Molecular Mechanisms through Which Peptidoglycan Induces IL-1 β Expression in Monocytic Cells

Hyun-Cheol Seo, Sun-Mi Kim, Sae-A Lee, Byung-Yong Rhim and Koanhoi Kim*

Department of Pharmacology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

Received October 16, 2012 / Revised November 21, 2012 / Accepted December 6, 2012

This study investigated the effects of PG on IL-1 β expression and determined cellular factors involved in PG-mediated IL-1 β up-regulation in mononuclear cells in order to understand the molecular mechanisms underlying inflammatory responses associated with bacterial pathogen-associated molecular patterns in the diseased artery. Exposure of human monocytic leukemia THP-1 cells to PG resulted in enhanced secretion of IL-1 β and also profound induction of the IL-1 β gene transcript. These effects were abrogated by OxPAPC, an inhibitor of TLR-2/4. Pharmacological inhibitors such as U0126, SP6001250, Akti IV, rapamycin, and DPI also significantly attenuated PG-mediated IL-1 β up-regulation. However, polymyxin B did not influence the IL-1 β expression. This study indicates that PG contributes to vascular inflammation in atherosclerotic plaques by up-regulating expression of IL-1 β via TLR-2, Akt, mTOR, MAPKs, and ROS.

Key words : Interleukin-1 β , peptidoblycan, THP-1 cell

서 론

Interleukin (IL)-1 family는 상당한 염기서열 상동관계를 공유하고 β -pleated sheet 구조(IL-1 α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist [IL-1Ra], IL-18)를 포함하는 4가지 단백질로 구성된다. IL-1 β 는 31 kDa leaderless procytokine으로 바뀌고 세포 내에서 caspase-1에 의해 잘리어 10 kDa의 활성화된 형태로 된다[8,4]. IL-1 receptor type 1 (IL-1R1)에 IL-1 β 가 연결되면 IL-1R 보조단백질은 수용체 복합체에 의해 모이고, 세포내 신호변환은 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성화인산화 cascade를 통해 실행된다. 신호 cascade는 전사인자 nuclear factor kappa B (NF- κ B)와 activating protein-1 (AP-1)와 염증성 유전자의 전사 후에 활성화되어 최고점에 달한다[2,24]. 광범위한 신호 증폭 때문에 적은 양의 IL-1 β 로도 상당한 생물학적 활동을 나타낸다.

IL-1 cytokine은 내피세포, 평활근세포 및 대식세포의 강한 염증성 효과로 인해 죽상동맥경화증의 혈관벽 염증전파수단으로 간주된다[15,21,22]. 임상 및 동물연구에서 IL-1 α 또는 그 수용체 IL-1R1의 발현은 죽상동맥경화에 연계된 것으로 나타났다. 또한, 인간 죽상동맥경화 병변에 존재하는 대식세포는 IL-1 β 를 만든다[6,18]. IL-1 β 의 결핍은 apoE가 부족한 생쥐에

서 죽상동맥경화증의 심각성을 감소시킨다[11]. IL-1R1 $^{-/-}$ 생쥐에서 IL-1R 신호차단은 유전학, 식이요법, 감염노출을 포함한 여러 활성 성향요인과 혈관병변의 악화를 일으키는 것으로 알려진 실험조건에서 죽상동맥경화의 진행을 감소시킨다[3]. 따라서 IL-1 β 발현의 조절을 이해하는 것은 죽상동맥경화와 긴밀한 관계가 있으므로 중요하다.

