

Propenone 유도체의 NF- κ B 활성 억제 및 IL-8 유도에 의한 단핵구의 장 상피세포 부착 억제 효과

박수영 · 김경진 · 이종숙 · 이용석 · 김정애*

영남대학교 약학대학

(Received December 21, 2007; Revised January 17, 2008)

Inhibitory Effects of Propenone Derivatives on NF- κ B activity and IL-8-Induced Monocyte Adhesion to Colon Epithelial Cells

Su-Young Park, Kyoung-Jin Kim, Jong Suk Lee, Eung-Seok Lee and Jung-Ae Kim*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract — In this study, we examined the inhibitory effects of propenone derivatives, 1,3-diphenyl-propenone (DPhP), 3-phenyl-1-thiophen-2-yl-propenone (PhT2P), 3-phenyl-1-thiophen-3-yl-propenone (PhT3P) and 1-furan-2-yl-3-phenyl-propenone (FPhP), on TNF- α -induced nuclear factor (NF)- κ B activity and interleukin (IL)-8-induced monocyte adhesion to colon epithelial cells. 1-Furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone (FPP-3) that is previously reported as a NF- κ B inhibitor suppressed TNF- α -induced monocyte-epithelial cell adhesion in a concentration-dependent manner. The propenone derivatives, DPhP, PhT2P, PhT3P, FPhP, also inhibited TNF- α -induced NF- κ B activation in a similar degree to FPP-3. In a DPPH radical scavenging assay, none of the compounds showed DPPH radical scavenging activity, indicating that the inhibitory actions of the propenone derivatives on redox-sensitive NF- κ B activity is not due to a simple free radical scavenging activity. In addition, the propenone derivatives also suppressed the IL-8-induced monocyte adhesion to colon epithelial cells. Furthermore, the effective concentrations of the propenone derivatives on both NF- κ B activation as well as IL-8 induced monocyte-epithelial cell adhesion were 1000 times lower than 5-aminosalicylic acid (5-ASA), a clinically used drug for inflammatory bowel disease. These results suggest that the propenone derivatives may be a potential lead having a strong inhibitory activity against inflammatory cytokine-induced epithelial inflammation.

Keywords □ TNF- α , NF- κ B, propenone, interleukin-8, 5-aminosalicylic acid

염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 장 점막의 궤양을 수반하며 장 점막의 투과도 증가 및 점막하부로 호중구 등의 백혈구 침범을 특징으로 하는 만성 소화기 염증 질환이다.^{1,2)} 특히 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 같은 염증성 사이토카인의 증가와 이로 인한 염증세포의 활성화 및 이들 세포의 장 점막 침윤이 주요 병인으로 주목되고 있다.^{3,4)} TNF- α 에 의한 염증세포의 점막 부착 및 침윤의 과정은 상피세포에서 발현되는 intercellular adhesion molecule(ICAM) 등의 발현 증가에 의한 과정이며, TNF- α 자극에 대한 이들 인자의 발현 조절에서 NF- κ B의 활성이 중요한 역할을 함이 보고 되었다.⁵⁻⁷⁾

뿐만 아니라, 염증부위로 백혈구의 부착을 유도하는 중요 주화성 인자들인 monocyte chemoattractant protein(MCP)-1과 Interleukin-8(IL-8)도 IBD의 염증 병변을 악화시키는 인자들이다.⁸⁻¹⁰⁾ 특히 IL-8은 IBD를 앓는 환자 장 점막에서 발현이 증가되어 있으며, 그 발현 정도와 염증의 정도가 상관관계가 있음이 보고 되고 있다.¹¹⁻¹³⁾ TNF- α 에 의한 경우와 마찬가지로 IL-8에 의한 백혈구의 장 점막 부착 및 침윤 과정에도 NF- κ B에 의해 그 발현이 조절되는 ICAM의 발현이 중요한 역할을 하고 있다.^{14,15)} 따라서, NF- κ B 활성 억제제는 염증과정의 중요 단계인 TNF- α 및 IL-8에 의한 백혈구의 장 점막 부착 및 침윤을 차단할 수 있는 효과적인 IBD 치료제가 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 NF- κ B 활성 억제 작용을 보유한 FPP-3^{16,17)}와 그 구조 유사체인 propenone 유도체들의 NF- κ B 활성 억제 작용과 TNF- α 및 IL-8에 의한 백혈구의 장 점막 부착 억제능을 조

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2816 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) jakim@yu.ac.kr

사하였다.

