

Parthenolide Suppresses the Expression of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Induced by Toll-Like Receptor 2 and 4 Agonists

A-Neum Lee^{1,5}, Se-Jeong Park^{2,5}, Sae-Mi Yun¹, Mi-Young Lee³,
Bu-Soon Son⁴ and Hyung-Sun Youn^{1,2†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science and ²Department of Medical Science,
College of Medical Sciences, Soonchunhyang University, Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea

³Department of Medical Biotechnology, College of Medical Sciences,
Soonchunhyang University, Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea

⁴Department of Environmental Health Science, College of Natural Sciences,
Soonchunhyang University, Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea

Toll-like receptors (TLRs), which are pattern recognition receptors (PRRs), recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and regulate the activation of innate immunity. All TLR signaling pathways culminate in the activation of NF- κ B, leading to the induction of inflammatory gene products such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from the herb feverfew (*Tanacetum parthenium*), has been used as folk remedies to treat many chronic diseases for many years. In the present report, we present biochemical evidence that parthenolide inhibits the NF- κ B activation induced by TLR agonists and the overexpression of downstream signaling components of TLRs, MyD88, IKK β , and p65. Parthenolide also inhibits TLR agonists-induced COX-2 and iNOS expression. These results suggest that parthenolide can modulate the immune responses regulated by TLR signaling pathways.

Key Words: Toll-like receptors, Parthenolide, NF- κ B, COX-2, iNOS

서 론

선천성 면역 반응은 거의 모든 생물체에 존재하는 숙주의 방어 체계로서, 무척추 동물에서는 병원체에 대항하기 위한 숙주의 유일한 방어 체계이지만, 고등동물에 있어서는 병원균에 대항하기 위한 숙주의 최초 방어 체계라 할 수 있다. Toll-like receptors (TLRs)는 병원균들이 숙주의 몸 속에 들어 왔을 때 병원균들이 가지고 있는 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)을 인식하여 선천성 면역 반응을 유도하고, 뒤이어 후천성 면역

반응을 유도하는 중요한 역할을 한다 (Akira et al., 2006; Beutler, 2009; Lemaitre et al., 1996; Medzhitov, 2007). 현재까지 최소한 13개의 TLRs가 포유동물 세포 안에서 발견되었으며, 각각의 TLRs는 병원균들이 가지고 있는 PAMPs를 인식하는 것으로 알려져 있다 (Kawai and Akira, 2007).

TLRs는 일반적으로 myeloid differential factor 88 (MyD88)과 Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF)를 통한 신호 전달 경로를 가지고 있다 (Kawai and Akira, 2007). MyD88은 TLR3를 제외한 모든 TLRs의 TIR domain에 붙는 어댑터 분자이다. MyD88은 IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4)를 유도하고, IRAK-4는 IRAK-1의 인산화를 유도하며, 인산화된 IRAK-1은 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)를 유도하며, TRAF6는 I κ B kinases (IKK) complex의 활성화를 유도한다. 활성화된 IKK 인산화 효소는 전사 요소 nuclear factor κ B (NF- κ B)를 활성화 시킨다. 활성화된 NF- κ B는 cytokine, cyclooxygenase-2 (COX-2), 그리고 inducible nitric oxide

*접수일: 2009년 12월 14일 / 수정일: 2010년 3월 21일
채택일: 2010년 3월 23일

†교신저자: 윤형선, (우) 336-745 충남 아산시 신창면 읍내리 646,
순천향대학교 의료과학대학 임상병리학과
Tel: 041-530-3086, Fax: 041-530-3085
e-mail: hyoun@sch.ac.kr

⁵A-Neum Lee and Se-Jeong Park contributed equally to this work

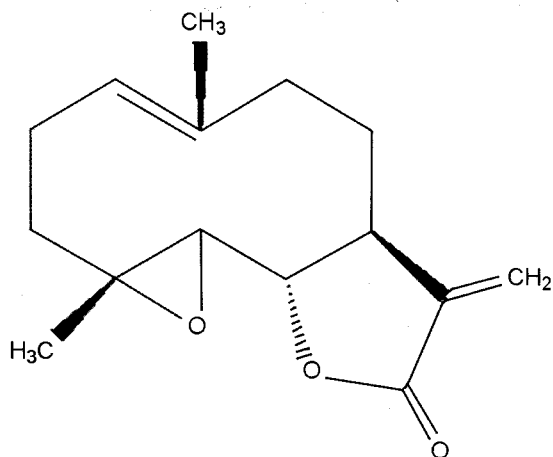


Fig. 1. The structure of parthenolide.

synthase (iNOS)와 같은 염증을 유발하는 유전자들을 유도한다 (Takeda and Akira, 2005).