Peptidoglycan (PG)은 그람양성세균의 세포벽 구성성분이고 평범한 사람의 장과 다른 점막의 식물군에 풍부하게 존재한다. 점막이 아닌 곳에서 PG는 세균성 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)로 선천적 면역 체계에 의해 인식되므로 Toll-like receptors (TLR)를 통한 염증을 촉진한다[26,28]. 또한 PG는 단핵세포에 의한 α m β 2-integrin의 발현을 유도하고 단핵세포의 β 2-integrin에 의존적인 이동(migration)을 증가시킨다[19]. PG는 내피 세포에 의한 부착 분자의 발현과[5] 단핵세포와 대식세포에 의한 염증성 사이토카인과 케모카인을 증가시킨다[13,27]. PG는 주로 대식세포가 풍부한 죽종부위, 사람의 죽상동맥경화 병변에서 높은 비율로 존재한다[12]. 따라서 병변에서 추가적인 염증성 요소로 추정된다. 따라서 PG가 염증반응을 유도하는 것을 통한 신호경로의 설명은 죽상동맥경화증에서 세균성 PAMP의 역할의 현재의 지식에 기여할 것이다. 그러나 PG가 IL-1 β 발현을 유도하는 분자메커니즘은 아직 밝혀지지 않았다.

본 실험에서 PG가 단핵세포와 대식세포에 의한 IL-1 β 의 분비에 영향을 주는지를 조사하였다. PG가 THP-1 세포주, 사람의 급성 단구계열의 백혈병 세포주에서 IL-1 β 의 분비를 상당히 증가시키는 것을 발견하였다. 또한 본 실험에서는 PG와 매개된 사이토카인 발현에 관계된 세포분자를 확인하고, PG

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8064, Fax : +82-51-510-8068

E-mail : koanhoi@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

와 매개된 IL-1 β 상향조절에 TLR2, Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR), MAPK, and reactive oxygen species (ROS)가 관여하는 것을 발견했다.

재료 및 방법

세포배양 및 시약

THP-1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하고 제안한 대로 유지하였다. 황색포도상구균으로부터 분리한 PG인 polymyxin B와 oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonosyl-sn-phosphatidylcholine (OxPAPC)는 InvivoGen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 내독소가 없는 bovine serum albumin (BSA), LY294002, diphenyleneiodonium chloride (DPI), N-acetylcysteine (NAC), rapamycin과 SP600125는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. U0126, SB202190, Akt inhibitor IV (Akti IV)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 억제제 실험에서 THP-1세포를 앞의 화학물질들을 1시간동안 처리하고 PG (1 μ g/ml)를 더해 9시간 동안 자극하였고, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)로 배지에 분비된 IL-1 β 의 양을 측정하고 reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)로 IL-1 β 유전자 전사체를 증폭시켰다.

IL-1 β ELISA

분비된 IL-1 β 의 양을 상용되는 ELISA kit를 제조업자의 지

시에 따라 이용하여 측정하였다(BD Biosciences, San Diego, CA, USA). THP-1 세포는 0.1% BSA가 들어있는 RPMI medium 1640에 하룻밤 동안 배양하고, PG에 노출시킨 후 세포 배양배지를 모았다. 세포배양배지와 IL-1 β 의 표준을 IL-1 β 가 붙어있는 단일클론항체로 미리 코팅되어있는 microtiter plate에 넣어주었다. 2시간 배양 후, plate를 씻고 IL-1 β 에 특정한 효소-복합 다 클론성 항체를 배양하였다. Plate를 씻고 기질을 첨가하고 배양한 다음 색의 강도를 측정하였다. 배지에 존재하는 IL-1 β 의 양을 표준곡선에 따라 계산하였다. ELISA 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

RT-PCR

THP-1 세포를 0.1% BSA가 들어있는 RPMI medium 1640에 하룻밤 동안 배양하고 PG에 노출하였다. 전체 RNA를 세포로부터 추출하고 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 이용하여 42°C에서 1시간 동안 역전사하였다. Primer를 첨가하고 25 cycles (94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec)을 PCR을 실행하여 IL-1 β 전사체를 증폭시켰다. IL-1 β 의 primer로 5-GGACAAGGGAGGAAGATGC-3 (forward)와 5-TCTTTCAACACGCAGGACAG-3 (reverse)를 사용하고, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 primer로 5-AAGCTCTGCGTACTGCTCCT-3 (forward)와 5-GCTTGCTTCTTTTGGTTGG-3 (reverse)를 사용하였다. PCR 결과를 2% agarose gel에서 전기영동에 의해 분리하고 ethidium bromide 염색한 다음 이미지를 사진으로 찍었다. 각 band의 intensity를 IL-1 β /GAPDH로 표시하였다.

