

류마티스 관절염에서 칼시뉴린의 발현과 기능

가톨릭대학교 의과대학 ¹내과학교실 류마티스내과, ²가정의학과교실, ³인하대학교 의과대학 내과학교실 류마티스내과

박보형¹ · 유승아¹ · 홍경희¹ · 형복진¹ · 황유나² · 조철수¹ · 박 원³ · 김완욱¹

Expression and Function of Calcineurin in Inflammatory Arthritis

Bo Hyoung Park¹, Seung Ah Yoo¹, Kyung Hee Hong¹, Bok Jin Hyoung¹, Yu Na Hwang², Chul Soo Cho¹, Won Park³ and Wan Uk Kim¹

¹Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, ²Department of Family Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, ³Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

ABSTRACT

Background: Calcineurin plays a crucial role in T cell activation, cell growth, apoptosis, and angiogenesis, and its over-expression has been implicated in the pathogenesis of cardiomyopathy and stroke. However, the expression and function of calcineurin in the pathologic lesion of chronic inflammatory diseases, like rheumatoid synovium, remain to be defined. This study was aimed to determine the role of calcineurin in inflammatory arthritis and investigate the expression and function of calcineurin in the rheumatoid synovium and synoviocytes, the actual site of chronic inflammation. **Methods:** Immunohistochemical staining using specific antibody to calcineurin was performed in the synovium of rheumatoid arthritis (RA). Fibroblast-like synoviocytes (FLS) from RA and osteoarthritis (OA) patients were isolated from RA and OA patients, and cultured with IL-1 β and TNF- α in the presence or absence of cyclosporin A, a calcineurin inhibitor. The calcineurin expression was assessed by phosphatase assay and Western blotting analysis. IL-6, -10, -17, matrix metalloproteinase (MMP)-1, -2, -3, and -9 released into the culture supernatants were measured by ELISA. After transfection with GFP-Cabin 1 gene into synoviocytes, the levels of IL-6 and MMPs were measured by ELISA. **Results:** Calcineurin was highly expressed in the lining layer of synovium and cultured synoviocytes of RA patients. The elevated calcineurin activity in the rheumatoid synoviocytes was triggered by proinflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . In contrast, IL-10, an anti-inflammatory cytokine, failed to increase the calcineurin activity. The targeted inhibition of calcineurin by the over-expression of Cabin 1, a natural calcineurin antagonist, inhibited the production of IL-6 and MMP-2 by rheumatoid synoviocytes in a similar manner to the calcineurin inhibitor, cyclosporin A. **Conclusion:** These data suggest that abnormal activation of calcineurin in the synoviocytes may contribute to the pathogenesis of chronic arthritis, and thus provide a potential target for controlling inflammatory arthritis. (Immune Network 2006;6(1):33-42)

Key Words: Calcineurin, cabin 1, cyclosporin A, rheumatoid synoviocyte

책임저자 : 김완욱, 성빈센트병원 내과
☎ 442-723, 경기도 수원시 팔달구 지동 93-6번지
Tel: 031-249-8168, Fax: 031-253-8898
E-mail: wan725@catholic.ac.kr

본 연구는 한국학술진흥재단 협동연구지원사업(KRF-2004-042-E00065)으로부터 연구비 지원을 받아 수행되었음.

서 론

류마티스 관절염은 활막세포의 활성화 및 백혈구의 침윤과 신생혈관으로 구성된 종양과 유사한 활막의 팽창을 특징으로 한다(1). 류마티스 관절염에서 활막조직 내 활막세포는 판누스(pannus)를 형성하는 만성 염증반

응에서 핵심적인 역할을 수행한다(2). 활막세포는 주 조직적 복합체-II, 맥관 세포 유착 분자(vascular cell adhesion molecule -1; VCAM-1)와 같은 활성화 단백질을 강하게 발현하며 이를 통해 침윤된 T 림프구에 효과적으로 항원을 제시할 수 있다. 류마티스 관절염 환자로부터 채취한 활막 섬유아세포 주(fibroblast cell line)는 기질 금속단백분해효소와 IL-1 β , IL-6, IL-8과 같은 사이토카인을 생성하는 능력을 가지고 있다(3). 더욱이 활막 섬유아세포는 비 정상적으로 과도하게 증식하고 주변으로 침윤하며 H-ras나 p53 유전자의 체세포 돌연 변이와 같은 종양 세포의 특징을 나타낸다(4,5).

칼시뉴린(calcineurin A)은 60kDa 촉매 부위(calcineurin A)와 19kDa 칼슘 결합 부위(calcineurin B)로 이루어진 이형접합 인산분해효소이다(6). 단백질 타이로신 인산화와 세포질 내 유리 칼슘의 증가에 의해 칼시뉴린 인산분해효소는 활성화되며 이것은 전신 흥분성 루푸스와 같은 자가 면역 질환에서 비정상적인 림프구의 활성화와 관련이 있다(7,8). 면역세포에서 칼시뉴린은 NF-AT, NF- κ B, c-fos, Elk-1 등을 포함하는 다양한 전사 인자(transcriptional element)의 활성을 조절한다(6). 결국 칼시뉴린은 T 림프구의 활성화, 세포성장, 혈관생성에 중요한 역할을 하며, 칼시뉴린의 과 발현은 심근병증, 심근경색증 등과 같은 질환의 발생과 깊은 관련이 있다(9). 그러나 아직까지 류마티스 관절염 환자의 활막과 같은 만성 염증성 질환의 병적인 부위에서 칼시뉴린의 발현과 기능에 관해서는 알려진 바가 없다.

칼시뉴린 억제제인 사이클로스포린 A (cyclosporin A)는 장기이식 후 거부 반응을 막기 위하여 널리 사용되는 면역억제제로서 류마티스 관절염을 포함하는 만성 염증성 질환의 치료에도 활용되고 있다(10). 사이클로스포린 A의 가장 핵심적인 기전은 T 림프구에서 형성되는 사이토카인을 억제시키는 것이다. 류마티스 관절염의 발병 기전과 관련된 최신 연구는 T 림프구 매개성 면역 반응보다는 이와 독립적인 사이토카인의 활성화 및 류마티스 활막세포가 지니는 공격적 행동 등에 초점이 모아지고 있다(11). T 림프구보다는 활막세포가 연골과 골 파괴에 보다 중요한 역할을 한다는 관점에서 볼 때 '사이클로스포린 A가 류마티스 관절염 환자에서 왜 효과적인가?'에 대해 충분히 설명이 되지 않는다.

이에 저자들은 류마티스 관절염에서 칼시뉴린의 역할을 규명하기 위하여 만성 염증성 관절염의 실제 염증 부위인 활막과 활막세포에서 칼시뉴린의 발현과 기능을 조사해 보고자 하였다.

