플라보노이드 루테올린의 lippopolysacharide로 유도한 type 1 interferon 억제 효과

정원석 · 배기상[1] · 조창래[1] · 박경철[1] · 구본순[1] · 김민선[1] · 함경완[1] · 조범연[1] · 조길환[1] · 서상완[2] · 이시우[3] · 송호준[1] · 박성주[1]*

전남 한방 산업 진흥원, 1:원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2:충북 제천 전통의약 산업센터, 3:한국 한의학 연구원

Flavonoid Luteolin Inhibits LPS-induced Type I Interferon in Primary Macrophages

Won Seok Jung, Gi Sang Bae[1], Chang Re Cho[1], Kyoung Chel Park[1], Bon Soon Koo[1], Min Sun Kim[1], Kyung Wan Ham[1], Beom Yeon Jo[1], Gil Hwan Cho[1], Sang Wan Seo[2], Siwoo Lee[3], Ho Joon Song[1], Sung Joo Park[1]*

Jeonnam Development Institue for Korean Traditional Medicine,
1:Department of Herbology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2:ChungBuk Oriental Medicine Center, 3:Division of Constitutional Medicine Research, Korea Institute of Oriental Medicine

Type I interferons (IFNs) are critical mediators of the innate immune system to defend viral infection. Interferon regulatory factor (IRF) and signal transducer and activator of transcription (STAT) play critical roles in type I IFN production in response to viral infection. Luteolin is natural polyphenolic compounds that have anti-inflammatory, cytoprotective and anti-carcinogenic effects. However, the mechanism of action and impact of luteolin on innate immunity is still unknown. In this study, we examined the effects of luteolin on the lipopolysacchride (LPS)-induced inflammatory responses. Luteolin inhibited Type I IFNs expression of mRNA and increased interleukin(IL)-10 expression of mRNA. Next, we examined the protective effects of IL-10 using IL-10 neutralizing antibody (IL-10NA). Blockade of IL-10 action didn't cause a significant reduction of Type I IFNs than LPS-induced luteolin pretreatment. Pretreatment of luteolin inhibited the level of IRF-1, and IRF-7 mRNA and the nuclear translocation of IRF-3. Also, luteolin reduced the activation of STAT - 1, 3. Theses results suggest that luteolin inhibits LPS-induced the production of Type I IFNs by both IRFs and STATs not IL-10 and may be a beneficial drug for the treatment of inflammatory disease

Key words : luteolin type I interferon(IFN), lipopolysacchride(LPS), interferon regulatory factor(IRF), signal transducers and activators of transcription(STAT)

서 론

Interferone (IFN)-α,β는 세포에서 바이러스에 대항하는 체액성 면역 인자로 알려져 있으며 이러한 이 두 사이토카인은 비슷한 유전자 구조와 기능을 가지고 있어 Type I IFN으로 구분되어 진다[1-11].

이 비슷한 유전자 구조를 가지고 있는 IFN-α와 IFN-β의 차이점은 사람이나 쥐에서 IFN-α는 다양한 유전자 subtype이 존재하는 반면 IFN-β의 경우에는 하나의 유전자 타입으로 나타나는 차이를 나타낸다.

현재 IFN-α/β의 생물학적 기능이나 기전에 관한 다양한 연구가 진행되어 밝혀진 사실은 선천면역과 후천면역 조절에 관여한다고 알려진 Toll-like receptor (TLR) signaling 과 깊은 연관이 있다는 사실이다. 즉 간단히 말하면 lipopolysacchride (LPS)와 같은 pathogen-associated molecules 이 항원제시세포들을 자극하였을때 TLR 신호전달을 통하여 다양한 효과 분자들이 발현을 하는데 그중에 IFN-α/β가 포함된다[15-20].

* 교신저자 : 박성주, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
· E-mail : parksj08@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6450
· 접수 : 2009/09/07 · 수정 : 2009/09/25 · 채택 : 2009/10/07

이 TLR 신호전달 과정 중에서 IFN-α/β 유전자가 발현하기 위한 기전으로 전사단계에서 IFN regulatory factors (IRFs)는 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 최소 4가지 IRF-1, 3, 5, 7이 IFN 생성에 관여하는데 그 중에서 IRF-7은 IFN-α/β의 유전자 발현 조절에 가장 핵심적인 역할을 담당하며 또한 IRF-3는 자연적인 자극에 대항하는데 중요한 역할을 하게 된다[21-27].

또한 IFN-α/β가 생성되어 세포에서 분비되면 STAT-1, 3가 활성화 되는데 STAT-1, 3의 발현은 면역기간이나 염증반응에서 사이토카인의 지속적인 분비에 관여하는 중요한 역할을 하는 분자이다.

