

## cAMP 증가 유도 약물의 대식세포- 및 T 세포-매개성 면역반응 조절작용

이만희 · 조재열\*<sup>#</sup>

경북대학교 수의과대학, \*강원대학교 BT학부대학 생물소재공학전공 및 생명공학연구소  
(Received December 18, 2006; Revised December 23, 2006)

### Immunomodulatory Effect of cAMP-Elevating Agents on Macrophage- and T cell-Mediated Immune Responses

Man Hee Rhee and Jae Youl Cho\*<sup>#</sup>

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

\*School of Bioscience and Biotechnology and Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract** — To investigate the immunomodulatory roles of cyclic AMP (cAMP) on macrophage- and T lymphocyte-mediated immune responses, cAMP elevating agents were employed and carefully re-examined under the activation conditions of the cells. Various inhibitors tested dose-dependently blocked tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  production with  $IC_{50}$  values ranged from 0.04 to 300  $\mu$ M. Of the inhibitors, cAMP-elevating agents showed lower cytotoxicity assessed by lactate dehydrogenase (LDH) release, suggesting less toxic and more selective. In particular, co-treatment of dbcAMP with a protein kinase C inhibitor staurosporine displayed the synergistic inhibition of TNF- $\alpha$  production. The modulatory effect of dbcAMP on TNF- $\alpha$  and nitric oxide (NO) was significantly affected by treatment time of dbcAMP. Thus, post-treatment of dbcAMP (three hours before LPS) abrogated dbcAMP's inhibitory activity, and rather enhanced TNF- $\alpha$  level up to 60%. In contrast, additional NO production was shown at the co-treatment of dbcAMP with LPS. Unlike simultaneous treatment of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and interferon (IFN)- $\gamma$  co-treatment, the combination of dbcAMP with other NO-inducing stimuli did not show drastic overproduction of NO. cAMP elevating agents also diminished splenocyte proliferation stimulated by concanavalin (Con) A, phytohemagglutinin A (PHA) and lipopolysaccharide (LPS). In addition, dbcAMP but not rolipram strongly suppressed  $CD8^+$  T cells (CTLL-2). Finally, cAMP elevating agents were differentially involved in regulating CD98-mediated cell-cell adhesion. Thus, dbcAMP and rolipram significantly enhanced the cell-cell adhesion, whereas forskolin blocked. Therefore, our results suggest that cAMP elevating agents participate in various immune responses mediated by macrophages and T cells with a different fashion depending on cellular environments and activation signals.

**Keywords** □ cAMP elevating agents, TNF- $\alpha$ , NO, splenocyte proliferation, cell-cell adhesion, macrophages, T cells

대식세포나 T 세포는 내재성 면역반응(innate immunity)과 획득성 면역반응(adaptive immunity)을 수행하는 대표적인 면역세포들이다. 대식세포는 병원성물질의 침입시 이들을 탐식하고 이를 통한 활성화과정을 경험하게 된다.<sup>1)</sup> 그 결과 여러 가지 cytokine 류와 nitric oxide(NO) 및 활성산소 등과 같은 독성 분자들을 분비하여 감염된 병원성 물질을 제거하는 내재성 면역반응을 매개하게 된다. 또한 대식세포는 탐식된 항원을 가수분해효소 체계와 구조적 적합성항원 복합체(MHC) class II를 이용한 항원공여

및 제시과정을 통해 T 세포의 분열을 유도하고 분열된  $CD4^+$  T cell은 helper type I 혹은 type II의 T(Th) 세포로 분화하게 된다.<sup>1,3)</sup> 다시 이들  $CD4^+$  Th 세포는 B 세포를 자극하여 침입된 항원에 대항하는 항체를 생산하고, 또한 바이러스가 감염된 세포나 종양화된 세포들을 제거할  $CD8^+$  cytotoxic T 세포의 분열 및 활성을 조절하게 한다.<sup>4,5)</sup>

cyclic AMP(cAMP)는 매우 다양한 생리적인 기능을 수행하는 대표적인 생화학적 second messenger이다. 특별히, cAMP는 여러 가지 기질을 활성화시키는 protein kinase A의 활성을 매개로 하여 세포내에서의 생물학적 역할들을 수행하게 된다.<sup>6)</sup> cAMP와 관련된 대표적인 신호전달 체계는 간세포나 지방세포에서 진행되는 포도당 생성과정(gluconeogenesis)으로 알려져 있다. 이

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 033-250-6562 (팩스) 033-253-6560  
(E-mail) jaecho@kangwon.ac.kr

들 과정은 protein kinase A 활성화에 의해 매개되는 연속적인 인산화과정을 통해 조절된다.<sup>7)</sup> 면역세포에서의 cAMP 기능에 관한 연구도 최근 활발히 진행되고 있는 연구주제 중의 하나이다. 면역을 담당하는 세포에서의 cAMP 증감은 여러 가지 면역관련 단백질(collagenase, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  및 interleukin(IL)-1 등)들의 발현 조절과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>8)</sup> 또한 특별히 면역 병리적 상태를 매개하는 면역세포나 염증세포에서 cAMP 농도 변화가 뚜렷이 관찰되었기 때문에 cAMP 농도 조절 방법이 이들 병리현상의 치료적 접근 방법으로 인지되고 있기도 하다.

세포내 cAMP 농도는 adenylyl cyclase 활성을 통한 cAMP 생합성계와 phosphodiesterase(PDE)를 이용한 cAMP의 분해계의 균형에 의해 조절되고 있다. 현재 이들 효소계에 작용하는 여러 가지 저해제나 활성유도제들이 이용되고 있다.<sup>9)</sup> Adenylyl cyclase의 활성을 유도하기 위한 약물들로는 prostaglandin (PG) $E_2$ 나 forskolin 등이, PDE 활성 저해제로는 비선택적인 pentoxifylline (PTX) 및 theophylline 등이, 그리고 선택적 PDE 저해제로서 rolipram이나 RP73401 등이 각각 널리 사용되고 있다. 이들 약물들은 다양한 조건에서 세포 비특이적으로 cAMP의 농도를 높이는 것으로 알려져 있다. 그러나 동일한 cAMP 증가 효과에도 불구하고, 이들 약물들은 면역세포의 기능 조절 작용이 매우 다양한 것으로 보고되고 있다. 즉 PTX는 항관절염 치료효과가 있는 것으로 보고되고 있는 반면에, 강력한 PDE IV 저해제인 RP73401은 오히려 치료효과가 없는 것으로 확인되었다.<sup>10,11)</sup> 또한 NO 생성을 유도하는 약물에 따라, 이들 약물들(isoproterenol 및 3-isobutyl-1-methylxanthine)의 반응 역시 매우 다양한 것으로 나타나,<sup>12)</sup> cAMP elevating agent들을 이용한 다양하고도 심도있는 면역약리 연구가 절실히 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 cAMP elevating agent들을 이용한 면역세포(대식세포 및 T 세포)의 반응성(TNF- $\alpha$  및 NO 생성, 분열능 및 세포독성, 세포유착현상 등)을 비교 조사하였으며, 몇가지 흥미로운 사실을 확인하였기에 이에 보고하고자 한다.