실험재료 및 방법

시약

이 실험에 사용한 fetal bovine serum(FBS)와 penicillin/streptomycin(PS), RPMI1640 배지는 Hyclone사(South Logan, UT, USA)에서 구입하였다. HEPES, sodium pyruvate, sodium bicarbonate, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, BCECF-AM, Diphenylpicryl-hydrazyl, vitamin C, vitamin E 은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Tumor necrosis factor(TNF)-α는 Biosource사(Camarillo, CA, USA)에서 구입하였고, GeneJammer transfection reagent은 Stratagene사(CA, USA)에서 구입하였다. Dual-Luciferase Reporter Assay kit은 Promega사(Corporation, Madison, USA)에서 구입하였다.

세포배양(Cell culture)

염증성 장질환의 세포 모델로 HT-29 사람대장 상피세포와 U937 사람 단핵구 세포를 이용하였다. 세포는 10% FBS, 1% PS 및 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 1.5 g/l sodium bicarbonate이 함유된 RPMI1640 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였으며, 세포가 배양 flask에 80% 이상 자라면 1:5의 비율로 계대 하였다.

부착능 실험(Adhesion assay)

U937 세포에 10 μg/ml BCECF-AM 를 처리하여 37°C에서 30 분 동안 반응시켜 준비해 두었다. HT-29 세포를 48 well plate 에 1×10⁵ cslls/cm² 가 되게 배양하여 1% PS만 함유된 각 화합물을 1, 5, 10 μM 농도로 1시간 전처리하고, 10 ng/ml TNF-α을 처리하여 37°C에서 3시간 반응시켰다. 화합물이 처리된 HT-29 세포의 배지를 제거하고 PBS로 1회 씻어 주었다. 그 후 BCECF-AM으로 처리된 U937 세포를 HT-29 세포와 함께 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 부착되지 않은 U937 세포를 제거하기 위하여 PBS로 1회 씻어 주었다. 세포 용해를 위해 0.1% Triton X-100 in 0.1 M Tris를 처리하여 30분 동안 실온에서 반응시킨 후, Fluostar optima microplate reader(BMG Labtechnologies, Germany)을 사용하여 형광을 정량하였다.

Reporter gene 발광효소 실험(Reporter gene luciferase assay)

HT-29 세포가 50~60% 정도 자랐을 때 PBS로 2회 씻어 준 후, 10% FBS는 포함하고 PS는 포함되지 않은 RPMI1640 배지 6.5 ml과 transfection mixture 700 μl를 넣어 37°C에서 3시간 배

양시켰다. 이때의 transfection mixture은 35 μl GeneJammer transfection reagent와 0.24 μg/ml NFκB luciferase construct (firefly luciferase)와 0.2 μg/ml pRL-TK(renilla luciferase)를 FBS와 PS를 포함하지 않는 700 μl의 RPMI1640 배지에 넣어 실온에서 7분간 반응시킨 후 사용하였다. Transfection의 반응이 끝나는 3시간 후 10% FBS와 1% PS이 함유된 RPMI1640 배지를 7ml 넣어 준 후 37°C에서 24시간 배양시켰다. NFκB가 transfection이 된 세포를 24 well plate에 1×10⁵ cslls/cm²이 되게 배양하였다. 각 화합물을 10 μM의 농도로 1시간 전처리하고, 10 ng/ml TNF-α을 3시간 처리 후 37°C에서 반응시켰다. PBS로 2회 씻어 낸 후 lysis buffer를 넣어 -70°C에서 24시간의 freezing 과정 후 세포들을 모은 다음 LAS, stop & Glow buffer를 첨가하여 Turner TD20/20 luminometer(Turner Biosystems, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정(DPPH radical scavenging activity)

96 well plate의 각 well에 화합물을 농도별로 10 μl씩 처리한 후 200 μM Diphenylpicryl-hydrazyl을 190 μl를 첨가하였다. 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 실험에서 양성대조군으로 50 μg/ml vitamin C와 50 μg/ml vitamin E를 사용하였다.

