[UCI]I804:24011-200000232685

2006년 8월
박사학위논문

Endotoxin에 의해 유도되는 tissue factor 및 plasminogen activator inhibitor-1 유전자의 발현조절에 관한 연구

- Tissue factor와 PAI-1발현에 관한 연구 -

조선대학교대학원

의학과

문 현 식

Endotoxin에 의해 유도되는 tissue factor 및 plasminogen activator inhibitor-1 유전자의 발현조절에 관한 연구

- Tissue factor와 PAI-1발현에 관한 연구 -

Gene expression mechanism of endotoxin-induced tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1

2006년 8월 25일

조선대학교대학원

의학과

문 현 식

Endotoxin에 의해 유도되는 tissue factor 및 plasminogen activator inhibitor-1 유전자의 발현조절에 관한 연구

- Tissue factor와 PAI-1발현에 관한 연구 -

지도교수 하 상 호

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2006년 4월 일

조선대학교대학원
의학과

문 현 식

문 현 식의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	유 재 원	(인)
위원	조선대학교 교수	이 상 홍	(인)
위원	조선대학교 교수	전 제 열	(인)
위원	조선대학교 교수	전 영 진	(인)
위원	조선대학교 교수	하 상 호	(인)

2006년 6월 일

조선대학교대학원

-CONTENTS-

ABSTRACT
I. 서론 ····· 1
II. 재료 및 방법 ····· 5
A. 재료····· 5
B. 세포배양····· 5
C. 역전사효소-중합효소 연쇄반응····· 5
D. 벡터의 세포내 도입····· 6
E. 겔이동성 분석시험····· 7
F. Western Immunoblot analysis····· 7
G. 통계처리····· 8

III. 결과 ····· 9
A. Endotoxin에 의한 tissue factor유전자 발현 증가····· 9
B. Endotoxin에 의한 PAI-1 유전자 발현 증가·····14
C. Protein kinase 저해제에 의한 tissue factor 유전자 발현억제·····19
D. Protein kinase 저해제에 의한 PAI-1 유전자 발현억제·····28

IV. 고찰 ·····34
V. 결론 ·····39
VI. 참고문헌·····40

-LIST OF FIGURES-

Figure 1. Expression of tissue factor gene by LPS. ····· 12

Figure 2. Activation of NF-κB by LPS. ····· 13

Figure 3. Expression of PAI-1 gene by LPS. ····· 17

Figure 4. Activation of AP-1 by LPS. ····· 18

Figure 5. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580
on p44/42 or p38 MAP kinase activation. ····· 23

Figure 6. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580
on tissue factor gene expression. ····· 24

Figure 7. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580
on NF-κB DNA binding activity. ····· 25

Figure 8. Effects of PD98059 on NF-κB DNA binding activity. ····· 26

Figure 9. Effects of PD98059 or SB203580 on NF-κB activation. ····· 27

Figure 10. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580
on PAI-1 gene expression. ····· 30

Figure 11. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580
on AP-1 DNA binding activity. ····· 31

Figure 12. Effects of PD98059 on AP-1 DNA binding activity. ····· 32

Figure 13. Effects of PD98059 or SB203580 on AP-1 activation. ····· 33

ABSTRCT

Gene expression mechanism of endotoxin-induced tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1

Expression mechanism of tissue factor and PAI-1

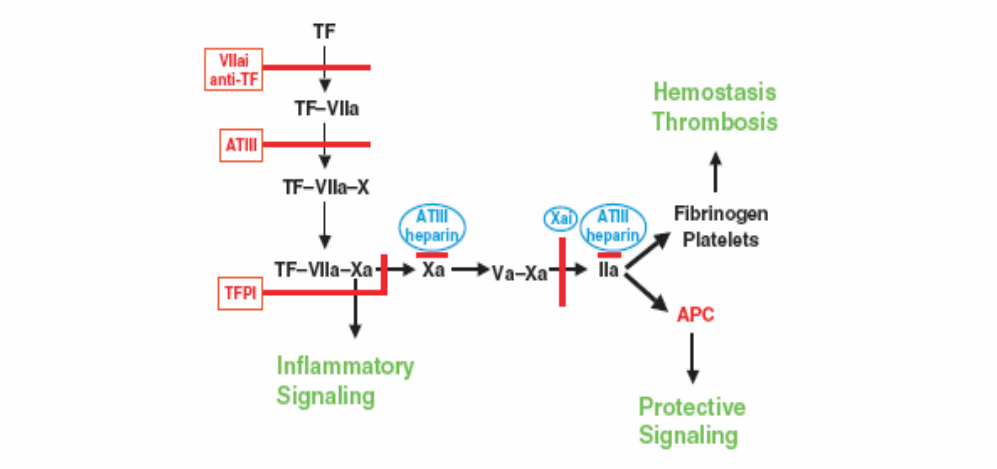
Mun Hyun Sik
Advisor : Prof. Ha Sang Ho, M.D., Ph.D.
Department of Medicine
Graduate School of Chosun University

The effects of protein kinase inhibitors on the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) genes was investigated in U937 human monocyte cell line using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Treatment of U937 cells with PD98059, extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) pathway inhibitor, for 8 hrs decreased LPS-induced production of both tissue factor and PAI-1 mRNA. PD98059 also inhibited NF-κB and AP-1 which are important in the gene expression of tissue factor and PAI-1, respectively. Inhibition of LPS-induced expression of tissue factor and PAI-1 by SB203580, p38 MAPK inhibitor, was less than the inhibition by PD98059. Collectively, the experiments indicate that ERK1/2 pathways positively regulate tissue factor and PAI-1 gene expression through the activation of NF-κB and AP-1. Due to the critical role that tissue factor and PAI-1 play in mediating microthrombosis induced by endotoxin, the inhibitory effects of PD98059 on the gene expression suggest that ERK1/2 pathway may be a target to prevent endotoxin-induced thrombosis.

Key words: Tissue factor, PAI-1, PD98059, SB203580, NF-κB, AP-1

I. 서론

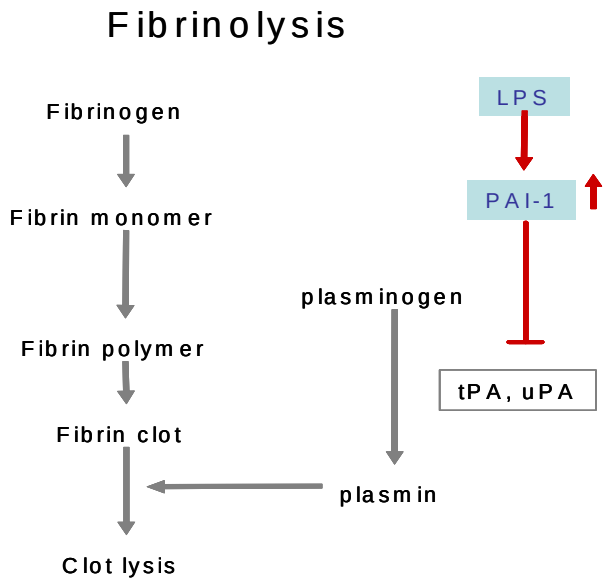
그람 음성 세균에 의해 유발된 패혈증은 많은 경우 혈전증을 수반하여(1,2), 다양한 장기의 혈관주위에 fibrin이 침착되어 세포손상, 조직괴사, 혈관파괴 등을 일으켜 장기를 손상시킨다(3). 그람 음성 세균의 독성을 나타내는 물질인 endotoxin(lipopolysaccharide, LPS)은 염증세포를 활성화시키고, 여러 가지 물질을 합성 및 분비하여 septic shock의 병리과정을 유발한다(4). 동물실험과 세포배양실험을 통하여 LPS에 노출되면 혈전증이 유발됨이 알려졌으나 자세한 기전에 대해서는 밝혀지지 않고 있다.



Tissue factor는 protease들의 응고 cascade의 일차적인 initiator이며(5), 세포표면의 plasma Factor VII/VIIa의 receptor 및 cofactor역할을 한다(6). 이러한 cascade의 활성화는 thrombin의 생성을 유발하고 생성된 thrombin은 firinogen의 argine-glycine 펩티드결합을 절단하여 fibrin monomer로 전환시키면, 이 fibrin monomer들이 결합하여 fibrin fiber를 형성한다. 혈관내피세포와 monocyte가 그람음성 세균의 세포벽성분인 LPS에 노출되면 tissue factor의 발현이 증가하는데(7,8), 비정상적으로 증가된 tissue factor

의 발현이 그람음성세균에 의한 패혈증을 포함한 다양한 질병의 혈전증에 중요할 수 있다고 보고되었다(9). 또한 패혈증에 걸린 토끼와 baboon의 응고반응에 tissue factor가 중요한 역할을 한다는 사실(10)과 LPS를 주사한 생쥐의 신장과 폐에서 tissue factor의 mRNA양이 증가하였음(11, 12)이 보고되어 LPS에 의한 혈전증에 tissue factor가 관여하고 있음을 시사해준다.