## 실험 방법

### 시약 및 재료

N-Monomethyl-L-arginine(MMA), phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), concanavalin(Con) A, phytohemagglutinin (PH) A, dibutyl cyclic AMP(dbcAMP), PGE $_2$ , forskolin, starurosporine, herbimycin A, genistein, PTX, TNF- $\alpha$  및 LPS(*E. coli* 0111 : B4)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구매하여 사용하였으며, rottlerin, rolipram 및 AG126 등은 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. A77,1726(leflunomide 유도체)는 대웅제약 중앙연구소 합성연구팀에서 합성한 것을 이용하였

다. CD98 항체는 미네소타 대학의 Skubiz 박사로부터 공급받아 사용하였다.<sup>13)</sup> Murine 대식세포주인 RAW264.7 세포, human 단핵구 세포주인 U937 세포 및 IL-2 dependent CD8 $^+$  세포주인 CTLL-2 세포는 ATCC(Manassas, VA, USA)로 부터 각각 확보하여 실험하였다. 또한 세포배양시 사용된 RPMI 1640 및 fetal bovine serum(FBS)은 Life Technologies사(Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였다. 그 외 사용된 모든 시약은 Sigma제품을 이용하였다. 초자의 경우 24 well plate는 Nunc사(North Aurora Road, IL, USA) 제품을, interferon (IFN)- $\gamma$  및 TNF- $\alpha$  enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 Amersham Life Science Co(Arlington Heights, U.K.)사로부터 구입하여 정량에 이용하였으며 ELISA reader로는 Spectramax 250 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 사용하였다.

### In vitro TNF- $\alpha$ 생성 및 정량

RAW264.7 및 PMA-분화된 U937 세포를 10% 항생물질 [penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin(100  $\mu$ g/ml)]과 5%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서  $1 \times 10^6$  cell/ml로 조절한 후, 24 well plate에 접종하고, 5% CO $_2$  및 37°C에서 18 시간 동안 전배양하였다.<sup>14)</sup> 이후 배지를 파이펫하고 10배 농도로 조제된 시험물질 50  $\mu$ l와 450  $\mu$ l의 LPS(최종농도 1  $\mu$ g/ml) 함유 배지를 동시에 배양 well에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 6시간 후 배지를 파이펫하여 원심분리(12,000 rpm, 3분간)하고, 얻어진 상층액 일부는 정량전까지 -20°C 이하에서 보관하였다. TNF- $\alpha$ 의 정량은 mouse 및 human TNF- $\alpha$  ELISA kit를 이용하여 정량하였다. TNF- $\alpha$ 의 정량한계는 5 pg/ml 이하였으며 standard TNF- $\alpha$ 에 대한 표준곡선의  $r^2$  값은 두 방법이 0.99 이상이었다.

### Nitric Oxide의 정량

배양 배지에서의 nitric oxide 정량은 Cho 등의 방법(2000)으로 실시하였다.<sup>14)</sup> 24시간 동안 배양된 RAW264.7 세포( $2 \times 10^5$  cell/well) 배양 well로부터 얻어진 배지 100  $\mu$ l와 Griess시약[5% (v/v) phosphoric acid 용액 내 1%(w/v) sulfanilamide 및 0.1%(w/v) naphthylethylenediamide] 100  $\mu$ l를 혼합한 후 상온에서 10분 동안 방치한 후, 발색된 정도를 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 표준 정량곡선은 sodium nitrite를 적절한 농도로 희석하여 동일 방법으로 흡광도를 측정한 후 완성하였다.

### Lymphocyte 분열 assay

T 및 B 세포 분열증식 assay는 T 세포 mitogen인 Con A 및 PHA와, B 세포 mitogen인 LPS를 이용하여 다음의 방법으로 실

시하였다.<sup>14)</sup> Balb/c 생쥐로부터 무균조작으로 비장을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20 mM Tris buffer(pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI 1640 배지로 3회 세척 후 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포를  $5 \times 10^6$  cell/ml 농도로 96 well plates에 접종하였다. 약물과 LPS(10  $\mu$ g/ml), Con A(1  $\mu$ g/ml) 혹은 PHA(10  $\mu$ g/ml)를 처리하고 48시간 동안 배양하였다. T 및 B 세포 분열증식 정도는 MTT assay로 확인하였다.

#### CTLL-2 cell 분열 assay

RPMI 1640 배지로 배양된 CTLL-2 세포를  $5 \times 10^5$  cell/ml 농도로 조절한 후 96 well plates에 100  $\mu$ l씩 접종하였다.<sup>14)</sup> 여러 농도로 조절된 약물은 IL-2(50 U/ml)를 첨가하기 1시간 전에 처리하였다. 세포분열 정도는 IL-2 처리 48시간 후에 MTT assay 방법으로 측정하였다.

#### MTT assay

TNF- $\alpha$  및 NO 분비조절 실험시 처리된 각 약물들의 세포독성에 미치는 영향 및 splenocyte와 CTLL-2 세포들의 분열정도를 평가하기 위해 MTT assay 법을 사용하였다.<sup>14)</sup> 각 조건에서의 배양 시간이 종료된 후, 다시 배양 well에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 용액(5 mg/ml) 20  $\mu$ l를 첨가하고 4시간을 추가적으로 동일 조건에서 배양하였다. 발색은 30% SDS용액을 첨가하여 유도하였다.<sup>15)</sup> 흡광도는 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

#### LDH 정량

배양된 배지 150  $\mu$ l를 취하여 정량용 vial에 넣고 Dimension (Du Pont, Wilmington, DE, USA)을 이용하여 정량하였다.<sup>14)</sup> Dimension에 의한 LDH의 정량은 lactate가 pyruvate로 산화되는 동안 생성되는 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)의 환원형태 정도를 측정하는 효소학적 방법으로 정량한계는 0~6000 U/dl이다.