TLR3와 TLR4는 MyD88 대신에 adaptor molecule인 TRIF를 통하여 IFN regulatory factor 3 (IRF3)의 활성화를 유도한다 (Sato et al., 2003). TRIF는 TBK1 (TANK-binding kinase 1)과 IRF3를 통하여 IFN- β 나 IFN γ 에 의해서 유도되는 유전체들을 유도한다. 또한 TRIF의 C-말단 부분은 RIP1 (receptor interacting protein 1)과 반응하여 지연된 NF- κ B 활성화를 유도한다 (Meylan et al., 2004). 그래서 TRIF는 TBK1을 사용하여 IRF3 활성화를 유도하고, RIP1을 사용하여 NF- κ B 활성화를 유도한다 (Fitzgerald et al., 2003; Sato et al., 2003).

멕시코와 인도의 약용 식물인 *Tanacetum parthenium*로부터 분리된 추출물인 parthenolide (Fig. 1)는 생물학적 활성을 가지는 중요한 sesquiterpene lactones 중의 하나이다 (Bork et al., 1997). 열을 내리는 효과가 있다는 뜻을 가진 이 식물은 수년 전부터 류마티스 관절염, 발열, 편두통, 천식, 알레르기, 월경 장애와 같은 다양한 염증 질병들에 대한 민간요법으로 이용되었다 (Heinrich et al., 1998; Murphy et al., 1988; Schinella et al., 1998). 많은 연구에서 산화적인산화 (oxidative phosphorylation), 혈소판응집 (platelet aggregation), 히스타민 (histamine)과 세로토닌 (serotonin)의 분비의 억제에 대한 parthenolide의 효과가 보고되었다 (Groenewegen and Heptinstall, 1990; Sheehan et al., 2002). Parthenolide는 IKK kinase를 타겟으로 하여 UV, TNF- α , 등 여러 agonists에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화와 COX-2와 iNOS의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Hehner et al., 1998; Oka et al., 2007).

하지만 parthenolide가 TLR agonists들에 의해 유도된

TLRs 신호 전달 체계를 어떻게 조절하는지는 알려져 있지 않다. 그래서 우리는 이번 연구를 통해서 parthenolide가 TLR agonists에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화와 활성화된 NF- κ B에 의해서 유도되는 유전자인 COX-2와 iNOS의 발현을 어떻게 조절하는지 알아보려고 한다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 parthenolide는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Macrophage-activating lipopeptide (MALP-2, 2 kDa)와 lipopolysaccharide (LPS)는 Alexis Biochemical (San Diego, CA, USA)과 List Biological Lab (San Jose, CA, USA) 회사로부터 각각 구입하였다. COX, iNOS, I κ B α 그리고 β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 회사로부터 구입하였다. 그 밖의 다른 시약들은 Sigma-Aldrich 회사로부터 구입하였다.

세포 배양

RAW 264.7 cells (a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71)과 293T cells (human embryonic kidney)은 10% (v/v) FBS, 100 units/mL Penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였으며, 세포들은 5% CO₂/air를 포함하고 있는 37°C 배양기 안에서 배양하였다.

트랜스펙션 (transfection)과 발광효소 유전자 분석 (luciferase reporter gene assay)

NF- κ B luciferase plasmid, Heat shock protein (HSP) 70- β -galactosidase plasmid 등 transfection을 위한 모든 DNA는 EndoFree Plasmid Maxi kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 준비되었다.

NF- κ B 발광효소 유전자 분석은 선행연구에서 사용한 방법에 의하여 분석하였다 (Youn et al., 2006c). 발광효소 plasmid와 HSP70- β -galactosidase plasmid는 Superfect transfection 시약 (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 세포 안으로 transfection 시켰다. 발광효소의 활성화는 luciferase assay system (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다. 발광효소의 활성화는 β -galactosidase의 활성화를 측정하여 표준화시켰다.