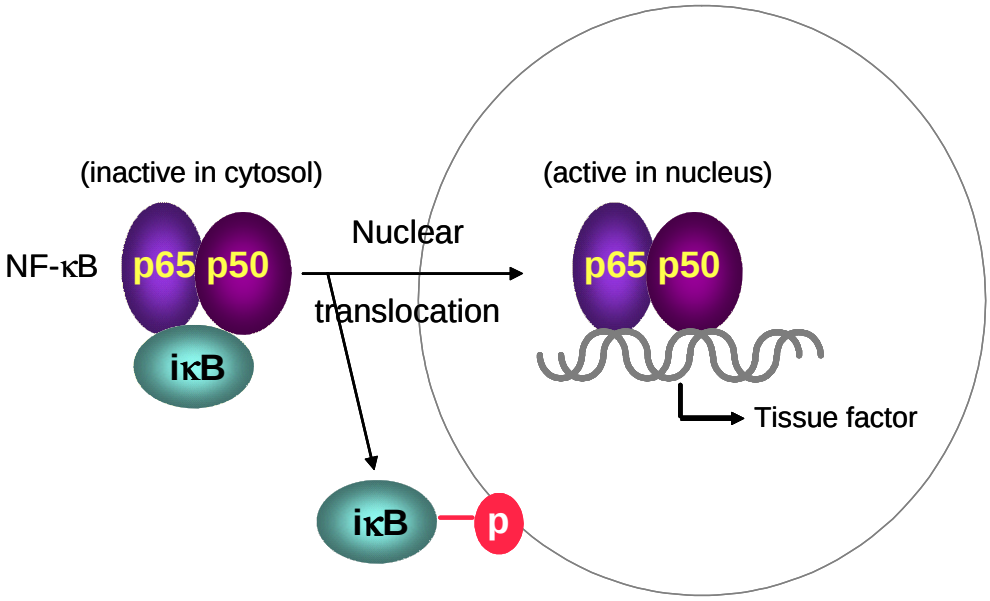
Fibrin clot의 제거는 생성될 때와 마찬가지로 protease cascade에 의해 신호가 증폭되어 일어난다(13). Serine protease인 plasminogen activator가 plasminogen을 활성형의 serine protease plasmin으로 변형시키고 이렇게 생성된 plasmin이 fibrin clot을 제거한다(13).



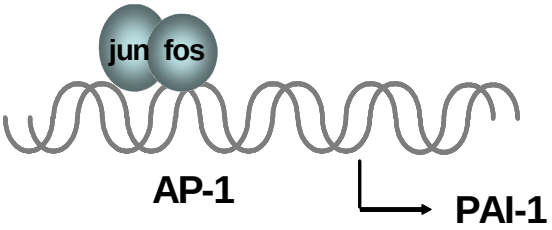
tPA: tissue plasminogen activator
uPA: urokinase-type plasminogen activator
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1

Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)은 빠르고도 특이적으로 plasminogen activator를 저해하여 fibrin clot의 제거를 방해한다. PAI-1의 활성은 tissue factor의 경우와 마찬가지로 혈전증을 유발하는 질병상태에서 증가하며, 흰쥐와 생쥐에서 LPS가 PAI-1 mRNA발현을 유도한다는 사실이 보고 되었다(14-18).

Tissue factor와 PAI-1의 유전자발현은 각각 전사촉진제인 nuclear factor-κB(NF-κB)와 activator protein-1(AP-1)의 활성도에 의해 지배되는 것으로 알려져 있다(19-22). Tissue factor의 유전자발현에 NF-κB가 중요하다는 사실은 NF-κB의 활성을 특이적으로 저해하는 pyrrolidine dithiocarbamate가 tissue factor의 유전자발현도 억제한다는 보고에 의해 확인되었다(19, 20). NF-κB는 자극 받지 않은 세포의 세포질에, 억제자인 IκB와 결합한 상태로 존재한다. 어떤 외부자극에 의해 큰 포식세포가 활성화 되면 IκB의 인산화가 초래되어 NF-κB로부터 떨어져 나오게 된다. 유리된 NF-κB은 핵으로 이동해서 NF-κB 결합부위와 결합하게 되면, 다양한 유전자의 발현을 자극하게 된다.



PAI-1의 유전자 발현을 조절하는 전사촉진제인 AP-1은 c-jun과 c-fos 단백질의 heterodimer로 구성되어 있고, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)나 LPS등이 세포를 자극하면 핵으로 이동하여 AP-1 결합부위에 결합하여 유전자의 발현을 촉진하는 것이다.



Endotoxin에 의해 유발되는 혈전증에 중요한 역할을 하는 tissue factor와 PAI-1의 발현조절기전을 밝혀내기 위하여, 세포내 신호전달에 중요한 역할을 수행하는 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 특이적 저해제를 사용하여 tissue factor와 PAI-1의 유전자 발현에 대한 영향을 분석하였다. 또한, tissue factor와 PAI-1 유전자의 발현에 중요한 역할을 수행하는 NF-κB와 AP-1의 활성에 대한 영향도 분석함으로써 tissue factor와 PAI-1의 유전자발현조절 기전을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 재료

LPS는 *Salmonella thyposa*에서 분리한 것으로 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서,radicicol, SB203580, 및 PD98059는 CalBiochem (La Jolla, CA, USA)에서, 세포배양에 사용된 물질들은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 그 외의 다른 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

B. 세포배양

Human monocyte 세포주인 U937 세포는 American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포들은 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum), 2 mM의 L-glutamine, 100 U/㎖ 페니실린과 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium으로 배양하였다. 세포들은 37°C에서 5% CO_2 존재 하에 배양하였다.

C. 역전사 효소-중합효소 연쇄반응

Total RNA는 Tri Reagent(Molecular Researh Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 이전에 기술되었던 방법(23)으로 분리하였다. 분리한 total RNA를 0.8% agarose gel에 전기영동하여 28s ribosomal RNA와 18s ribosomal RNA가 깨지지 않고 있음을 확인하였다. Primer 염기서열은 다음과 같다. tissue factor: sense primer; 5'-CCC AAA CCC GTC AAT CAA-3', anti-sense primer; 5'-TGT TGG CTG TCC GAG GTT-3', PAI-1:

sense primer; 5'-TAC GAC ATC CTG GAA CTG CC-3', anti-sense primer; 5'-GTC CAT GAT GAT CTC CTC GG-3', and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): sense primer; 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3', anti-sense primer; 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'. 동량의 RNA를 oligo(dT)15 primer를 사용해 cDNA로 역전사시켰다. PCR은 cDNA와 각 primer를 이용하였다. 시료들을 94°C에서 5분간 가열한 후 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 30초, 72°C에서 1분 순서로 30회 반복하고, 72°C에서 5분간 더 반응시켰다. PCR 생성물들은 3% NuSieve 3:1 gels (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)에서 전기영동시키고 ethidium bromide로 염색시켰다. Tissue factor, PAI-1과 GAPDH primer는 각각 257bp, 317bp, 및 349bp 크기로 증폭되었다.

D. 벡터의 세포내 도입

벡터는 이미 알려진 대로 NF-κB(24) 또는 AP-1(25)결합부위가 세 번 반복되는 염기서열이 포함된 pCAT-promoter vector (Promega Corp, ,USA)를 사용하였다. U937 세포를 1 X 10^7 cells/ml의 농도로 맞춘 후 DNA (10 μg/ml)을 DEAE-dextran 방법으로 transfection 시켰다(26). 세포를 희석하여 농도를 5 X 10^5 cells/ml로 맞춘 후 37°C에서 5% CO_2 하에 배양하였다. 24시간 후 LPS(1 μg/ml)를 처리하여 18시간 더 배양한 후 세포용해용 완충액으로 세포의 단백질을 추출하였다. 세포추출물을 4°C에서 12,000 x g로 10분간 원심분리하여 찌꺼기들을 가라앉히고, 상등액을 회수하여 chloramphenicol acetyl transferase (CAT)의 발현 정도를 CAT ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 제조회사의 방법대로 측정하였다.

E. 겔이동성 분석시험

겔이동성 분석시험은 전에 기술했던 방법 (27)으로 수행하였다. LPS를 2시간 처리한 U937세포들을 저장액(10 mM HEPES, 1.5 mM $MgCl_2$, pH 7.5)에 용해시켰고, 핵은 3,000 xg에서 5분 동안 원심분리하여 침전시켰다. 핵을 고장액(30 mM HEPES, 1.5 mM $MgCl_2$, 450 mM KCl, 0.3 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μg/ml of aprotinin, and 1 μg/ml of leupeptin)을 이용하여 용해시켰다. 용해시킨 후, 14,500 x g에서 5분 동안 원심분리시키고, 상층액은 DNA 결합실험에 사용하였다. 두 가닥의 올리고 핵산 (double-stranded)의 끝은 [γ-^{32}P]-ATP를 부착시켰다. 핵추출물(5 μg)은 binding-buffer(100 mM KCl, 30 mM HEPES, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.3 mM EDTA, 10% glycerol,1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μg/ml의 aprotinin, and 1 μg/ml의 leupeptin)에서 poly(dI-dC)와 [^{32}P]-labeled DNA probe와 함께 10분 동안 반응시켰다. DNA-단백질 결합 복합체는 0.5X TBE buffer내에서 4% polyacrylamide gel을 이용하여 DNA로부터 분리시켰다. 전기영동을 시행하고 gel을 말린 후, autoradiography로 확인하였다.

F. Western Immunoblot analysis

U937 세포를 LPS로 20분간 자극 시켰다. 세포를 용해시킨 후 단백질 (20 ㎍)을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 nitrocellulose 막(Amersham International, Buckinghamshire, UK)으로 electrotransfer하였다. 막들은 0.05% Tween-20와 3% bovine serum albumin(BSA)을 포함한 Tris-buffered saline(TBS, pH7.6)에 실온에서 1시간 동안 담가놓았다. Nitrocellulose 막들을 phospho p44/p42 항체 또는 phospho p38 항체 p38 항체에 반응시켰다. 면역반응 띠들은 horseradish peroxidase가 붙어있는

항토끼 IgG를 이용하여 검출하였고, 화학발광시약물 (ECL Chemiluminescent Western Blotting Detection Reagents, Amersham)로 확인하였다

G. 통계처리

각각의 실험군은 평균 ± SD로 통계처리하였다. 처치군은 Dunnett's two-tailed *t* test를 사용해 대조군과 비교하였다 (28).