#### 세포-세포간 유착 반응

U937 세포를  $5 \times 10^5$  cell/ml 농도로 조절한 후 U-bottom의 96 well plate에 20  $\mu$ l를 넣고, 10  $\mu$ l의 약물, 10  $\mu$ l의 유착반응 유도 항체[CD98 항체(ANH-18, 최종 1  $\mu$ g/ml)]를 최종 첨가하였다. 6시간 배양된 배양 세포를 부유시킨 후, 20  $\mu$ l를 취해 hemocytometer에 옮겨 넣고, 현미경으로 clustered cell과 non-clustered free cell의 수를 측정하였다. 약물 군이 갖는 세포유착과정의 조절 정도는 약물을 넣지 않은 대조군의 세포유착정도를 100%로

기준하여 계산하였다.<sup>13)</sup>

$$\% \text{ of aggregation} = \frac{(\text{total-unaggregated cells})}{\text{total}} \times 100$$

$$\% \text{ of control} = (\text{약물/대조군}) \times 100$$

#### 통계처리

각 측정값은 평균±표준편차로 표현하였다. 그룹간의 통계적 유의성은 SAS package를 이용하여 P<0.05 수준에서 Duncan의 다중 비교법에 의해 분석하였다.

## 결 과

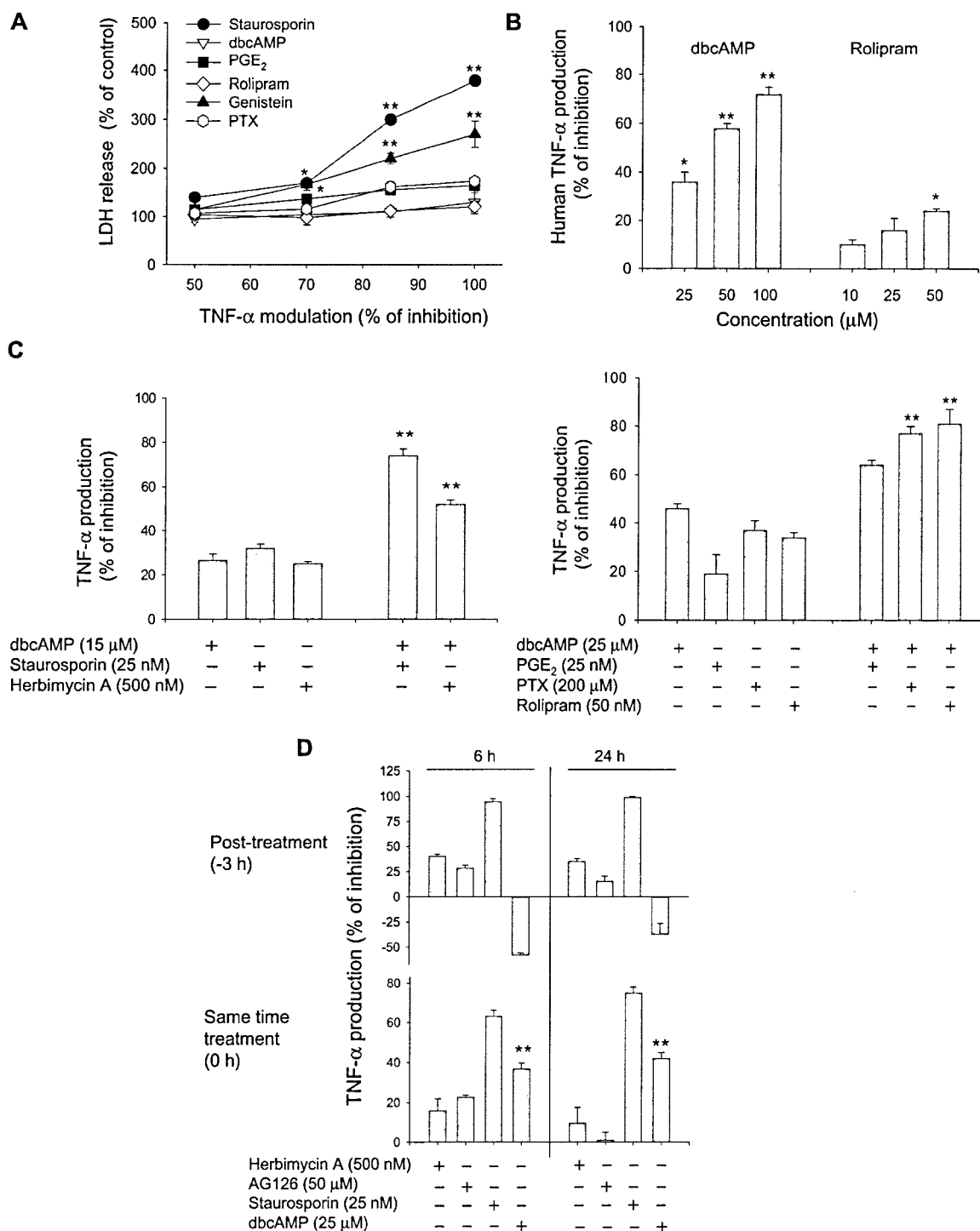
#### cAMP elevating agent들의 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 효과

많은 연구 결과들은 세포내 cAMP 농도가 상승될 경우 LPS에 의해 유도되는 TNF- $\alpha$  생성이 억제된다고 보고하였다.<sup>10)</sup> 따라서, 본 연구에서는 우선 수준의 cAMP elevating agent들 [dbcAMP(cell permeable cAMP), PGE<sub>2</sub>(adenylyl cyclase 활성화제), PTX(pentoxifylline, 비특이적 PDE inhibitor), rolipram(선택적인 PDE type IV 저해제)]이 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 세포 유래 TNF- $\alpha$  분비에 어떤 억제 경향을 나타내는지 심도 있게 분석해보았다. Table I에서 처럼, cAMP elevating agent들은 40 nM에서 300  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 수치를 보이는 등 매우 다양한 효과를 나타냈다. 반면에 대조약물로 사용된 protein kinase C 저해제인 staurosporine은 23 nM 그리고 protein tyrosine kinase inhibitor인 genistein은 49  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 수치를 각각 보였다.