Fig. 1. Expression of IL-1 β at the messenger and protein levels in response to PG. (A) THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated for indicated time periods with 1 μ g/ml PG. IL-1 β gene transcripts were amplified by RT-PCR. *** p <0.001 vs. 0 hr. (B) THP-1 cells were incubated for 9 hr with indicated amount of PG. IL-1 β gene transcripts were amplified by RT-PCR. *** p <0.001 vs. 0 ng/ml. (C) THP-1 cells (1×10^6 cells/ml) were stimulated for 9 hr with or without (control) PG (1 μ g/ml). The amount of IL-1 β released into the medium was measured by ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3 replicates/group). ** p <0.01 vs. control. *** p <0.001 vs. control.

통계처리

통계적인 분석은 GraphPad PRISM, version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 실행하였고, $p < 0.05$ 를 통계적으로 의미있는 것으로 간주된다.

결 과

전사체와 단백질단계에서 PG에 의한 IL-1 β 발현의 상향조절 대식세포에서 IL-1 β 발현에 PG의 영향을 알아보기 위해, IL-1 β 발현의 전사수준을 RT-PCR로 조사하였다(Fig. 1A, B). PG가 없을 때 THP-1 세포에서 IL-1 β 전사체가 상당히 약하게 발견된 반면 PG가 존재하는 경우 IL-1 β 의 전사체의 발현을

유도하였다. IL-1 β 전사체의 유도는 PG 처리 후 3시간 뒤부터 관찰되었고 9시간 까지 지속되었다. IL-1 β 전사체의 발현은 PG 10 ng/ml이 존재했을 때 유도되었고 100과 1,000 ng/ml에서는 더 분명해졌다. PG가 사이토카인의 방출에 어떠한 영향을 주는지 아닌지를 조사하였다(Fig. 1C). THP-1 세포는 본질적으로 적은 양의 IL-1 β 를 분비하였고, PG는 IL-1 β 단백질 분비를 상당히 증가시켰다. PG가 없는 control cell과 비교해보면, IL-1 β 분비물의 양은 PG의 양이 10, 100, 1,000 ng/ml 일때 각각 1.5-, 1.6- and 3.0-fold 증가하였다.

PG로 인한 IL-1 β 발현에 TLR2/4의 억제제가 미치는 영향
PG에 의한 IL-1 β 발현에 TLRs의 관련성을 TLR2/4 억제제

Fig. 2. Effects of OxPAPC and polymyxin B on PG-mediated IL-1 β up-regulation. (A) THP-1 cells were stimulated for 9 hr with or without PG (1 μ g/ml) after treatment for 1 hr with OxPAPC (30 μ g/ml) or polymyxin B (10 mg/ml). IL-1 β gene transcript was amplified. *** $p < 0.001$ vs. control. ### $p < 0.001$ vs. PG. (B) The amount of IL-1 β released into the medium was measured (n=3 replicates/group). *** $p < 0.001$ vs. control. ### $p < 0.001$ vs. PG.

Fig. 3. Effects of LY294002 and Akti IV on PG-mediated IL-1 β up-regulation. (A) THP-1 cells were stimulated for 9 hr with or without PG (1 μ g/ml) after pretreatment with LY294002 and Akti IV (10 μ M each). IL-1 β gene transcript was amplified. *** $p < 0.001$ vs. control. ## $p < 0.01$ vs. PG. (B) The amount of IL-1 β released into the medium was measured (n=3 replicates/group). *** $p < 0.001$ vs. control. ### $p < 0.001$ vs. PG.

인 OxPAPC를 사용하여 조사하였다(Fig. 2A, B). OxPAPC는 PG와 매개된 IL-1 β 의 발현을 전사와 단백질 수준에서 억제시켰다. PG에 의한 IL-1 β 의 분비는 OxPAPC의 존재 하에 거의 완전히 차단되어 대조군 세포만큼 줄어들고, PG에서 유도된 IL-1 β 전사체의 발현도 OxPAPC의 존재 하에 억제되었다. PG를 준비할 때 lipopolysaccharide (LPS)로 오염될 수도 있고, 오염된 LPS가 염증성 사이토카인과 케모카인의 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서, LPS의 강한 억제제인 polymyxin B를 사용하여 PG에 의한 IL-1 β 의 상향조절에 LPS가 기여하는지 아닌지를 조사하였다. Polymyxin B는 PG에 의한 IL-1 β 분비나 전사를 약화시키지 않았다(Fig. 2A, B).

