydrochloride(pH 7.5-8.0), 250mM NaCl, 50 mM Sodium Fluoride의 조성으로 만들어 준비하였다. 사용 직 전에 protease inhibitor 인 1mM의 PMSF(phenylmethylsulfanylfuoride), $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 aprotinin, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 leupeptin을 첨가하여 사용하였다. 배양된 세포들을 lysis buffer에 작용시킨 후 원심분리하고 supernatant만을 새 tube에 옮기고 단백질 정량을 시행하고 이후 실험에 사용할 때까지 -70°C 냉각고에서 보관한다. 단백질 정량은 Bio-Rad Assay 방법으로 시행하였는데 Bovine Serum Albumin 표준용액을 사용하여 시행하였다.

6. Western 분석법

세포내의 총단백을 Whole Lysis Buffer(0.1% Nonidet P40, 5 mM EDTA, 50mM Tris, pH 7.5-8.0, 250 mM NaCl, 50 mM NaF)로 추출한 후 bicinchoninic acid법으로 단백 농도를 측정하였다. $30 \mu\text{g}$ 의 단백을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 PBS로 희석한 5% skim-milk로 1시간 동안 비특이 결합을 차단하였다. 5% skim-milk에 1:1,000으로 희석한 rabbit polyclonal anti-I κ B α 항체를 membrane과 실온에서 밤새 반응시킨 후

PBS로 15분씩 3번 세척하였다. Membrane을 5% skim-milk에 1:2,000으로 희석한 goat-anti-rabbit HRP-conjugated 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 15분씩 3번 세척하였고 ECL kit를 이용해 발색시켰다.

7. IKK 분석

내인성 IKK 활성도에 대한 면역 복합체 키나아제 분석은 DiDonato 등이 사용한 방법을 따랐다²¹. 먼저 20mM Tris-HCL(pH7.6), 150 mM NaCl, 25mM β -glycerophosphate, 2mM pyrophosphate, 1mM sodium orthovanadate, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1mM DTT, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 그리고 1mM PMSF가 함유된 버퍼를 이용해 세포를 파괴시켰다. 그 산물을 4°C 에서 $16000 \times g$ 로 10 분간 원심분리한 후, 상층액을 anti-IKK α 항체 (1:100), $50 \mu\text{l}$ 의 protein-G Sepharose beads와 함께 4°C 에서 end-over-end rotation으로 밤새 반응시킨다. 그리고 beads는 버퍼 A(1M NaCl, $20 \mu\text{M}$ Tris-HCl(pH7.4), 0.1% Nonidet P-40), 버퍼 B($200 \mu\text{M}$ NaCl, $20 \mu\text{M}$ Tris-HCl(pH7.4), 0.1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, $1 \mu\text{M}$ EDTA), 버퍼 C($20 \mu\text{M}$ Tris-HCl(pH7.4), 0.1% Nonidet P-40)으로 차례로 두 차례 세척한다. 키나아제 반응은 $0.5 \mu\text{g}$ GST-I κ B α (aa1-317포함)과 $10 \mu\text{Ci}$ 의 [^{32}P]ATP를 함유하는 버퍼(20 mM HEPES(pH 7.6), 20 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl, and 1 mM DTT) $10 \mu\text{l}$ 를 첨가함으로써 시작된다. 이 혼합물을 30°C 에서 30분간 반응시킨 후 protein sample 버퍼를 첨가함으로써 키나아제 반응은 끝나게 된다. 키나아제 반응물은 SDS/PAGE 10% gel에서 nitrocellulose membrane으로 transfer시킨 후 autoradiography로 관찰한다. 이 membrane은 후에 anti-IKK α 항체를 이용한 immuno-

blot으로 동량의 키나아제를 확인하는데 이용하였다.

결 과

1. CsA가 기관지 상피세포주에서 TNF- α 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해에 미치는 영향

CsA가 기관지 상피세포주에서 TNF- α 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해에 미치는 효과를 평가하기 위하여, A549와 BEAS-2B 세포를 25, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 CsA로 2시간동안 전처리한 후, TNF- α (5ng/ml)로 30분간 자극하고 $I\kappa B\alpha$ 의 발현을 Western 분석으로 분석하였다. A549와 BEAS-2B 세포 모두에서 TNF- α 처리로 $I\kappa B\alpha$ 의 분해가 관찰되었다(Fig. 1). CsA 단독 처리는 $I\kappa B\alpha$ 의 발현에 영향을 미치지 않았다(data not shown). A549 와 BEAS-2B 세포에서 각각 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 CsA 전처리로 TNF- α 에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해가 억제되기 시작하였고, 농도가 증가함에 따라 농도 의존성으로 $I\kappa B\alpha$ 분해의 억제가 증가되었다(Fig. 1). 이 결과는 CsA가 기관지 상피세포에서 외부 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해를 효과적으로 억제함을 시사하는 소견이다.