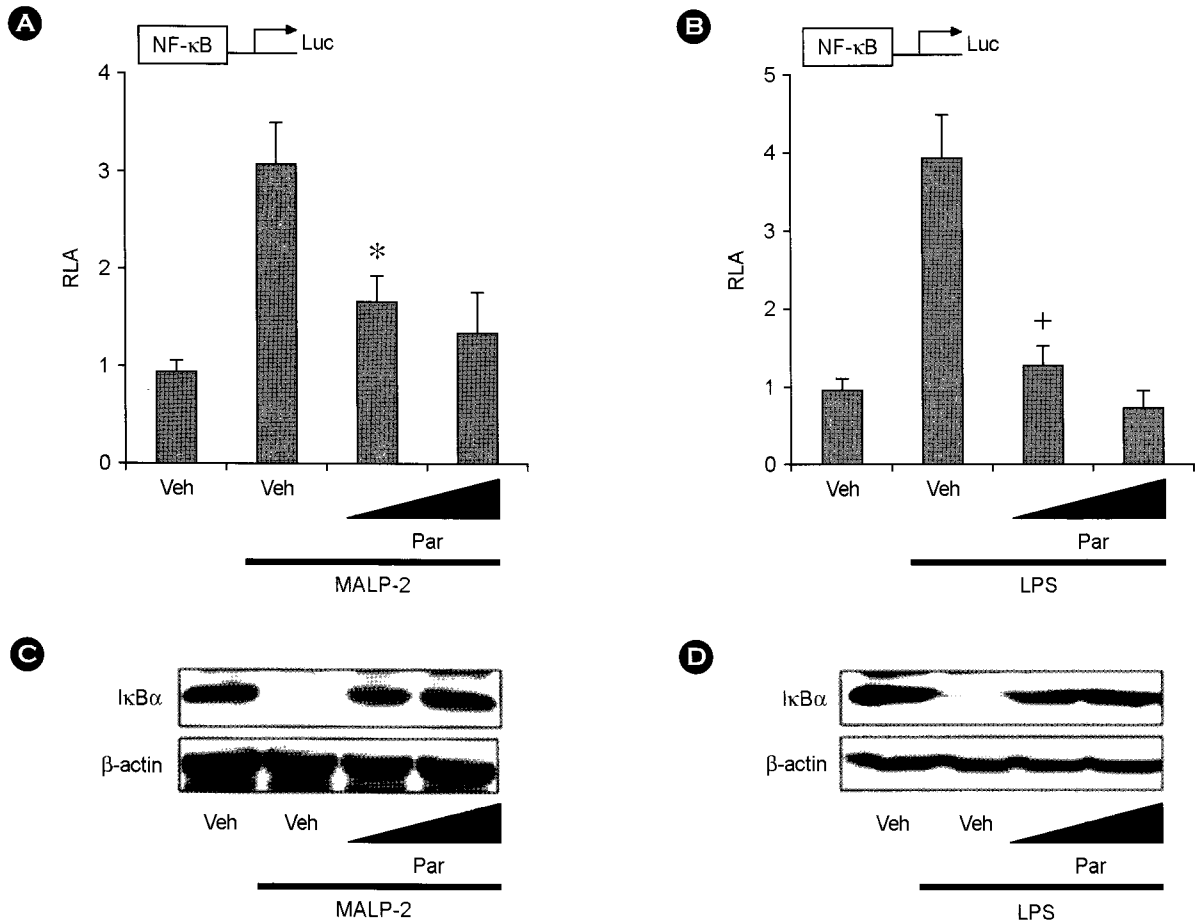


Fig. 2. Parthenolide suppressed the NF- κ B activation induced by MALP-2 and LPS. **A, B)** RAW264.7 cells were transfected with NF- κ B luciferase reporter plasmid and pre-treated with parthenolide (10, 20 μ M) for 1 hr and then treated with MALP-2 (10 ng/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) (B) for an additional 8 hrs. Cell lysates were prepared and luciferase and β -galactosidase enzyme activities were measured as described in "Materials and Methods". Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β -galactosidase activity. Values are mean \pm SEM (n=3). *, Significantly different from MALP-2 alone, $P < 0.05$. +, Significantly different from LPS alone, $P < 0.05$. **C, D)** RAW264.7 cells were pretreated with parthenolide (10, 20 μ M) for 1 hr and then further stimulated with MALP-2 (10 ng/mL) (C) for 15 mins or LPS (50 ng/mL) (D) for 30 mins. Cell lysates were analyzed for I κ B α and β -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; Par, parthenolide.