플라보노이드는 폴리페놀릭 화합물로써 식용식물이나 채소 등의 어디에나 나타나는 물질로써 특정 플라보노이드에서는 항종양, 항허혈, 항염증 등의 다양한 치료효과를 나타내었고 이것은 항산화 작용에 의한 것이라고 생각되어왔다[28].

그럼에도 불구하고 플라보노이드의 약리학적 작용에 관한 몇몇 연구들은 플라보노이드의 항염증작용이 항산화 활성이 아닌 세포의 부착 과정을 조절하여 나타난 것이라 연구하였고[29] 그 중에서 다양한 식물 추출물이나 금은화, 인동초, 셀러리, 피망, 소엽, 소자, 카밀라에서 발견되는 luteolin (Chart 1) (3′, 4′,5,7-tetrahydroxyflavone)은 LPS로 유도한 tumor necrosis factor (TNF)-α의 분비를 억제하였고 마우스 대식세포에서 NF-κB를 활성화 시켜 항염증 작용을 나타내었다. 하지만 luteolin의 항염증 작용을 설명하기엔 아직 불분명하다.

이에 우리는 luteolin 이 IFN-α/β의 생성에 어떻게 관여 하는지와 그 기전 대해 조사하였다.

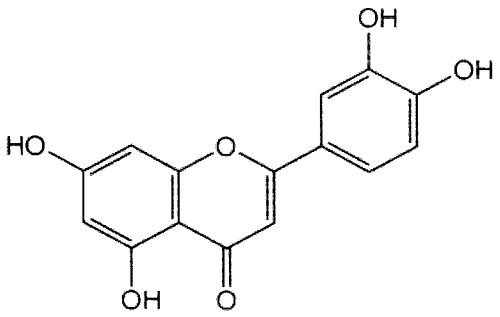

Fig. 1. The structure of Luteolin

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Luteolin 은 Roth Chemicalien (Karlsruhe, Germany)에서 구입하였으며 Monoclonal neutralizing anti-mouse IL-10 Antibody는 RnD systems (USA)에서 구입하였고 세포배양에 사용한 RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin는 Gibco BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다. 그 외에 Thioglycollate (TG)는 BD Pharmingen (San Diego, CA). TRIzol reagent and polymerase chain reaction (PCR) reaction kit는 Invitrogen coorporation (Carlsbad, CA) 구입하였으며, 실험에 사용한 항체인 Phospho STAT-1,3 antibodies은 Cell signaling (Beverly, MA). STAT-1,3 anti antibodies는 SantaCruz (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. 실험동물인 C57BL/6 mice는 Orient Bio Co. (Sungnam, KyungKiDo, Republic of Korea)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 복강대식세포 배양

실험 3~4일 전에 실험 mouse에 염증 물질 (thioglycollate 2~3 ml)을 i.p. 로 투여하여 RPMI-1640+10%FBS medium을 6~7 ml를 복강에 투여하여 넣어 복강액을 뽑아내 원심분리 한 후 cell을 counting해서 Dish나 Plate에 깔고 5% CO_2 37℃가 유지되는 incubator에서 3시간 배양하고, suspension 세포를 버린 후에 부착한 세포를 대식세포로 간주하여 실험하였다

2) RNA 추출

Total RNA는 Tri-zol 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 luteolin 을 전 처리한 뒤 LPS로 자극한 후 24시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml 씩 가해 세포를 포집한 후, 원심분리를 하여 위에 PBS는 버리고 바닥에 남은 세포를 Tri-zol (invitrogen, USA) 용액을 1 ml 넣어서 세포를 용해시킨 후 100 ㎕의 chloroform 용액을 가하고 두세번 잘 섞어준 뒤 12,000RPM에서 15분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 12,000RPM에서 10분간 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 ㎕씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량한다. 추출한 RNA는 reverse transcriptase PCR 의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 간단히 기술하자면 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 mg) 에 0.5 mg 의 oligo-(dT)을 넣고 70℃ 에서 10분간 변성시켰다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 500 mM dNTPs, 200Unit reverse transcriptase 을 첨가하고 42℃에서 1시간동안 반응시켰다. 그 후에 PCR은 각각의 tube에 1 ml cDNA, 1x PCR buffer, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTPs, 0.2 mM 의 primer를 넣고 PCR 조건인 92℃에서 30초, 58℃에서 45초, 그 후에 72℃에서 30초를 30cycle 반복하였다.