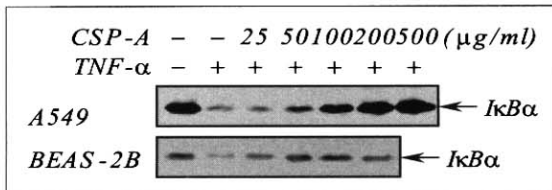


Fig. 1. Cyclosporin A blocked TNF- α -induced $I\kappa B\alpha$ degradation. A549(upper panel) and BEAS-2B(lower panel) cells were pre-treated with 25, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ of cyclosporin A (CSP-A) for 2 h, and then stimulated with TNF- α (5 ng/ml) for 30 min. The levels of $I\kappa B\alpha$ in cellular extracts were detected by Western blot analysis.

2. 기관지상피 세포주에서 FK506의 처리가 TNF- α 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해에 미치는 영향

FK506이 기관지 상피세포주에서 TNF- α 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해에 미치는 효과를 평가하기 위하여, BEAS-2B 세포에 20ng/ml의 FK506을 1시간에서 24시간까지 전처리한 후, TNF- α (5ng/ml)로 30분간 자극하고 $I\kappa B\alpha$ 의 발현을 Western 분석으로 분석하였다. FK506 단독 처리는 $I\kappa B\alpha$ 의 발현에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 2A). BEAS-2B 세포에서 FK506의 전처리 시간에 관계없이 TNF- α 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해는 억제되지 않았다(Fig. 2B). A549 세포에서도 20 ng/ml의 FK506 전처리로 TNF- α 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해가 억제되지 않았다(Fig. 2C). FK506의 농도를 8mg/ml까지 증가시켜도 TNF- α 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해가 억제되지 않았다(Fig. 2D). 이 결과는 FK506이 CsA와는 달리 기관지 상피세포에서 외부 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해를 억제하지 않음을 시사하는 소견이다.

3. 단핵구, 림프구 및 폐포대식세포에서 FK506의 전처리가 외부 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해에 미치는 영향

염증세포에서 FK506이 외부자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 폐포대식세포, 말초혈액 단핵구, 말초혈액 림프구에서 FK506 전처리가 외부자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해에 미치는 효과를 평가하였다. 폐포대식세포에서 1시간의 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$) 자극으로 $I\kappa B\alpha$ 가 분해되었는데, $I\kappa B\alpha$ 의 분해는 20ng/ml의 FK506의 2시간 전처리로 억제되었다(Fig. 3A). 말초혈액 단핵구를 IL-1 β (5 ng/ml, 30분), TNF- α (5 ng/ml, 30분), LPS(1 $\mu\text{g/ml}$, 60분)로 자극하면 $I\kappa B\alpha$ 의 분