대상 및 방법

활막 섬유아세포의 분리 및 배양. 관절치환 수술을 받은 류마티스 관절염 혹은 골 관절염 환자로부터 얻은 활

막조직을 이용하여 섬유아세포 양 활막세포(fibroblast-like synoviocyte, FLS)를 분리하였다. 약술하면(12), 조직을 2~3 mm 조각으로 잘게 썬 후 37°C (5% CO₂ atmosphere) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 1형 콜라겐 분해효소로 4시간 동안 처리하였다. 분리된 세포는 DMEM (supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, penicillin and streptomycin)에서 재 부유시킨 후, 75 cm² 플라스크(flask)에 부착시켰다. 밤새 배양한 후 비 부착세포를 제거하고 부착세포만을 DMEM (supplemented with 10% FCS)에서 배양하였다. 계대 배양을 거듭하여 FLS만 남게 되는 passage 3에서 7 사이의 활막세포를 24-well plate (Nunc)에 3×10⁵/well의 농도로 DMEM (supplemented with 10% Fetal calf serum, FCS) 배양액에서 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 세포들의 균질성은 flow cytometry (>95% CD 90, <2% CD 14, <1% CD 19 positive)를 이용해 확인하였다. 칼시뉴린 활성화에 대한 FCS 작용을 제거하기 위하여, 세포를 DMEM으로 세척하였고 serum-free DMEM/ITS(A)로 48시간 동안 배양하였다. 배양세포에 자극이 필요한 경우 TNF- α (R & D), IL-1 β (Endogen Inc.)를 처리하여 IL-6과 기질 금속단백 분해 효소의 합성을 유도하였다. 순수 분리된 FLS 세포 주에 4 nM에서 800 nM의 다양한 농도의 사이클로스포린 A (CalBiochem)를 첨가하여 배양하였다. 24시간에서 72시간 배양 후 상층액을 채취하였고, 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

활액 내 단핵구의 분리와 배양. 류마티스 관절염 환자로부터 관절 천자를 통하여 활액을 얻었으며, 채취된 활액은 즉시 PBS를 이용하여 1 : 5로 희석하였고, 무균 거즈(sterile gauze)에 통과시켰다. 활액 내 단핵구(synovial fluid mononuclear cell, SFMC)는 Ficoll-Hypaque (SG 1077) 상의 비중 차이에 의하여 분리되었다. 분리된 SFMC를 완전 배지(complete medium, consisting of RPMI-1640 supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamate)에 넣고 37°C (5% CO₂ atmosphere)에서 다양한 농도(4 nM에서 800 nM)의 사이클로스포린 A를 96-well plate (Nunc)에 첨가한 후 5×10⁵/well 농도로 3중(triplicate) 배양을 시행하였다. 24시간 배양 후 상층액에서 IL-17과 IL-10의 농도를 효소면역법(ELISA)으로 측정하였다.

면역조직 화학염색. 포르말린으로 고정된 후 파라핀으로 포매(embedding)한 활막조직을 5 μ m 두께로 잘라서 면역조직 화학염색을 시행하였다. 절편은 슬라이드 글라스에 마운트하고 xylene으로 탈파라핀화 한 후, 에탄올로 탈수를 시키고 초단파(microwave)를 조사하여 항원을 노출시켰다. 조직절편에 존재하는 내인성 과산화소 활성화는 3% H₂O₂를 이용하여 차단하였고, 비 특이적인 결합을 방지하기 위하여 조직을 37°C에서 60분 동안

10% 염소 혈청으로 반응시켰다. 이후 4°C에서 1 : 100으로 희석시킨 생쥐 항-인형 칼시뉴린 항체(Sigma)와 밤새 반응시켰다. 절편을 세척한 후 biotin이 표지된 염소 항-마우스 IgG (DAKO) 이차 항체와 반응을 시켰다. 세척 후 조직에 peroxidase가 부착된 streptavidin (DAKO)을 첨가한 후 실온에서 30분 동안 반응시켰고 3, 3-diaminobenzidine으로 발색하였다. 마지막으로 조직을 hematoxylin으로 대조 염색하고 탈수시킨 후 마운트하였다. 음의 대조 조직(negative control tissue)은 일차 항체의 첨가과정을 제외하고 모두 같은 방법으로 시행하였다.

칼시뉴린 A의 Western blotting 검사. 배양된 FLS (5×10^5 cells)를 세포 용해액(0.5% Triton X-100, 300 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 7.6, containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, and 1 μ g/ml leupeptin)에 넣고 30분 동안 용해시켰다. 원심분리(10,000 \times g, 10분) 후 얻은 상층액 내 단백질 양을 Bradford assay (BioRad)로 측정하였다. 동량의 단백질(80 μ g)을 10% SDS-PAGE에서 분리한 다음 polyvinyl difluoride membrane (PVDF; Amersham Pharmacia)으로 이동시켰다. 이후 PVDF membrane을 rat 항-칼시뉴린 단일클론항체(Sigma), 항-칼시뉴린 A α 다클론항체(Santa Cruz Biotechnology), 항-칼시뉴린 A β 다클론항체(Santa Cruz Biotechnology)와 반응을 시킨 후 홍당무과산화효소가 부착된 항-마우스 IgG (Santa Cruz Biotechnology) 또는 항-염소 IgG (Santa Cruz Biotechnology)와 반응시켰다. 최종적으로 chemiluminescence (FCL, Amersham Pharmacia Biotech) 방법으로 칼시뉴린의 발현을 확인하였고 β -actin에 대한 상대값으로 표현하였다.

칼시뉴린 인산분해효소 활성도의 측정. 칼시뉴린의 효소 활성도는 RII phosphopeptide를 특이적 기질로 하는 인산분해 효소 분석 키트(BioMol)를 이용하여 측정하였다. 효소 활성도는 okadaic acid 존재 하에서 유리된 인산염에서 EGTA와 okadaic acid 존재 하에 유리된 인산염을 제외하고 계산하였다. 칼시뉴린 인산분해효소에 의해 RII부터 방출된 유리 인산염은 말라카이트 그린 반응으로 30분 동안 620 nm에서 microtiter plate 판독기를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 결과는 세포질 단백 1 mg 당 유리되는 인산염 농도로 환산하였다.

칼시뉴린 A α 와 A β mRNA에 대한 역전사중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT PCR). RNAzolB (Biotex Laboratories)를 이용하여 배양된 활막세포로부터 total RNA를 얻었다. 추출한 2 μ g total RNA를 주형으로 RevertAidTMM-MULV 역전사 효소(MBI Fermentas), random hexamer (TaKaRa)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 2 μ l의 cDNA로 중합효소 연쇄반응을 시행하였는데, 여기에 사용된 각각의 염기서열은 다음과 같다.

CnA α : 5'-CGACAGGAAAAAATTTGCTGGAT-3' and 5'-TTGTTTGGCTTTTCCTGTACATG-3' (673 bp); CnA β : 5'-AACCATGATAGAAGTAGAAGCTC-3' and 5'-CACACTACT GCTGGATAGTTATAA-3' (568 bp); GAPDH: 5'-C GATGC TGGGCGTGAGTC-3' and 5'-CGTTCAGCTCAG GGATGACC-3' (498 bp). 증폭된 PCR 산물은 $1 \times$ TAE 완충액에서 1.5% agarose 젤에 전기영동하였다.

세포사멸사의 측정. 칼시뉴린 억제제인 사이클로스포린 A를 처리한 후 활막세포 사멸 정도를 DNA 분절도 효소면역측정법 혹은 caspase-3 활성도로 측정하였다.

DNA 분절도 효소면역측정법(ELISA): 세포사멸 정도는 분절된 DNA와 BrdU를 검출할 수 있는 단일클론항체를 사용한 sandwich ELISA kit (Roche Applied Science)로 측정하였다. 약술하면, 항-DNA 항체를 microtiter plate에 부착시키고, BrdU가 표지된 DNA 분절을 고정된 항-DNA 항체에 결합시켰다. 극초단파 조사로 항체가 결합된 BrdU-labeled DNA 분절을 plate 표면에 고정시켰다. 마지막으로 과산화효소가 부착된 항-BrdU 항체를 BrdU와 반응시키고 결합되지 않은 항-BrdU 항체를 제거한 후 TMB를 기질로 하여 흡광도를 측정하였다.

Caspase-3 활성도 분석: Caspase-3의 효소 활성도는 apo-target caspase-3/cpp32/colorimetric protase 분석 키트(Bio-source)를 사용하여 제작자가 제안한 방식으로 측정하였다.

IL-6, IL-10, IL-17, 기질 금속 단백질 분해 효소에 대한 효소면역측정법(ELISA). 배양된 상층액에서 유리되는 IL-6, -10, -17의 양은 이전에 기술된 방식대로 ELISA로 측정하였다(13). 표준 사이토카인 항원으로 재조합 인형 IL-6, -10, -17 (R & D)을 사용하였다. 기질금속단백분해효소-1 (Amersham Pharmacia Biotech), 기질금속단백분해효소-2 (R & D), 기질금속단백분해효소-3 (Amersham Pharmacia Biotech), 기질금속단백분해효소-9 (R & D)의 농도 역시 ELISA 방법으로 측정하였다. 사용된 기질금속단백분해효소 분석 키트는 전구형과 활성형이 모두 측정되며 다른 종류의 기질금속단백분해효소와는 교차 반응이 5% 미만으로 제시되었다.