3) Primers and probes

Forward (f)와 reverse (r) primer는 Invitrogen에서 합성하였고 TaqMan probe는 MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany)에서 합성하였고 TaqMan minor groove binder (MGB) probe (Applied Biosystems)는 Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems)를 사용하여 디자인하였다.

Real-time PCR에 사용한 primer 와 probe 는 아래와 같다.

· Primer

- TTG CTC GAG ATG TCA TGA AGG A (mHPRT-f)
- TGA GAG ATC ATC TCC ACC AAT AAC T (mHPRT-r)
- CCG AAG ACC TTA TGA AGC TCT TTG (mIRF-1-f)
- GCA AGT ATC CCT TGC CAT CG (mIRF-1-r)
- CTG GAG CCA TGG GTA TGC A (mIRF-7-f)

- AAG CAC AAG CCG AGA CTG CT (mIRF-7-r)
- CCT GTG TGA TGC AGG AAC C (mIFN-α4-f)
- TCA CCT CCC AGG CAC TGA (mIFN-α4-r)
- ATG AGT GGT GGT TGC AGG C (mIFN-β-f)
- TGA CCT TTC AAA TGC AGT AGA TTC A (mIFN-β-r)
- GGG AGA ACC TGA AGA CCC TCA (mIL-10-f)
- TGC TCT TGT TTT CAC AGG GAA G (mIL-10-r)

· Probe

- FAM-TGG GAG GCC ATC ACA TTG TGG CTA MRA (mHPRT)
- FAM-CAG TCT GAG TGG CAG CGG ACA CAC A-TAMRA (mIRF-1)
- FAM-CTG GAG GGC GTG CAG CGT GA-TAMRA (mIRF-7)
- FAM-AGA CTC CCT GCT GGC TGT GAG GAC A-MGB-NFQ (mIFN-α4)
- FAM-AAG CAT CAG AGG CGG ACT CTG GGA-TAMRA (mIFN-β)
- FAM-CTG AGG CTA CGG CGC TGT CAT CG-TAMRA (mIL-10)

4) 면역염색법

마우스 복강내에서 추출한 대식세포에 luteolin을 전처리 한 그룹과 그렇지 않은 그룹에 500 ng/ml LPS로 37℃에서 1시간 동안 자극한 뒤 세포를 고정시키기 위해 PBS로 3회 세척한 후에 4%paraformaldehyde용액에 30분간 배양하였다. 그 뒤 0.1% TritonX-100용액으로 상온에서 15분간 배양한 후 세척을 하고 blocking serum으로 1시간 blocking 한뒤 1:100으로 희석한 1차 항체 IRF3 antibody (Zymed, 51-3200, invitrogen, Carlsbad, CA92008, USA)를 넣어 overnight 동안 배양하고 다음날 1:50으로 희석한 Alexafluor 568 형광이 붙어있는 2차 항체 goat anti-rabbit IgG (invitrogen, USA)로 4시간 동안 암실에서 반응시키고 그 후 핵염색을 위하여 1:1000으로 희석시킨 DAPI로 30분간 염색시키고 형광현미경으로 관찰하였다.

5) Western blot analysis

복강에서 추출한 마우스 대식세포를 60 mm culture dish에 1×10^6 cells/ml로 세포를 배양하고 serum free media(RPMI1640)으로 12시간 starvation 시킨 후 luteolin (25 mM)으로 1시간 전처리 한뒤에 LPS (500 ng/ml)로 자극하여 cold PBS로 3회 세척한 후 시간별로 (0, 1, 2, 3 h) cell을 harvest하여 cell을 얻은 뒤 원심분리(5000RPM, 5min) 하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 수거하였다. lysis buffer(lysis buffer 1 ml + phosphotase inhibitor 10 ㎕+protase inhibitor 10 ㎕)를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리(15000RPM, 20min)하여 찌꺼기를 가라앉히고 단백질 정량하였다. 동일한양의 단백질을 샘플링 버퍼(4X)를 같이 넣어 섞은 다음 그 샘플을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후 맴브레인에 옮기고 나서 5% skin milk로 2h blocking 하였다. STAT-1, 3의 phosphorylation과 STAT-1, 3를 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

6) Statistical analysis

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. luteolin이 IFN-α/β의 mRNA 생성에 미치는 영향

LPS로 유도된 IFN- α/β에 대한 루테올린의 효과를 확인하기 위하여 DMSO 대조군과 루테올린을 처리한 그룹을 비교하였다. 대식세포에 luteolin(25 mM)을 1시간 전처리하고 LPS (500 ng/ml)로 자극한뒤 시간대(0.5, 1, 3, 6 h)별로 분석하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 IFN-α/β의 mRNA레벨은 luteolin을 처리한 샘플에서 DMSO 대조군에 비해 현저하게 줄어든 것을 확인할수 있었다. 이 실험에서 루테올린의 세포독성은 없었다.