III. 결과

A. Endotoxin에 의한 tissue factor 유전자 발현 증가

Tissue factor의 유전자 발현이 endotoxin에 의해 증가 하는지 확인하기 위하여 U937 세포에 LPS(1 μg/ml)를 처리한 후 시간대 별로 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. RNA는 불안정하여 잘 파괴되기 때문에 total RNA가 파괴되지 않고 잘 분리 되었는지 확인하기위하여 0.8% agarose에 전기영동 하였다. Ethidium bromide로 염색한 결과 28s ribosomal RNA와 18s ribosomal RNA가 파괴되지 않은 상태로 깨끗하게 분리되었음을 확인하였다. 분리한 total RNA(1 μg)을 역전사 시킨 후, 그 중 100 ng을 tissue factor에 대한 sense primer와 anti-sense primer를 이용한 PCR 분석에 사용하였다. 그 결과, LPS를 처리한 후 2 시간이 지나면서 tissue factor의 mRNA가 발현되기 시작하였고, 8시간에 tissue factor mRNA의 생성이 최대치를 이루고 16시간까지 유지되었다 (Fig. 1). Tissue factor 유전자는 LPS를 처리한 후 8 시간에 최대로 발현되었으므로, 이 후의 tissue factor에 대한 mRNA 분석실험에는 LPS를 8시간 동안 처리하였다. LPS에 의한 tissue factor의 mRNA 발현증가가 비특이적으로 유전자의 발현을 증가시킨 것이 아니고, tissue factor 유전자에 특이적인 현상인지 알아보기 위하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 대한 RT-PCR를 수행하였다. GAPDH는 해당과정에 관여하는 효소로서 대부분의 세포에서 실험적인 상황에 관계없이 일정하게 발현되고 있으므로 실험상의 오류에 의한 결과를 보정하기 위하여 분석하였다. LPS를 처리에 의하여 GAPDH의 mRNA 생성 정도에는 아무런 영향을 미치지 않았으므로, LPS에 의해 tissue factor의 mRNA 생성이 증가한 것은 LPS가 일반적으로 유전자의 발현을 증가시키지 않으면서 tissue factor 유전자의 발현을 유도한 것임을 알 수 있었

다.

이러한 LPS에 의한 tissue factor의 유전자의 발현증가의 작용기전을 알아보기 위하여, tissue factor의 발현에 중요한 역할을 수행하는 전사촉진제에 대한 영향을 확인하였다. NF-κB는 p65와 p50의 heterodimer로 구성된 전사를 촉진하는 단백질로서 tissue factor의 유전자 발현에 매우 중요한 역할을 수행함이 알려져 있으므로 (19, 20), LPS가 NF-κB를 활성화 시킬 수 있는지 확인하였다. 이미 알려진 대로 NF-κB 결합부위가 세 번 반복되는 염기서열이 포함된 pCAT-promoter vector를 U937세포에 transfection 시킨 후 LPS를 처리하였다. 만약, LPS가 NF-κB의 활성을 증가시킨다면 증가된 NF-κB는 벡터의 바로 이웃한 유전자인 CAT의 발현을 증가시키게 된다. 발현이 증가한 CAT 단백질은 아주 안정하고 포유류의 세포에서는 발현되지 않기 때문에 만약 이 단백질의 발현양이 LPS에 의해 증가된다면 이는 LPS가 NF-κB의 활성을 증가시켰기 때문인 것으로 판단할 수 있다. 벡터를 transfection 시킨 후 LPS(1 μg/ml)를 18 시간 처리하고 세포 추출물을 분리하여 CAT의양을 CAT ELISA로 측정한 결과 LPS에 의해 CAT의 발현양이 현저히 증가하였음을 확인하였다(Fig. 2A). 이러한 결과는 LPS가 NF-κB의 활성을 증가시켰기 때문인 것으로 판단할 수 있으며, 이를 다시 한번 확인하기 위하여 NF-κB DNA결합실험을 수행하였다. NF-κB가 tissue factor 유전자의발현을 증가시키기 위해서는 tissue factor의 promoter부위에 결합하는 것이 필수 적이다. 따라서, U937 세포에 LPS(1 μg/ml)를 2 시간 처리한 후 세포의 핵추출물을 분리하여 DNA 결합실험에 사용하였다. NF-κB가 결합하는 DNA 결합부위의 3'-끝부분을 방사성동위원소로 labeling한 후 핵 추출물과 반응시켰다. 이 반응 물을 polyacrylamide gel electrophoresis 장치를 이용하여 전기영동한 후 자가방사법으로 x-ray 필름에 감광되는 정도를 측정하였다. NF-κB가 결합하지 않은 DNA 결합부위는 -극으로부터 +극 쪽으로

많이 움직이는 반면, NF-κB와 DNA의 복합체는 +극 쪽으로 아주 조금 움직여서 동위원소로 labeling 된 DNA와 분리된 띠를 형성하게 된다. 이 띠의 굵기와 진하기 정도로 NF-κB가 DNA에 결합하는 활성을 측정하였다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이 LPS를 2 시간 처리한 후 분리한 핵 추출물은 대조군인 아무것도 처리하지 않은 세포의 핵 추출물에 비해서 상당히 진한 DNA/NF-κB 복합체를 형성함을 확인할 수 있다. 이러한 DNA/NF-κB 복합체의 형성이 특이적인 반응인지 확인하기 위하여 방사성동위원소를 붙이지 않은 NF-κB 결합부위를 LPS를 처리한 핵추출물과 방사성동위원소가 붙은 NF-κB 결합부위 반응에 과량 첨가하면 NF-κB가 대부분 방사성동위원소가 붙지 않은 결합부위에 결합함으로써 방사성동위원소가 붙은 DNA/NF-κB 복합체가 거의 형성되지 않고, 따라서 DNA/NF-κB 복합체의 띠가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 LPS가 NF-κB의 DNA 결합을 특이적으로 증가시킴을 시사한다.

이상의 결과들로부터 LPS가 패혈증상태에서 혈전 생성의 개시에 중요한 역할을 하는 tissue factor의 발현을 증가시키며, 이 tissue factor의 발현에 중요한 역할을 수행하는 전사촉진제인 NF-κB의 DNA결합을 증가시키고, 이를 통하여 tissue factor의 mRNA 발현에 중요한 역할을 수행함을 확인할 수 있었다.

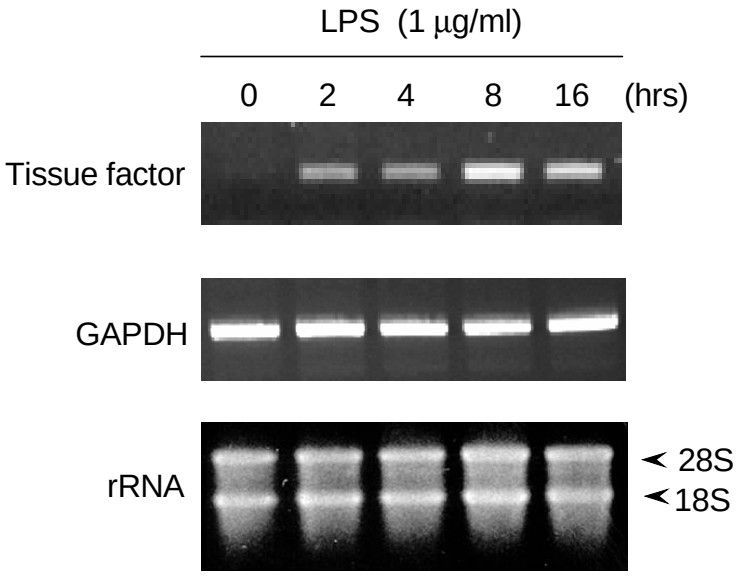


Figure 1. Expression of tissue factor gene by LPS. U937 cells (5x 10^5 cells/ml) were incubated with LPS (1 μg/ml) for 0, 2, 4, 8, or 16 hrs. Total RNA was then prepared and analyzed by RT-PCR.

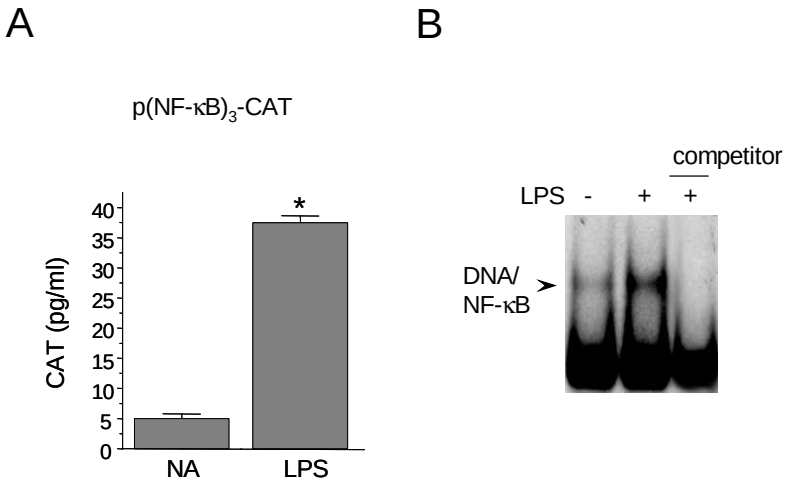


Figure 2. Activation of NF-κB by LPS. (A) U937 cells were transfected wtih p(NF-κB)3-CAT by DEAE dextran method. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with LPS (1 μg/ml) for 18 hrs. Cell extracts were then prepared and analyzed for the expression of CAT using CAT ELISA kit. (B) U937 cells were treated with LPS for 2 hrs. Nuclear extracts were the isolated and subjected to EMSA. Radioisotope-unlabeled κB was used as a competitor.