면역압 (immunoblotting) 방법

Western blotting은 선행연구의 방법에 의하여 분석하였다 (Youn et al., 2006a; Youn et al., 2006b). 단백질 추출물들은 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이전되었으며, Membrane은 0.1% Tween 20 그리고 5% 탈지 건조된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline을 가지고 blocking 하였다. Membrane은 1차 항체를 가지고 blotting하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, ECL western blot detection 시약 (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL, USA)을 사용하여 단백질을 규명하였다.

데이터 분석

각각의 데이터 값은 세 개가 한벌의 실험으로 얻어졌으며, mean \pm standard error mean (SEM)으로 표현되었다.

결과 및 고찰

Parthenolide의 TLR2와 TLR4 agonists의해 유도된 NF- κ B 활성화 억제

NF- κ B는 TLRs 신호 전달 경로를 통해 활성화되며, 염증 및 염증 발생 유전자들을 활성화시켜 여러 질병을 유도하는 중요한 전사 요소이다 (Pahl, 1999).

먼저 우리는 parthenolide가 TLR2와 TLR6 그리고 TLR4 agonists에 의해 유도된 NF- κ B 활성을 억제하는지

에 대해 알아보았다. 이 실험을 위해서 NF- κ B 발광효소 유전자 분석법이 사용되었다. Parthenolide는 MALP-2 (TLR2와 TLR6 agonist)와 LPS (TLR4 agonist)에 의해 유도된 NF- κ B 활성을 억제시켰다 (Fig. 2A, B). 또한 parthenolide는 MALP-2와 LPS에 의해 유도된 I κ B α 의 분해를 억제시켰다 (Fig. 2C, D). 이것은 parthenolide가 TLRs를 통한 신호 전달 경로를 조절하여 NF- κ B 활성을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

Parthenolide의 TLR2와 TLR4 agonists에 의해 유도된 COX-2와 iNOS의 발현 억제

다음 실험으로 발광효소 유전자 분석과 western blotting

방법을 사용하여 NF- κ B 활성화에 의해서 조절되는 유전자인 COX-2와 iNOS의 발현이 parthenolide에 의해서 억제되는지 알아보았다. TLRs가 여러 agonists을 인식하여 신호를 아래로 전달하면, NF- κ B 활성화를 유도하고, 활성화된 NF- κ B는 cytokine, COX-2, iNOS와 같은 염증 유전자들의 발현을 유도한다. 숙주에 침입한 병원체들의 계속된 자극과 이러한 과정들이 반복됨으로써 결국 여러 질병을 일으킨다. Parthenolide는 MALP-2 그리고 LPS에 의해서 유도된 COX-2와 iNOS의 발현을 억제시켰다 (Fig. 3). 이것은 parthenolide가 염증 유전자들을 조절하는 항염증 효과에 대한 중요한 역할을 가진다는 것을 의미한다고 할 수 있겠다.