플라스미드 건조(plasmid construct). 인형 캐빈 1 유전자는 칼시뉴린 결합 도메인 서열(5641-6614)을 포함하는 두 쌍의 primer를 이용하여 중합효소 연쇄반응으로 류마티스 활막세포 cDNA로부터 증폭하였다. pGFP-캐빈 1 구성체를 합성하기 위하여 PCR 산물을 green fluorescence protein (GFP) expression vector (BD Biosciences, Clontech), pGFP-C1로 유전자 복제를 하였고 염기서열은 sequencing (ABI PRISM 310, Applied Biosystems)으로 확인하였다.

활막세포에 캐빈 1 유전자의 과 발현. LipofectAMINETM 2000 reagent (Invitrogen)를 이용하여 SV40 T antigen을 포

합하는 무한 증식 활막세포인 MH7A 세포(14)에 케빈 1 유전자의 플라스미드 DNA 형질전환을 수행하였다. 형질전환을 시행하기 전에 3×10^4 의 농도로 MH7A 세포를 6-well plate에 부착시켰다. DNA-LipofectAMINE reagent 복합체를 형성하게 하기 위하여 serum-free Opti-MEM 상태에서 각 well마다 LipofectAMINE reagent (1.6 μ l)와 pEGFP-C1 vector 혹은 pEGFP-케빈 1 (0.8 μ g)을 혼합하였다. 이 복합체를 각 well에 첨가를 하고 plate를 앞뒤로 부드럽게 흔들어서 혼합하였다. 4시간이 지난 후 이 세포들을 RPMI 1640 (supplemented with 10% FCS) 배지에서 37°C, 24시간 동안 배양하였다. GFP-케빈 1 혹은 GFP 유전자의 과 발현은 레이저스캔 동초점 영상 시스템 (laser scanning confocal imaging system)을 이용하여 관찰하였다. 형질 전환된 세포 내 케빈 1 단백질의 발현 정도는 Western blot으로 측정하였다. 약술하면, 세포를 용해액(20 mM Tris-HCl; pH 7.5; 0.5 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA, 0.25% Triton X-100; protease inhibitor cocktail; 2 mM PMSF; 1 mM DTT)에 넣어 용해시키고 Bradford protein assay (BioRad)를 이용하여 단백질 양을 측정하였다. 50 μ g 단백질을 8% SDS-PAGE 겔에서 전기영동하였고 nitrocellulose막으로 이송한 후, 이 막을 항-케빈 1 항체(Calbiochem) 혹은 항- β -actin (Sigma) 항체와 반응시켰다. 세척 후 1시간 동안 horseradish peroxidase가 부

착된 2차 항체와 반응시켰고 chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech) 방법으로 케빈 1 단백질의 발현을 측정하였다.

통계. 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 집단간의 평균값의 비교는 Mann-Whitney U-test를 이용하였고 $p < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

염증성 활막조직에서 칼시뉴린의 발현. 관절조직에서 칼시뉴린의 분포와 위치를 알아보기 위하여, 3명의 류마티스 관절염 환자의 활막에서 칼시뉴린의 축매 부위인 칼시뉴린 A에 특이적 항체를 이용한 면역조직 화학염색법을 시행하였다(16). 칼시뉴린 A는 3명의 류마티스 관절염 환자의 활막조직 절편에서 모두 발현되었다(Fig. 1). 양성 염색 반응은 과 증식된 활막의 표피 세포, 침윤된 백혈구, 활막 혈관 내피 세포에서 나타나고 있으며 이것은 칼시뉴린이 여러 가지 다양한 세포에서 발현될 수 있음을 보여준다.

활막의 표피세포층(lining layer)은 FLS (Fig. 2A)와 대식세포 양 활막세포(macrophage like synovocyte)로 이루어져 있다. 연구자는 활막조직으로부터 활막세포를 분리하여 칼시뉴린 A의 기저 발현(basal expression)을 조사하였다. Western blot 검사를 통하여 류마티스 관절염

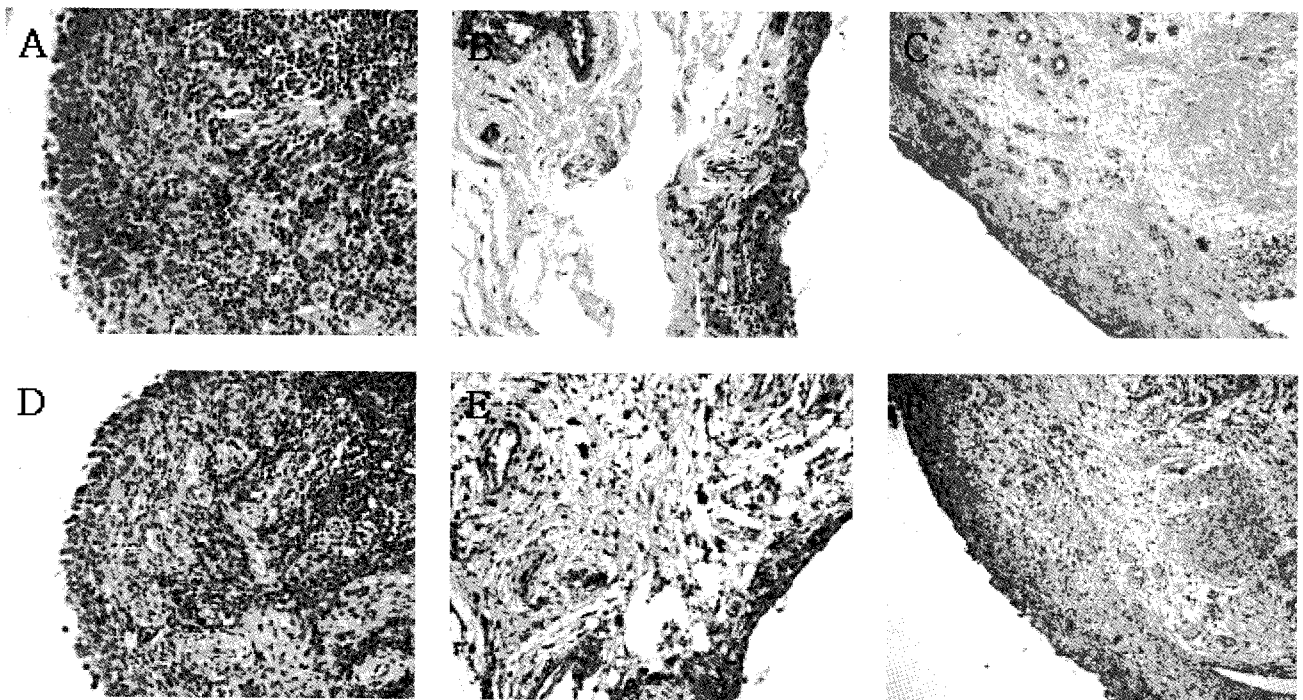


Figure 1. Expression of calcineurin in the rheumatoid synovium of patient with rheumatoid arthritis. (A-C) Hematoxyline and eosin staining of the rheumatoid synovium ($\times 200$). Tissue sections showed the synovial proliferation with heavy lymphoplasmacytic infiltration. (D-F) Immunohistochemical staining of the synovium using anti-calcineurin A antibody showed the high expression of calcineurin A in the synovial lining layer, endothelium, and infiltrating leukocytes.