B. Endotoxin에 의한 PAI-1 유전자 발현 증가

PAI-1의 유전자 발현이 endotoxin에 의해 증가 하는지 확인하기 위하여 U937 세포에 LPS(1 μg/ml)를 처리한 후 시간대 별로 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. PAI-1은 특이적으로 plasminogen activator를 저해하여 serine protease인 plasminogen activator가 plasminogen을 활성형의 serine protease plasmin으로 변형시켜 fibrin clot을 제거하는 것을 방해한다(13). RNA의 안정성을 28s ribosomal RNA와 18s ribosomal RNA의 상태로 확인하였으며, 분리한 total RNA(1 μg)를 역전사 시킨 후 PAI-1 에 대한 sense primer와 anti-sense primer를 이용하여 PCR 분석한 결과, LPS를 처리한 후 4 시간이 지나면 PAI-1의 mRNA가 발현되기 시작함을 알 수 있다 (Fig. 3). LPS를 처리한지 8시간에 PAI-1 mRNA의 생성이 최대치를 이루고 16시간까지 유지됨을 확인하였다 (Fig. 3). LPS에 의한 PAI-1의 mRNA 발현증가가 비특이적으로 유전자의 발현을 증가시킨 것이 아니고, PAI-1 유전자에 특이적인 현상인지 알아보기 위하여 GAPDH에 대한 RT-PCR를 수행한 결과, LPS를 처리에 의하여 GAPDH의 mRNA 생성 정도에는 아무런 영향을 미치지 않았으므로, LPS에 의해 PAI-1의 mRNA 생성이 증가한 것은 LPS가 일반적으로 유전자의 발현을 증가시키지 않으면서 PAI-1 유전자의 발현을 유도한 것임을 알 수 있었다.

이러한 LPS에 의한 PAI-1의 유전자의 발현증가의 작용기전을 알아보기 위하여, PAI-1의 발현에 중요한 역할을 수행하는 전사촉진제에 대한 영향을 확인하였다. AP-1은 c-jun과 c-fos계열 단백질의 heterodimer로 구성된 전사촉진제로서 PAI-1의 유전자 발현에 매우 중요한 역할을 수행함이 알려져 있으므로(21, 22), LPS가 AP-1을 활성화 시킬 수 있는지 확인하였다. AP-1 결합부위가 세 번 반복되는 염기서열이 포함된 pCAT-promoter vector를 U937세포에 transfection 시킨 후 LPS를 처리하였다. 만약, LPS가

AP-1의 활성을 증가시킨다면 증가된 AP-1은 벡터의 바로 이웃한 유전자인 CAT의 발현을 증가시키게 된다. 벡터를 transfection 시킨 후 LPS(1 μg/ml)를 18 시간 처리하고 세포 추출물을 분리하여 CAT의양을 CAT ELISA로 측정한 결과 LPS에 의해 CAT의 발현양이 현저히 증가하였음을 확인하였다 (Fig. 4A). 이러한 결과는 LPS가 AP-1의 활성을 증가시켰기 때문인 것으로 판단할 수 있으며, 이를 다시 한번 확인하기 위하여 AP-1 DNA결합 실험을 수행하였다. U937 세포에 LPS(1 μg/ml)를 2 시간 처리한 후 세포의 핵추출물을 분리하여 DNA 결합실험에 사용하였다. AP-1이 결합하는 DNA 결합부위의 3'-끝부분을 방사성동위원소로 labeling한 후 핵 추출물과 반응시켰다. 이 반응 물을 polyacrylamide gel electrophoresis 장치를 이용하여 전기영동한 후 자가방사법으로 x-ray 필름에 감광되는 정도를 측정하였다. Fig. 4B에 나타난 바와 같이 LPS를 2 시간 처리한 후 분리한 핵 추출물은 대조군인 아무것도 처리하지 않은 세포의 핵 추출물에 비해서 상당히 진한 DNA/AP-1 복합체를 형성함을 확인할 수 있다. 이러한 DNA/AP-1 복합체의 형성이 특이적인 반응인지 확인하기 위하여 방사성동위원소를 붙이지 않은 AP-1 결합부위를 LPS를 처리한 핵추출물과 방사성동위원소가 붙은 AP-1 결합부위 반응에 과량 첨가하면 AP-1가 대부분 방사성동위원소가 붙지 않은 결합부위에 결합함으로써 방사성동위원소가 붙은 DNA/AP-1 복합체가 거의 형성되지 않고, 따라서 DNA/AP-1 복합체의 띠가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). 이러한 결과들은 LPS가 AP-1의 DNA 결합을 특이적으로 증가시킴을 시사한다. 특이적인 DNA/AP-1 복합체가 형성하는 띠 아래쪽에 있는 띠는 LPS에 의해 더 증가되지도 않고, 방사성동위원소가 붙은 DNA에 의해 없어지지도 않음을 알 수 있다. 따라서 아래쪽의 띠는 비특이적으로 어떤 단백질이 결합한 것임을 알 수 있다.

이상의 결과들로부터 LPS가 패혈증상태에서 혈전의 용해를 억제한데 중요

한 역할을 하는 PAI-1의 발현을 증가시키며, 이 PAI-1의 발현에 중요한 역할을 수행하는 전사촉진제인 AP-1의 DNA결합을 증가시키고, 이를 통하여 PAI-1의 mRNA 발현에 중요한 역할을 수행함을 확인할 수 있었다.

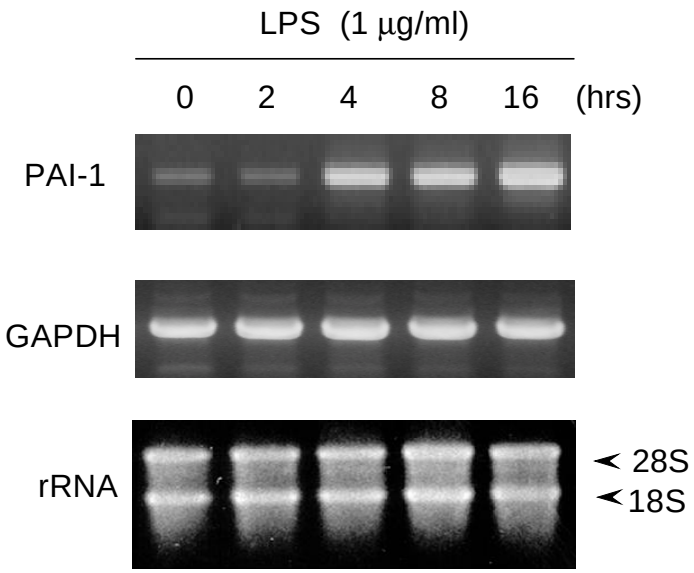


Figure 3. Expression of PAI-1 gene by LPS. U937 cells (5x 10^5 cells/ml) were incubated with LPS (1 μg/ml) for 0, 2, 4, 8, or 16 hrs. Total RNA was then prepared and analyzed by RT-PCR.

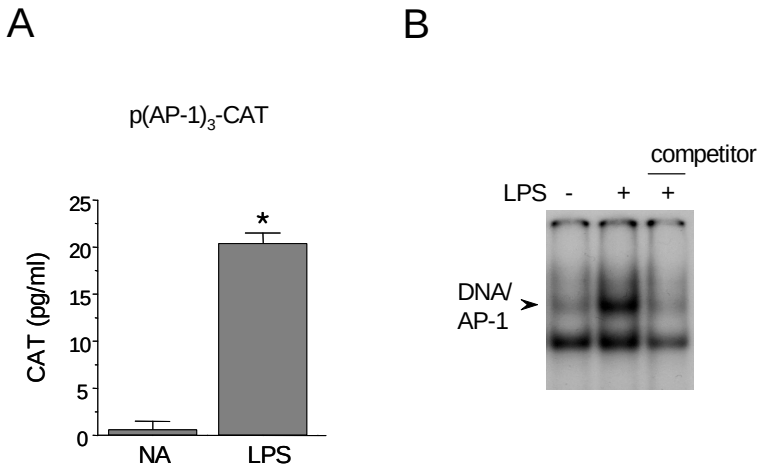
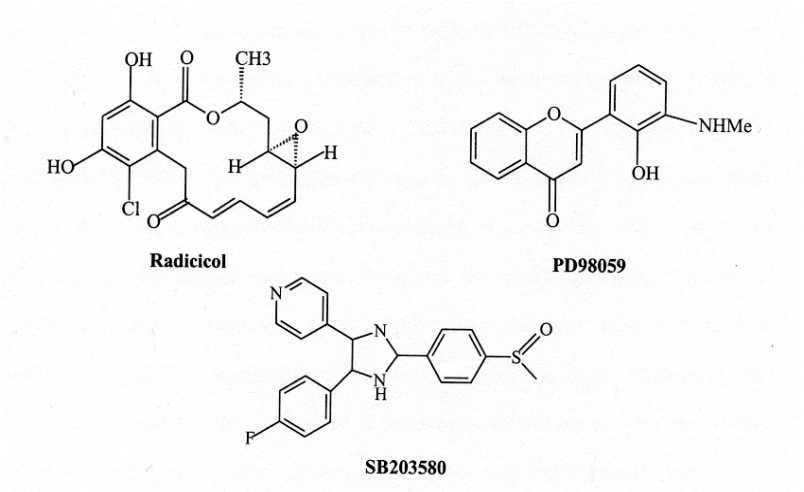


Figure 4. Activation of AP-1 by LPS. (A) U937 cells were transfected wtih p(AP-1)3-CAT by DEAE dextran method. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with LPS (1 μg/ml) for 18 hrs. Cell extracts were then prepared and analyzed for the expression of CAT using CAT ELISA kit. (B) U937 cells were treated with LPS for 2 hrs. Nuclear extracts were the isolated and subjected to EMSA. Radioisotope-unlabeled AP-1 binding oligomer was used as a competitor.

C. Kinase 저해제에 의한 tissue factor 유전자 발현 억제

Tissue factor의 유전자 발현 조절에 관여하는 신호전달체계를 연구하기 위하여 몇 가지 인산화효소 저해제를 사용하였다. Radicicol은 heat shock protein 90의 억제제로서 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase(MAPK/ERK)와 p38 MAPK의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다 (29-31). PD98059는 ERK1/2의 활성을 조절하는 MEK-1의 특이적 억제제이며, SB203580은 bycylic imidazole 화합물로서 p38 MAPK의 특이적 억제제이다 (32, 33). Radicicol, PD98059, 및 SB203580의 구조는 아래와 같다.



