

의학 석사학위 논문

혈액세포에서 MEK1/2 억제제 U0126에
의한 부착분자의 발현 증가

아주대학교 대학원

의학과

박성례

혈액세포에서 MEK1/2 억제제 U0126에
의한 부착분자의 발현 증가

지도교수 문 창 현

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

박 성 례

박성례의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 문 창 현 인

심사위원 이 수 환 인

심사위원 정 이 숙 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

혈액세포에서 MEK1/2 억제제 U0126에 의한 부착분자의 발현 증가

목적: 세포부착분자는 혈관 병변 부위에서 TNF- α 나 IL- β 등의 proinflammatory cytokine의 분비에 의해 혈관 내피세포 표면이나 백혈구세포에서 발현된다고 알려져 있다. 발현된 부착분자는 백혈구와 단핵구 등과의 세포 간 상호작용에 관여함으로써 일련의 염증반응을 매개하여 조직의 손상을 가속화한다고 알려져 있다. 이러한 염증반응에서의 부착분자 발현과정에 MAP Kinase pathway가 연관된다는 것을 시사하는 많은 연구결과가 보고 되었다. 따라서 본 연구에서는 혈액세포인 U937 세포에서 MEK/ERK 조절물질을 이용하여 부착분자의 발현조절과 MEK/ERK의 관계를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법: U937 혈액세포를 사용하였으며, 2% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지 조건에서 MEK1/2 억제제인 U0126을 처리한 후 flow cytometry를 통해서 부착분자의 발현변화를 관찰하였다. 혈액세포에서 증가된 부착분자의 발현이 내피세포와의 부착에 관여하는지 adhesion assay를 통해서 관찰하였다. U0126의 작용이 세포생장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 부착분자의 발현을 증가시키는 U0126의 작용이 U937 세포에 특이적인 현상인지 알아보기 위해서 다른 종류의 세포주 즉, 혈관내피세포, T 림프세포, 섬유아세포에서 U0126에 의한 부착분자의 발현 변화를 confocal microscopy를 통해 확인하였다.

결과: U937세포에 U0126 (1, 3, 10, 20 μ M)을 처리한 경우 U0126의 농도에 의존적으로 integrin- β 2 (CD11b)와 L-selectin (CD62L)의 발현이 증가하였다. U937

세포와 bEnd.3 세포간의 부착반응 역시 U0126 (10 μ M)에 의하여 증가하였다. U0126은 부착분자의 발현을 증가시키는 농도 (1, 3, 10, 20 μ M)범위에서 세포의 viability에는 별다른 영향을 미치지 않음을 MTT assay를 통하여 확인하였다. U0126은 농도 의존적으로 ERK의 활성을 억제하였다. U0126에 의한 부착분자의 발현증가에 관여하는 매개인자를 알아보기 위해 여러 억제제에 의한 영향을 관찰한 결과, trolox와 rottlerin을 전 처리했을 때 U0126에 의한 CD11b의 증가가 억제되었다. SN50과 LY90062을 처리했을 때에는 U0126에 의한 CD11b의 증가가 억제되지 않았다. U0126의 작용이 다른 종류의 세포에서도 나타나는 현상인지 U0126을 처리하여 알아본 결과, T 림프세포에서 U0126에 의해 CD11b의 발현이 증가되는 것을 관찰하였고, 뇌혈관세포와 섬유아세포에서 U0126에 의해 ICAM-1의 발현이 증가되지 않음을 확인할 수 있었다.

결론: 혈액세포인 U937 세포에서 MEK1/2 억제제인 U0126에 의하여 부착분자의 발현이 증가하는 현상을 확인하였다. U0126의 부착분자 증가작용과 U0126에 의한 ERK의 활성억제 작용 간에 correlation이 좋게 나타났으므로, 두 작용이 서로 연관되어있을 가능성이 시사되었다.