PG로 유도된 IL-1 β 발현에 mTOR과 Akt의 역할
PG는 Akt의 인산화를 증가시켜 Akt를 활성화시킨다[14].

Fig. 4. Effects of rapamycin on PG-mediated IL-1 β up-regulation. (A) THP-1 cells were stimulated for 9 hr with or without PG (1 μ g/ml) after pretreatment with rapamycin (100 nM). IL-1 β gene transcript was amplified. *** p <0.001 vs. control. (B) The amount of IL-1 β released into the medium was measured (n=3 replicates/group). *** p <0.001 vs. control. ### p <0.001 vs. PG.

PG에 의한 IL-1 β 발현에 Akt가 관여하는 지를 LY294002와 Akti IV 사용하여 조사하였다(Fig. 3A, B). LY294002는 quercetin의 morpholine 유도체로 Akt를 활성화시키는 phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks)를 강력히 억제한다. Akti IV는 Akt단백질 인산화효소의 억제제이다. Akti IV는 IL-1 β 발현의 전사와 단백질 수준에 상당히 영향을 주었다. Akti IV는 PG에 의한 IL-1 β 유전자 발현의 유도를 현저히 감소시키고 IL-1 β 분비를 상당히 감소시켰다. 그러나 LY294002는 PG와 매개된 IL-1 β 의 유전자 전사와 분비에 영향을 주지 않았다. mTOR은 Akt의 하위분자이고 Akt의 생물학적 효과에 역할을 담당하므로[7], mTOR의 억제제인 rapamycin을 사용하여 PG에 의한 IL-1 β 의 발현에 mTOR가 작용을 하는지 조사하였다(Fig. 4A, B). Rapamycin은 IL-1 β 발현에 영향을 주었다. 특히, rapamycin은 PG에 의한 IL-1 β 의 전사보다는 IL-1 β 의

Fig. 5. Effects of inhibitors of MAPKs on PG-mediated IL-1 β up-regulation. (A) THP-1 cells were stimulated for 9 hr with or without PG (1 μ g/ml) after pretreatment with indicated MAPKs inhibitors (10 μ M each). IL-1 β gene transcript was amplified. *** p <0.001 vs. control. # p <0.05 vs. PG. (B) The amount of IL-1 β released into the medium was measured (n=3 replicates/group). *** p <0.001 vs. control. ### p <0.001 vs. PG.

분비를 상당히 감소시켰다.

PG에 의해 유도된 IL-1 β 발현에서 MAPKs의 역할

PG는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK, and c-jun N-terminal kinase (JNK)의 인산화를 증가시킨다[14]. 이는 PG가 MAPKs를 활성화한다는 의미이다. PG에 의해 유도된 IL-1 β 상향조절에서 MAPKs의 역할을 조사하기 위해, 다음과 같은 MAPK 억제제 -SB202190 (p38 MAPK 억제제), SP600125 (JNK 억제제), U0126 (ERK 억제제)를 사용하였다(Fig. 5A, B). U0126과 SP600125는 PG가 매개한 IL-1 β 단백질의 분비 뿐만 아니라 PG가 유도한 IL-1 β 전사체를 감소시켰다. 반면, SB202190는 PG가 매개한 IL-1 β 유전자 전사와 단백질 분비를 억제하지 않았다.

Fig. 6. Effects of ROS quenchers on PG-mediated IL-1 β up-regulation. (A) THP-1 cells were stimulated for 9 hr with or without PG (1 μ g/ml) after pretreatment with DPI (10 μ M) or NAC (5 mM). IL-1 β gene transcript was amplified. *** p <0.001 vs. control. # p <0.05 vs. PG (B) The amount of IL-1 β released into the medium was measured (n=3 replicates/group). *** p <0.001 vs. control. ### p <0.001 vs. PG.