한편 안전하고 선택적인 TNF- $\alpha$  저해제 개발을 위해서 현재 TNF- $\alpha$  생합성 경로를 차단하는 다양한 저분자 약물들의 개발이 시도되고 있다. 본 연구에서는 우선 각 생합성 경로를 억제하는 대표적인 약물들을 이용하여 이들 약물들의 선택성 및 안전성을 비교 평가해 보았다. 이를 위하여, 각 TNF- $\alpha$  저해제가 갖는 50% 이상의 TNF- $\alpha$  생산 억제농도를 중심으로 RAW264.7 세포 생존율에 미치는 독성 영향을 확인하였다. 특히, 세포 독성 평가는 가장 민감한 독성 지표 효소의 하나인 LDH의 유리량을 검정함으

**Table I** - Inhibitory effects of signaling enzyme inhibitors on LPS-induced TNF- $\alpha$  production in RAW264.7 cells

Compound	Target enzyme	IC <sub>50</sub> values ( $\mu$ M)
dbcAMP	Cell-permeable cAMP	36.4±2.2
PGE <sub>2</sub>	Adenylyl cyclase (activator)	0.0464±2.2
Pentoxifylline	Non-selective PDE (inhibitor)	278.4±13.7
Rolipram	PDE IV (inhibitor)	0.049±0.0051
RP73401	PDE IV (inhibitor)	0.0064±0.0013
Genistein	Protein tyrosine kinase (inhibitor)	48.8±3.6
Staurosporin	Protein kinase C (inhibitor)	0.0231±0.004



**Fig. 1** – Effects of cAMP elevating agents on LDH release and TNF- $\alpha$  production in LPS-activated macrophages. (A) LDH release effect : RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were simultaneously treated with LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) and various inhibitors at concentrations, displaying more than 50% inhibition of TNF- $\alpha$  production. LDH level in culture supernatants was determined by Dimension. (B) Effect on human TNF- $\alpha$  production: PMA-differentiated U937 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of dbcAMP and rolipram. (C) Synergistic signal : RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were simultaneously stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence or absence of staurosporine or herbimycin A (left panel), or cAMP elevating drugs (right panel). (D) Treatment time effect : RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence or absence of various inhibitors. Supernatants were then collected after 6 or 24 h and TNF- $\alpha$  levels were determined by murine (C, D) or human (B) ELISA kits as described in Materials and methods. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations performed in triplicates. \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.01$  compared to control (A and B), single treatment (C) or post-treatment (D).

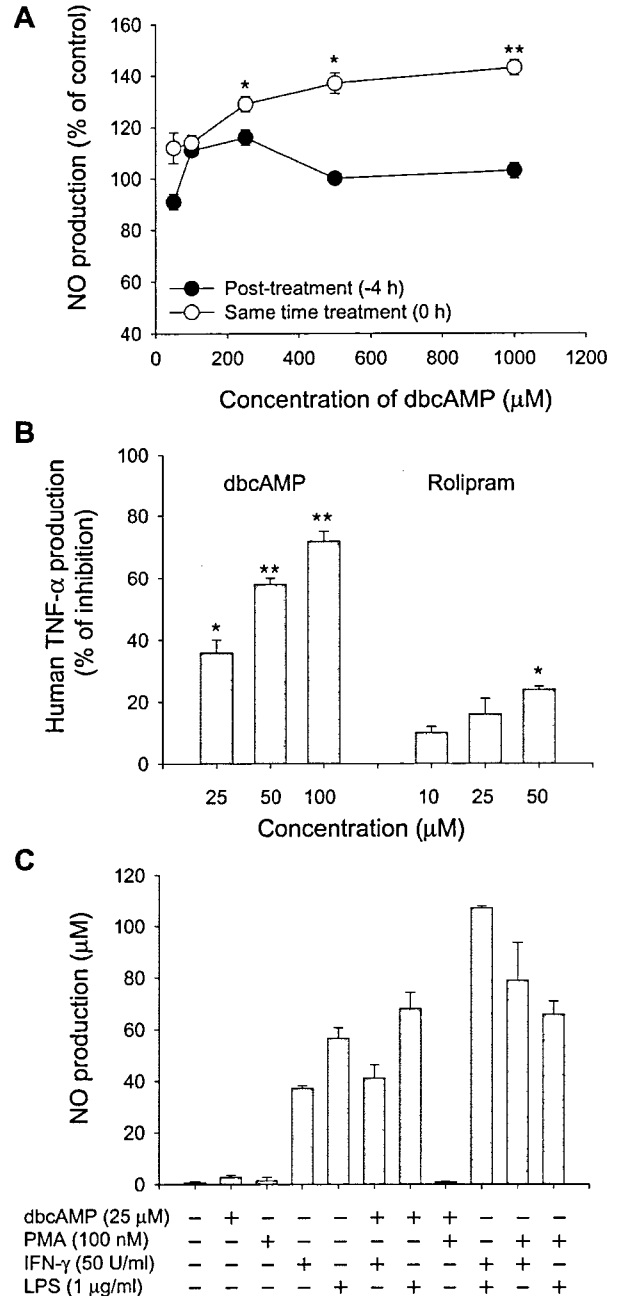
로써 보다 민감도와 정확성을 높이고자 하였다. Fig. 1A에서 처럼, staurosporine은 가장 높은 LDH 유리효과를 나타냈으며, genistein은 두 번째 높은 세포독성 효과를 나타냈다. 하지만 cAMP 증가 약물들은 상대적으로 낮은 세포독성을 유도하였는데, 특별히 비특이적 PDE 저해제인 PTX와 PGE<sub>2</sub>가 유의성 있는 LDH 유리 효과를 나타냈다.

Murine 대식세포 모델에서의 TNF- $\alpha$  억제효과를 human 모델과 비교하기 위해, PMA로 분화 유도된 U937 세포(대식세포 유사 세포)를 LPS로 자극하고 이때 분비되는 TNF- $\alpha$ 에 관한 dbcAMP 및 rolipram의 억제능을 조사하였다. Fig. 1B에서 처럼 rolipram[강력한 cAMP 의존성 PDE(type IV) 억제제]은 50  $\mu$ M 농도에서도 20% 이하의 억제 효과를 나타낸 반면, dbcAMP는 murine 세포주(RAW264.7)에서 얻어진 결과와 유사하게 억제작용을 나타냈다.

Murine과 human에서 유사한 TNF- $\alpha$  억제 효능을 나타낸 dbcAMP와, 기존에 알려진 TNF- $\alpha$  저해제들과의 병용처리를 통해 시너지 효과를 나타내는 TNF- $\alpha$  저해 경로를 탐색하였다. Fig. 1C에서 처럼, dbcAMP와 protein tyrosine kinase inhibitor인 herbimycin A 혹은 cAMP elevating agent들인 PGE<sub>2</sub>, PTX 및 rolipram 과의 병용투여는 단순한 상승효과 만을 유도하였다. 반면에, 흥미롭게도, protein kinase C 억제제인 staurosporine과는 TNF- $\alpha$  억제시 뚜렷한 시너지효과를 나타낸 것으로 확인되었다. 끝으로, dbcAMP의 처리시간에 따른 TNF- $\alpha$  생성 억제 영향을 조사하기 위해, dbcAMP의 처리시간을 달리하여 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 조절현상을 관찰하였다. dbcAMP와 LPS의 동시 처리시에는 효과적으로 TNF- $\alpha$  분비를 억제(40% 정도)하였다(Fig. 1D). 그러나, 흥미롭게도 dbcAMP를 LPS보다 3시간 전에 처리할 경우에는, dbcAMP에 의한 TNF- $\alpha$  억제효과는 완전히 상실되고, 오히려 TNF- $\alpha$  분비를 30~50% 정도 더 유리시키는 것으로 나타났다. 따라서 본 결과로 볼 때 cAMP에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비조절은 다른 신호전달과정 경로에 비해 매우 선택적이면서 안전하게 TNF- $\alpha$  생성을 억제하는 것으로 판단된다. 또한 어떤 경로 및 어떤 조건에 의한 cAMP 농도 상승이냐에 따라 다양한 TNF- $\alpha$  조절효과를 가지는 것으로 생각된다.