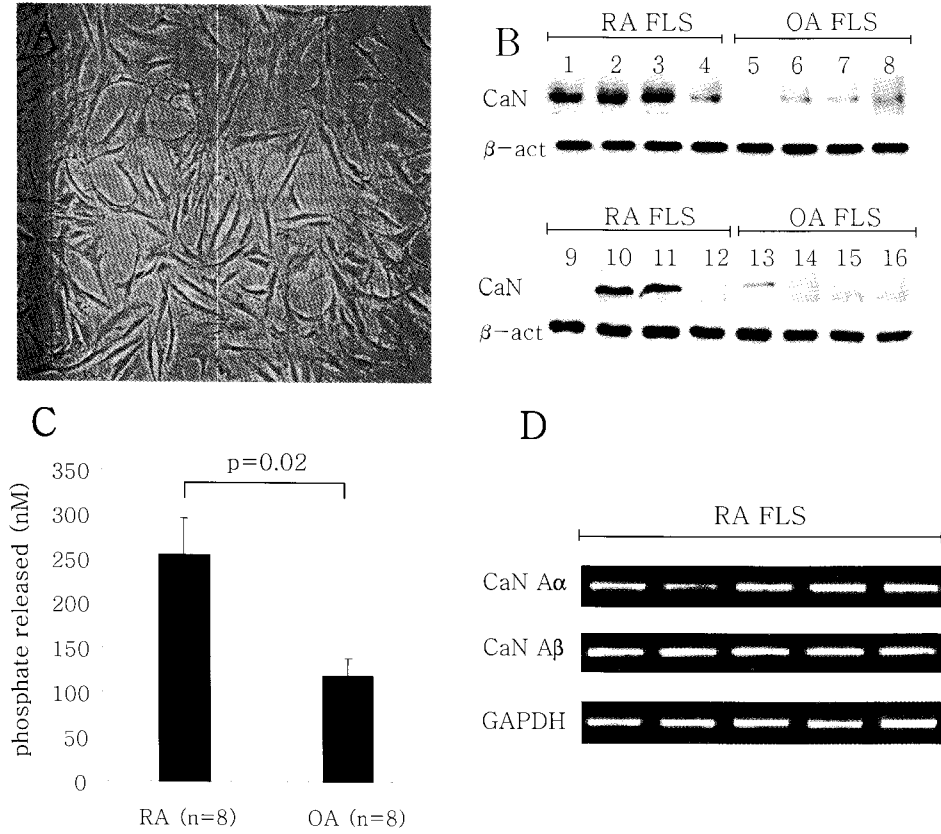


Figure 2. Expression of calcineurin A in synovial fibroblasts. (A) Phase-contrast microscopy of fibroblast-like synoviocytes (FLS) of rheumatoid arthritis patients. (B) Basal expression levels of calcineurin (CaN) A protein in the rheumatoid arthritis FLS (RA FLS, lane 1 to 4, lane 9 to 12) and osteoarthritis FLS (OA FLS, lane 5 to 8, lane 13 to 16), as determined by Western blotting analysis using anti-calcineurin A antibody. The house-keeping gene β -actin (β -act) was used as control. Data represent the results from one of three similar experiments. (C) Comparison of calcineurin phosphatase activity in the FLS between patients with rheumatoid arthritis (RA, n=8) and osteoarthritis patients (OA, n=8). (D) Reverse transcriptase PCR for calcineurin A α mRNA (CaN A α) and calcineurin A β mRNA (CaN A β) in rheumatoid synoviocyte.

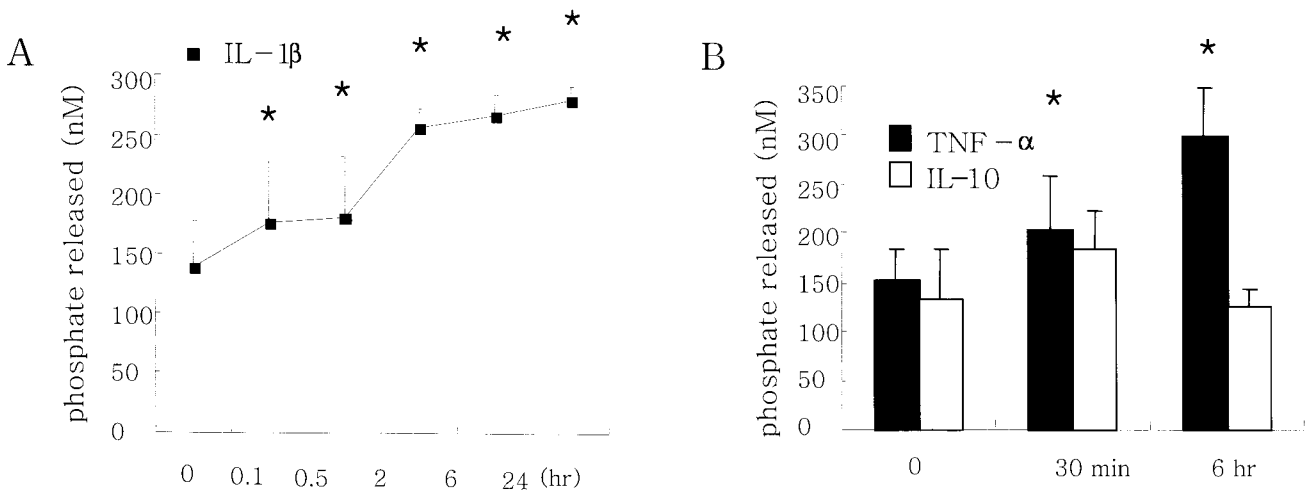


Figure 3. Increase of calcineurin activity in rheumatoid synoviocytes by proinflammatory cytokine. (A, B) The proinflammatory cytokines, IL-1 β (10 ng/ml) and TNF- α (10 ng/ml), but not IL-10 (10 ng/ml), time-dependently increased the calcineurin phosphatase activity in rheumatoid synoviocytes. The data are presented as the mean \pm SD values of three independent experiments. **p* < 0.05.

(n=8)과 대조군으로 골관절염 환자(n=8)의 활막세포에서 칼시뉴린의 발현을 비교한 결과, 류마티스 관절염의 활막세포가 골관절염의 활막세포보다 더 많은 양의 칼시뉴린을 발현하고 있었다(optical density ratio [calcineurin/ β -actin]: 0.36 ± 0.09 versus 0.04 ± 0.02 , *p* = 0.03) (Fig. 2B). 인산분해효소 분석법에 의하여 측정된 칼시뉴린 A의 기

저 활성도 역시 골관절염의 활막세포(n=8)보다 류마티스 관절염의 활막세포(n=8)에서 더 높았다(*p* = 0.02)(Fig. 2C).

칼시뉴린 A는 칼시뉴린 A α 와 칼시뉴린 A β 라는 두 가지 중요한 아형(isoform)이 있는데(17), 이들은 독특한 기능과 특징을 가지고 있다. 예를 들어, 칼시뉴린 A α 는

광범위하게 분포하는 반면 칼시뉴린 A β 는 면역 반응을 매개하는 림프계열의 세포에서 주로 현저하게 발현된다(17). 본 연구에서 RT PCR을 통해 류마티스 관절염 환자의 FLS에는 칼시뉴린 A α 와 칼시뉴린 A β mRNA 모두 발현되어 있음을 발견하였다(Fig. 2D). 활막세포에 칼시뉴린의 두 가지 아형이 모두 존재한다는 결과는 Western blot 검사로도 확인되었다(결과 생략). 칼시뉴린 A β 가 주로 림프구에 표현되어 있음을 고려해 볼 때(17,18), 연구자의 결과는 활막세포가 관절 내에서 면역 반응에 수동적으로 반응하기보다는, 림프계열의 세포들처럼 염증 반응에 적극적으로 관여하는 면역세포의 하나로서 취급되어야 함을 시사한다(1-3,11).