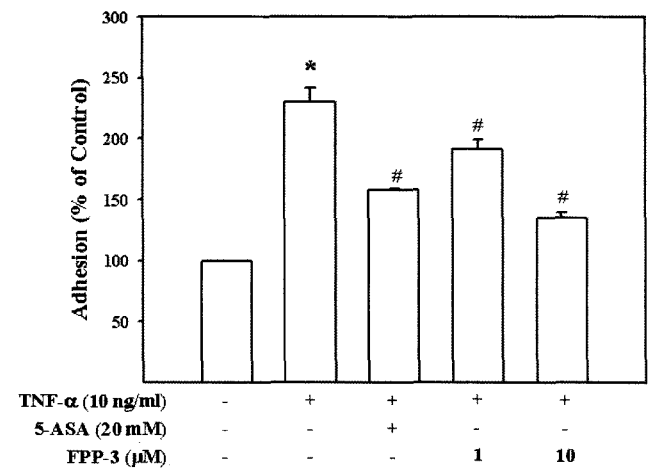


Fig. 1 – Inhibitory effects of FPP-3 on TNF-α-induced monocyte adhesion to colon epithelial cells. The adhesion of BCECF fluorescence-labeled U937 cells to HT29 colon epithelial cells was quantitated by using a fluorescence-detecting microplate reader. HT29 cells were pretreated with FPP-3 for 1 hr prior to the treatment with 10 ng/ml of TNF-α treatment for 3 hr. The data represent the mean±SEM of three independent experiments with duplicate. *P<0.01 compared to untreated control group. #P<0.01 compared to the TNF-α-treated group.

실험결과 및 고찰

염증성 장질환의 치료제 개발을 위한 활성 물질 검색을 위하여 보편적으로 사용되고 있는 *in vitro* 모델인 장 상피 유래 세포주 HT29 세포와 백혈구 U937 세포를 이용하였으며, 염증인자 TNF- α 에 의하여 백혈구가 장 상피세포에 부착되는 염증 개시의 중요 단계에서 화합물들이 나타내는 억제능을 검색하였다. COX/5-LOX dual inhibitor로 개발된 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone(FPP-3)는 carageenan으로 유도한 rat paw edema를 유의하게 억제하는 등¹⁷⁾의 항염증 효과가 보고되어 있으나, 염증성 장질환에 대한 억제 활성은 보고된 바 없기 때문에, 본 연구에서 FPP-3의 TNF- α 로 유도된 장 상피세포와 단핵구의 부착에 대한 억제 활성을 검증한 결과, Fig. 1과 같이 FPP-3는 TNF- α 유도성 장 상피세포와 단핵구의 부착을 유의하게 억제하였다.

TNF- α 로 유도된 장 상피세포와 단핵구의 부착은 monocyte chemoattractant protein(MCP)-1이나 intercellular adhesion molecule(ICAM) 등의 발현 증가와 밀접한 관련이 있으며, 이들 MCP-1과 ICAM의 발현은 NF- κ B 의존적으로 이루어지는 것으로 잘 알려져 있다.^{18,19)} 이러한 FPP-3 결과를 바탕으로 FPP-3 유사 화합물인 DPhP, PhT2P, PhT3P, FPhP 등의 propenone 유

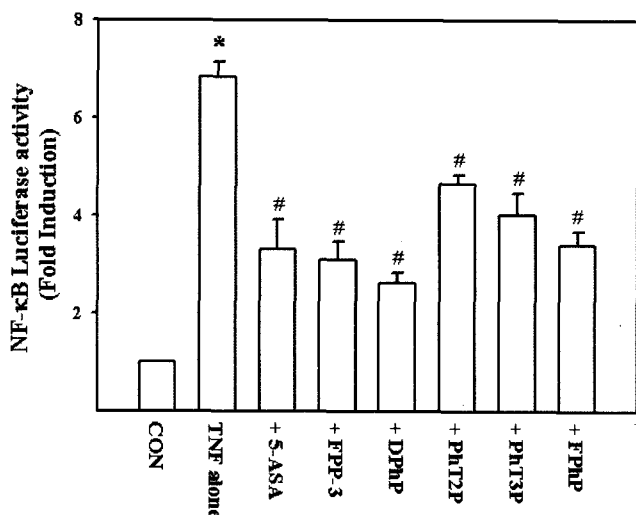


Fig. 2 - The inhibitory effects of propenone derivatives on TNF- α -induced NF- κ B promoter activity. HT29 cells were transfected with NF- κ B luciferase (firefly) construct together with pRL-TK (renilla luciferase) as a transfection control using Genjammer transfection reagent. After 24 hr of transfection, the cells were stimulated with TNF- α in the presence or absence of propenone derivatives. Luciferase activities were determined using a dual-luciferase reporter assay kit and normalized to those of control values. The data represent the mean \pm SEM of three sets of experiments with triplicate. * P < 0.01 compared to untreated control group. # P < 0.01 compared to the TNF- α -treated group.