핵심되는 말: U0126, 혈액세포, 부착분자, ERK

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림 차례	v
표 차례	vi
약어	vii
I. 서론	1
A. 세포부착분자	1
B. 세포부착분자와 신호전달	3
C. 연구목적	5
II. 재료 및 방법	6
A. 실험기기 및 시약	6
1. 실험시약	6
2. 실험기구	7
B. 연구방법	8
1. 세포배양	8
2. 실험조건	8
3. 세포사멸 측정: MTT assay	8
4. 세포부착분자 측정: Flow cytometry	9
5. 세포부착측정	9
6. 면역조직화학검사법	9
7. Western blotting	10
8. 통계처리	10
III. 결 과	11
A. U0126에 의한 세포부착분자의 발현 변화	11
B. U0126에 의한 혈액세포와 내피세포간의 세포부착	11

C. U0126에 의한 세포성장	11
D. U0126에 의한 MEK과 ERK MAPK의 활성 변화	17
E. U1026에 의한 부착분자 증가와 ROS와 PKC와의 연관성	17
F. 다른 세포주에서 U0126에 의한 세포부착분자의 발현변화	17
IV. 고찰	26
V. 결론	31
참고문헌	32
영문요약	38

그림 차례

Fig. 1. Leukocyte infiltration	2
Fig. 2. Expression of CD11b by U0126 in U937 cells	12
Fig. 3. Expression of CD11b by U0126 in U937 cells	13
Fig. 4. Expression of CD62L by U0126 in U937 cells	14
Fig. 5. Effect of U0126 on adhesion of U937 cells to endothelial cells	15
Fig. 6. Effect of U0126 on the cell viability in U937 cells	16
Fig. 7. Activation of ERK and MEK by U0126 in U937 cells	19
Fig. 8. Effect of LY90062, SN50 and PKC inhibitors on U0126-induced CD11b expression in U937 cells	20
Fig. 9. Effect of rottlerin & trolox on U0126-induced CD11b expression in U937 cells	21
Fig. 10. Expression of CD11b by U0126 in Jurkat cells	22
Fig. 11. Expression of CD11b by PD98059 in Jurkat cells	23
Fig. 12. Activation of ERK and MEK by U0126 in Jurkat cells	24
Fig. 13. Expression of ICAM-1 by U0126 in bEnd.3 & NIH3T3 cells	25
Fig. 14. Diagram of U0126-induced adhesion molecule expression	31

표 차례

Table. 1. Adhesion molecules in leukocyte infiltration	3
--	---

약 어

CD11b: CD11b/CD18 (Mac-1)

CD62L: L-selectin

CTL: control

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

ERK: extracellular signal-related kinase

ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1

MAPK: mitogen activated protein kinase,

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

PI3K: phosphoinositide-3 kinase

PKC: protein kinase C

ROS: reactive oxygen species

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

I. 서 론

A. 세포부착분자

세포부착분자 (adhesion molecule)는 세포표면에서 발현되는 glycoprotein으로 neoplastic diseases와 같은 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 백혈구의 표면에서 receptor로서 발현되는 분자들과 그들의 표적세포의 표면에 ligand로서 발현되는 분자들 간의 상호작용은 세포와 세포사이의 관계에서 중요한 과정으로 알려져 있다 (Elangam 등, 1997). 염증부위에서 백혈구에 의한 혈관내피세포나 기저막으로의 침윤현상 (infiltration)은 백혈구와 내피세포 표면에 여러 부착분자의 발현을 매개로 하여 발생된다. 세포부착분자는 immunoglobulin superfamily, integrin family, selectin, cadherin으로 나눌 수 있다 (Table. 1). Selectin은 침윤현상의 초기단계에 발현되는 부착분자로 칼슘 의존적으로 heterophilic 결합을 하며 특정 oligosaccharide와 결합을 한다. Selectin의 종류에는 leukocyte에서 발현되는 L-selectin과 혈소판과 내피세포에서 발현되는 P-selectin, 그리고 내피세포에서 발현되는 E-selectin이 있다. Integrin은 주로 백혈구에서 발현되는 부착분자로 β 2-integrin family인 LFA-1 (CD11a/CD18)과 Mac-1 (CD11b/CD18), 그리고 p150, 95 (CD11c/CD18)이 있다. Integrin은 세포와 세포뿐만 아니라 세포와 세포의 기질의 상호작용을 매개하는 부착분자이다. 세포간 혹은 세포 기질과의 상호작용은 정상적인 세포의 기능을 유지하는데 매우 중요할 뿐 아니라, 외부로부터의 신호전달 및 염증반응의 개시, 종양의 증식 및 이동과 신생 혈관 생성과 같은 다양한 병적 상태에서도 핵심적인 역할을 한다고 알려져 있다 (최철희, 2003). Integrin은 immunoglobulin superfamily의 receptor로 작용하여 침윤현상이 나타날 때 백혈구가 내피세포로 단단히 부착할 수 있게 도와주는 역할을 한다. Cadherin은 침윤반응에는 직접 관여하지 않으며 세포와 세포사이의 상호작용에 관여하는 부착분자이다. Immunoglobulin superfamily는 주로 내피세포에서 발현되는 부착분자로 ICAM-1과 VCAM-1, PECAM-1 등이 있으며, integrin