#### cAMP elevating agent들의 NO 생성에 미치는 효과

cAMP elevating agent들은 다양한 TNF- $\alpha$  조절작용을 나타내므로, 대식세포에서 분비되는 대표적인 독성분자인 NO 분비에 관한 조절 효과를 추가적으로 조사하였다. Fig. 2A에서 처럼 dbcAMP의 동시 혹은 4시간 전처리에 따른 NO 생성 조절능은 TNF- $\alpha$  분비 결과와는 다른 경향으로 나타났다. 즉 동시처리 시에는 매우 한정된 농도에서만 통계적으로 약간 NO 생성을 증가시켰으나, 4시간 전처리 시에는 dbcAMP 농도 의존적으로 NO 유리량을 상승(약 40% 정도까지)시키는 것으로 나타났다. 또한



**Fig. 2** – Effect of dbcAMP on NO production and cytoprotection in LPS-activated macrophages. (A) Treatment time effect : RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of dbcAMP. (B) Cytoprotective effect : RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of dbcAMP. MTT solution was then added after 24 h incubation. (C) Combination treatment : RAW264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with LPS (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of various stimuli as well as dbcAMP. Supernatants were then collected after 24 h and NO levels were determined by Griess assay (A, B) as described in Materials and methods. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations performed in triplicates. \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.01$  compared to control.

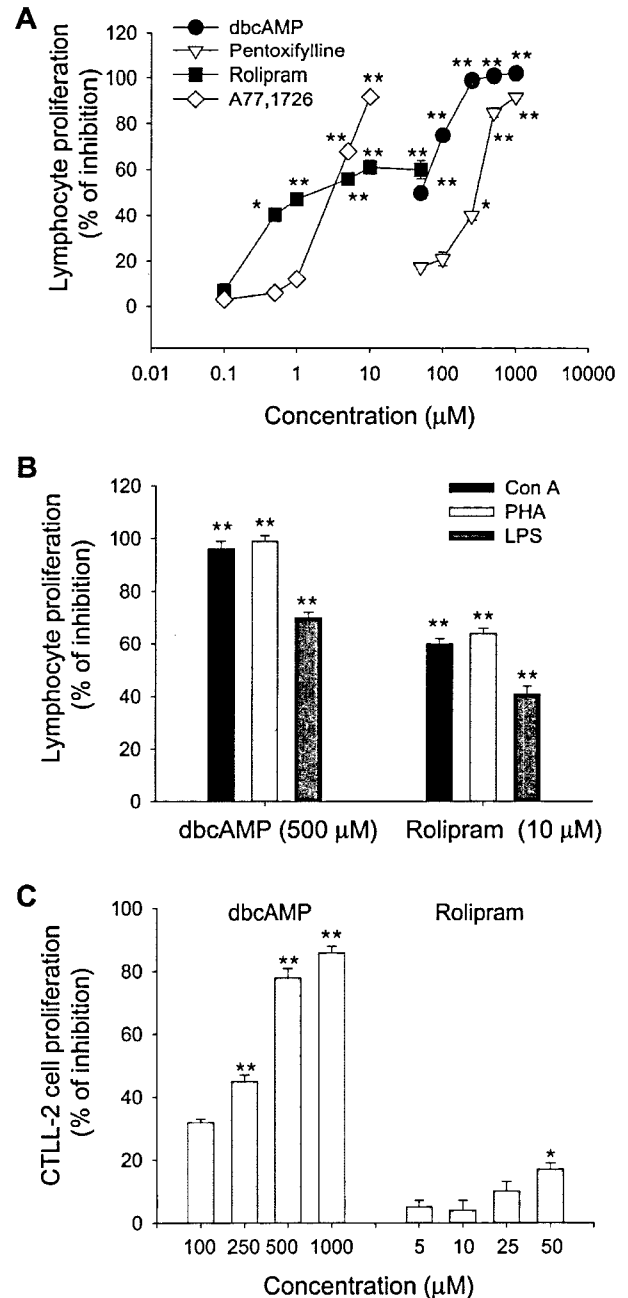
LPS 유도시 발생하는 NO 매개성 세포독성에 관한 조절 작용도 dbcAMP의 처리시간에 따라 다소 차이가 나는 것으로 확인되었다. 즉 4시간 전처리 시에는 LPS 매개성 세포독성을 약 40% 정도까지 촉진한 것으로 보였다(Fig. 2B). 다른 NO 유리 신호전달 촉진 약물들과의 상호작용을 조사하기 위해, NO 유리와 관련되어져 있는 PMA, LPS 및 IFN- $\gamma$ 과의 병용처리 효과를 평가하였다. Fig. 2C에서 보여지듯, dbcAMP와 IFN- $\gamma$  혹은 LPS 병용 처리는 IFN- $\gamma$  보다 LPS에서 다소 증가된 NO 분비량을 보여주었을 뿐, PMA와 IFN- $\gamma$ 에서 보여주는 synergy 효과는 확인되지 않았다. 따라서 본 결과로 볼 때, cAMP는 TNF- $\alpha$  분비시와는 달리, NO 생성을 더욱 촉진하는 세포내 신호전달 과정 유도를 매개할 것으로 판단된다.