도체들이 NF- κ B 활성에 미치는 영향을 조사하였다. NF- κ B luciferase reporter gene constructs를 삽입시킨 세포에 TNF- α 를 처리하면 NF- κ B 활성이 유의하게 증가하였고, FPP-3와 마찬가지로 DPhP, PhT2P, PhT3P, FPhP 모두 10 μ M 농도에서 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성을 유의하게 억제하였다(Fig. 2). 특히, TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성 억제는 DPhP가 가장 우수하였다. 뿐만 아니라, 염증성 장질환 치료제로 현재 임상에서 사용되고 있는 약물인 5-ASA의 경우와 비교하면, 5-ASA 20 mM 농도에서 나타나는 활성과 이들 propenone 유도체들의 10 μ M 농도에서의 활성이 유사한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 FPP-3 및 propenone 유도체들의 효능이 5-ASA와 비교하여 1000배 우수함을 암시한다.

TNF- α 에 의한 TNF receptor 활성화는 세포막 NADPH oxidase를 경유하여 활성산소종을 발생시키는 것으로 알려져 있으며, NF- κ B는 세포의 redox 상태 의존적으로 활성화된다고 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서 propenone 유도체들의 TNF- α 로 유도된 NF- κ B 활성 억제 능력이 화합물 자체가 보유한 비선형 항산화능에 기인한 것인지 확인하기 위하여 DPPH radical 소거능을 조사한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 NF- κ B 억제 효능이 가장 우수한 DPhP의 경우 DPPH radical 소거능은 Vitamin E(250 μ M)와 비교할 때 무시할 정도임을 확인하였다. PhT2P와 PhT3P 및 FPhP의 경우도 DPPH radical 소거능은 없는 것으로 확인되었다(Table I). 이와 같은 결과는 propenone 유도체들의 NF- κ B의 활성 억제 작용은 단순한 활성산소종 소거능에 의한 것이 아님을 암시한다.

염증성 장질환은 그 매개인자로 TNF- α 이외에도 많은 사이토카인들이 관여하며, 그 중에서 특히 interleukin-8은 염증과정뿐 아니라 과도한 혈관신생 유도 작용이 있어 염증조직에서의 병변을 악화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는

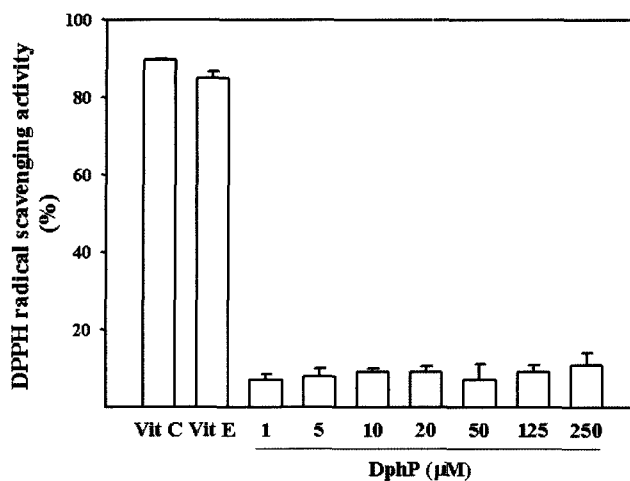
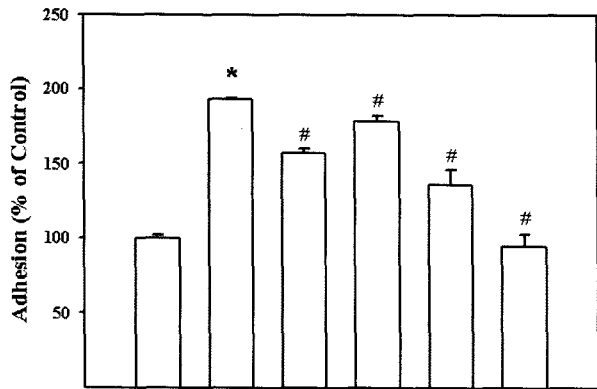


Fig. 3 - DPPH free radical scavenging activity of DPhP. The data represent the mean \pm SEM.