family와 결합을 하게 된다. 혈관 병변 부위에서 TNF- α 나 IL- β 등의 proinflammatory cytokine이 분비되어 혈관 내피세포 표면에 immunoglobulin superfamily, integrin family, selectin 등의 부착분자들이 발현됨으로써 백혈구와 단핵구 등과의 상호작용이 증가되는 일련의 염증반응을 지속적으로 가속화시킴으로써 혈관병변을 증가시킨다고 알려져 있다 (Fig. 1). 그러므로 혈관 질환에서 부착분자의 발현 조절을 통한 과도한 염증반응의 억제가 중요하다고 할 수 있다.

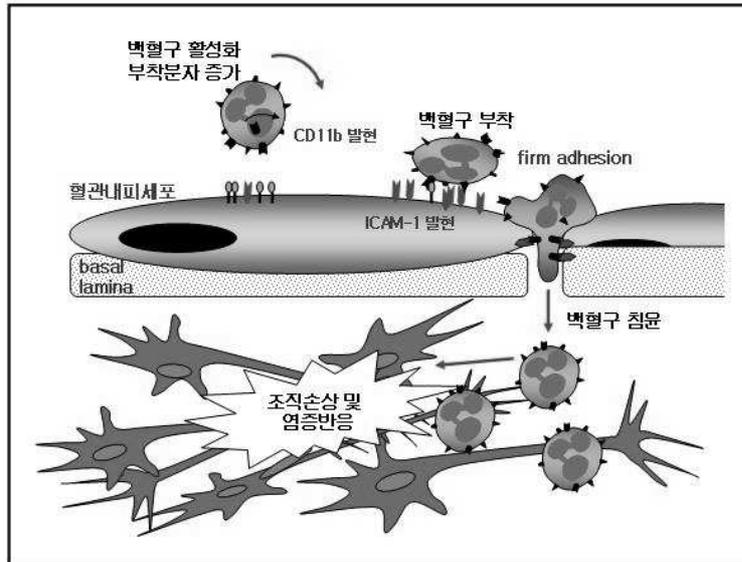


Fig. 1. Leukocyte infiltration

Table. 1. Adhesion molecules in leukocyte infiltration.

Adhesion molecule	Name	Ligand	Function
Selectin family	L-selectin (CD62L)	GlyCAM, sialyl-Lewis ^x	Rolling
	E-selectin (CD62E)	SSEA-1, sialyl-Lewis ^x	
	P-selectin (CD62P)	PSGL-1, sialyl-Lewis ^x	
Integrin family	CD11a/CD18 (LFA-1)	ICAM-1, ICAM-2	Adherence and transmigration
	CD11b/CD18 (Mac-1)	ICAM-1, iC3b	
	CD11c/CD18 (p150,95)	iC3b	
	CD49d/CD29 (VLA-5)	fibrinogen	
Immunoglobulin superfamily	ICAM-1 (CD54)	LFA-1, Mac-1	Adherence and transmigration
	ICAM-2 (CD102)	LFA-1	
	VCAM-1 (CD108)	VLA-4	
	PECAM-1 (CD31)	CD31 (homophilic)	