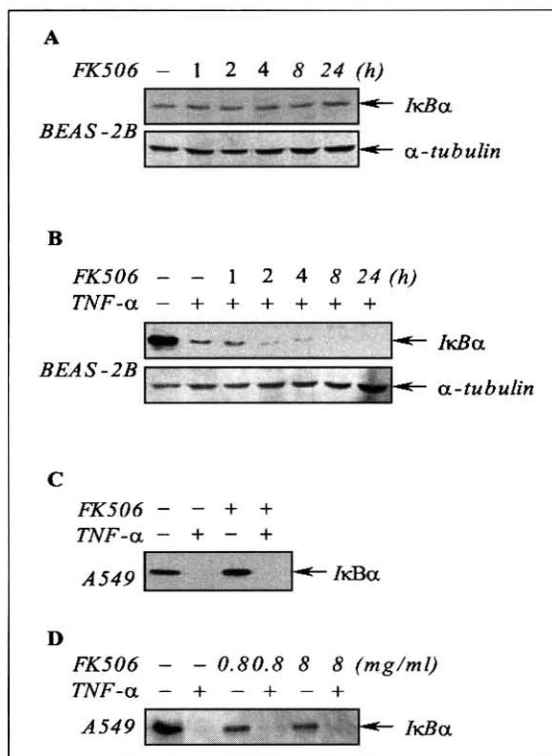


Fig. 2. FK506 did not prevent $\text{TNF-}\alpha$ -induced $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ degradation in respiratory epithelial cells. **(A)** BEAS-2B cells were treated with 20 ng/ml of FK506 for the indicated times. **(B)** BEAS-2B cells were pre-treated with 20 ng/ml of FK506 for the indicated times, and then stimulated with $\text{TNF-}\alpha$ (5 ng/ml) for 30 min. **(C)** A549 cells were pre-treated with FK506 (20 ng/ml) for 2 h, and then stimulated with $\text{TNF-}\alpha$ for 30 min. **(D)** A549 cells were pre-treated with FK506 at the indicated doses for 2 h, and then stimulated with $\text{TNF-}\alpha$ for 30 min. Whole cell extracts were subjected to Western blot analysis for $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ and α -tubulin.

해가 관찰되었는데, FK506을 2시간 전처리하면 각각의 외부 자극에 의한 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 분해가 억제되었다(Fig. 3B). 말초혈액 림프구에서도 FK506의 전처리로 $\text{TNF-}\alpha$ 자극에 의한 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 분해가 억

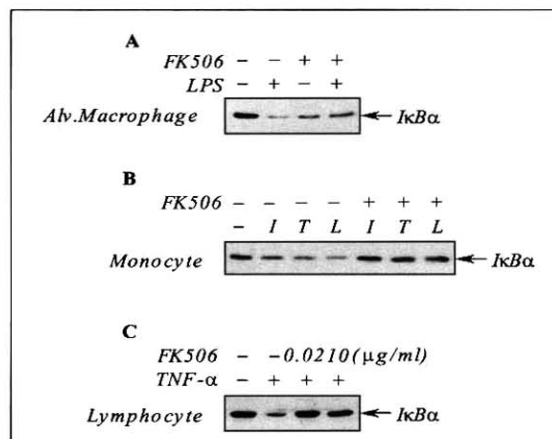


Fig. 3. FK506 prevented $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ degradation in inflammatory cells.

(A) Pulmonary alveolar macrophages were pre-treated with 20 ng/ml of FK506 for 2h, and then stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 1h. **(B)** Peripheral blood monocytes were pre-treated with FK506 (20 ng/ml) for 2 h, and then stimulated with 5 ng/ml of $\text{IL-1}\beta$ (I) or $\text{TNF-}\alpha$ (T) for 30 min, and 1 $\mu\text{g/ml}$ of LPS (L) for 60 min. **(C)** Peripheral blood lymphocytes were pre-treated with FK506 at the indicated doses for 2 h, and then stimulated with $\text{TNF-}\alpha$ for 30 min. Whole cell extracts were subjected to Western blot analysis for $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.

제되었다(Fig. 3C). 이 결과는 말초혈액 단핵구, 림프구, 폐포대식세포에서 외부 자극에 의한 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 분해가 FK506에 의해 억제됨을 시사하는 소견이다.

4. CsA와 FK506이 IKK 활성화에 미치는 영향

외부 자극에 의해 활성화된 $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase(IKK)는 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 인산화를 통해 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 분해를 유도한다. CsA와 FK506의 전처리에 의한 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 의 분해 억제가 IKK의 활성화 억제와 관련이 있는지를 평가하기 위하여, CsA와 FK506 전처리가 외부 자

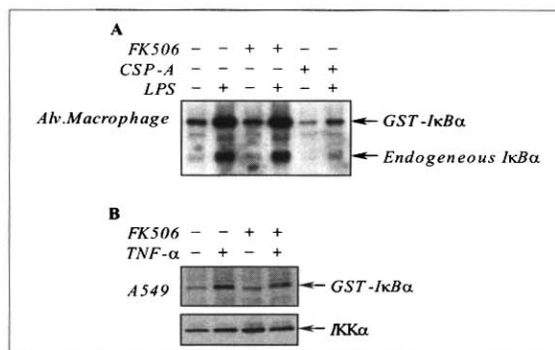


Fig. 4. Effect of cyclosporin A and FK506 on IKK activity.