ERK1/2와 p38 MAPK는 LPS에 의한 세포내 신호전달에 매우 중요한 효소로서 threonine과 tyrosine에 인산화되어야 활성을 가지게 된다. 따라서 인산화된 형태의 ERK1/2와 p38 MAPK에 대한 항체를 사용하여 Western blot immunoassay를 수행하면, LPS가 이들 인산화효소의 활성을 증가시켰는지 확인할 수 있다. LPS (1 μg/ml)를 20분간 처리한 후 세포 추출물을 분리하여

인산화된 형태의 ERK1/2에 대한 Western blot immunoassay를 수행한 결과, LPS가 44 kilodalton과 42 kilodalton의 분자량을 갖는 단백질인 ERK1과 ERK2의 인산화를 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 5). LPS는 또한 p38 MAPK의 인산화를 증가시킨다는 사실도 확인하였다. Radicicol, PD98059, 및 SB203580의 활성을 측정하기 위해 LPS를 하기 전에 약 1 시간 동안 이들 약물을 전 처리하였다. Radicicol을 전처리 한 경우 LPS에 의해 유도되는 ERK1/2과 p38의 인산화를 동시에 억제하나 억제정도는 약간의 차이가 있었다. ERK1/2의 인산화 억제정도는 약 50%정도 되는 것으로 보이고 p38 MAPK의 경우는 약 90%이상 억제시킨 것으로 볼 수 있다. ERK1/2 pathway의 특이적 저해제인 PD98059의 경우 p38 MAPK에는 별 영향없이 ERK1/2의 인산화를 매우 강하게 억제함을 확인할 수 있었다. 이와 반대로 p38 MAPK 저해제인 SB203580의 경우에는 ERK1/2에는 별 영향없이 p38 MAPK를 강하게 억제함을 확인하였다.

Tissue factor의 유전자 발현이 이들 인산화효소 저해제에 의해 억제되는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. U937 세포에 radicicol(200 ng/ml), PD98059(50 μM), 및 SB203580(30 μM)를 1 시간 전 처리한 후 LPS(1 μg/ml)를 8 시간 처리하고, total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 radicicol, PD98059, 및 SB20580 모두 LPS에 의해 유도되는 tissue factor mRNA 생성을 억제하였으며, 그 억제 정도는 PD98059가 가장 강하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 ERK1/2와 p38 MAPK 모두 tissue factor 유전자의 발현에 중요한 역할을 수행하나 그 정도는 ERK1/2의 관련성이 p38 MAPK보다 더 큼을 시사한다.

Tissue factor 유전자의 발현과 NF-κB의 활성과의 관련성 및 이들의 조절기전을 알아보기 위하여 인산화효소 저해제들을 사용하여, NF-κB의 DNA 결합능에 대한 영향을 실험하였다. 그 결과 인산화 활성 저해제들이 tissue

factor 유전자의 발현에 미치는 영향과는 조금 다른 결과를 얻었다. 우선 radicicol과 PD98059의 경우 NF-κB의 DNA 결합 활성을 크게 억제하였으나, SB203580은 별다른 영향이 없었다(Fig. 7). 이러한 결과는 ERK1/2는 NF-κB의 DNA 결합활성에 중요한 역할을 수행하는 반면 p38 MAPK는 별다른 기능을 수행하지 않음을 알 수 있다. 또한, p38 MAPK 저해제가 NF-κB의 활성에는 영향이 없으면서 tissue factor의 유전자 발현을 억제한 것으로 보아, SB203580은 NF-κB-비의존적인 경로를 통하여 tissue factor의 유전자 발현을 조절함을 시사한다. ERK1/2과 NF-κB의 활성과의 관련성을 좀 더 정확하게 알아보기 위하여 ERK1/2 경로 억제제인 PD98059를 여러 가지 농도로 처리하였다. 그 결과 PD98059는 용량의존적으로 NF-κB의 DNA 결합 활성을 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

NF-κB의 활성에 대한 ERK1/2와 p38 MAPK의 관련성을 검증하고 이들 신호전달효소들이 NF-κB의 전사촉진활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 NF-κB결합부위를 가진 벡터를 U937 세포에 transfection 시켰다. Transfection 24시간 후 PD98059 (50 μM)와 SB203580(30 μM)를 1시간 전 처리하고 LPS(1 μg/ml)를 18 시간 처리하였다. 세포 추출물을 분리한 후 CAT ELISA kit를 이용하여 CAT의 생성양을 측정한 결과 PD98059는 LPS에 의해 유도되는 NF-κB의 전사촉진 활성을 억제하였으나, SB203580은 NF-κB의 전사촉진 활성에 아무 영향이 없었다(Fig. 9). 따라서, NF-κB의 전사촉진활성에 p38 MAPK의 경로 보다는 ERK1/2 경로가 중요함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 NF-κB의 DNA 결합 활성에서 얻은 결과와 일치하였다.

이상의 결과들로부터 tissue factor의 유전자 발현에 ERK1/2 경로가 중요하게 작용함을 알 수 있었으며, 또한 NF-κB의 DNA 결합 활성 및 전사촉진 활성에도 매우 중요한 역할을 수행함을 알 수 있었다. 반면, p38 MAPK의 경

우 NF-κB의 DNA 결합 및 전사촉진 활성에는 영향이 없으면서 tissue factor 유전자의 발현에는 어느 정도 관련이 있음을 알 수 있었다.

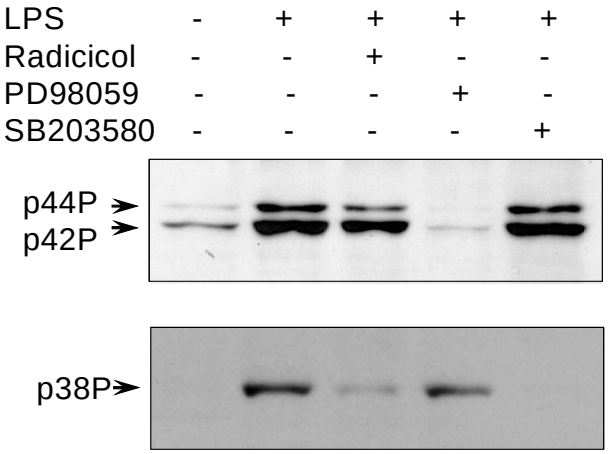


Figure 5. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580 on p44/42 or p38 MAP kinase activation. U937 cells were pretreated with radicicol (200 ng/ml), PD98059 (50 μM), and SB203580 (30 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 20 minutes. Cell extracts were prepared and subjected to Western immunoblot assay using antibodies specific for phosphorlated form of p44/42 or p38, repectively.

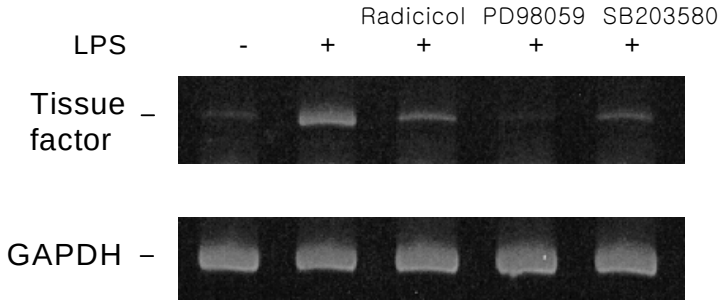


Figure 6. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580 on tissue factor gene expression. U937 cells were pretreated with radicicol (200 ng/ml), PD98059 (50 μM), and SB203580 (30 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 8 hrs. Total RNA was then prepared and analyzed by RT-PCR.

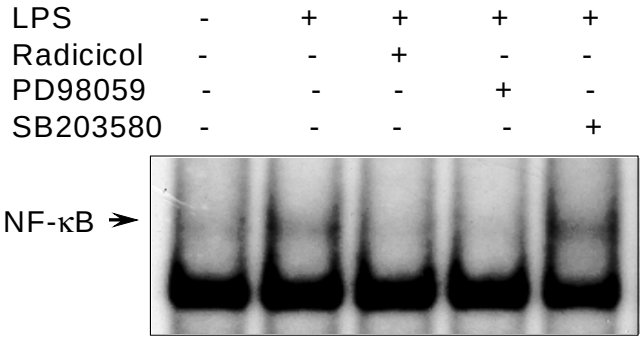


Figure 7. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580 on NF-κB DNA binding activity. U937 cells were pretreated with radicicol (200 ng/ml), PD98059 (50 μM), and SB203580 (30 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 2 hrs. Nuclear extracts were then prepared and subjected to EMSA. Positions of the specific DNA-protein complexes are indicated by arrow.

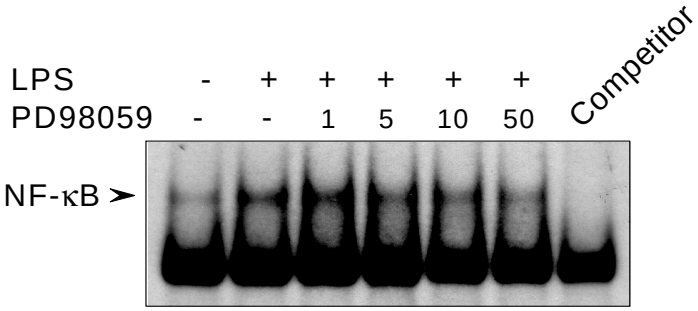


Figure 8. Effects of PD98059 on NF-κB DNA binding activity. U937 cells were pretreated with PD98059 (1, 5, 10, or 50 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 2 hrs. Nuclear extracts were then prepared and subjected to EMSA. Positions of the specific DNA-protein complexes are indicated by arrowhead. Radioisotope-unlabeled NF-κB binding oligomer was used as a competitor.