B. 세포부착분자와 신호전달

특정자극에 의한 부착분자의 발현에 관여한다고 알려진 단백질들은 protein tyrosine kinase, PI3-kinase, MAP kinase, PKC, ROS 등이 있다. 그 중 MAP kinase는 intracellular signaling을 매개하는 serine-threonine protein kinases family로써 외부로부터 전달된 신호를 세포막으로부터 핵으로 전달함으로써 세포의 성장과 분화, 그리고 사멸을 조절하는 주요 신호전달계이다. MAP kinase는 extracellular signal-regulated protein kinases (ERK), p38 MAP kinase and c-Jun N-terminal protein kinases (JNKs) / stress-activated protein

kinases (SAPKs) 등 3 가지 이상의 종류로 나뉘어 진다. MAP Kinase pathway 는 염증반응에서 활성화된다고 알려져 있으며 활성화된 MAP Kinase는 부착분자의 발현 증가에 중요한 작용을 하고 있다고 보고 되어져 있다. HUVEC 세포에서 CoCl₂에 의해 유도된 신호전달이 VCAM-1을 발현시키는데 이는 MAP Kinase와 NF- κ B를 활성화시키고, 그리고 PKC의 활성을 통해서 PECAM-1이 인산화 된다고 알려져 있다 (Chand 등, 1999). 그리고 MEK1/2 inhibitor인 PD98059가 U937 세포에서 GM-CSF나 TNF- α 를 처리했을 때 ERK를 통해 증가된 CD11b의 발현을 억제한다고 보고 되어 있다 (Emiko 등, 2002).

PKC는 효소의 활성화와 인산화에 의해 조절되는 단백질로, 세포 내 신호전달, 종양 생성, 유전자 발현, 그리고 세포성장 및 증식 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. PKC의 isotype은 12가지가 알려져 있는데 이는 다음과 같은 특징으로 세 가지로 분류될 수 있다. phospholipids (PS), calcium, diacylglycerol (DAG)에 의존적인 conventional PKC (α , β I, β II, γ)와 calcium에는 독립적이고, DAG에는 의존적인 novel PKC (δ , ϵ , η , θ , μ), 그리고 calcium과 DAG에 모두 독립적인 atypical PKC (ζ , ι , λ)가 있다 (Hongyu 등, 2003). 이러한 PKC isotype들은 다양한 유전자를 발현시키고 조절함으로써 다양한 생물학적 기능을 나타내고 또한 부착분자의 발현 증가에도 관여한다고 보고 되어 있다.

ROS는 radical과 non-radical 형태의, 산소로부터 유래된 물질들을 통칭하는 것으로 크게 두 가지의 기능을 한다. 첫째, neutrophil 등의 대식세포들로부터 방출된 많은 양의 ROS들은 박테리아와 주변 세포들의 세포막과 세포내에 존재하는 지질과 단백질을 산화시키고, 염색체에 손상을 일으켜 세포에 독성을 나타내게 된다. 둘째, 대식세포 외에 세포들에서 ROS는 세포내 신호전달에 필요한 2차 전달자로 작용하여, protein kinase C (PKC), mitogen activated protein kinase (MAPK), nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 등의 다양한 하위 신호전달계를 활성화시킨다고 알려져 있다. 또한 ROS는 pathogen invasion에 대한 방어기작, myocardial infarction, neurodegeneration, ischemic reperfusion injury, atherosclerosis, adult respiratory distress syndrome과 같은 inflammatory

disorder를 유도한다고 알려져 있다. 여러 염증 질병에서 발생하는 ROS는 하위 신호전달계를 다양하게 활성화시킴으로써 부착분자의 발현증가에 관여한다고 보고 되어 있다.