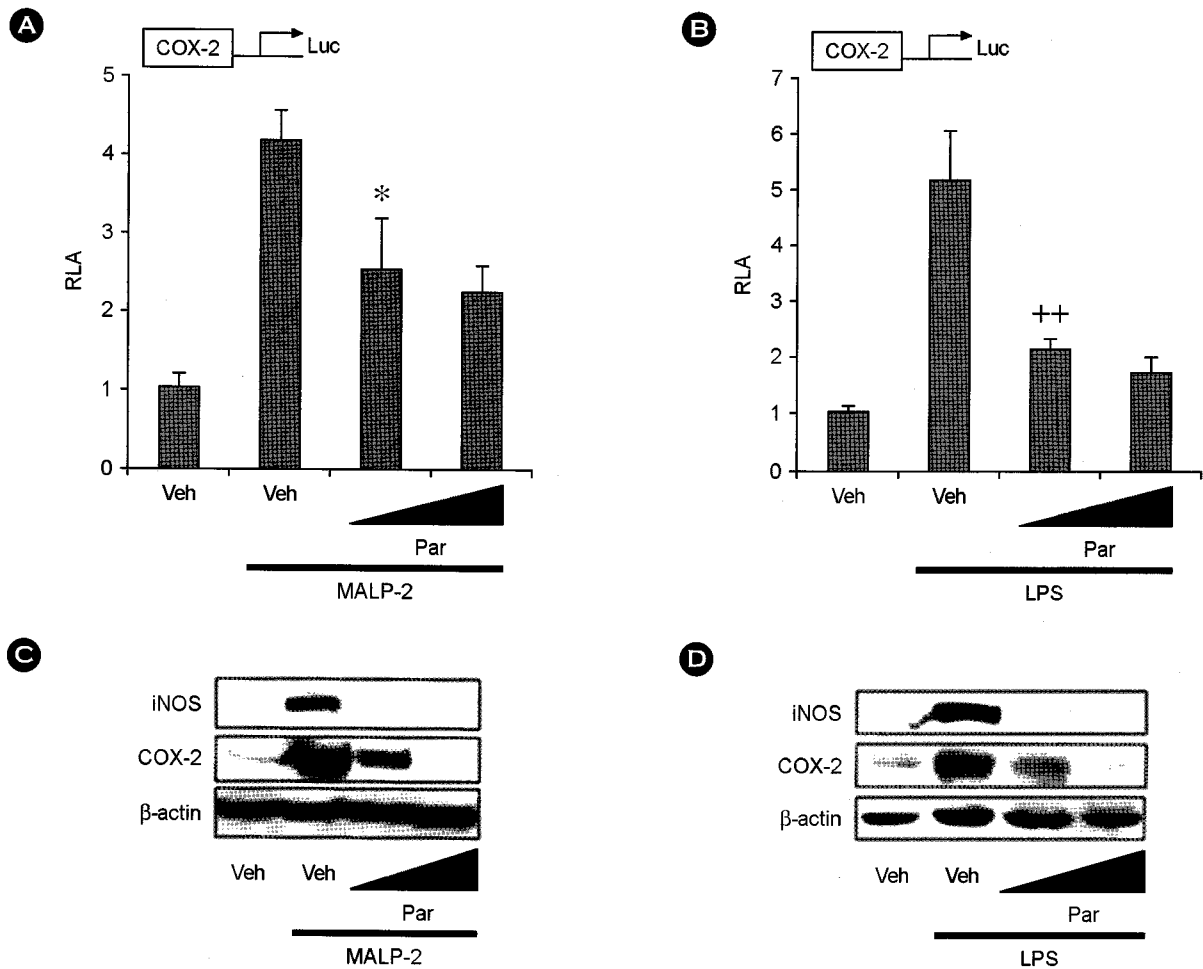


Fig. 3. Parthenolide suppressed the COX-2 and iNOS expression induced by MALP-2 and LPS. **A, B)** RAW264.7 cells were transfected with COX-2 luciferase reporter plasmid and pre-treated with parthenolide (10, 20 μ M) for 1 hr and then further stimulated with MALP-2 (10 ng/mL) (A) or LPS (10 ng/mL) (B) for an additional 8 hrs. Cell lysates were prepared and luciferase and β -galactosidase enzyme activities were measured as described in "Materials and Methods". Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β -galactosidase activity. Values are mean \pm SEM (n=3). *, Significantly different from MALP-2 alone, $P < 0.05$. **, Significantly different from LPS alone, $P < 0.01$. **C, D)** RAW264.7 cells were pretreated with parthenolide (10, 20 μ M) for 1 hr and then further stimulated with MALP-2 (10 ng/mL) (C) and LPS (10 ng/mL) (D) for 8 hrs. Cell lysates were analyzed for iNOS, COX-2 and β -actin protein by immunoblots. Veh, vehicle; Par, parthenolide.

Parthenolide의 TLRs downstream 분자에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화 억제

마지막으로 우리는 parthenolide가 TLRs의 downstream 분자에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제하는지 알아보았다. Parthenolide는 MyD88, IKK β 또는 p65에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제시켰다 (Fig. 4).