Table I – DPPH radical scavenging activities of propenone derivatives

농도 (μM)	Radical scavenging activity (%±SEM)				
	Vit C	Vit E	PhT2P	PhT3P	FPhP
1			4.9±0.9	6.2±2.0	6.6±1.0
20			7.6±1.4	5.9±0.8	5.1±0.8
50			8.4±1.7	14.9±2.4	15.6±2.0
125			12.4±0.8	15.3±2.1	16.5±1.7
250	93.9±0.2	85.2±0.2	13.2±1.8	16.1±2.2	19.2±1.7

DPPH radical scavenging activity was calculated from the following equation in which H and H_0 were optical density of solvent with and without sample, respectively. Radical scavenging activity (%) = $\{(1-H)/H_0\} \times 100$. The data represent the means ± SEM.



IL-8 (10 ng/ml)	-	+	+	+	+	+
5-ASA (20 mM)	-	-	+	-	-	-
DPhP (μM)	-	-	-	1	5	10

Fig. 4 – Inhibitory effects of DPhP on IL-8-induced monocyte adhesion to colon epithelial cells. The adhesion assay was performed the same method described in the legend of Fig. 1 except that HT29 cells were pretreated with DPhP for 1 hr prior to the treatment with 10 ng/ml of IL-8 treatment for 3 hr. The data represent the mean ± SEM of three independent experiments with duplicate. * $P < 0.01$ compared to untreated control group. # $P < 0.01$ compared to the IL-8-treated group.

TNF-α에 의해 유도되는 NF-κB 억제 활성 효능을 보이는 propenone 유도체들이 IL-8 유도성 장 상피세포와 단핵구 부착에 대한 억제 작용이 있는지 확인하고자 하였다. DPhP를 비롯하여(Fig. 4) propenone 유도체(PhT2P, PhT3P, FPhP) 모두 IL-8에 의해 유도된 장 상피세포에 단핵구의 부착을 농도의존적으

로 억제함을 확인하였다(Table II).

결론

COX-2와 5-LOX에 대해 이중 억제작용 및 NF-κB 활성 억제를 통한 항염증 활성이 우수한 것으로 보고된 FPP-3 화합물에 대해 TNF-α에 의해 유도되는 장염에 대한 작용을 조사한 결과, TNF-α 유도성 장 상피세포와 단핵구 부착을 억제하는 활성이 우수함을 확인하였다. FPP-3와 유사한 구조의 propenone 유도체들도 농도의존적인 NF-κB 활성 억제 및 IL-8 유도성 장 상피세포와 단핵구 부착에 대한 억제 활성을 보유함을 확인하였다. 이러한 propenone 유도체들의 효능은 현재 임상에서 염증성 장 질환에 보편적으로 사용되고 있는 5-ASA의 경우보다 1000배 낮은 농도에서 발견되고 있음을 확인하였으며, 이러한 결과는 propenone 유도체들이 염증성 장질환의 치료제로서의 가능성이 높음을 암시하는 것이다. 특히 DPhP 화합물의 경우는 propenone 유도체들 중에서 NF-κB 억제활성은 물론 백혈구의 장 상피세포 부착억제 효능이 월등한 점으로 미루어 볼 때 염증성 장질환의 치료제 개발의 lead compound가 될 수 있음을 보여주고 있다.

감사의 말씀

이 연구는 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. R11-2007-040-02004-0).

참고문헌

- 1) Begue, B., Wajant, H., Bambou, J. C., Dubuquoy, L., Siegmund, D., Beaulieu, J. F., Canioni, D., Berrebi, D., Brousse, N., Desreumaux, P., Schmitz, J., Lentze, M. J., Goulet, O., Nadine, C. B. and Ruemmele, F. M. : Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. *Gastroenterology* **130**, 1962 (2006).
- 2) Van Grevenstein, W. M. U., Hofland, L. J., Van Rossen, M. E. E., Van Koetsveld, P. M., Jeekel, J. and Van Eijck, C. H. J. : Inflammatory cytokines stimulate the adhesion of colon carcinoma cells to mesothelial monolayers. *Dig. Dis. Sci.*

Table II – Inhibitory effect of propenone derivatives on IL-8-induced monocyte adhesion to colon epithelial cells

Treatment group	Inhibition Percentage (%±SEM)		
	PhT2P	PhT3P	FPhP
IL-8+5-ASA 20 mM	19.2±3.79*		
IL-8+Comp 1 μM	4.48±6.32	8.25±2.11	28.47±4.50*
IL-8+Comp 5 μM	9.90±8.47	29.92±3.09*	31.62±3.38*
IL-8+Comp 10 μM	30.25±4.51*	45.40±2.56*	40.65±3.18*

The data represent the means ± SEM. * $P < 0.01$, compared to the IL-8-treated group.