C. 연구 목적

특정자극에 의한 부착분자의 증가발현은 염증반응을 가속화시킨다고 알려져 있으며, MAPK pathway의 활성화증가와 관련되어 있다고 보고 되어 있다. 따라서 본 연구에서는 혈액세포인 U937 세포에서 MEK1/2 억제제로 알려진 U0126을 이용하여 부착분자의 발현 변화조절과 MEK/ERK의 관계를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 실험기기 및 시약

1. 실험시약

0.25% Trypsin-EDTA과 penicillin-streptomycin, 그리고 RPMI 1640은 GibcoBRL (Grand Island, NY, USA)에서, fetal bovine serum은 Hyclone (Logan, UT, USA), dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 JBI (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 세포배양에 사용하였다. 그리고 U0126과 PD98059, 그리고 trolox는 calbiochem (SanDiego, CA, USA)에서, myristoylated PKC-e V1-2는 Biomol (Plymoth Meeting, PA), rottlerin은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였다. Western blot을 위한 antibody는 cell signaling technology (Beverly, MA)에서 p-ERK, ERK, p-MEK, MEK, 그리고 HRP anti-rabbit antibody를 구입하였다. Flow cytometry를 위한 antibody는 Becton Dickinson (NJ, USA)에서 anti-mouse CD11b, anti-mouse CD62L antibody를 구입하였으며, FITC-labelled anti-mouse IgG antibody는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. Confocal microscopy를 위한 antibody는 Santa Cruz Biotechnology에서 ICAM-1 antibody를, Sigma (Louis, MO)에서 Hoechst 33258을 구입하였다. 그리고 2차 antibody로 FITC-labelled anti-rabbit IgG antibody (Alexa 488)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다.

2. 실험기구

세포 배양 및 세포를 다룰 때 incubator (Sanyo, Japan)와 clean bench (Sam Ki, Seoul, Korea), 그리고 centrifuge (Vision, Seoul, Korea)를 사용하였다. Western blot은 western kit (Bio Rad, CA)을 사용하여 LAS image analyzer (Kodak, Japan)으로 확인하였다. Flow cytometry를 할 때엔 FACS vantage (Becton Dickinson, NJ, USA)를 사용하였다. Confocal microscopy를 할 때엔 confocal laser scanning microscope CLSM (Olympus, Japan)을 사용하였으며 이 외에 Micropipette (Gilson, France), Microscope (Nikon, Japan), Ultrasonicator (Sonics & MAterials INC, Danbury, CT, USA)를 사용하였다.

B. 연구방법

1. 세포배양

본 연구에서는 ATCC에서 분양받은 혈액 세포주인 human monocyte cell line U937 세포와 human T lymphocyte cell line Jurkat 세포를 사용하였다. U937 세포와 Jurkat 세포의 배양은 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 0.1% amphotericin을 함유한 RPMI 1640 배지를 이용하여, 5% CO₂가 존재하는 37°C incubator에서 배양하였다. 그리고 bEnd.3 뇌혈관 세포와 NIH3T3 섬유아 세포의 배양은 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 0.1% amphotericin, 4.5 g/L glucose 및 1.5 g/mL sodium bicarbonate를 함유한 DMEM 배지를 이용하여, 5% CO₂가 존재하는 37°C 배양기에서 배양하였다.

2. 실험조건

Incubator (5% CO₂, 37°C)에서 배양하던 5 X 10⁵ cells/ml의 U937 세포를 2% FBS RPMI 1640 배지로 갈아준 뒤, 1~2시간 배양하였다. 그 후, 조건에 맞게 MEK1/2 억제제를 처리하여 관찰하였다.

3. 세포사멸 측정: MTT assay

Cell viability를 측정하기 위한 방법으로 살아있는 cell의 activity를 mitochondrial dehydrogenase가 soluble MTT를 water-insoluble formazan으로 바꾸는 것을 측정하는 것이다. U937 세포를 2% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에서 U0126을 농도별로 12시간 동안 처리하였다. MTT solution을 5 mg/ml가 되도록 처리하여 2시간 동안 37°C incubator에서 배양한 후 100 μ l의

solubilization buffer (5% acetic acid, 5% 1N-HCl, DMF를 1:1로 혼합하고 20% SDS buffer를 첨가)를 넣어 overnight 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 부착분자 측정 : Flow cytometry