이미 feverfew의 추출물인 parthenolide가 TNF- α , phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 그리고 H₂O₂에 의해 자극을 받아 증가된 I κ B kinase를 억제하여서 NF- κ B 활성화를 억제한다고 발표되었다 (Hehner et al., 1998). 우리는 이번 연구에서 parthenolide가 TLR2와 TLR6의 agonist인

MALP-2와 TLR4의 agonist인 LPS에 의해 자극된 TLRs의 신호 전달 경로를 통해 I κ B kinase를 억제하여 NF- κ B의 활성화 뿐만 아니라 COX-2와 iNOS의 발현도 억제시키는 효과를 가진다는 결과를 얻어내었다. Parthenolide는 선천성 면역과 염증에 관련된 NF- κ B의 활성을 억제하여 COX-2와 iNOS의 발현을 조절하는 효과를 가지는 염증 억제제로써도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 이러한 연구 결과를 기반으로 앞으로의 연구에서 parthenolide가 TLRs signaling pathway를 어떻게 이용하여 염증 인자 또는 염증 유전자를 억제하는지 정확한 분자학적인 타겟이 밝혀질 것으로 기대한다.

오늘날 염증을 치료하기 위한 치료제로써 COX에 의한

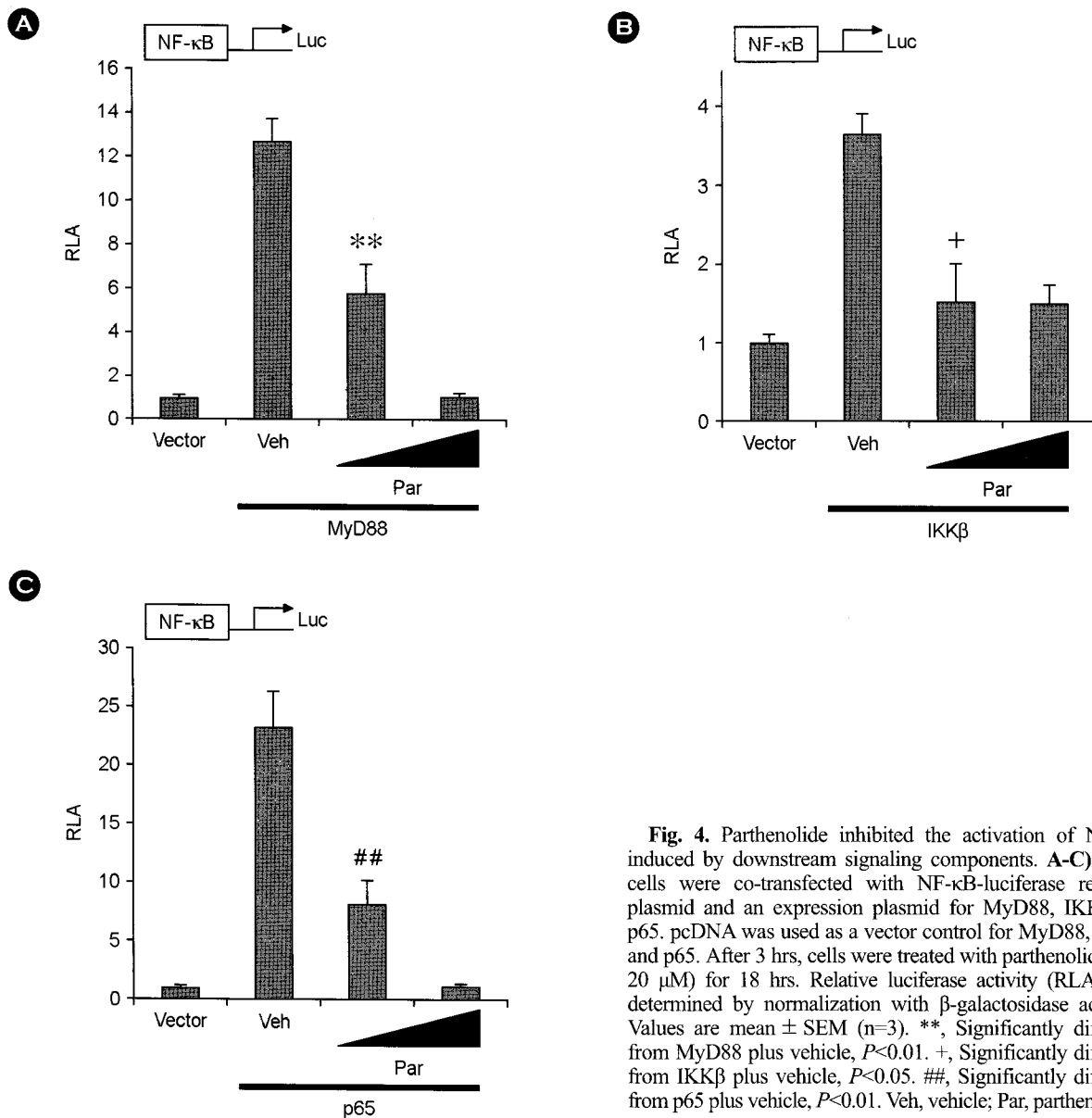


Fig. 4. Parthenolide inhibited the activation of NF- κ B induced by downstream signaling components. **A-C)** 293T cells were co-transfected with NF- κ B-luciferase reporter plasmid and an expression plasmid for MyD88, IKK β , or p65. pcDNA was used as a vector control for MyD88, IKK β and p65. After 3 hrs, cells were treated with parthenolide (10, 20 μ M) for 18 hrs. Relative luciferase activity (RLA) was determined by normalization with β -galactosidase activity. Values are mean \pm SEM (n=3). **, Significantly different from MyD88 plus vehicle, $P < 0.01$. +, Significantly different from IKK β plus vehicle, $P < 0.05$. ##, Significantly different from p65 plus vehicle, $P < 0.01$. Veh, vehicle; Par, parthenolide.

통증을 완화시키는 Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)들이 개발되었다. NSAIDs의 대표적인 약들로는 aspirin, ibuprofen과 naproxen 등이 있지만 NSAIDs에 의한 gastric problems 때문에 오늘날 많은 연구자들은 염증 치료를 위해서 자연에서 얻어진 물질에 보다 높은 관심을 가지기 시작하였다 (Harris et al., 2005; Naesdal and Brown, 2006). 이번 연구에서는 자연에 존재하는 물질인 feverfew의 추출물 parthenolide가 면역시스템 조절을 위해서 중요한 역할을 하는 TLRs 신호 전달체계를 어떻게 조절하여 항염증 효과를 가지고 있는지 알아보았다. 우리의 결과는 Parthenolide가 여러 TLR agonists에 의해서 유도된 NF- κ B의 활성화와 COX-2와 iNOS의 발현을 억제하여 병원균들로부터 유도되는 염증 반응이나 만성적인 질병들을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 중요한 결과라 할 수 있겠다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 "차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project)"으로 지원받은 과제입니다.

REFERENCES

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006. 124: 783-801.
- Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009. 113: 1399-1407.
- Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett*. 1997. 402: 85-90.
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2003. 4: 491-496.