- 52, 2775 (2007).
- 3) Schreiber, S., Campieri, M., Colombel, J. F., Van Deventer, S. J., Feagan, B., Fedorak, R., Forbes, A., Gassull, M., Gendre, J. P., Van Hogezaand, R. A., Lofberg, R., Modigliani, R., Pallone, F., Petritsch, W., Prantera, C., Rampton, D., Seibold, F., Vatn, M., Zeitz, M. and Rutgeerts, P. : Use of anti-tumour necrosis factor agents in inflammatory bowel disease. *Int. J. Colorectal. Dis.* **16**, 1 (2001).
 - 4) Zareie, M., Singh, P. K., Irvine, E. J., Sherman, P. M., McKay, D. M. and Perdue, M. H. : Monocyte/macrophage activation by normal bacteria and bacterial products: implications for altered epithelial function in Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* **158**, 1101 (2001).
 - 5) Neurath, M. F., Fuss, I., Schürmann, G., Pettersson, S., Arnold, K., Müller-Lobeck, H., Strober, W., Herfarth, C. and Büschenfelde, K. H. : Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann. NY Acad. Sci.* **17**, 149 (1998).
 - 6) Kim, Y. S., Kim, J. S., Jung, H. C. and Song, I. S. : The effects of thalidomide on the stimulation of NF-kappaB activity and TNF-alpha production by lipopolysaccharide in a human colonic epithelial cell line. *Mol. Cells* **17**, 210 (2004).
 - 7) Hohensinner, P. J., Kaun, C., Rychli, K., Niessner, A., Pfaffenberger, S., Rega, G., Martin, R., Maurer, G., Ullrich, R., Huber, K. and Wojta, J. : Macrophage colony stimulating factor expression in human cardiac cells is upregulated by tumor necrosis factor-alpha via an NF-kappaB dependent mechanism. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 2520 (2007).
 - 8) MacDermott, R. P. : Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* **31**, 907 (1996).
 - 9) Reinecker, H. C., Loh, E. Y., Ringler, D. J., Mehta, A., Rombeau, J. L. and MacDermott, R. P. : Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* **108**, 40 (1995).
 - 10) Grimm, M. C., Elsbury, S. K., Pavli, P. and Doe, W. F. : Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* **38**, 90 (1996).
 - 11) Izzo, R. S., Witkon, K., Chen, A. I., Hadjiyane, C., Weinstein, M. I. and Pellecchia, C. : Interleukin-8 and neutrophil markers in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **87**, 1447 (1992).
 - 12) Mazzucchelli, L., Hauser, C., Zraggen, K., Wagner, H., Hess, M., Laissue, J. A. and Mueller, C. : Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am. J. Pathol.* **144**, 997 (1994).
 - 13) Daig, R., Andus, T., Aschenbrenner, E., Falk, W., Schölmerich, J. and Gross, V. : Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **38**, 216 (1996).
 - 14) Panja, A., Goldberg, S., Eckmann, L., Krishen, P. and Mayer, L. : The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **161**, 3675 (1998).
 - 15) Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A. and Sartor, R. B. : Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J. Immunol.* **163**, 3474 (1999).
 - 16) Lee, E. S., Ju, H. K., Moon, T. C., Lee, E., Jahng, Y., Lee, S. H., Son, J. K., Baek, S. H. and Chang, H. W. : Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)-kappa B activation in cultured murine macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 617 (2004).
 - 17) Lee, E. S., Park, B. C., Paek, S. H., Lee, Y. S., Basnet, A., Jin, D. Q., Choi, H. G., Yong, C. S. and Kim, J. A. : Potent analgesic and anti-inflammatory activities of 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone with gastric ulcer sparing effect. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 361 (2006).
 - 18) Kang, D. G., Moon, M. K., Lee, A. S., Kwon, T. O., Kim, J. S. and Lee, H. S. : Cornuside suppresses cytokine-induced proinflammatory and adhesion molecules in the human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1796 (2007).
 - 19) Aljada, A., Ghanim, H., Saadeh, R. and Dandona, P. : Insulin inhibits NFkappaB and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Meta.* **86**, 450 (2001).