U937 세포에 U0126을 농도별로 처리하거나, 1~24시간동안 2% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양한 뒤 세포를 모아 1X PBS로 세척하였다. 분리된 세포 (5×10^5 cells/ml)를 0.5% BSA가 첨가된 1X PBS (FACS buffer)에 Integrin- $\beta 2$ (CD11b), L-selectin (CD62L) monoclonal antibody를 (1:300) 넣은 뒤, 얼음에서 1~2시간 반응시켰다. 1시간 뒤 FACS buffer로 세척하고, FITC가 부착된 anti-mouse IgG antibody를 (1:300) FACS buffer를 넣고, 차광하여 얼음에서 1시간 반응시켰다. 1시간 뒤 FACS buffer로 세척하고, 500 ml FACS buffer를 넣은 뒤 유세포 분석기로 형광을 측정한다. 파장은 Ex 488 nm, Em 520 nm범위에서 측정하였다.

5. 세포부착측정

2% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에서 U0126을 처리하여 12시간동안 배양한 뒤 배지로 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 DMEM배지로 starvation시킨 bEnd.3 세포와 함께 1~2시간 같이 배양한 뒤 1X PBS로 부착하지 않은 세포를 조심스럽게 세척한 뒤 부착된 세포만을 전자현미경으로 관찰하였다.

6. 면역조직화학검사법

12 mm glass위에 bEnd.3와 NIH3T3 세포를 U0126을 처리하여 배양한 후, 1X HCSS로 세 번 세척하고, 10분간 100% methanol로 고정시켰다. 다시 1X HCSS로 세 번 세척한 후 3% BSA로 30분간 반응시켰다. 1X HCSS로 세 번 세

척하고 0.3% BSA가 첨가된 1X HCSS에 ICAM-1 monoclonal antibody (1:400)를 넣은 뒤 25℃에서 3시간 혹은 4℃에서 overnight 반응하였다. 1X HCSS로 세 번 세척하고 FITC가 첨가된 Alexa 488 antibody (1:400)를 넣어준 뒤 차광하여 1~2시간 반응시켰다. 그 후 두 번 세척하고 hoechst를 (1:1000) 넣어 10분 동안 반응시켰다. 세척한 뒤 mounting solution을 2 μ l을 slide glass에 넣고 그 위에 물기를 약간 제거하고 glass를 뒤집어서 올려놓았다. glass주변을 매니큐어로 마무리 한 다음 confocal microscope로 ICAM-1의 발현변화를 관찰하였다.

7. Western blotting

단백질의 발현을 알아보기 위하여 MEK1/2 억제제와 같이 배양한 U937 세포를 모아서 차가운 1X PBS (pH 7.4)로 washing 후 SDS sample buffer를 넣은 뒤, 5초씩 3초 간격으로 5회의 sonication으로 세포를 깨준다. 만들어진 sample을 10% SDS-PAGE 젤을 이용하여 전기영동을 한 뒤 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 그 후 1시간 동안 5% skim milk로 blocking하고, TBS-0.05% tween (T-TBS)로 세척하였다. 3% BSA와 0.02% NaN₃가 포함된 TBS에 p-ERK ERK, p-MEK, MEK monoclonal antibody (1:500)를 넣어 25℃에서 3시간 혹은 4℃에서 overnight 반응하였다. 그 후 발색을 위한 HRP가 첨가된 rabbit-IgG antibody (1:1000)와 1시간 동안 반응시킨 뒤 T-TBS로 세척하고 LAS를 이용하여 ERK의 발현변화를 관찰하였다.

8. 통계처리

각 자료 값은 최대값에 대한 % 값으로 나타냈고, 모든 자료는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm S.E.M.)로 나타내었다. 유의성은 student's *t*-test로 통계 처리하여 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

III. 결 과

A. U0126에 의한 세포부착분자의 발현 변화

혈액세포에서 MEK1/2 억제제 U0126에 의한 부착분자의 발현 변화를 알아보기 위해 U937 세포에 U0126을 처리한 후 flow cytometry로 분석하였다. U937 세포에 U0126 (10 μ M)을 처리한 후 4, 8, 12, 24 시간 후 CD11b의 발현 변화를 관찰한 결과, 4시간부터 CD11b의 발현이 증가하였다 (Fig. 2). U0126을 1, 3, 10, 20 μ M 농도별로 처리 하여 12시간 후에 CD11b의 발현을 관찰한 결과, 3 μ M에서부터 CD11b의 발현이 증가하였다 (Fig. 3). CD62L의 발현 변화를 U0126 1, 3, 10, 20 μ M 농도별로 처리하고 12시간 후에 관찰한 결과, 3 μ M에서부터 발현이 증가하였다 (Fig. 4).