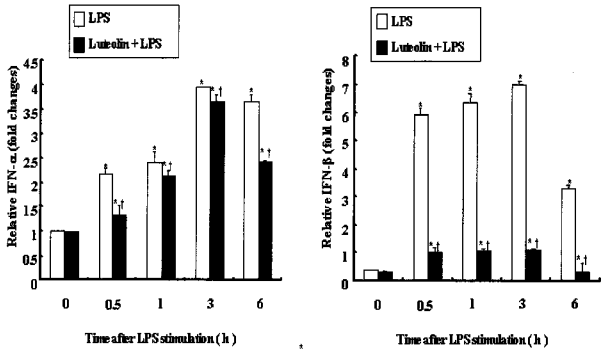

Fig. 1. Effect of luteolin on LPS-induced IFN-a/b. The cells were pretreated with 25 mM luteolin for 60 min prior to stimulation with LPS (500 ng/ml) for indicated time. IFN-α/β mRNA transcription levels were examined by real time RT-PCR. *, P < 0.05 vs. DMSO treatment; †, P < 0.05 vs. LPS treatment alone. Data represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments.

2. luteolin의 IL-10을 통한 면역조절 기전 조사

루테올린의 IFN-α/β 생성억제 기전을 조사하기 위하여 IL-10을 조사한 결과 IL-10은 루테올린을 전처리 하였을 때 생성이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2a). 이 결과로 루테올린이 IFN-α/β 생성을 억제하는 기전에 IL-10이 관련이 있다고 가정하여 그 결과를 확실하게 검증하기 위하여 IL-10 중화항체인 neutralizing IL-10 antibody를 이용하여 실험한 결과 IL-10이 루테올린의 IFN-α/β의 생성에 미치는 영향은 없었다(Fig. 2b). 이 결과로 루테올린이 type 1 IFN 생성에 미치는 영향은 IL-10 경로를 통해서가 아니라 다른 경로를 통해서 이루어 진다는 사실을 입증하였다.

3. 루테올린의 IRF에 미치는 영향 조사

루테올린의 다른 면역조절 기전을 조사하기 위하여 IFN-α/β의 생성에 중요한 역할을 한다고 알려진 IRF 를 조사하였다. Real-Time RT-PCR과 면역염색법을 이용하여 IRF-1, 3, 7에 루테올린이 미치는 영향을 조사한 결과 IRF-1, 7의 mRNA 생성은 루테올린이 유의성 있게 억제하였다는 사실을 확인하였고 IRF-3가 핵으로 이동하여 IFN을 생성하는 과정도 또한 억제한다는 사실을 확인하였다(Fig. 3).

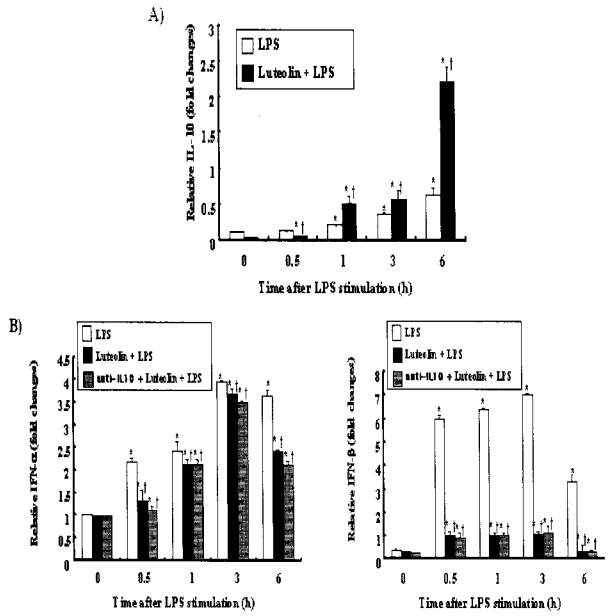

Fig. 2. IL-10 has no association in LPS-induced IFN-a/b inhibition of luteolin. (A) The murine macrophages were pretreated with 25 mM luteolin for 60 min prior to stimulation with LPS (500 ng/ml) for indicated time. IL-10 mRNA levels were examine by real time RT-PCR. (B) Using IL-10 neutralizing Ab (10 mg/ml), the cells were pretreated nIL-10 for 60 min, 25 mM luteolin incubated for 60 min after the nIL-10 treatment, LPS was stimulated then for indicated time. IFN-α/β mRNA transcription levels were examined by real time RT-PCR. *, P < 0.05 vs. DMSO treatment; †, P < 0.05 vs. LPS treatment alone. Data represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments.