### cAMP elevating agent들의 lymphocyte 분열 생성에 미치는 효과

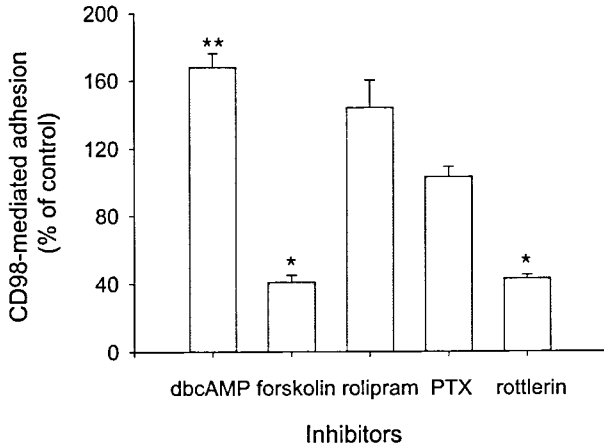
Fig. 3A에서 보듯 cAMP elevating agent들은 Con A에 의해 자극된 splenocyte 유래 lymphocyte들의 분열을 효과적이면서 농도 의존적으로 억제하였다. 그러나 다른 약물들과 달리, 강력한 PDE IV inhibitor인 rolipram은 60% 이상을 억제하지는 못하였다. 이들의 억제효능이 Con A 이외에 다른 mitogen(LPS 및 PHA)에 의한 splenocyte 유래 lymphocyte들의 분열을 억제하는지 확인하기 위하여 이들 자극원을 이용하여 억제효능을 평가하였다. Fig. 3B에서 처럼 dbcAMP와 rolipram은 Con A 및 PHA 유도성 T 세포(주로 CD4<sup>+</sup> T 세포) 분열을 매우 효과적으로 억제하였으며, LPS 자극에 의해 유도되는 B 세포 분열과정 역시 억제하는 것으로 확인되었다. CD8<sup>+</sup> T 세포의 분열에 미치는 효과를 측정하기 위해, IL-2 의존성 CD8<sup>+</sup> T 세포인 CTLL-2 세포를 이용하여 이들 약물들이 CTLL-2 세포분열에 미치는 효과를 평가하였다. Fig. 3C에서 처럼 dbcAMP는 농도 의존적으로 억제하였으나, rolipram은 50  $\mu$ M 처리시에도 상대적으로 약한 CTLL-2 세포 분열 억제 능을 나타냈다. 따라서 본 결과로 볼 때, 세포내 cAMP는 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 분열과정을 조절하는 중요한 생화학적 분자로 사료된다.

### cAMP elevating agent들의 CD98 매개성 세포유착반응 조절 효과

면역세포는 긴밀한 세포간 상호작용을 통해 여러 가지 면역반응들을 수행하게 된다. 세포간 상호작용은 adhesion molecule들에 의해 조절되는 세포간 유착과정을 통해 매개된다. CD98은 대식세포나 수지상세포에서 매우 높게 발현되는 대표적인 adhesion molecule로서 CD29( $\beta$ 1-integrins)의 기능을 조절하는 당단백질이다.<sup>13,16)</sup> 따라서 본 연구자는 마지막으로 cAMP elevating agent들이 CD98 매개성 세포유착과정에 미치는 효과를 비교 검토하였다. Fig. 4는 cAMP elevating agent들이 매우 다양하게 CD98



**Fig. 3** – Effect of cAMP elevating agents on mitogenic responses of murine splenocytes and IL-2 dependent CTLL-2 cells. (A) Con A-induced splenocyte proliferation : Splenocytes ( $5 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with Con A (1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of various inhibitors. (B) Mitogenic responses : Splenocytes ( $5 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with Con A (1  $\mu$ g/ml), PHA (10  $\mu$ g/ml) or LPS (10  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of dbcAMP or rolipram. (C) CTLL-2 cell proliferation : CTLL-2 cells ( $5 \times 10^5$  cell/ml) were treated with IL-2 (50 U/ml) in the presence or absence of dbcAMP or rolipram. Cell proliferation was determined by MTT assay as described in Materials and methods. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations performed in triplicates. \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.01$  compared to control.



**Fig. 4** - Effect of cAMP elevating agents on CD98-induced cell-cell adhesion. U937 cells ( $1 \times 10^5$  cell/ml) were stimulated with anti-CD98 antibody (ANH-18, 1  $\mu$ g/ml) in the presence or absence of various compounds [dbcAMP (100  $\mu$ M), forskolin (50  $\mu$ M), rolipram (10  $\mu$ M), pentoxifylline (PTX, 500  $\mu$ M) and rottlerin (20  $\mu$ M)] for 6 h. The extent of cell-cell adhesion was determined by quantitative homotypic aggregation assay as described in Materials and methods. Data represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent observations performed in triplicates. \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.01$  compared to control.

매개성 세포유착 과정을 조절한다는 것을 보여주고 있다. 즉 dbcAMP는 약 60% 정도 세포유착 반응을 증가시켰으며, forskolin의 경우는 오히려 억제시킨 것으로 나타났다. 대조약물인 protein kinase C  $\delta$  저해제인 rottlerin 역시 매우 효과적으로 억제하였다.<sup>15)</sup> 따라서 본 연구결과는 이들 cAMP-elevating drug들이 다양하게 면역 세포간의 유착현상을 조절할 수 있다는 가능성을 시사한다.

## 고 찰

TNF- $\alpha$ 는 대식세포나 수지상세포와 같은 항원공여세포(antigen-presenting cells)가 외부 항원에 자극을 받으면서 분비되는 pro-inflammatory cytokine의 하나이다. 정상적인 상태에서의 TNF- $\alpha$ 는 암세포나 세균의 감염에 대항할 수 있는 방어물질로 작용하나, 비정상적으로 과도하게 분비될 경우의 TNF- $\alpha$ 는 여러 가지 치명적인 염증과정을 매개하는 단백질로 알려져 있다. 특별히, TNF- $\alpha$  매개성 염증현상은 류마티스성 관절염이나 기관지 천식 및 급성 패혈증성 속 등을 매개하는 것으로 보고되어져 있다.<sup>17,18)</sup> 따라서 많은 연구자들은 이들 급/만성 염증질환을 치료하기 위한 방법의 하나로 TNF- $\alpha$  저해제 개발을 시도하고 있으며, 대표적인 약물계열이 PDE 저해제나 cAMP 유도체 등과 같이 세포내 cAMP 농도 및 관련 경로를 조절하는 약물들로 알려져 있다.<sup>10,19)</sup>

먼저 본 연구에서는 cAMP-elevating agent들을 포함해서 현재까지 알려진 TNF- $\alpha$  저해제들이 가지는 효과를 세포독성 관점