B. U0126에 의한 혈액세포와 내피세포간의 세포부착

U937 세포에서 U0126에 의한 부착분자의 발현 증가가 혈액세포와 혈관내피세포간의 부착성에 관여를 하는지 알아보기 위하여 U0126을 12시간동안 U937 세포와 배양한 후, bEnd.3 세포와의 부착정도를 관찰하였다. 그 결과, U937 세포에 U0126 (10 μ M)을 처리한 그룹이 처리하지 않은 그룹보다 bEnd.3 세포에 많이 부착되었다 (Fig. 5).

C. U0126에 의한 세포성장

부착분자의 발현을 증가시키는 U0126이 세포생장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 U0126을 1, 3, 10, 20 μ M 농도별로 처리하여 12시간 후에 MTT assay를 수행한 결과, U0126이 세포생장에는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 6).

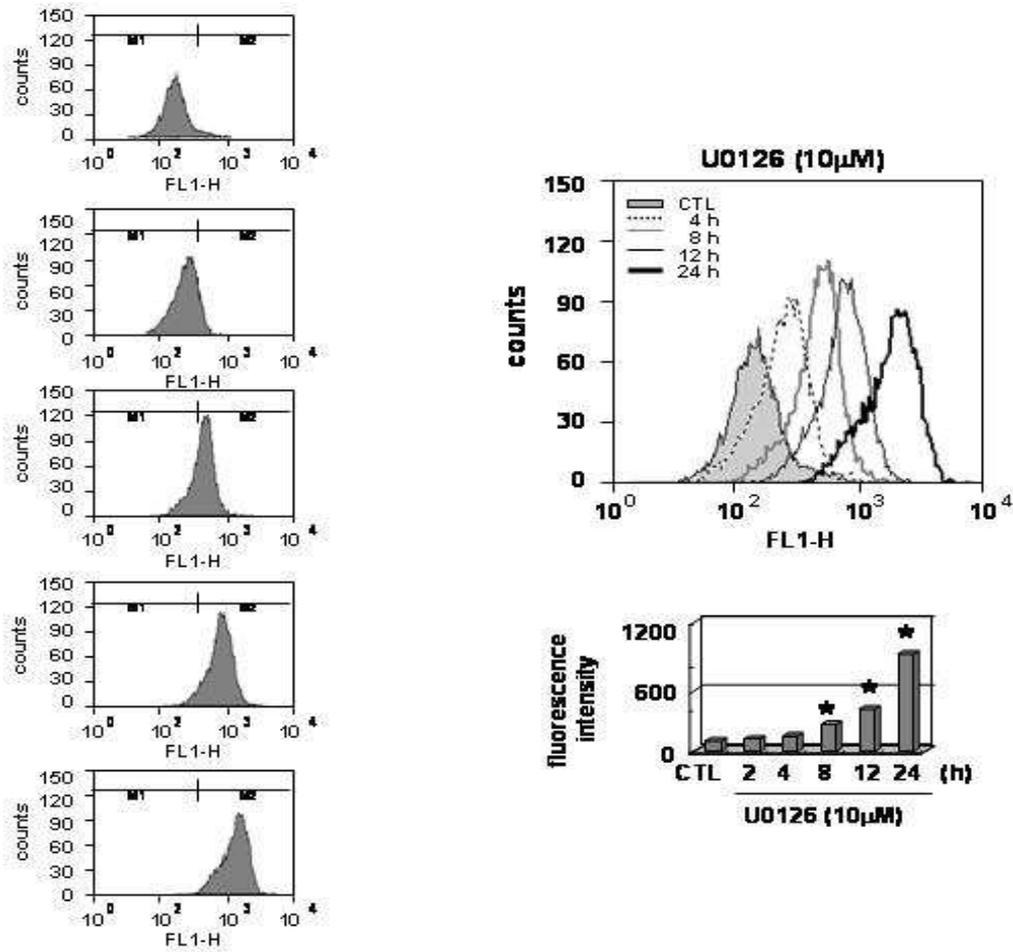


Fig. 2. Expression of CD11b by U0126 in U937 cells. U937 cells were treated with U0126 (10 μM) for indicated times (4, 