PG로 유도된 IL-1 β 발현에서 ROS의 역할

IL-1 β 의 발현에 ROS가 역할을 하는지를 NAC와 DPI를 사용하여 조사하였다(Fig. 6A, B). NADPH산화효소의 억제제인 DPI는 PG가 매개한 IL-1 β 분비를 상당히 억제하였고 PG가 매개한 IL-1 β 유전자 전사에는 약간의 영향을 주었다. 그러나 ROS의 직접적 scavenger인 NAC는 PG가 매개한 발현에 영향을 주지 않았다.

고찰

본 연구는 죽상동맥경화증 병변에 세균의 구성요소로 존재하는 PG가 전사와 단백질 수준을 IL-1 β 발현에 상향조절한다는 것을 대식세포주인 THP-1세포를 사용하여 증명하였다. 이 결과는 이전에 연구된 ribonuclease 보호분석을 사용하여 인간의 혈액 단핵세포에서 PG와 LPS에 의한 IL-1 α 와 IL-1 β 발현이 유도된다는 Wang et al [27]의 결과와 유사하다. PG는 IL-1 β 유전자 전사의 발현을 유도시키고, PG가 없으면 IL-1 β 분비의 증가는 감지되지 않는다. PG에 의한 IL-1 β 분비는 상당하지만, IL-1 β 전사 유도의 범위에서는 중요하게 고려되지 않았다. 그것은 PG에 THP-1 세포가 노출되면 Dinarello et al [4]에 의해 가정된 것처럼 두번째 자극의 존재에서 활동적인 IL-1 β 의 더 많은 양의 분비를 할 수 있다는 것을 가정할 수 있다.

PG가 IL-1 β 의 발현을 유도하는 것이 분명하다 하더라도, IL-1 β 발현에 관련된 세포분자는 아직 명확하지 않다. 본 연구는 PG에 의한 IL-1 β 발현에서 역할을 하는 세포인자를 확인하였다. PG는 염증반응으로 이어지는 신호통로의 활성화를 유도하는 TLR2에 의해 세균성 PAMP를 인식한다[1,10,26]. 따라서 TLR2/4 저해제인 OxpAPC을 이용하여 IL-1 β 의 발현에 TLR2/4가 관여하는지를 조사하였다. OxpAPC은 IL-1 β 의 분비와 전사를 완전히 차단한다. 또한 발현은 완전히 억제되고, polymyxin B는 IL-1 β 발현을 억제하지 않았다. 이 결과는 PG에 의해 유도된 IL-1 β 발현에 TLR4 보다는 TLR2가 관여한다는 것을 의미한다.

PG는 Akt 인산화를 증가시키는데[14], 이 사실은 PG가 Akt를 활성화시킴을 의미한다. 따라서 Akt와 Akt 활성화인자인 PI3K [16]가 PG와 매개된 IL-1 β 발현에 연관되는지를 조사하였다. Akt 억제제는 IL-1 β 의 분비를 완전히 차단하는데 반하여 PI3K 억제제는 IL-1 β 발현을 억제하지 못했다. 이 결과는 PG가 매개한 IL-1 β 에 Akt가 필요하다는 것을 의미한다. Akt는 mTOR을 포함한 protein target을 통해 생물학적 효과를 달성한다[7]. 따라서 mTOR가 PG에 의한 IL-1 β 발현에 연관되어 있는지를 조사하였다. mTOR의 억제제인 rapamycin은 IL-1 β 분비를 상당히 감소시키는 반면 유전자의 전사는 조금 감소시킨다. 이 결과는 rapamycin이 PG에 의한 IL-1 β 발현을 유전자수준보다는 단백질 수준에서 억제시킴을 의미한다. 그

리고 이 결과는 단백질 합성에 mTOR가 책임이 있다는 것과 세포의 번역조직의 커짐과 꺼짐에 영향을 준다는 사실과 일치한다[20]. 따라서 Akt/mTOR 경로가 PG와 매개된 IL-1 β 상향 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