(A) Pulmonary alveolar macrophages were pre-treated with 200 μ g/ml of cyclosporin A (CSP-A) or 20 ng/ml of FK506 for 2 h, and then stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 10 min. (B) A549 cells were pre-treated with FK506 for 2 h, and then stimulated with TNF- α for 10 min. Cells were lysed in a buffer containing 1% Triton X-100, and IKK complex was immunoprecipitated using anti-IKK α antibody, and an IKK assay was performed using GST-I $\kappa B\alpha$ as a substrate. To ensure that equal amounts of kinases were immunoprecipitated, the amounts of immunoprecipitated IKK α was evaluated by Western blot analysis.

극에 의한 IKK의 활성화에 미치는 영향을 분석하였다. 폐포대식세포를 1 μ g/ml의 LPS로 10분간 자극하면 IKK의 활성도가 증가하였는데, 200 μ g/ml의 CsA 또는 20ng/ml의 FK506으로 2시간동안 전처리한 후에 LPS로 자극하였을 때 IKK의 활성도 증가가 억제되지 않았다(Fig. 4A). 이 결과는 말초혈액 단핵구, 림프구, 폐포대식세포에서 CsA 또는 FK506 전처리에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해 억제는 IKK 활성도의 억제와는 다른 경로를 통하여 이루어질 가능성을 시사하는 소견이라 하겠다. A549 세포주에서도 TNF- α 자극에 의한 IKK 활성도의 증가가 FK506을 전처리로 억제되지 않았다(Fig. 4B).

고 찰

각종 염증 세포에서 분비되는 염증 매개성 사이토카인이 염증성 호흡기 질환에서 중요한 역할을 함은 잘 알려져 있는 사실이다. 기관지 상피세포는 다양한 폐 손상에 있어서 주된 목표가 될 뿐만 아니라, 염증 세포와 같이 염증 매개성 사이토카인을 분비함으로써 염증의 시작과 유지에 중요한 역할을 담당한다. 따라서 염증 세포와 함께 기관지 상피세포에서의 염증 매개성 사이토카인의 발현을 이해하는 것은 각종 염증성 폐질환의 발병기전과 새로운 치료법을 개발하는 데 있어 중요하다. 염증 세포와 기관지 상피세포에서 염증 매개성 사이토카인의 분비는 $I\kappa B/NF-\kappa B$ 경로의 활성화와 밀접한 관련이 있다. 염증 억제제로 널리 사용되고 있는 CsA와 FK506이 $I\kappa B/NF-\kappa B$ 경로에 미치는 영향에는 세포에 따라 다양한 효과가 알려져 있다. 그러나 CsA와 FK506이 기관지 상피세포에서 $I\kappa B/NF-\kappa B$ 경로에 미치는 효과에 관해서는 알려져 있지 않고, 각종 염증 세포에서의 차이에 관해서도 보고가 미미한 실정이다.

본 연구에서 CsA와 FK506 자체는 기관지 상피세포에서 $I\kappa B\alpha$ 의 발현에 영향을 미치지 않았다. 이 결과는 FK506이 쥐의 섬유아세포와 사구체간질세포에서 오히려 NF- κB 를 활성화 시키고, 이를 통한 IL-6의 증가가 FK506의 신독성과 관련이 있을 가능성을 제시한 Muraoka 등의 연구¹⁸ 결과와 상반된 결과이다. 또한 Zhang 등은 $I\kappa B\alpha$ 의 proteasome을 통한 분해가 이러한 NF- κB 활성화의 기전임을 발표하였다¹⁹. 기존의 연구 결과와 본 연구 결과의 차이의 기전을 본 연구에서는 제시할 수 없었지만, 실험에 사용된 세포에 따른 차이일 것으로 생각된다.

기존의 알려져 있는 CsA와 FK506의 세포 내 작용 기전이 상당히 유사함에도 불구하고, 기관지 상피세포에서 CsA와 FK506이 외부 자극에 의한

I κ B α 의 분해에 미치는 효과는 차이를 보였다. 즉, CsA 전처치로 외부자극에 의한 I κ B α 의 분해가 억제되었지만, FK506 전처치로는 외부자극에 의한 I κ B α 의 분해가 억제되지 않았다. 기관지 상피세포에서와는 달리, 폐포 대식세포, 림프구, 단핵구 등의 염증 세포에서는 외부자극에 의한 I κ B α 의 분해가 FK506에 의해 억제되었다. 이는 이전의 연구 결과와 일치하는 소견으로서^{13,14}, FK506의 면역억제 효과의 일부는 염증 세포에서 I κ B/NF- κ B 경로의 활성화 차단을 통하여 이루어질 가능성을 시사하는 소견이다.