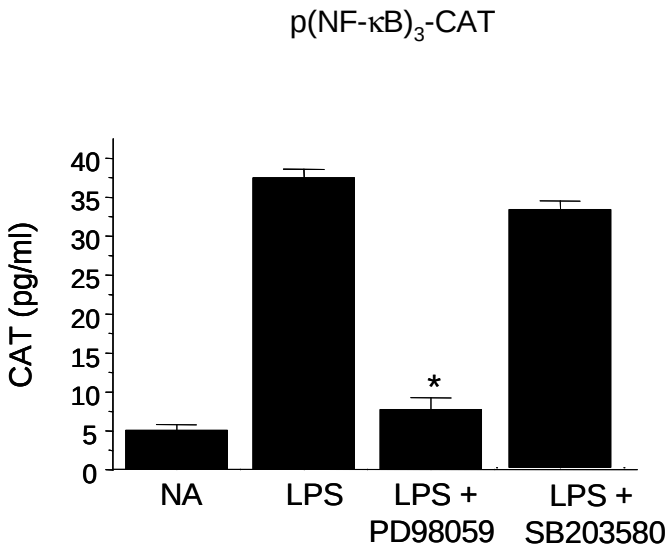


Figure 9. Effects of PD98059 or SB203580 on NF-κB activation. U937 cells were transfected wtih p(NF-κB)3-CAT by DEAE dextran method. Twenty-four hours after transfection, cells were pretreated with PD98059 (50 μM) or SB203580 (30 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 18 hrs. Cell extracts were then prepared and analyzed for the expression of CAT using CAT ELISA kit.

D. Kinase 저해제에 의한 PAI-1 유전자 발현 억제

PAI-1의 유전자 발현이 인산화효소 저해제에 의해 억제 하는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. U937 세포에 radicicol(200 ng/ml), PD98059(50 μM), 및 SB203580(30 μM)를 1 시간 전 처리한 후 LPS(1 μg/ml)를 8 시간 처리하고, total RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 radicicol, PD98059, 및 SB20580 모두 LPS에 의해 유도되는 PAI-1 mRNA 생성을 억제하였으며, 그 억제 정도는 PD98059가 가장 강하였다(Fig. 10). 이러한 결과는 ERK1/2와 p38 MAPK 모두 PAI-1 유전자의 발현에 중요한 역할을 수행하나 그 정도는 ERK1/2의 관련성이 p38 MAPK보다 더 큼을 시사한다.

PAI-1 유전자의 발현과 AP-1의 활성과의 관련성 및 이들의 조절기전을 알아보기 위하여 인산화효소 저해제들을 사용하여, AP-1의 DNA 결합능에 대한 영향을 실험하였다. 그 결과 인산화 활성 저해제들이 PAI-1 유전자의 발현에 미치는 영향과는 조금 다른 결과를 얻었다. 우선 radicicol과 PD98059의 경우 AP-1의 DNA 결합 활성을 크게 억제하였으나, SB203580은 영향이 적었다(Fig. 11). 이러한 결과는 ERK1/2는 AP-1의 DNA 결합 활성에 중요한 역할을 수행하는 반면, p38 MAPK는 미약한 기능만을 수행함을 알 수 있다. 또한, p38 MAPK 저해제가 AP-1의 활성에는 영향이 약한 반면, PAI-1의 유전자 발현을 억제한 것으로 보아, SB203580은 AP-1-비의존적인 경로를 통하여 PAI-1의 유전자 발현을 조절함을 시사한다. ERK1/2과 AP-1의 활성과의 관련성을 좀 더 정확하게 알아보기 위하여 ERK1/2 경로 억제제인 PD98059를 여러 가지 농도로 처리하였다. 그 결과 PD98059는 용량의존적으로 AP-1의 DNA 결합 활성을 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 12).

AP-1의 활성에 대한 ERK1/2와 p38 MAPK의 관련성을 검증하고 이들 신

호전달효소들이 AP-1의 전사촉진활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 AP-1결합부위를 가진 벡터를 U937 세포에 transfection 시켰다. Transfection 24시간 후 PD98059 (50 μM)와 SB203580(30 μM)를 1시간 전 처리하고 LPS(1 μg/ml)를 18 시간 처리하였다. 세포 추출물을 분리한 후 CAT ELISA kit를 이용하여 CAT의 생성 양을 측정한 결과 PD98059는 LPS에 의해 유도되는 AP-1의 전사촉진활성을 강하게 억제하였으나 SB203580은 그 억제 정도가 적었다(Fig. 13). 따라서, AP-1의 전사촉진활성에 ERK1/2 경로가 더 중요함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 AP-1의 DNA 결합 활성에서 얻은 결과와 일치하였다.

이상의 결과들로부터 PAI-1의 유전자 발현과 AP-1의 DNA 결합 활성 및 전사촉진활성은 ERK1/2 경로가 중요하게 작용함을 알 수 있었으며, p38 MAPK의 경우 AP-1의 활성과 PAI-1 유전자의 발현에 미약하나마 관련이 있음을 알 수 있었다.

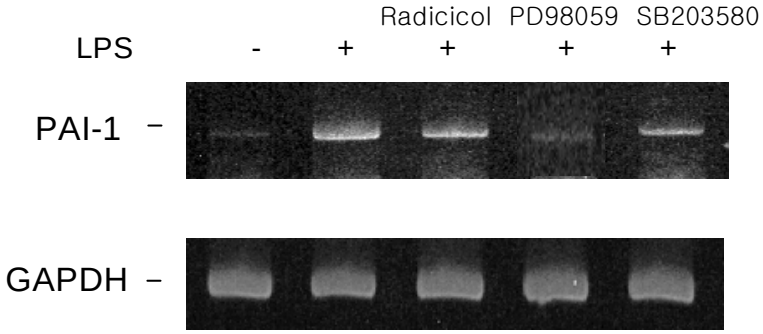


Figure 10. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580 on PAI-1 gene expression. U937 cells were pretreated with radicicol (200 ng/ml), PD98059 (50 μM), and SB203580 (30 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 8 hrs. Total RNA was then prepared and analyzed by RT-PCR.

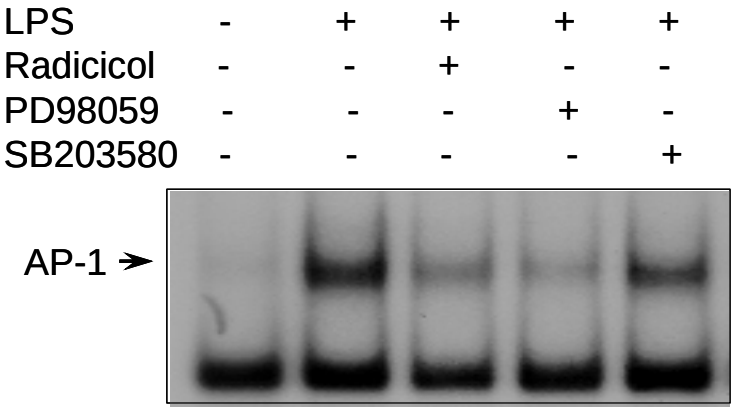


Figure 11. Effects of radicicol, PD98059, or SB203580 on AP-1 DNA binding activity. U937 cells were pretreated with radicicol (200 ng/ml), PD98059 (50 μM), and SB203580 (30 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 2 hrs. Nuclear extracts were then prepared and subjected to EMSA. Positions of the specific DNA-protein complexes are indicated by arrow.

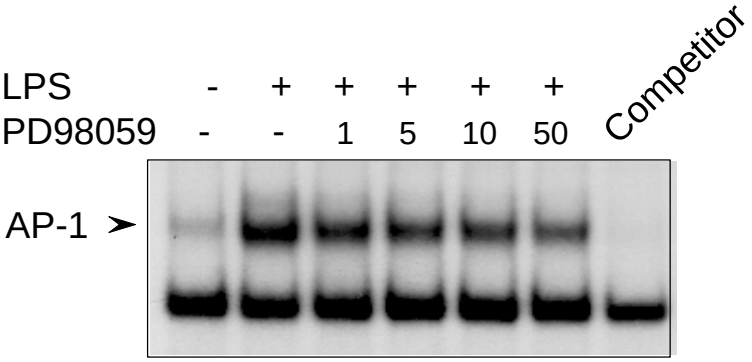


Figure 12. Effects of PD98059 on AP-1 DNA binding activity. U937 cells were pretreated with PD98059 (1, 5, 10, or 50 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 2 hrs. Nuclear extracts were then prepared and subjected to EMSA. Positions of the specific DNA-protein complexes are indicated by arrowhead. Radioisotope-unlabeled AP-1 binding oligomer was used as a competitor.