MAPKs는 serine/threonine-specific protein kinases로 세포밖의 자극에 반응하고 다양한 세포의 활성을 조절하며 PG에 의해 활성화 된다[14]. MAPKs는 TLR-2, -4, -9 신호에서 케모카인 생산에 중요하다[25]. 그러므로 IL-1 β 발현에 MAPKs가 역할을 하는지를 조사하였다. p38 MAPK는 아니지만 ERK와 JNK의 선택적 억제제는 IL-1 β 발현을 상당히 감소시켰다. 이 결과는 PG에 매개된 IL-1 β 발현에 MAPKs의 활성화(특히 ERK와 JNK)가 요구된다는 것을 가리킨다. TLR2는 PG의 반응에서 ROS 생산에 영향을 준다는 보고[9]는 ROS가 TLR2보다 아래에서 작용하는 분자라는 것을 의미한다. 본 연구는 DPI와 NAC를 사용하여 ROS 또한 IL-1 β 발현에 포함되는지 아닌지를 조사하였다. DPI는 ROS를 생산하는 NADPH oxidase의 억제제이고, 이를 통해 ROS형성을 억제한다[17]. 세포 내 glutathione의 repletion을 위한 cysteine source 역할을 하는 thiol 복합체인 NAC는 ROS의 직접적인 scavenger 역할을 한다[23]. DPI는 PG와 매개된 IL-1 β 의 상향조절을 상당히 감소시켰다. 이 결과는 ROS가 PG에 의한 IL-1 β 상향조절에 NADPH oxidase가 활발히 관여함을 나타낸다.

본 연구에서는 THP-1 세포가 PG에 노출되면 IL-1 β 분비 증가와 IL-1 β 유전자 전사의 유도에 대한 결과를 보여주었고, 그 과정에 TLR2, Akt, mTOR, ERK, JNK, ROS가 참여한다는 것을 밝혔다. 이후의 연구에서는 이 분자들의 신호 cascade의 전후관계를 나타내는 connections나 crosstalk의 유형을 밝힐 필요가 있다.

감사의 글

이 과제는 2011년도 부산대학교 교수국외장기파견지원비에 의하여 연구되었음.

References

1. Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
2. Barksby, H. E., Lea, S. R., Preshaw, P. M. and Taylor, J. J. 2007. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.* **149**, 217-225.
3. Chi, H., Messas, E., Levine, R. A., Graves, D. T. and Amar, S. 2004. Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation* **110**, 1678-1685.
4. Dinarello, C. A. 1997. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 253-265.
5. Dobrina, A., Nardon, E., Vecile, E., Cinco, M. and Patriarca, P. 1995. Leptospira icterohemorrhagiae and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immunol.* **63**, 2995-2999.
6. Galea, J., Armstrong, J., Gadsdon, P., Holden, H., Francis, S. E. and Holt, C. M. 1996. Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1000-1006.
7. Hahn-Windgassen, A., Nogueira, V., Chen, C. C., Skeen, J. E., Sonenberg, N. and Hay, N. 2005. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 32081-32089.
8. Kavita, U. and Mizel, S. B. 1995. Differential sensitivity of interleukin-1 alpha and -beta precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease. *J. Biol. Chem.* **270**, 27758-27765.
9. Kavoosi, G., Ardestani, S. K. and Kariminia, A. 2009. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to Leishmania major phosphoglycans (PGs). *Parasitology* **136**, 1193-1199.
10. Kawai, T. and Akira, S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13**, 816-825.
11. Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H. and Seishima, M. 2003. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 656-660.
12. Laman, J. D., Schoneveld, A. H., Moll, F. L., van Meurs, M. and Pasterkamp, G. 2002. Significance of peptidoglycan, a proinflammatory bacterial antigen in atherosclerotic arteries and its association with vulnerable plaques. *Am. J. Cardiol.* **90**, 119-123.
13. Langer, M., Malykhin, A., Maeda, K., Chakrabarty, K., Williamson, K. S., Feasley, C. L., West, C. M., Metcalf, J. P. and Coggeshall, K. M. 2008. Bacillus anthracis peptidoglycan stimulates an inflammatory response in monocytes through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *PLoS One* **3**, e3706.
14. Lee, S. A., Kim, S. M., Son, Y. H., Lee, C. W., Chung, S. W., Eo, S. K., Rhim, B. Y. and Kim, K. 2011. Peptidoglycan enhances secretion of monocyte chemoattractants via multiple signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 132-138.
15. Loppnow, H. and Libby, P. 1990. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J. Clin. Invest.* **85**, 731-738.
16. Manning, B. D. and Cantley, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274.
17. Miesel, R., Sanocka, D., Kurpisz, M. and Kroger, H. 1995. Antiinflammatory effects of NADPH oxidase inhibitors. *Inflammation* **19**, 347-362.
18. Moyer, C. F., Sajuthi, D., Tulli, H. and Williams, J. K. 1991. Synthesis of IL-1 alpha and IL-1 beta by arterial cells in atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* **138**, 951-960.