염증성 사이토카인에 의한 칼시뉴린의 활성화. 염증성 관절염에서 류마티스 관절의 활막세포는 다양한 염증성 사이토카인에 노출된다. 연구자는 염증성 사이토카인 IL-1 β 와 TNF- α 와 같은 자극이 활막세포 내 칼시뉴린 인산분해효소 활성화도에 미치는 영향을 조사하였다. 결과 IL-1 β (10 ng/ml)를 처리한 후 5분 만에 FLS 내 칼시뉴린 활성화도가 빠르게 증가하였으며 6시간 후 최고점에 도달하였고 이러한 효과는 24시간 동안 높게 유지되었다(Fig. 3A). TNF- α (10 ng/ml)를 처리하였을 경우 역시 칼시뉴린 활성화도가 시간-의존적으로 증가됨을 관찰하였으나(Fig. 3B), 항 염증성 사이토카인인 IL-10 (10 ng/ml)을 처리하였을 경우 칼시뉴린 활성화도의 변화는 없었다(Fig. 3B).

사이클로스포린 A에 의한 사이토카인과 기질금속단백분해효소 생성의 차등적 조절. 활막세포의 활성화에서 칼시뉴린의 역할을 결정하기 위해서, FLS에 의해서 생성되는 전 염증성 사이토카인 중 하나인 IL-6 생성에 대한 칼시뉴린 저해제의 효과를 조사하였다. FLS를 IL-1 β (0.1 ng/ml) 및 TNF- α (1 ng/ml)로 자극할 경우 자극하지 않았을 경우에 비해 IL-6의 생성은 각각 136배, 24배 증가하였다. 여기에 사이클로스포린 A (40~800 nM)를 추가하였을 때 IL-1 β 및 TNF- α 에 의해 유도된 IL-6의 생성이 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 4A). 활막세포에 사이클로스포린 A 800 nM를 처리하였을 때 IL-1 β 혹은 TNF- α 에 의해 유도되는 IL-6 생성의 감소 정도는 이들 사이토카인을 단독 처리한 경우와 비교하여 각각 42.0%와 33.5%이다. 다른 칼시뉴린 저해제인 FK506 역시 사이클로스포린 A와 비슷한 경향을 보인다(Fig. 4B). 한편, 활막세포에 고농도의 사이클로스포린 A (40~4000 nM)를 처리하여도 세포 사멸이 전혀 변화되지 않았기 때문에(Fig. 4C), 사이클로스포린 A에 의한 IL-6 생성의 감소가 비 특이적인 세포 독성에 의한 것이 아니라고 판단된다. MTT 분석에 의한 FLS의 생존 능력 및 caspase-3 활성화도 역시 사이클로스포린 A (40~800 nM)의 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 한편, FLS를 IL-1 β

(10 ng/ml)로 72시간 동안 자극할 경우 기질금속단백분해효소-1 및 -2의 생성이 기저 수준에 비해서 각각 4.6배와 2.0배 증가하였으며(Fig. 4D), 여기에 사이클로스포린 A (40~800 nM)를 추가하였을 경우 이러한 증가들이 강하게 억제되었다. 예를 들어, 사이클로스포린 A 800 nM을 처리할 경우 기질금속단백분해효소-1 과 -2의 생성은 IL-1 β 를 단독으로 처리한 것에 비해 각각 85.4%와 94.3%로 감소하였다. 따라서 기질금속단백분해효소-1과 -2의 생성은 IL-6에 비해 사이클로스포린 A에 더욱 민감한 것으로 판단된다. TNF- α 에 의해 유도된 기질금속단백분해효소-1과 -2 역시 사이클로스포린 A 처리에 의해 농도-의존적으로 감소되었다. 이와는 대조적으로 활막세포로부터 생성된 기질금속단백분해효소-3과 -9는 사이클로스포린 A에 의해서 거의 영향이 없거나 15% 미만으로 감소하였는데(Fig. 4D, 자료 제시 없음), 이것은 칼시뉴린이 기질금속단백분해효소-1, -2, -3 및 -9의 생성에 차별적으로 관여하고 있음을 의미한다.

류마티스 FLS는 IL-17과 같이 분비된 가용성 매개체 혹은 주변에 침윤된 세포 표면 단백질의 자극을 받아 활성화 될 수 있다(1-3,11,19,20). 작동세포(effector cell)로서 단핵세포의 활성화에 대한 칼시뉴린의 역할을 결정하기 위하여 류마티스 관절염 환자의 SFMC 세포로부터 생성된 사이토카인에 대한 사이클로스포린 A의 직접적인 효과를 연구하였다. 자극되지 않은 SFMC는 24시간의 배양 기간 동안 IL-17과 IL-10을 생성하였다(IL-17: 130 \pm 65 pg/ml, IL-10: 51 \pm 17 pg/ml). 여기에 사이클로스포린 A를 추가했을 때 SFMC에서 생성되는 IL-10의 농도는 농도-의존적으로 증가한 반면, IL-17의 농도는 감소하였다(Fig. 4E). 사이클로스포린 A 800 nM의 농도에서 SFMC에서 생성되는 IL-10의 평균 농도는 306 \pm 94 pg/ml (기저 생성의 5배)이었고, IL-17의 평균 농도는 32 \pm 5 pg/ml (초기 반응의 24.6%)이었다. 활막세포의 활성화에서 세포들 간 상호 작용의 중요성을 고려할 때(20), 이러한 결과는 사이클로스포린 A가 침윤된 단핵세포의 기능 조절을 통해 간접적으로 활막세포의 불활성화가 유도되고 결국 세포 간 상호작용의 약화가 초래될 것으로 추정된다.

칼시뉴린의 억제 유전자인 Cabin 1의 과 발현을 통한 활막세포의 불활성화. 사이클로스포린 A 등의 칼시뉴린 억제 약물은 칼시뉴린 억제와는 무관한 기전에 의해 다양한 생화학적 효과를 나타낼 수 있다. 이러한 이유로 칼시뉴린의 선택적, 비경쟁적 길항제인 캐빈 1 (Cabin 1, calcineurin-binding protein)을 과 발현시켜, 칼시뉴린 활성도를 특이적으로 억제하고자 하였다(21,22). 먼저 활막세포에서 캐빈 1의 발현을 조사한 결과 골관절염 환자(n=5)와 류마티스 관절염 환자(n=5)의 활막세포 내 캐빈 1의 발현 정도에 차이를 보이지 않았다(Fig. 5A). 따라서