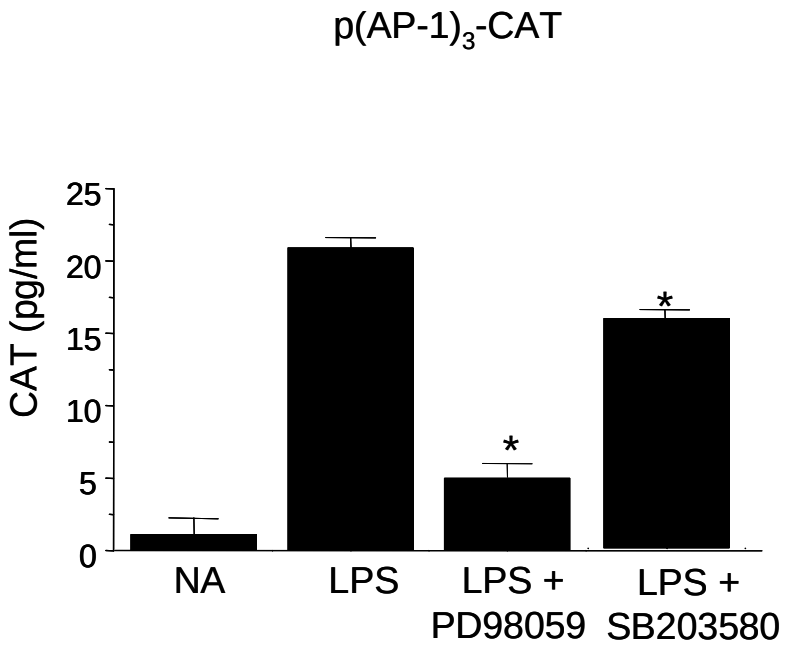


Figure 13. Effects of PD98059 or SB203580 on AP-1 activation. U937 cells were transfected wtih p(AP-1)3-CAT by DEAE dextran method. Twenty-four hours after transfection, cells were pretreated with PD98059 (50 μM) or SB203580 (30 μM) for 1 hr before incubation with LPS (1 μg/ml) for 18 hrs. Cell extracts were then prepared and analyzed for the expression of CAT using CAT ELISA kit.

IV. 고찰

본 연구를 통하여 세포 내 신호전달에 중요한 역할을 수행하는 ERK1/2 경로가 패혈증에 의한 혈전증의 유발에 중요한 역할을 수행하는 tissue factor와 혈전의 용해를 방해하는 PAI-1의 유전자 발현에 중요함을 확인하였다. 패혈증 증후군은 내재면역이 심각하게 활성화되어 나타나는 복합적인 반응의 결과로서 흔히 환자들을 죽음에 이르게 할 수 있다. 내재면역이 조절되지 않는 동안 혈액응고 cascade가 개시되어 광범위하게 혈관 내 혈액응고를 유발하고 미세혈관 혈전증을 유발함으로써 임상증상을 유발하게 되며, 이러한 혈액응고 cascade의 개시에 관여하는 세포표면 수용체가 tissue factor이다(5). Tissue factor는 monocyte나 혈관내피세포등에서 염증성 사이토카인이나 endotoxin에 의해 유도된다(34). Tissue factor는 혈액응고 인자인 VIIa에 대한 친화성이 매우 큰 수용체로 작용한다. Tissue factor가 없을 때, VIIa는 매우 낮은 활성을 가지고 있다가, tissufe factor와 결합하게 되면 매우 강한 활성을 지니게 된다(35). Tissue factor/VIIa 복합체는 factor X를 활성화시켜 Xa로 전환 시킨다. 이러한 cascade의 활성화는 thrombin의 생성을 유발하고 생성된 thrombin은 firibogen의 argine-glycine 펩티드결합을 절단하여 fibrin monomer로 전환시키면, 이 fibrin monomer들이 결합하여 fibrin fiber를 형성한다. 혈관 내피세포와 monocyte가 그람음성 세균의 세포벽성분인 LPS에 노출되면 tissue factor의 발현이 증가하는데(7,8), 비정상적으로 증가된 tissue factor의 발현이 그람음성세균에 의한 패혈증을 포함한 다양한 질병의 혈전증에 중요할 수 있다고 보고 되었다(9). 또한 패혈증에 걸린 토끼와 baboon의 응고 반응에 tissue factor가 중요한 역할을 한다는 사실(10)과 LPS를 주사한 생쥐의 신장과 폐에서 tissue factor의 mRNA양이 증가하였음(11, 12)이 보고 되어 LPS에 의한 혈전증에 tissue factor가 관여하고 있음을 시사해준다.

Tissue factor의 유전자 발현이 endotoxin에 의해 증가 하는지 RT-PCR로 확인한 결과, GAPDH의 mRNA 생성 정도에는 아무런 영향을 미치지 않으면서 tissue factor의 mRNA 생성을 증가시킨 것을 확인하였다. LPS에 의한 tissue factor의 유전자의 발현증가의 작용기전을 알아보기 위하여, tissue factor의 유전자 발현이 인산화효소 저해제에 의해 억제되는지 확인하였다. 그 결과 radicicol, PD98059, 및 SB20580 모두 LPS에 의해 유도되는 tissue factor mRNA 생성을 억제하였으며, 그 억제 정도는 PD98059가 가장 강하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 ERK1/2와 p38 MAPK 모두 tissue factor 유전자의 발현에 중요한 역할을 수행하나 그 정도는 ERK1/2의 관련성이 p38 MAPK보다 더 큼을 시사한다. ERK1/2 경로는 LPS에 의한 세포내 신호전달에 매우 중요한 효소로서 threonine과 tyrosine에 인산화되면 NF-κB를 포함한 다른 전사촉진제를 인산화 시킴으로써 특정한 유전자의 발현을 유도하게 된다. 본 연구결과를 통하여 ERK1/2가 tissue factor의 유전자 발현에 중요하다는 사실을 확인하였으므로, 앞으로 tissue factor의 유전자 발현을 감소시킴으로써 패혈증에 의한 혈전증을 치료 또는 예방하고자 할 때, ERK1/2를 표적으로 하는 약물을 개발 할 수 있을 것으로 판단된다.

LPS에 의한 tissue factor의 유전자의 발현증가의 작용기전을 알아보기 위하여, tissue factor의 발현에 중요한 역할을 수행하는 전사촉진제에 대한 영향을 확인하였다. CAT reporter유전자를 transfection 시킨 후 활성을 측정한 결과 LPS는 NF-κB의 전사촉진 활성을 활성화시킴을 확인하였고, DNA 결합실험을 통하여 LPS가 NF-κB의 DNA 결합 활성을 촉진함을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 LPS가 패혈증상태에서 혈전의 생성의 개시에 중요한 역할을 하는 tissue factor의 발현을 증가시키며, 이 tissue factor의 발현에 중요한 역할을 수행하는 전사촉진제인 NF-κB의 DNA결합을 증가시키고,

이를 통하여 tissue factor의 mRNA 발현에 중요한 역할을 수행함을 확인할 수 있었다. Tissue factor의 유전자발현에 NF-κB가 중요하다는 사실은 NF-κB의 활성을 특이적으로 저해하는 pyrrolidine dithiocarbamate가 tissue factor의 유전자발현도 억제한다는 보고에 의해 확인되었다(17, 17-1). NF-κB는 자극 받지 않은 세포의 세포질에, 억제자인 IκB와 결합한 상태로 존재한다. 어떤 외부자극에 의해 큰 포식세포가 활성화되면 IκB의 인산화가 초래되어 NF-κB로부터 떨어져 나오게 된다. 유리된 NF-κB은 핵으로 이동해서 NF-κB 결합부위와 결합하게 되면, 다양한 유전자의 발현을 자극하게 된다.

PAI-1 유전자의 발현 역시 tissue factor와 마찬가지로 LPS에 의해 증가되고, ERK1/2에 의한 신호전달이 중요함을 확인하였다. 패혈증에 의한 혈전증의 유발에는 fibrin clot의 생성 못지않게 fibrin clot의 제거시스템을 억제하는 것이 중요하다. Fibrin clot의 제거는 생성될 때와 마찬가지로 protease cascade에 의해 신호가 증폭되어 일어난다(13). Serine protease인 plasminogen activator가 plasminogen을 활성형의 serine protease plasmin으로 변형시키고 이렇게 생성된 plasmin이 fibrin clot을 제거한다(13). Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)은 빠르고도 특이적으로 plasminogen activator를 저해하여 fibrin clot의 제거를 방해한다. PAI-1의 활성은 tissue factor의 경우와 마찬가지로 혈전증을 유발하는 질병상태에서 증가하며, 흰쥐와 생쥐에서 LPS가 PAI-1 mRNA발현을 유도한다는 사실이 보고 되었다(14-17). 본 연구를 통하여 ERK1/2 억제제가 PAI-1 유전자의 발현을 억제함을 밝힘으로써, ERK1/2 경로가 PAI-1 유전자 발현에 중요함을 확인하였다.

PAI-1유전자의 발현조절기전을 더 명확하게 규명하기 위하여 전사촉진제에 대한 영향을 분석하였다. PAI-1유전자의 발현조절에는 AP-1이 중요한

역할을 하는 것으로 알려져 있다(21, 22). AP-1은 c-jun과 c-fos 계열 단백질의 heterodimer로 구성되어 있고, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)나 LPS등이 세포를 자극하면 핵으로 이동하여 AP-1 결합부위에 결합하여 유전자의 발현을 촉진하는 것이다. CAT reporter유전자를 transfection 시킨 후 활성을 측정한 결과 LPS는 AP-1의 전사촉진 활성을 활성화시킴을 확인하였고, DNA결합실험을 통하여 LPS가 AP-1의 DNA 결합 활성을 촉진함을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 LPS가 패혈증상태에서 혈전의 용해를 억제하는 PAI-1의 발현을 증가시키며, 이 PAI-1의 발현에 중요한 역할을 수행하는 전사촉진제인 AP-1의 DNA결합을 증가시키고, 이를 통하여 AP-1의 mRNA 발현에 중요한 역할을 수행함을 확인할 수 있었다.

LPS는 큰 분자크기를 갖고 있고, 세포 안으로 침투하지 못하여 세포막 수용체에 작용한다. LPS분자는 CD14와 결합하고, PKC와 PKA와 같은 신호전달체계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(36,37). 일련의 신호전달경로를 통해서 NF-κB/Rel나 AP-1의 활성을 증가시키면 tissue factor와 PAI-1을 포함한 여러 염증 유전자 전사활성화를 유도한다. LPS의 막수용체는 몇몇 막단백질들이 대식세포의 수용체로 작용하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, CD14과 Toll-like receptors (TLRs)등이다. CD14는 단핵구와 호중구에서 잘 발현되는 55-kDa의 glycosylphosphatidylinositol-anchored protein으로(38) LPS수용체라고 알려져 있으며, LPS와 강하게 결합한다. TLRs는 포유류 막투과성 단백질군을 구성하고, 신생면역인식에서 중요한 역할을 한다(39, 40).