19. Nijhuis, M. M., Pasterkamp, G., Sluis, N. I., de Kleijn, D. P., Laman, J. D. and Ulfman, L. H. 2007. Peptidoglycan increases firm adhesion of monocytes under flow conditions and primes monocyte chemotaxis. *J. Vasc. Res.* **44**, 214-222.
20. Shaw, R. J. and Cantley, L. C. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424-430.
21. Sica, A., Wang, J. M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J. J., Larsen, C. G., Zachariae, C. O. and Matsushima, K. 1990. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **144**, 3034-3038.
22. Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E. and Mantovani, A. 1989. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J. Immunol.* **142**, 549-553.
23. Spagnuolo, G., D'Anto, V., Cosentino, C., Schmalz, G., Schweikl, H. and Rengo, S. 2006. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials* **27**, 1803-1809.
24. Suzuki, H., Shibano, K., Okane, M., Kono, I., Matsui, Y., Yamane, K. and Kashiwagi, H. 1989. Interferon-gamma modulates messenger RNA levels of c-sis (PDGF-B chain), PDGF-A chain, and IL-1 beta genes in human vascular endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **134**, 35-43.
25. Thobe, B. M., Frink, M., Hildebrand, F., Schwacha, M. G., Hubbard, W. J., Choudhry, M. A. and Chaudry, I. H. 2007. The role of MAPK in Kupffer cell toll-like receptor (TLR) 2-, TLR4-, and TLR9-mediated signaling following trauma-hemorrhage. *J. Cell. Physiol.* **210**, 667-675.
26. Wang, Q., Dziarski, R., Kirschning, C. J., Muzio, M. and Gupta, D. 2001. Micrococci and peptidoglycan activate TLR2, MyD88, IRAK, TRAF, NIK, IKK, NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect. Immunol.* **69**, 2270-2276.
27. Wang, Z. M., Liu, C. and Dziarski, R. 2000. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by Staphylococcus aureus, peptidoglycan, and endotoxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 20260-20267.
28. Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R. and Golenbock, D. 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**, 1-5.

초록 : 펩티도글라이칸에 의한 인터루킨-1 베타 발현 기전 연구

서현철 · 김선미 · 이새아 · 임병용 · 김관희*

(부산대학교 의학전문대학원 약리학교실)

본 연구에서는 IL-1 β 발현에 PG의 영향을 조사하였고, 단핵세포에서 PG에 의한 IL-1 β 상향조절에 포함된 세포인자를 밝혔다. PG에 사람의 THP-1 세포를 노출시키면 IL-1 β 분비 증가뿐만 아니라 IL-1 β 유전자 전사를 유도하는 결과를 가져왔고, TLR-2/4의 억제제인 OxPAPC에 의해 저해되었다. U0126, SP6001250, Akti IV, rapamycin, DPI 같은 약리학적 저해제도 PG에 의한 IL-1 β 의 상향조절을 상당히 약화시켰다. 그러나 polymyxin B는 IL-1 β 발현에 영향을 미치지 않았다. 본 연구는 PG는 TLR-2, Akt, mTOR, MAPKs, ROS를 통하여 IL-1 β 의 발현을 상향시킴을 확인하였다.