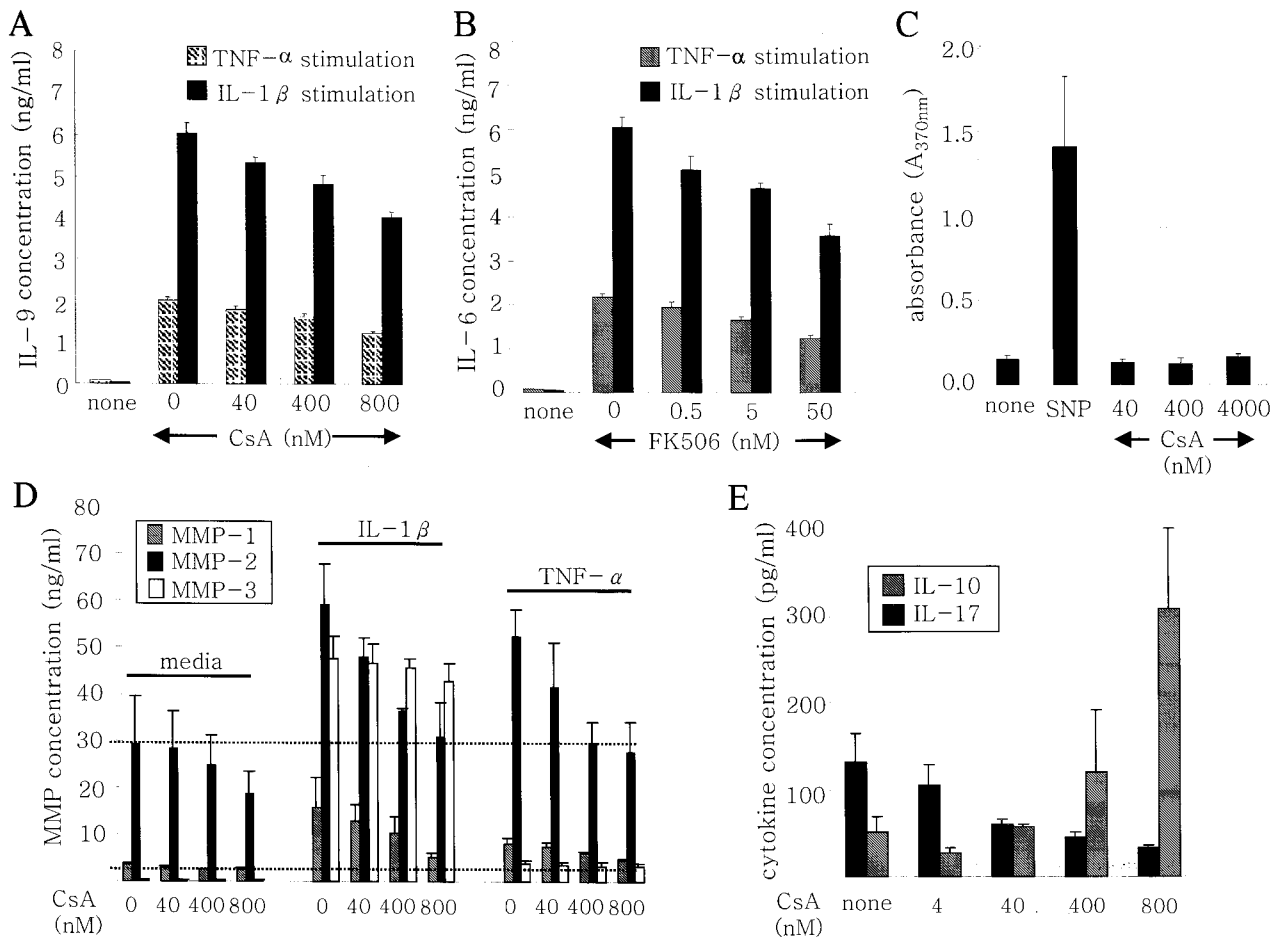


Figure 4. Effect of cyclosporin A on the productions of cytokine and matrix metalloproteinase. (A, B) Fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis patients were stimulated with IL-1 β (0.1 ng/ml) and TNF- α (1 ng/ml) for 24 hours in the presence of cyclosporin A (40 to 800 nM) or FK506 (0.5 to 50 nM). The IL-6 production in the supernatants was measured in triplicate by ELISA. Each value represents the mean \pm SD of three separate experiments. (C) In the four independent experiments, cyclosporin A, ranging from 40 to 4000 nM, did not affect the degree of apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts, which was assessed by cellular DNA fragmentation ELISA. Sodium nitroprusside (SNP) 1 mM was used as an apoptosis inducer. (D) Matrix metalloproteinase-1 and -2 productions by rheumatoid synovial fibroblasts, stimulated with medium alone, IL-1 β (10 ng/ml) and TNF- α (10 ng/ml) for 72 hours, were dose-dependently inhibited by cyclosporin A (40 to 800 nM). The concentrations of matrix metalloproteinase-1, -2 and -3 in the culture supernatants were measured by ELISA. Dot lines denote the basal levels of matrix metalloproteinase-1 and -2. Data are the mean \pm SD of three independent experiments. (E) Cyclosporin A divergently regulated the productions of IL-17 and IL-10 by synovial fluid mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients (n=5). Spontaneous production levels of IL-17 and IL-10 in the presence of cyclosporin A (4 to 800 nM) were determined in the culture supernatants by ELISA. Data are presented as mean \pm SD of five independent experiments.

캐빈 1을 과 발현시킬 경우 류마티스 관절염 활막세포의 활성이 억제될 것으로 가정하였다. 예비 실험에서 무한 증식 활막세포(MH7A cell)에 GFP-캐빈 1 펩티드 융합 펩타이드 유전자를 형질 전환시킨 결과, 고유의 캐빈 1 단백질(220kDa) 이외에도 GFP-캐빈 1 융합 펩타이드(66kDa)의 검출이 가능하였다(Fig. 5B, 5C). 칼시뉴린 효소 활성도는 GFP만 형질전환된 세포나 혹은 형질전환되지 않은 세포와 비교하여 GFP-캐빈 1 펩티드 융합 단백질이 과 발현된 세포에서 거의 완전히 억제되었다(Fig. 5D). GFP-캐빈 1 융합 단백질이 과 발현된 활막세포를 GFP만 형질전환된 세포와 비교할 경우 배지 단독 혹은,

IL-1 β 로 자극할 경우보다 IL-6의 생성이 부분적으로 억제되었다(형질전환된 세포 vs 형질전환되지 않은 세포에서 생성된 IL-6의 농도; 배지 단독 2.6 ± 0.2 vs 1.0 ± 0.1 ng/ml, IL-1 β 로 자극한 경우 5.1 ± 0.4 vs 3.1 ± 0.2 ng/ml) (Fig. 5E). 활막세포에서 생성되는 기질금속단백분해효소-2의 생성 역시 캐빈 1 펩티드 형질전환에 의해 강력히 억제되었다(형질전환된 세포 vs 형질전환되지 않은 세포; 31.1 ± 0.3 vs 5.2 ± 0.1 ng/ml). 그러나 캐빈 1 펩티드는 기질금속단백분해효소-3, -9의 발생을 억제시키지는 못 하였는데(Fig. 5F), 이러한 결과는 칼시뉴린의 약리학 적 길항제인 사이클로스포린 A에 의해 기질금속단백분