Tssue factor와 PAI-1 유전자가 LPS에 의해 발현이 증가됨으로써 혈액응고 cascade의 자극과 fibrin 용해 시스템의 저해가 동시에 이루어져서 과응고상태를 유발할 수 있다(41). 따라서, ERK1/2 경로 억제제가 전사촉진제인 NF-κB와 AP-1의 활성을 조절하여 tissue factor와 PAI-1의 발현을 조절한

다는 것은 혈액응고 cascade와 fibrin 용해 시스템을 동시에 조절함으로써 endotoxin에 의해 유발되는 혈전증을 막을 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

V. 결론

1. Endotoxin은 전사촉진제인 NF-κB와 AP-1의 활성을 증가시켜, 혈전의 생성에 중요한 tissue factor와 PAI-1 유전자의 발현을 증가시켰다.

2. Protein kinase 억제제들은 endotoxin에 의한 tissue factor와 PAI-1 유전자의 발현을 억제하였다.

3. Protein kinase억제제들은 endotoxin에 의한 NF-κB와 AP-1의 활성을 억제하였다.

4. ERK 경로 차단제인 PD98059가 가장 강하게 억제하여 ERK경로가 혈전 증유발 유전자의 발현에 더 중요한 역할을 수행함을 확인하였다.

패혈증에 의한 혈전의 생성에 tisssue factor와 PAI-1 유전자의 발현이 중요한 역할을 수행하며, 이들 유전자의 발현은 전사촉진제인 NF-κB와 AP-1에 의해 조절된다. 따라서, 이 tisssue factor와 PAI-1 유전자 그리고 NF-κB와 AP-1을 표적으로 하는 약물을 개발한다면 패혈증에 의한 혈전증을 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

VI. 참고문헌

1. Cybulsky, M. I., Chan, M. K. W. and Movat, H. Z., 1988, Biology of disease: acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor and their implication in gram-negative infection. *Lab Invest.* **58**, 365-378

2. Kincaid-Smith, P. and Whitworth, J. A., 1989, Disseminated intravascular coagulation and the kidney. *In* Hemostasis and the Kidney. Butterworth& Co., London. 191-198

3. Coalson, J. J., 1986, Pathology of sepsis, septic shock, and multiple organ failure *In* Perspective on Sepsis and Septic Shock. Society of Critical Care Medicine. Fullerton, CA., 27-59

4. Morrison, D. C. and Ryan, J. L., 1987, Endotoxins and disease methanisms. *Annu. Rev. Med.* **38**, 417-432

5. Edgington, T. S., Mackman, N., Brand, K. and Ruf, W., 1991, The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb. Haemostasis* **66,** 67-79

6. Broze, G. J., Jr. 1982, Binding of human Factor VII and VIIa to monocytes. *J. Clin. Invest.* **70,** 526-535

7. Gregory, S. A., Morrissey, J. H. and Edgington, T. S. 1989,

Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procagulant response to endotoxin. *Mol. Cell. Biol.* **9,** 2752-2755

8. Crossman, D. C., Carr, D. P., Tuddenham, E. G. D., Pearson, J. D. and McVey, J. H. 1990, The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J. Biol. Chem.* **265,** 9782-9787

9. Osterud, B. and Fagegstad, T. 1983, Increased tissue thromboplastin activity in monocytes of patients with meningococcal infection to an unfacorable prognosis, *Thromb. Haemostasis* **49,** 5-7

10. Warr, T. A., Rao, L. V. M. and Rapaport, S. I. 1990, Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plsma extrinsic pathway inhibitor activity, *Blood* **75,** 1481-1489

11. Mackman, N., Sawdey, M. S., Keeton, M. R. and Loskutoff, D. J. 1993, Murine tissue factor gene expression in vivo: tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am. J. Pathol.* **143,** 76-84

12. Norris, L. A., Weldon, S., Nugent, A. and Roche, H. M. 2006, LPS induced tissue factor expression in the THP-1 monocyte cell line is

attenuated by conjugated linoleic acid. *Thromb. Res.* **117,** 475-480

13. Vassalli, J. D., Sappino, A. and Belin, D. 1991, The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* **88,** 1067-1072

14. Hamsten, A., Wiman, B., deFaire, U. and Blomback, M. 1985, Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N. Eng. J. Med.* **313,** 1557-1563

15. Tabernero, M. D., Estelles, A., Vicente, V., Alberca, I. and Aznar, J. 1989, Incidence of increased plasminogen activator inhibitor in patients with deep venous thrombosis and/or pulmonary embolism. *Thromb. Res.* **56,** 565-570

16. Quax, P. H. A., van den Hoogen, C. M., Verheijen, J. H., Padro, T. Zeheb, R., Gelehrter, T. D., van Berkel, T. J. C., Kuiper, J. and Emeis, J. J. 1990, Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rat tissues *in vivo. J. Biol. Chem.* **265,** 15560-15563

17. Sawdey, M. S. and Loskutoff, D. J. 1991, Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression *in vivo.* Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-α, and transforming growth factor-β. *J. Clin. Invets.* **88,**

1346-1353

18. Arndt, P. G., Young, S. K. and Worthen, G. S. 2005, Regulation of lipopolysaccharide-induced lung inflammation by plasminogen activator inhibitor-1 through a JNK-mediated pathway. *J. Immunol.* **175,** 4049-4059

19. Orthner, C. L., Rodgers, G. M. and Fitzgerald, L. A. 1995, Pyrrolidine dithiocarbamate abrogates tissue factor expression by endothelial cells: evidence implicating nuclear factor-kappa B in TF induction by diverse agonists. *Blood* **86,** 436-443

20. Wang, L., Wei, W., Hu, Y., Song, S. and Yan, Z. 2004, An oligonucleotide decoy for nuclear factor-kappa B inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced human umbilical cord vein endothelial cell tissue factor. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **15,** 483-490

21. Descheemaeker, K. A., Wyns, S. Nelles, L., Auwerx, J. Ny, T. and Collen, D. 1992, Interaction of AP-1-, AP-2-, and Sp-1-like proteins with two distinct sites in the upstream regulatory region of the plasminogen activator inhibitor-1 gene mediates the phorbol 12-myristate 13-acetate response. *J. Biol. Chem.* **267,** 15086-15091

22. Guo, B., Inoki, K., Isono, M., Mori, H., Kanasaki, K., Sugimoto, T., Akiba, S., Sato, T., Yang, B., Kikkawa, R., Kashiwagi, A., Haneda, M. and Koya, D. 2005, MAPK/AP-1-dependent regulation of PAI-1 gene expression by TGF-beta in rat mesangial cells. *Kidney Int.* **68,** 972-984

23. Chomczynski, P. and Mackey, K., 1995, Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal. Biochem.* **225**, 163-164

24. Pierce, J. W., Lenardo, M. and Baltimore, D. 1988, Oligonucleotide that binds nuclear factor NF-kappaB acts as a lymphoid-specific and inducible enhancer element, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85,** 1482-1486

25. Jain, J., Valge-Archer, V. E. and Rao, A. 1992, Analysis of the AP-1 sites in the IL-2 promoter. J. Immunol. 148, 1240-1250

26. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. 1982, Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2,** 1044-1051

27. Jeon, Y. J., Yang, K. H., Pulaski, J. T. and Kaminski, N. E. 1996, Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of

nuclear factor- kappa B/Rel activation. *Mol. Pharmacol.,* **50**, 334-341

28. Dunnett, M. 1955, A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Statistics, Assoc.,* **50**, 1096-1121

29. Soga, S, Kozawa, T., Narumi, H., Akinaga, S., Irie, K., Matsumoto, K., Sharma, S. V., Nakano, H., Mizukami, T. and Hara M. 1998, Radicicol leads to selective depletion of Raf kinase and disrupts K-Ras-activated aberrant signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273,** 822-828

30. Roe, S. M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. and Pearl, L. H. 1999, Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.* **42,** 260-266

31. Takehana, K., Sato, S., Kobayasi, T. and Maeda, T. 1999, A radicicol-related macrocyclic nonaketide compound, antibiotic LL-Z1640-2, inhibits the JNK/p38 pathways in signal-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257,** 19-23

32. Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., et al. 1995, SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase

homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **364,** 229-233

33. Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. and Saltiel, A. R. 1995, A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92,** 7686-7689

34. Drake, T. A., Morriseey, J. H. and Edgington, T. S. 1989, Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. *Am. J. Pathol.* **134,** 1087-1097

35. Ruf, W. and Dickinson, C. D. 1998, Allosteric regulation of the cofactor-dependent serine protease coagulation factor VIIa. *Trends Cardiovasc. Med.* **8,** 350-356

36. Muroi, M. and Suzuki, T. 1993, Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell. Signal.* **5,** 289-298

37. Novotney, M., Chang, Z. L., Uchiyama, H. and Suzuk,i T. 1991, Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines, *Biochemistry* **30,** 5597-5604

38. Goyert, S. M., Ferrero, E., Rettig, W. J., Yenamandra, A. K., Obata, F. and Le Beau, M. M. 1988, The CD14 monocyte differentiation

antigen maps to a region encoding growth factors and receptors, *Science* **239,** 497-500

39. Kopp, E. B. and Medzhitov, R. 1999, The Toll-receptor family and control of innate immunity, *Curr. Opin. Immunol.* **11,** 13-18

40. Kaisho, T. and Akra, S. 2006, Toll-like receptor function and signaling, *J. Allergy Clin. Immunol.* **117,** 979-987

41. Ware, L. B., Bastarache, J. A. and Wang, L. 2005, Coagulation and fibrinolysis in human acute lung injury-new therapeutic targets?, *Keio J. Med.* **54,** 142-149