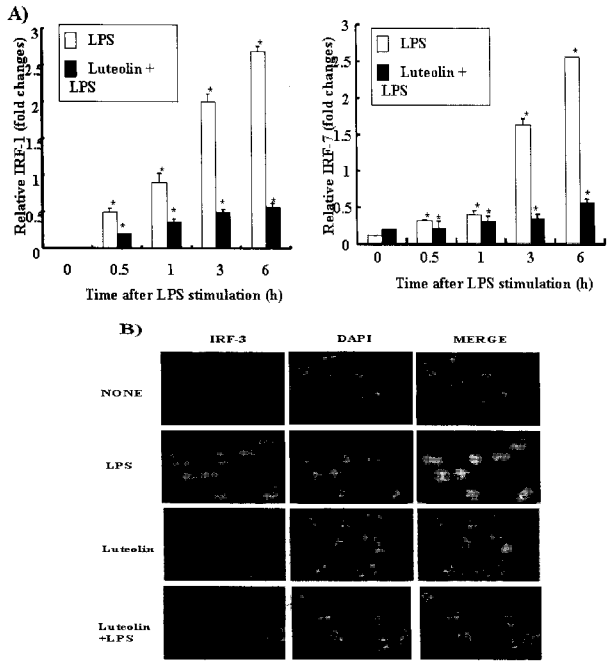

Fig. 3. The inhibitory effects of luteolin on LPS-induced IRFs. To examine the effect of luteolin on LPS induced (A) IRF mRNA expression, the cells were pretreated with or without 25 mM luteolin for 60 min prior to incubation with 500 ng/ml LPS for the indicated time points. IRF mRNA expression was measured using real-time RT-PCR. (B) Nuclear translocation of IRF-3 was examined using immunostaining. The cells were pretreated with 25 mM luteolin for 60 min and then stimulated with 500 ng/ml LPS or LPS alone for 60 min. *, P < 0.05 vs. DMSO treatment; †, P < 0.05 vs. LPS treatment alone. Data represent the mean ± S.E.M. of three independent experiments.

4. 루테올린이 STAT 기전에 미치는 영향 조사

STAT 기전은 생성된 type 1 IFN에 의해 활성화 된다고 널리 알려져 있다. 그러므로 우리는 STAT-1, 3의 인산화를 조사하여 루테올린이 실질적으로 LPS로 유도된 type 1 IFN의 생성에 관여하고 그 이후의 기전인 STAT signaling에 또한 영향을 미친다는 사실을 밝혀내었다. LPS로 자극한 대식세포에서 LPS는 2, 3시간부터 인산화가 진행되어 신호전달이 시작되는데 비해 루테올린을 전처리한 곳에서는 STAT-1, 3 모두 인산화하지 않았다 (Fig. 4). 이 결과는 루테올린이 STAT-1, 3 의 활성화를 줄인다는 것을 보여주고 있다.

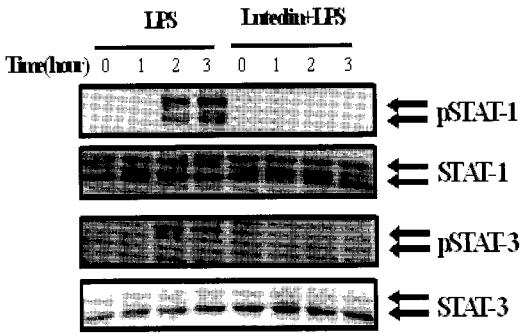

Fig. 4. Effects of luteolin on reduction of STAT- 1, 3 phosphorylation. To examine the effect of luteolin on inhibition of STAT-1, 3 activation, the cells were pretreated with 25 mM luteolin for 60 min prior to stimulation with LPS (500 ng/ml) for the indicated time points. The 20 μg of protein from each cell lysate was resolved on 10% SDS-PAGE. Western blot analysis was performed to detect the activation of STAT-1, 3. STAT-1, 3 are loading control. Similar results were obtained in three independent experiments.

고 찰

대식세포는 LPS와 같은 그람음성균 세포외막 성분을 인식하여 우리 몸을 방어하는데 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 그래서 본 저자는 루테올린이 LPS로 유도한 type 1 IFN에 미치는 영향을 조사하는데 마우스 복강 대식세포를 이용하여 실험을 진행하였다.