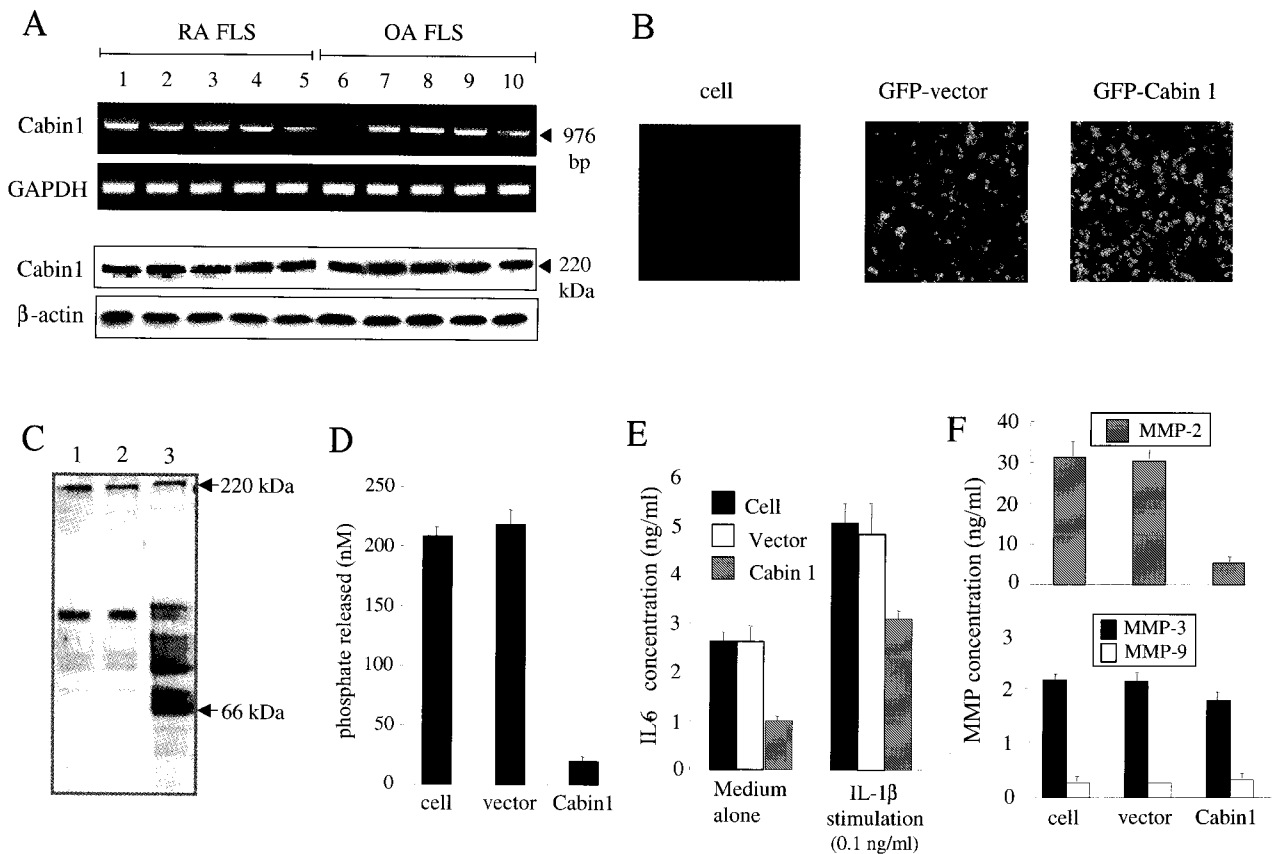


Figure 5. Inactivation of rheumatoid synoviocytes by Cabin 1 peptide transfection. (A) Expression of Cabin 1 mRNA (upper) and protein (lower), a natural calcineurin antagonist, in fibroblasts-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA FLS, lane 1 to 5) and osteoarthritis patients (OA FLS, lane 6 to 10), as determined by reverse transcriptase PCR and Western blotting analysis, respectively. (B) Immortalized rheumatoid synoviocytes, MH7A20, were transfected with either GFP-Cabin 1 gene (5641-6614) or GFP only, which was demonstrated by green fluorescence on confocal microscope ($\times 400$). (C) Western blotting analysis using anti-Cabin 1 antibody revealed the expression of fusion protein GFP-Cabin 1 peptide (66 kDa), in addition to full length Cabin 1 protein (220 kDa); untransfected control (lane 1), GFP-vector-transfected synoviocytes (lane 2), cells transfected with GFP-Cabin 1 peptide (lane 3). (D) Comparison of calcineurin phosphatase activity in cells transfected with GFP-Cabin 1 peptide versus cells transfected with GFP only or untransfected cells. (E) Partial inhibition of the spontaneous and IL-1 β -stimulated IL-6 production by GFP-Cabin 1 peptide. (F) Cabin 1 peptide nearly completely blocked the matrix metalloproteinase-2 production by MH7A cells, while minimally affecting the productions of matrix metalloproteinase-3 and -9.

해효소-1, -2, -3과 9의 생성이 변화되는 양상과 일치하는 결과이다(Fig. 4D). 케빈 1 펩티드가 활막세포로부터 IL-6 및 기질금속단백분해효소-2의 생성을 억제한다는 결과는 케빈 1 유전자가 류마티스 관절염과 같은 만성 염증성 질환의 치료에 활용될 수 있음을 시사한다. 그러나, 골관절염 환자(n=5)와 류마티스 관절염 환자(n=5)의 활막세포 내 케빈 1의 발현 정도에 차이를 보이지 않은 것은 케빈 1의 억제 작용을 보상할 수 있는 다른 요인이 류마티스 관절염 환자에게 존재한다는 것을 암시하므로 이에 대한 고려가 필요할 것으로 생각된다.

고 찰

류마티스 관절염 환자에서 칼시뉴린 신호전달 물질과 활막세포의 활성 사이의 관계에 대하여는 아직 잘 규명

되어있지 않다. 본 연구는 비 염증성 관절염인 골관절염 환자에서보다 류마티스 관절염 환자의 활막세포에서 칼시뉴린의 발현이 현저히 증가가 되어 있음을 규명하였다. 활막세포 내 칼시뉴린의 활성은 IL-1 β 와 TNF- α 와 같은 전 염증성 사이토카인에 의해 증가가 되었으며 IL-10과 같은 항 염증성 사이토카인은 영향이 없었다. 칼시뉴린은 활막세포에서 IL-6와 기질금속단백분해효소-1, -2의 생성에서 중요한 역할을 담당하고 있었다. 뿐만 아니라 칼시뉴린은 류마티스 관절염 동물 모델에서 파괴된 관절의 판누스와 활막세포에서 강하게 발현되어 있었으며, 이것은 임상적, 병리학적으로 평가된 관절염의 위중도에 잘 비례하였다. 결과를 종합해 보면, 본 연구는 칼시뉴린이 만성 염증성 관절염에서 활막세포의 활성과 질병의 진행에 대한 세포 내 중요한 전달 물질임

을 의미한다.

류마티스 활막세포는 독특한 형태의 공격적인 표현형을 나타내는데 이는 아마도 반응성 산소(reactive oxygen species), 성장인자(growth factor), 전 염증성 사이토카인 등과 같이 유전자에 해로운 환경에 만성적으로 노출됨에 따라 유도되었을 것으로 생각된다(1-5). 본 연구는 만성 염증을 지속시키는 원동력으로서 칼시뉴린의 중요성을 강조하고 있다. 류마티스 관절 내 높은 농도의 전 염증성 사이토카인들-예를 들어 TNF- α , IL-1 β 등은 FLS 내 칼시뉴린의 활성도를 누적적으로 증가시킬 수 있다. 또한 활막세포는 주변에 침윤된 백혈구들과 긴밀히 접촉하고 있기 때문에 이들 세포 간 상호작용 결과 칼시뉴린의 활성도가 보다 상승될 수 있을 것이다. 어떠한 경우이든 증가된 칼시뉴린은 관절의 파괴와 염증성 세포의 충원을 일으키는 기질금속단백분해효소와 IL-6의 분비를 시킬 것이다. 이렇게 분비된 효소와 단백질은 관절 파괴를 증진시킬 뿐 아니라 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시키고 염증세포를 충원시킬 수 있는데 이는 다시 칼시뉴린의 활성을 증가시키게 되어 결국 염증 반응의 악순환의 고리가 형성될 것이다. 이 경우 칼시뉴린은 악순환 고리의 중심부에서 복잡한 염증 단계를 주도적으로 이끌어 갈 것이다.

사이클로스포린 A의 작용은 T 림프구에만 제한되어 있지 않고 세포의 종류와 자극에 따라 다양하다. 사이클로스포린 A에 의한 TNF- α 의 억제제는 LPS 처리한 단핵세포에서는 관찰할 수 없으나(23), B 림프구에서는 관찰할 수 있다(24). 사이클로스포린 A는 마우스에서 LPS 의해 유도되는 IL-10의 분비를 현저하게 증가시키나 항-CD3에 의해 유도되는 IL-10의 분비는 완전히 억제한다(25). 본 연구에서 사이클로스포린 A는 활막세포에서 기질금속단백분해효소-1, -2, -3 및 -9의 생성과 단핵구에서 IL-17, IL-10의 생성을 차별적으로 조절하였다. 이러한 결과는 칼시뉴린에 의해 정상적으로 억제되어 있는 IL-10 같은 유전자의 발현 혹은 이와 관련된 신호전달물질이 사이클로스포린 A의 처리에 의해 자극될 수 있음을 시사한다. 이러한 개념을 뒷받침하는 것으로, 사이클로스포린 A와 FK506은 T 림프구에서 IL-2 및 IL-17과 같은 염증성 사이토카인을 강하게 억제시키는 반면, 동시에 과립구-대식구 집락자극인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), TGF- β , IL-5 및 IL-13을 포함하는 항 염증성 사이토카인의 발현을 증가시킨다(26-28).