에서 효용성을 재 평가해 보았다. 효과적이고 부작용이 없는 약물 개발을 위해서는 무엇보다 표적 효소계에서만 작용하는 약물을 탐색해 내야하며, 특별히 이들 표적효소계가 TNF- $\alpha$  생합성 외에 다른 경로를 차단하거나 활성을 유도하게 되면 선택성이 결여된다고 가정되었다. 본 연구자는 특별히 약물의 선택성 유무를 세포독성과 관련된 파라미터로 설정하고 기준에 알려진 TNF- $\alpha$  저해제들이 이들 세포독성 파라미터(LDH)의 변화를 유도하는지를 조사하였다. Fig. 1A에서 알 수 있듯이 protein tyrosine kinase(genistein)나 protein kinase C(staurosporine) 저해제에 의한 50% 이상의 TNF- $\alpha$  분비억제는 세포 독성 유도를 의미하는 LDH 수치 상승을 동반한다는 것을 확인시켜 주었다. 즉 이들 효소계의 억제제는 또 다른 부작용을 초래할 수 있다는 것을 시사한다고 하겠다. 부작용을 감소하기 위한 방안으로 보다 더 선택적인 저해제를 탐색하고 있지만, 현재까지 protein tyrosine kinase나 protein kinase C를 포함한 여러 신호전달 효소계 저해제들 중에 세포독성과 무관한 저해제는 보고되어져 있지 않은 실정이다.<sup>20,21)</sup> 그러나 흥미롭게도 cAMP elevating agent들은 비교적 세포독성 유발 정도가 매우 낮은 것으로 나타났다. 비록 PTX나 PGE<sub>2</sub>는 40~60% 정도까지 LDH 분비를 상승시키긴 했지만 dbcAMP나 rolipram 등은 매우 강력히 그리고 세포독성 유발 없이 거의 100%의 TNF- $\alpha$  억제 효과를 확보할 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서 본 결과로 미루어볼 때 세포내 cAMP의 증가유도는 효과적인 TNF- $\alpha$  분비 억제 약물 개발시 유효한 생화학적 표적이 될 수 있다는 것을 시사한다. 비록 cAMP elevating drug들이 LPS 유도에 의한 대식세포의 NO 분비능을 저해하지 못했지만(Fig. 2), 여러 가지 superantigen(Con A, PHA 및 LPS)에 의해 자극된 T 및 B 세포 분열능 역시 강력히 억제(Fig. 3)된다는 관점에서는 cAMP elevating agent가 내재성 면역반응을 포함해서 획득성 면역반응까지 광범위하게 조절하는 것으로 판단된다.

특별히 치료적인 관점에서의 면역조절능을 고려한다면, 세포내 cAMP의 농도를 높이는 최선의 방법은 cAMP 유도체 혹은 cAMP 자체를 직접 세포에 처리하는 것이 가장 바람직한 것으로 판단된다. 즉 세포 투과성 cAMP는 murine TNF- $\alpha$  및 human TNF- $\alpha$  분비 모델에서 거의 유사한 억제 효과를 나타냈으며(Fig. 1B), CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T lymphocyte의 분열을 매우 효과적으로 저해하였다. 반면에 세포독성이 거의 없었던 PDE IV 저해제인 rolipram은 murine TNF- $\alpha$  억제 효능은 강력하지만 human TNF- $\alpha$  분비 실험과, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T lymphocyte 및 LPS 매개성 lymphocyte 분열 실험에서 TNF- $\alpha$  억제 농도의 1000배인 50  $\mu$ M 처리에서도 60% 이상의 억제 효능을 나타내지 못한 것으로 보아 치료적인 한계가 있을 것으로 판단되었다. 게다가 Fig. 1C는 protein kinase C의 억제가 동시에 이루어질 경우 dbcAMP의 효과를 상승시킬 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 즉

staurosporine과의 병용 처리시 매우 높은 TNF- $\alpha$  억제 효과를 확보할 수 있었기 때문이다. 현재까지도 이들 두 효소의 작용이 어떻게 TNF- $\alpha$  억제 효과에서 상승작용을 나타냈는지는 명확히 밝혀져 있지 않다. 다만 동시에 진행되는 protein kinase C 신호 전달 과정의 억제와 protein kinase A 활성화는 TNF- $\alpha$  생성에 필요한 mitogen activated protein kinase(특별히 ERK 및 JNK) 활성화 억제로 집중된다고 보고됨에 따라 이들 효소 관련된 하부 신호전달 과정이 억제 됨으로써 상승적 억제작용이 유지되는 것으로 판단된다.<sup>22)</sup> 세포내 신호간의 상호작용 현상은 NO 생성 과정에서도 보고된 바 있다. 즉 대식세포에 dbcAMP와 LPS간의 병용 처리는 LPS에 의해 분비되는 NO 양 보다 몇 배 증가된 NO 생성을 유도하는 것으로 알려져 있었다.<sup>23)</sup> 그러나 Fig. 2C에서 제시되었듯이, 본 연구자들의 NO 분비 조건에서는 이전에 보고된 결과를 재현하지 못하였다. 하지만 이전 보고들과 동일하게 PMA와 IFN- $\gamma$ 와의 동시 처리에서는 NO 분비시 상승효과를 확인할 수 있었다.<sup>24)</sup> dbcAMP와 LPS 처리시 얻어진 이전 보고들과 불일치된 결과들은 아마도 dbcAMP 처리 시간의 차이점이나 세포 및 배양조건의 차이점 등에서 기인한 것으로 판단된다. 즉 Fig. 1D 및 Fig. 2A 결과들은 NO 및 TNF- $\alpha$  생성을 위한 자극원 처리시 cAMP 농도가 어떤 조건에서 유지되느냐에 따라 cAMP의 상반된 다른 두가지 조절능을 보일 수 있다는 것을 시사하는 증거라 하겠다. 이와같은 현상은 dbcAMP 외에도 cAMP 농도 증가를 위해 어떤 방법적 접근을 시도했느냐에 의해서도 뚜렷한 차이를 나타낼 것으로 판단된다. 즉 선택적 PDE 저해인자(Fig. 1A), adenylyl cyclase 활성화에 의한 것인가, 혹은 직접적인 cAMP 농도 증가에 의한 것인가(Fig. 1B 및 Fig. 3), 그리고 혹은 직접적인 cAMP 증가방법인가(Fig. 4)에 따라서 각각 다양한 작용을 얻을 수 있다는 가능성을 보여주고 있다. 따라서 이와같은 다양성을 고려해볼 때, cAMP를 이용한 치료제 개발은 세포간, 자극원간 그리고 병리적 현상에 대비한 적절한 cAMP elevating agent들의 개발이 진행되어야 할 것으로 판단된다.