대식세포가 LPS와 같은 자극에 의해 활성화 되면 증식을 멈추고 활성화된 표현형으로 전환되어 초기에 나오는 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, NO 와 같은 물질을 생산하여 대항한다[33]. 게다가 IL-10과 같은 항염증 효과를 갖는 사이토카인의 분비를 지연시키게 되는데 이것은 면역반응의 억제에 매우 중요한 역할을 한다[34]. 대식세포에서 루테올린의 항염증작용에 대한 많은 논문들에서 연구가 진행되었지만 주로 초기 사이토카인과 NO 생성의 억제에 관한 내용들이었다[28-30,35,36]. 이에 우리는 루테올린이 type 1 IFN에 미치는 영향에 대한 연구를 진행하였다. 그 결과 flavonoid인 루테올린이 LPS로 유도한 type 1 IFN과 IRFs에 억제효과가 있다는 사실을 밝혀 내었다.

TLR4는 LPS와 그람음성균의 lipid A 부분 혹은 바이러스의 구성부분 예를 들어 respiratory syncytial virus의 결합 단백질 또는 mouse mammary tumor virus와 Moloney murine leukemia virus의 표면 단백질을 인식하여 활성화 된다. 그러나

TLR4의 어떤 부분이 바이러스 감염에 의해 수반되는 IFN 반응을 나타내는지는 아직 불분명하다 하지만 확실한 사실은 LPS에 의한 자극에서 TLR4 신호전달 기작에 의해 IFN 유전자가 생성이 증대한다는 사실이다[17,19,20,39,40].

IFN α/β는 바이러스 감염에 대항하는 체내의 첫 번째 방어선이라고 잘 알려져 있으며 또한 최근의 연구에서는 TRIF의존적인 IFN- α/β 생산이 자가면역질환 조절에 중요한 역할을 한다는 사실이 알려졌다[41,42]. 게다가 IFN- α/β는 면역조절에 관여하는 세포의 항상성과 발생에 영향을 미친다. 즉 골수에서 type 1 IFN들은 적은 양이 생성되고 hematopoietic cell들인 B cell, T cell, osteoclasts과 myeloid DCs 분화의 항상성에 중요한 영향을 미치고[43-45] IFN 기전은 항종양 활성과 세포성장조절에 중요한 역할을 한다[46-48]. 이 결과는 type 1 IFN들이 생물학적으로 중요한 역할을 하며 면역 항상성과 유지에 여러 세포에 영향을 미친다는 사실을 말한다.

Type 1 IFN들의 생성에 가장 중요한 조절인자는 IRF로 알려져 있다. 즉 다양한 종류의 IFN 생성에 IRF-7이 필요하다. 하지만 IFN- α/β는 IRF-7이 없이도 생산될 수 있는데 그것은 항상 발현하고 있는 IRF-3(NF-kB와 ATF-2/c-JUN에 연관)에 의해서이다. 그래서 type 1 IFN의 생성에는 포지티브한 피드백이 나타난다. 예를 들어 fibroblasts에서 IRF-7과 자가분비에 의해서 생성된 IFN-α/β가 또 다른 IFN-α/β들을 유도한다. 그리고 IRF-3는 IRF-7에 비해서 이런 IFN-α/β 생성기전(포지티브 피드백)에 더 중요한 역할을 하다고 알려져 있다[27,49]. 그 사실은 뒷바침 하는 사실로 IRF3 유전자 결핍 쥐에서는 LPS에 의한 endotoxin shock 내성을 나타내었으며[49] shock에서 중요한 역할을 하는 것은 IFN-β라고 알려져 있다[50].

이 결과로 TLR4는 IRF-3가 homodimer를 이루도록 매개하고 그것은 TRAM-TRIF-NAP1-TBK1 경로에 의해서라는 것을 알 수 있다. 그러나 만약에 IRF-7이 IFN-α/β 전처리에 의해 상승하였다면 IRF-3 유전자가 결핍된 DC들에서도 LPS에 의한 IFN-α/β의 생성을 볼수 있었을 것이다. 결론적으로 이 처럼 IFN-α/β의 생성은 복잡하게 이루어지고 있으며 IRF-7은 TLR4 신호전달에 의해 활성화 될수 있으며 만약에 이전의 자극에 노출되었다면 LPS로 활성화된 IRF-7은 IFN- α/β 유전자 발현에 가장 중요한 역할을 담당하게 된다. 이 논문에서 루테올린은 IRF-1, 7의 mRNA생성을 억제하였고 IRF-3가 핵으로 이동하는 것을 막았다는 사실을 보여주었다. 이 결과는 루테올린의 type 1 IFN 생성억제는 IRF-1, 3, 7을 통해 이루어 진다는 것을 나타낸다.