외부 자극에 의해 활성화된 IKK의 작용으로 I κ B α 의 32번과 36번의 serine이 인산화된 후에 proteasome 경로를 통해 분해되는 것이 가장 잘 알려진 I κ B α 의 분해 경로이다. 본 연구에서는 기관지 상피세포와 폐포대식세포에서 CsA 또는 FK506을 전처치 한 후에 외부 자극을 가했을 때, IKK 활성화가 억제되지 않았다. 이는 CsA 또는 FK506이 외부 자극에 의한 I κ B α 의 분해를 억제하는 데는, IKK 활성화의 억제가 아닌 다른 경로가 존재함을 시사하는 소견이다. 실제로 몇몇 연구에서 calcineurin(Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase)이 I κ B의 분해를 통해 NF- κ B를 활성화 시킨다는 사실이 보고되었^{13,22}, calcineurin의 작용은 CsA와 FK506에 의해 억제된다고 알려져 있다²⁴. 따라서, CsA와 FK506에 의한 I κ B α 의 분해 억제는 IKK와는 무관하게, calcineurin 억제에 의하여 이루어질 가능성을 생각할 수 있다.

폐의 염증에서 중요한 역할을 하는 기관지상피세포와 폐포대식세포, 말초혈액 단핵구와 림프구 등에서, 현재 임상에서 사용하는 약제 중 가장 강력한 면역억제제인 CsA와 FK506의 작용기전을 규명하는 것은 중요한 일이다. 본 연구에서 저자들은 기관지 상피세포에서 CsA와 FK506이 외부자극에 의한 I κ B α 의 분해에 미치는 영향이 다르고, 단핵구, 림프구 및 폐포대식세포에서 이 약제들에

의한 IKK활성 억제와는 무관하게 이루어짐을 확인하였다. 이러한 억제가 CsA와 FK506의 면역억제작용의 일부를 이룬다고 생각되며, 폐의 염증과 관련된 여러 세포에서의 CsA, FK506의 I κ B α 분해에 미치는 영향을 규명하였다는데 이 연구의 의의가 있다.

그러나 쥐의 섬유아세포나 사구체간질 세포와는 달리 기관지 상피세포에서 FK506 자체가 I κ B α 의 분해를 유도하지 않는 기전^{18,19}, CsA와 FK506이 기관지 상피세포에서 I κ B α 의 분해에 미치는 효과의 차이, 단핵구, 림프구 및 폐포대식세포에서 CsA와 FK506에 의한 I κ B α 의 분해 억제의 기전 등에 대하여는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 향후 이 부분에 대한 추가적인 연구는 CsA와 FK506의 효과나 부작용의 차이 등에 대한 이해뿐 아니라, 염증유발성 사이토카인의 발현 및 염증의 발생에 대한 세포내 기전을 이해하는데 많은 도움을 줄 것으로 기대한다.

요 약

연구배경 :

Cyclosporin A(CsA)와 tacrolimus(FK506)은 현재 임상에서 널리 쓰이는 면역억제제이다. CsA와 FK506이 I κ B/NF- κ B 경로에 미치는 영향에는 세포에 따라 다양한 효과가 알려져 있다. 그러나 CsA와 FK506이 기관지 상피세포에서 I κ B/NF- κ B 경로에 미치는 효과에 관해서는 알려져 있지 않고, 각종 염증 세포에서의 차이에 관해서도 보고가 미미한 실정이다. 본 연구에서는 비염증세포인 기관지상피세포와, 폐의 염증에 중요한 역할을 하는 염증 세포(폐포대식세포, 단핵구, 림프구)에서 CsA와 FK506이 I κ B α 의 분해에 미치는 영향과 그 기전을 평가하였다.

방 법 :

비염증세포로는 BEAS-2B 와 A549 세포주를 이

용하였다. FK506 또는 CsA 전처리 후 TNF- α 로 자극하고 anti- $I\kappa B\alpha$ 항체를 이용한 Western blot으로 $I\kappa B\alpha$ 의 분해 여부를 관찰하였다. 염증세포로는 폐포대식세포, 말초혈액 단핵구 및 림프구를 이용하였고, 역시 FK506 또는 CsA 전처리 후 TNF- α , IL-1 β , LPS로 자극하고 anti- $I\kappa B\alpha$ 항체를 이용한 Western blot으로 $I\kappa B\alpha$ 의 분해 여부를 관찰하였다. IKK의 활성도는 GST- $I\kappa B\alpha$ 를 기질로 이용한 in vitro immune complex kinase assay로 평가하였다.