주된 면역 억제제인 사이클로스포린 A와 FK506은 각각 사이클로필린(cyclophilin)과 FKBP12로 불리는 immunophilin 수용체와 결합하여 칼시뉴린의 활성을 특이적으로 억제시킨다(29). 최근 연구에서 사이클로필린이 항산화제로 기능하고 있음이 규명되었다. 예를 들어 사이클로필린은 페록시리독신(peroxiredoxin) 활성을 증가

시키고 사이클로스포린 A로 인한 독성으로부터 심근아세포를 보호해주는 기능이 있다(30). 사이클로필린의 발현을 증가시킨 유전자 형질 전환 마우스는 세포 내에서 샤프론(chaperone) 역할을 수행하는 펩티달-프로테아좀 시스템의 발현 조절을 통해 사이클로스포린 A에 의한 신독성에 저항한다(31). 따라서 사이클로스포린 A의 치료효과를 극대화하고 부작용을 최소화하기 위해서는 사이클로필린에는 영향을 주지 않으면서 칼시뉴린의 활성만을 선택적으로 억제하는 치료 전략이 필요하다.

칼시뉴린에 대한 몇 가지 내인성 조절인자들이 확인되었다. 캐빈 1이라고 불리는 새로운 생리적 칼시뉴린 길항제는 T 림프구 내에서 칼시뉴린 매개성 신호 전달을 억제한다(21). 카인(Cain; 쥐에서 발견되는 인형 캐빈 1의 상동체)을 이용하여 칼시뉴린을 선택적으로 억제시킬 경우 신경전달물질의 시냅스 세포 내 이입을 조절할 수 있으며(32), 심근세포 비후를 예방할 수 있다(33). 그러나 인형 캐빈 1 유전자를 조작하여 만성 염증성 질환을 치료하려는 시도는 아직 시행된 바 없다. 본 연구에서 저자들은 류마티스 관절염 활막세포에 캐빈 1을 과 발현시킬 경우 IL-6와 기질금속단백분해효소-2의 생성을 억제시킬 수 있음을 발견하였다. 활막세포 활성화 및 관절염 진행에서 칼시뉴린이 핵심적인 역할을 하고 있음을 고려할 때, 캐빈 1 유전자 치료는 최소한의 독성으로, T 림프구와 무관하게, 만성 관절염을 조절하는 새로운 치료 전략으로 활용될 수 있을 것이다.

이상의 연구를 종합해 보면, 류마티스 관절염에서 칼시뉴린 신호전달 물질의 비정상적인 증가로 인해 전 염증성 사이토카인과 기질금속단백분해효소의 생성이 유도되며, 이를 통해 활막세포 활성화 및 관절 파괴가 발생할 것으로 생각된다. 본 연구는 류마티스 관절염의 병인에 관한 새로운 시각을 제시하며, 관상동맥경화 및 이식 거부반응 등과 같은 만성 염증성 질환 치료의 후보물질로서 칼시뉴린의 중요성을 강조하고 있다.

참 고 문 헌

1. Feldmann M, Brennan, FM, Maini RN: Rheumatoid arthritis. *Cell* 85;307-310, 1996
2. Firestein GS: Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 39;1781-1790, 1996
3. Bucala R, Ritchlin C, Winchester R, Cerami A: Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J Exp Med* 173;569-574, 1991
4. Roivainen A, Jalava J, Pirtala L, Yli-Jama T, Tuusonen H, Toivanen P: H-ras oncogene point mutations in arthritic synovium. *Arthritis Rheum* 40;1636-1643, 1997
5. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR: Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94;10895-10900, 1997
6. Baksh S, Burakoff SJ: The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin Immunol* 12;405-415, 2000

7. Liossis SN, Kovacs B, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC: B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J Clin Invest* 98;2549-2557, 1996
8. Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC: Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest* 101;1448-1457, 1998
9. Crabtree GR, Olson EN: NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109;S67-79, 2002
10. Tugwell P, Pincus T, Yocum D, Stein M, Gluck O, Kraag G, McKendry R, Tesser J, Baker P, Wells G: Combination therapy with cyclosporine and methotrexate in severe rheumatoid arthritis. The Methotrexate-Cyclosporine Combination Study Group. *N Engl J Med* 333;137-141, 1995
11. Firestein GS: Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423;356-361, 2003
12. Franks JJ, Wamil AW, Janicki PK, Horn JL, Franks WT, Janson VE, Vanaman TC, Brandt PC: Anesthetic-induced alteration of Ca²⁺ homeostasis in neural cells: a temperature-sensitive process that is enhanced by blockade of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms. *Anesthesiology* 89;149-164, 1998
13. Cho CS, Cho ML, Min SY, Kim WU, Min DJ, Lee SS, Park SH, Choe J, Kim HY: CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 164;5055-5061, 2000
14. Miyazawa K, Mori A, Okudaira H: Establishment and characterization of a novel human rheumatoid fibroblast-like synovioyte line, MH7A, immortalized with SV40 T antigen. *J Biochem* 124;1153-1162, 1998
15. Kim WU, Lee WK, Ryoo JW, Kim SH, Kim J, Youn J, Min SY, Bae EY, Hwang SY, Park SH, Cho CS, Park JS, Kim HY: Suppression of collagen-induced arthritis by single administration of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles entrapping type II collagen: a novel treatment strategy for induction of oral tolerance. *Arthritis Rheum* 46;1109-1120, 2002
16. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH: Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 76;6270-6273, 1979
17. Guerini D, Klee CB: Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 86;9183-9187, 1989
18. Jiang H, Xiong F, Kong S, Ogawa T, Kobayashi M, Liu JO: Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Mol Immunol* 34;663-669, 1997
19. Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P: Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synovioytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 161;409-414, 1998
20. Sun L, Youn HD, Loh C, Stolow M, He W, Liu JO: Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* 6;703-711, 1998
21. Yamamura Y, Gupta R, Morita Y, He X, Pai R, Endres J, Freiberg A, Chung K, Fox DA: Effector function of resting T cells: activation of synovial fibroblasts. *J Immunol* 166; 2270-2275, 2001
22. Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH: Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem* 273;18325-18331, 1998
23. Cockfield SM, Ramassar V, Halloran PF: Regulation of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha expression in vivo. Effects of cycloheximide and cyclosporine in normal and lipopolysaccharide-treated mice. *J Immunol* 150;342-352, 1993
24. Tsai EY, Yie J, Thanos D, Goldfeld AE: Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol* 16;5232-5244, 1996
25. Durez P, Abramowicz D, Gerard C, Van Mechelen M, Amraoui Z, Dubois C, Leo O, Velu T, Goldman M: In vivo induction of interleukin 10 by anti-CD3 monoclonal antibody or bacterial lipopolysaccharide: differential modulation by cyclosporin A. *J Exp Med* 177;551-555, 1993
26. Dumont FJ, Staruch MJ, Fischer P, DaSilva C, Camacho R: Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *J Immunol* 160;2579-2589, 1998
27. Li B, Sehajpal PK, Khanna A, Vlassara H, Cerami A, Stenzel KH, Suthanthiran M: Differential regulation of transforming growth factor-beta and interleukin 2 genes in human T cells: demonstration by usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 174;1259-1262, 1991
28. Van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Troon JT, Rutschmann SK, Wijdenes J, Aarden LA: Human IL-13 production is negatively influenced by CD3 engagement. Enhancement of IL-13 production by cyclosporin A. *J Immunol* 156;1818-1823, 1996
29. Schreiber SL, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13;136-142, 1992
30. Hong F, Lee J, Song JW, Lee SJ, Ahn H, Cho JJ, Ha J, Kim SS: Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *FASEB J* 16;1633-1635, 2002
31. Hong F, Lee J, Piao YJ, Jae YK, Kim YJ, Oh C, Seo JS, Yun YS, Yang CW, Ha J, Kim SS: Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 316;1073-1080, 2004
32. Lai MM, Luo HR, Burnett PE, Hong JJ, Snyder SH: The calcineurin-binding protein cain is a negative regulator of synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem* 275;34017-34020, 2000
33. Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkenin JD: Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97;1196-1201, 2000