IL-10은 면역억제와 항염증 작용이 있는 사이토카인으로 대식세포와 수지상세포의 불활성화에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다[51]. 그 기전은 IL-10이 항원제시를 억제하고 사이토카인과 기타 염증 매개체들의 생성 억제에 기인한다. 그러므로 IL-10은 감염과 염증반응에서 면역반응이나 염증반응의 억제에 중요한 역할을 한다[51]. IL-10 활성 화 수용체는 Jak1-Tyk2 kinase와 연관되어 있고 이 기전은 STATs 활성화를 이끈다. 우리의 연구에서는 루테올린이 IL-10 생산을 유도하였다. 그래서 루테올린이 면역조절에 관여 하는 기전을 IL-10 유도에 의해서라는 가설을 세우고 IL-10 중화 항체를 사용하여 IL-10이 기능을 잃었을때 IFN-α/β에 생성에 루테올린이 미치는 영향을 실험하였다. 그 결과 IL-10이 기능을 잃었을때에도 IFN-α/β 생성에는 큰 변화가 없었다. 이에 우리는 IL-10이 IFN-α/β의 생성에 영향이 없다는 결론을 내렸다.

세포내 신호전달에서 생성된 IFN-α/β가 세포질 내에 IFN-α/β수용체와 결합하면 Jak1과 Tyk2의 활성화 그 외 타이로신 잔기들의 인산화를 시키게 되는데 이 것은 STAT-1을 포함하는 STAT 결합부위(docking sites)를 생성하게 된다[6].

STAT-3 또한 IFN-α/β수용체의 아래 기전으로 생성된 IFN-α/β에 의해 활성화된다. 우리의 결과는 루테올린이 STAT-1, 3의 활성화를 억제한다는 것을 보여주었다. 이 결과는 STAT-1 의 활성화를 줄이므로써 루테올린이 type 1 IFN의 생성억제에 큰 영향을 미친다는 사실을 나타낸다.

이러한 실험 결과들은 루테올린은 IFN-α/β 생성억제 효과가 있으며 그 기전은 IRF-1, 3, 7을 억제하고 STAT-1, 3의 인산화를 억제 하여 나타난다는 사실을 나타내고 있으며 이것은 향후 플라보노이드인 루테올린의 항염증 약물로써 개발 가능성이 있음을 나타낸다.

결 론

마우스의 복강 대식세포를 LPS로 자극하였을때 루테올린의 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

루테올린이 type 1 IFN인 IFN-α/β의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Real-Time RT-PCR방법으로 mRNA 레벨을 조사하였을 때 루테올린은 IFN-α/β 생성억제 효과가 있음을 확인하였다. 그리고 그 기전으로 IL-10과 IRF-1, 3, 7을 조사하였을 때 IL-10은 영향이 없었고 IRF-1, 7의 mRNA는 루테올린이 억제하였고 IRF-3는 항상 발현하는 단백질이기 때문에 핵으로 들어가서 신호전달 과정을 면역염색법으로 실험한 결과 IRF-3의 신호전달도 억제한다는 사실을 확인하였다. 그리고 IFN-α/β가 생성되서 관여하는 STAT 기전을 조사 하였을 때 또한 마찬가지로 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과로 보아 루테올린은 대식세포에 작용하여 IRF-1, 3, 7을 억제하여 IFN-α/β 생성을 억제하였고, 또한 STAT-1, 3의 인산화도 억제함으로써 IFN-α/β 가 지속적으로 생성되는 것 또한 억제한 것으로 보아 항염증성 효과를 가지고 있다고 볼 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 한국한의학연구원의 지원을 받아 기관고유사업의 일환으로 수행된 연구입니다. (K09011)