- Groenewegen WA, Heptinstall S. A comparison of the effects of an extract of feverfew and parthenolide, a component of feverfew, on human platelet activity *in-vitro*. *J Pharm Pharmacol*. 1990. 42: 553-557.
- Harris RE, Beebe-Donk J, Doss H, Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep*. 2005. 13: 559-583.
- Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, Lehmann V, Schulze-Osthoff K, Droge W, Schmitz ML. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J Biol Chem*. 1998. 273: 1288-1297.
- Heinrich M, Robles M, West JE, Ortiz de Montellano BR, Rodriguez E. Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (Compositae). *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998. 38: 539-565.
- Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 2007. 13: 460-469.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996. 86: 973-983.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007. 449: 819-826.
- Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*. 2004. 5: 503-507.
- Murphy JJ, Heptinstall S, Mitchell JR. Randomised double-blind placebo-controlled trial of feverfew in migraine prevention. *Lancet*. 1988. 2: 189-192.
- Naesdal J, Brown K. NSAID-associated adverse effects and acid control aids to prevent them: a review of current treatment options. *Drug Saf*. 2006. 29: 119-132.
- Oka D, Nishimura K, Shiba M, Nakai Y, Arai Y, Nakayama M, Takayama H, Inoue H, Okuyama A, Nonomura N. Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-kappaB. *Int J Cancer*. 2007. 120: 2576-2581.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999. 18: 6853-6866.
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2003. 171: 4304-4310.
- Schinella GR, Giner RM, Recio MC, Mordujovich de Buschiazzo P, Rios JL, Manez S. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *J Pharm Pharmacol*. 1998. 50: 1069-1074.

- Sheehan M, Wong HR, Hake PW, Malhotra V, O'Connor M, Zingarelli B. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol Pharmacol.* 2002. 61: 953-963.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005. 17: 1-14.
- Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Auranofin, as an anti-rheumatic gold compound, suppresses LPS-induced homodimerization of TLR4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006a. 350: 866-871.
- Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol.* 2006b. 72: 850-859.
- Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol.* 2006c. 72: 62-69.