결 과 :

사용된 모든 세포에서 CsA와 FK506은 $I\kappa B\alpha$ 의 발현에 영향을 미치지 않았다. 기관지 상피세포에서 TNF- α 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해는 CsA의 전처리로 억제되었으나, FK506의 전처리로 억제되지 않았다. 단핵구, 림프구 및 폐포대식세포에서 외부자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해는 CsA 또는 FK506의 전처리로 억제되었으나 IKK활성은 억제되지 않았다.

결 론 :

CsA와 FK506은 각각 기관지 상피세포와 단핵구, 림프구, 폐포대식세포에서 외부 자극에 의한 $I\kappa B\alpha$ 의 분해를 억제하는데, 이는 IKK 활성화의 억제가 아닌 다른 경로를 통하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991;66: 807-15.
2. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992;357: 695-7.
3. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506 and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992;357:692-4.
4. Flanagan WF, Cortesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell activation. *Nature* 1991;352:803-7.
5. Durand DB, Bush MR, Morgan JG, Weiss A, Crabtree GR. A 275 bp fragment at the 5' end of the IL-2 gene enhances expression from a heterologous promoter in response to signals from the T-cell activation genes. *J Exp Med* 1987;165:395-407.
6. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T-cell activation genes. *Science* 1988;241:202-5.
7. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705-16.
8. Kopp EB, Ghosh S. NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 1995;58: 1-27.
9. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
10. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:405-55.
11. Baeuerle PA, Baltimore D. $I\kappa$ B: A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 1988;242:540-6.
12. Baeuerle PA, Baltimore D. A 65-kD subunit of active NF- κ B is required for inhibition of NF- κ B by $I\kappa$ B. *Genes Dev* 1989;3:1689-98.
13. Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kindade RL, Tocci MJ, O'Keefe

- SJ, O'Neill EA. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I κ B/MAD3, an inhibitor of NF- κ B. *EMBO J* 1994;13:861-70.
14. Mattila PS, Ullma KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon MM, Crabtree GR, Herzenberg LA. The action of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J* 1990;9:4425-33.
15. Brini A T, Harel-Bellan A, Farrar WL. Cyclosporin A inhibits induction of IL-2 receptor alpha chain expression by affecting activation of NF- κ B-like factor(s) in cultured human T lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 1990;1:131-9.
16. McCaffrey PG, Kim PK, Valge-Archer VE, Sen R, Rao A. Cyclosporin A sensitivity of the NF- κ B site of the IL2R alpha promoter in untransformed murine T cells. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2134-42.
17. Marienfeld R, Neumann M, Chuvpilo S, Escher C, Kneitz B, Avots A, Schimpl A, Serfling E. Cyclosporin A interferes with the inducible degradation of NF- κ B inhibitors, but not with the processing of p105/NF- κ B1 in T cells. *Eur J Immunol* 1997;27:1601-9.
18. Muraoka K-I, Fujimoto K, Sun X, Yoshioka K, Shimizu K-I, Yagi M, Bose H, Miyazaki I, Yamamoto K-I. Immunosuppressant FK506 Induces Interleukin-6 Production through the Activation of Transcription Factor Nuclear Factor (NF)- κ B. Implications for FK506 Nephropathy. *J Clin Invest* 1996;97(11):2433-9.
19. Zhang YK, Sun X, Muraoka K-I, Ikeda A, Miyamoto S, Shimizu H, Yoshioka K, Yamamoto K-I. Immunosuppressant FK506 activates NF- κ B through the proteasome-mediated degradation of I κ B α . *J Biol Chem* 1999;274:34657-62.
20. Dejardin E, Bonizzi G, Bellahcene A, Castrovino V, Merville MP, Bours V. Highly expressed p100/p52(NF κ B2) sequesters other NF- κ B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene* 1995;11:1835-41.
21. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 1997;388:548-54.
22. Alzuherri H, Chang KC. Calcineurin activates NF- κ B in skeletal muscle C2C12 cells. *Cell Signal* 2003;15(5):471-8.