참고문헌

1. Taniguchi, T., Mantei, N., Schwarzstein, M., Nagata, S.,

Muramatsu, M., Weissmann, C. Nature 285: 547-549, 1980.
2. Weissmann, C., Weber, H. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 33: 251-300, 1986.
3. Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., Samuel, C.E. Annu Rev Biochem 56: 727-777, 1987.
4. Taniguchi, T. Annu Rev Immunol 6: 439-464, 1988.
5. Vilcek, J., Sen, G.S. "Interferons and other cytokines", Virology, 3rd edn, eds by Fields, D.M., Knipe, P.M., Howley, P.M. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, p 395, 1996.
6. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D. Annu Rev Biochem 67: 227-264, 1998.
7. Samuel, C.E. Clin Microbiol Rev 14: 778-809, 2001.
8. Levy, D.E., Garcia-Sastre, A. Cytokine Growth Factor Rev 12: 143-156, 2001.
9. Katze, M.G., He, Y., Gale, M. Jr. Nat Rev Immunol 2: 675-687, 2002.
10. Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R. Immunol Rev 202: 8-32, 2004.
11. Platanias, L.C. Nat Rev Immunol 5: 375-386, 2005.
12. Gallucci, S., Lolkema, M., Matzinger, P. Nat Med 5: 1249-1255, 1999.
13. Biron, C.A. Immunity 14: 661-664, 2001.
14. Le Bon, A., Tough, D.F. Curr Opin Immunol 14: 432-436, 2002.
15. Iwasaki, A., Medzhitov, R. Nat Immunol 5: 987-995, 2004.
16. Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B., Kono, D.H. Annu Rev Immunol 23: 307-336, 2005.
17. Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O., Akira, S. Int Immunol 14: 1225-1231, 2002.
18. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. Nature 413: 732-738, 2001.
19. Hertzog, P.J., O'Neill, L.A., Hamilton, J.A. Trends Immunol 24: 534-539, 2003.
20. Takeda, K., Akira, S. Int Immunol 17: 1-14, 2005.
21. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., Tanaka, N. Annu Rev Immunol 19: 623-655, 2001.
22. Nguyen, H., Hiscott, J., Pitha, P.M. Cytokine Growth Factor Rev 8: 293-312, 1997.
23. Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarté, M., Servant, M.J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., Hiscott, J. Gene 237: 1-14, 1999.
24. Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., Taniguchi, T. Cell 54: 903-913, 1988.
25. Barnes, B.J., Moore, P.A., Pitha, P.M. J Biol Chem 276: 23382-23390, 2001.
26. Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T. Nature 434: 772-777, 2005.
27. Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., Taniguchi, T. Immunity 13: 539-548, 2000.
28. Middleton, Jr. E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. Pharmacol Rev 52: 673-751, 2002.
29. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. Biochem Soc Trans 24(3):790-795, 1996.
30. Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economou, M., Fotsis, T., Roussos, C. J Pharmacol Exp Ther 296(1):181-187, 2001.
31. Levy, D.E., Marie, I., Prakash, A. Curr Opin Immunol 15: 52-58, 2003.
32. Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J., Vogel, S.N. Nat Immunol 3: 392-398, 2002.
33. Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A.F., Cardo, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J., Celada, A. Immunobiology 204: 534-550, 2001.
34. Jung, M., Sabat, R., Kratzschmar, J., Seidel, H., Wolk, K., Shonbein, C., Schütt, S., Friedrich, M., Döcke, W.D., Asadullah, K., Volk, H.D., Grütz, G. Eur J Immunol 34: 481-493, 2004.
35. Chen, C.Y., Peng, W.H., Tsai, K.D., Hsu, S.L. Life Sciences 81: 1602-1614, 2007.
36. Monica, C., Isabel, B., Elvira, B., Saleta, S., Jordi, Z., Julio, G., Fermin, S.M., Antonio, Z. Biochem Pharm 72: 1010-1021, 2006.
37. Haynes, L.M., Moore, D.D., Kurt-Jones, E.A., Fingberg, R.W., Anderson, L.J., Tripp, R.A. J Virol 75: 10730-10737, 2001.
38. Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., Finberg, R.W. Nat Immunol 1: 398-401, 2000.
39. Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Mühlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K., Akira, S. J Immunol 167(10):5887-5894, 2001.
40. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. Nat Immunol 4(11):1144-1150, 2003.
41. Guo, B., Chang, E.Y., Cheng, G. J Clin Invest 118: 1680-1690, 2008.
42. Shinohara, M.L., Kim, J.H., Garcia, V.A., Cantor, H. Immunity 29: 68-78, 2008.
43. Taniguchi, T., Takaoka, A. Nat Rev Mol Cell Biol 2:

378-386, 2001.

44. Lin, Q., Dong, C., Cooper, M.D. J Exp Med 187: 79-87, 1998.
45. Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E.F., Taniguchi, T. Nature 416: 744-749, 2002.
46. Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., Taniguchi, T. Nature 424: 516-523, 2003.
47. Takaoka, A., Taniguchi, T. Cancer Sci 94: 405-411, 2003.
48. Honda, K., Takaoka, A., Taniguchi, T. Immunity 25: 349-360, 2006.
49. Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K., Taniguchi, T. Biochem Biophys Res Commun 306: 860-866, 2003.
50. Karaghiosoff, M., Steinborn, R., Kovarik, P., Kriegshäuser, G., Baccarini, M., Donabauer, B., Reichart, U., Kolbe, T., Bogdan, C., Leanderson, T., Levy, D., Decker, T., Müller, M. Nat Immunol 4: 471-477, 2003.
51. Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A. Annu Rev Immunol 19: 683-765, 2001.