결론적으로, cAMP elevating agent들은 효과적이면서 선택적으로 LPS 매개에 의한 TNF- $\alpha$  생성을 억제하였으며, 특별히 protein kinase C 저해제인 staurosporine과 dbcAMP 간에는 상승적 억제작용을 나타냈다. 또한 dbcAMP는 LPS 자극에 대한 처리 시간에 의존적으로 TNF- $\alpha$  및 NO 생성에 관한 조절효능에 영향을 받았으며, 문헌보고와는 달리 IFN- $\gamma$ 와의 병용처리시 NO 분비에 관한 상승작용은 확인되지 않았다. 또한 dbcAMP는 선택적인 PDE type IV 저해제인 rolipram과 달리 CD4<sup>+</sup> lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T(TLL-2) 세포 및 LPS-responsive lymphocyte의 분열을 효과적으로 억제하였다. 마지막으로 cAMP elevating agent들은  $\beta$ 1-integrin에 의한 세포유착 과정을 유도하는 CD98 매개성 유착과정을 다양하게 조절하는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 결과로 미루어 볼 때, 세포내 cAMP 조절이 다양한 세포 내·

외 활성화에 영향을 미치며 특별히 어떤 경로에 의한 cAMP 조절이냐에 따라서는 다양한 조절현상을 나타내는 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고 여러 가지 결과들을 종합할 때, cAMP 농도 상승을 위해서는 직접적으로 세포 투과성 cAMP를 처리하는 것이 가장 효과적인 방법으로 사료된다.

## 감사의 글

연구는 학술진흥재단의 지방대 육성지원사업(2004-C0015) 및 농림기술관리센터의 2006년 농림기술개발과제의 일부 보조에 의해 수행되었으므로, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) Woods, J. A., Vieira, V. J. and Keylock, K. T. : Exercise, inflammation, and innate immunity. *Neurol. Clin.* **24**, 585 (2006).
- 2) Makala, L. H., Nishikawa, Y., Suzuki, N. and Nagasawa, H. : Immunology. Antigen-presenting cells in the gut. *J. Biomed. Sci.* **11**, 130 (2004).
- 3) Mastroeni, P. : Immunity to systemic Salmonella infections. *Curr. Mol. Med.* **2**, 393 (2002).
- 4) Heller, K. N., Gurer, C. and Munz, C. : Virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells: ready for direct attack. *J. Exp. Med.* **203**, 805 (2006).
- 5) Drozina, G., Kohoutek, J., Jabrane-Ferrat, N. and Peterlin, B. M. : Expression of MHC II genes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **290**, 147 (2005).
- 6) Selcher, J. C., Weeber, E. J., Varga, A. W., Sweatt, J. D. and Swank, M. : Protein kinase signal transduction cascades in mammalian associative conditioning. *Neuroscientist* **8**, 122 (2002).
- 7) Streeper, R. S., Svitek, C. A., Goldman, J. K. and O'Brien, R. M. : Differential role of hepatocyte nuclear factor-1 in the regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription by cAMP in liver- and kidney-derived cell lines. *J. Biol. Chem.* **275**, 12108 (2000).
- 8) Barnes, P. J. : Beta-adrenoceptors on smooth muscle, nerves and inflammatory cells. *Life Sci.* **52**, 2101 (1993).
- 9) Makranz, C., Cohen, G., Reichert, F., Kodama, T. and Rotshenker, S. : cAMP cascade (PKA, Epac, adenylyl cyclase, Gi, and phosphodiesterases) regulates myelin phagocytosis mediated by complement receptor-3 and scavenger receptor-AI/II in microglia and macrophages. *Glia* **53**, 441 (2006).
- 10) Cho, J. Y., Park, J. S., Baik, K. U., Lee, J. G., Kim, H. P., Yoo, E. S. and Park, M. H. : Differential effect of phosphodiesterase IV inhibitor RP73401 on various inflammatory and immune responses relevant to rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Res.* **49**, 423 (2004).



- 11) Maksymowych, W. P., Avina-Zubieta, A., Luong, M. H. and Russell, A. S. : An open study of pentoxifylline in the treatment of severe refractory rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **22**, 625 (1995).
- 12) Koncz, S. and Horvath, E. J. : Different action of IBMX, isoproterenol and rutin on orthovanadate-induced nitric oxide release in mouse macrophage cells. *Acta. Vet. Hung.* **50**, 323 (2002).
- 13) Cho, J. Y., Fox, D. A., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K. M., Katz, D. R. and Chain, B. : The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood* **98**, 374 (2001).
- 14) Cho, J. Y., Baik, K. U., Jung, J. H. and Park, M. H. : *In vitro* anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* **398**, 399 (2000).
- 15) Kumagai, T., Ikezoe, T., Gui, D., O'Kelly, J., Tong, X. J., Cohen, F. J., Said, J. W. and Koeffler, H. P. : RWJ-241947 (MCC-555), a unique peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand with antitumor activity against human prostate cancer in vitro and in beige/nude/X-linked immunodeficient mice and enhancement of apoptosis in myeloma cells induced by arsenic trioxide. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1508 (2004).
- 16) Cho, J. Y., Skubitz, K. M., Katz, D. R. and Chain, B. M. : CD98-dependent homotypic aggregation is associated with translocation of protein kinase Cdelta and activation of mitogen-activated protein kinases. *Exp. Cell Res.* **286**, 1 (2003).
- 17) Foey, A. D., Field, S., Ahmed, S., Jain, A., Feldmann, M., Brennan, F. M. and Williams, R. : Impact of VIP and cAMP on the regulation of TNF-alpha and IL-10 production: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **5**, R317 (2003).
- 18) Russo, C. and Polosa, R. : TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clin. Sci. (Lond)* **109**, 135 (2005).
- 19) Fernandez-Botran, R. : Soluble cytokine receptors: novel immunotherapeutic agents. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **9**, 497 (2000).
- 20) Chodon, D., Banu, S. M., Padmavathi, R. and Sakthisekaran, D. : Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by genistein in experimental hepatocellular carcinoma. *Mol. Cell. Biochem.* In press (2006).
- 21) Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y. and Hatayama, T. : Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 3215-23 (2006).
- 22) Zhang, B., Perpetua, M., Fulmer, M. and Harbrecht, B. G. : JNK signaling involved in the effects of cyclic AMP on IL-1beta plus IFNgamma-induced inducible nitric oxide synthase expression in hepatocytes. *Cell Signal.* **16**, 837 (2004).
- 23) Park, Y. C., Park, S. J., Jun, C. D., Kim, G. E., Park, K. I., Kim, H. D., Park, R. K. and Chung, H. T. : Cyclic AMP analogue as a triggering signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Cell. Immunol.* **179**, 41 (1997).
- 24) Momose, I., Terashima, M., Nakashima, Y., Sakamoto, M., Ishino, H., Nabika, T., Hosokawa, Y. and Tanigawa Y. : Phorbol ester synergistically increases interferon regulatory factor-1 and inducible nitric oxide synthase induction in interferon-gamma-treated RAW 264.7 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1498**, 19 (2000).