8, 12, 24 h). CD11b protein was detected using mouse anti-CD11b antibody and FITC-labeled anti-mouse IgG antibody. CD11b expression was analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of 3 separate experiments. * P<0.05 vs control.

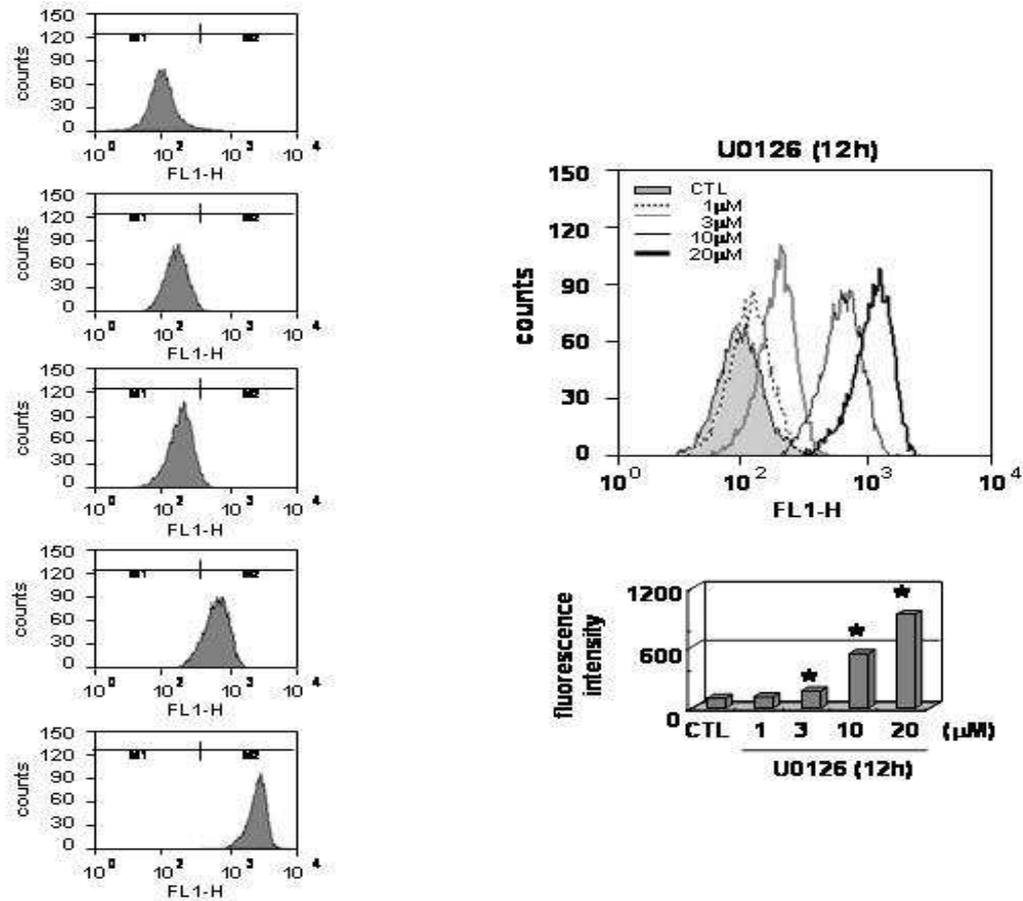


Fig. 3. Expression of CD11b by U0126 in U937 cells. U937 cells were treated with U0126 - 1, 3, 10, 20 μM for 12 h. CD11b protein was detected using mouse anti-CD11b antibody and FITC-labeled anti-mouse IgG antibody. CD11b expression was analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of 3 separate experiments. * $P < 0.05$ vs control.

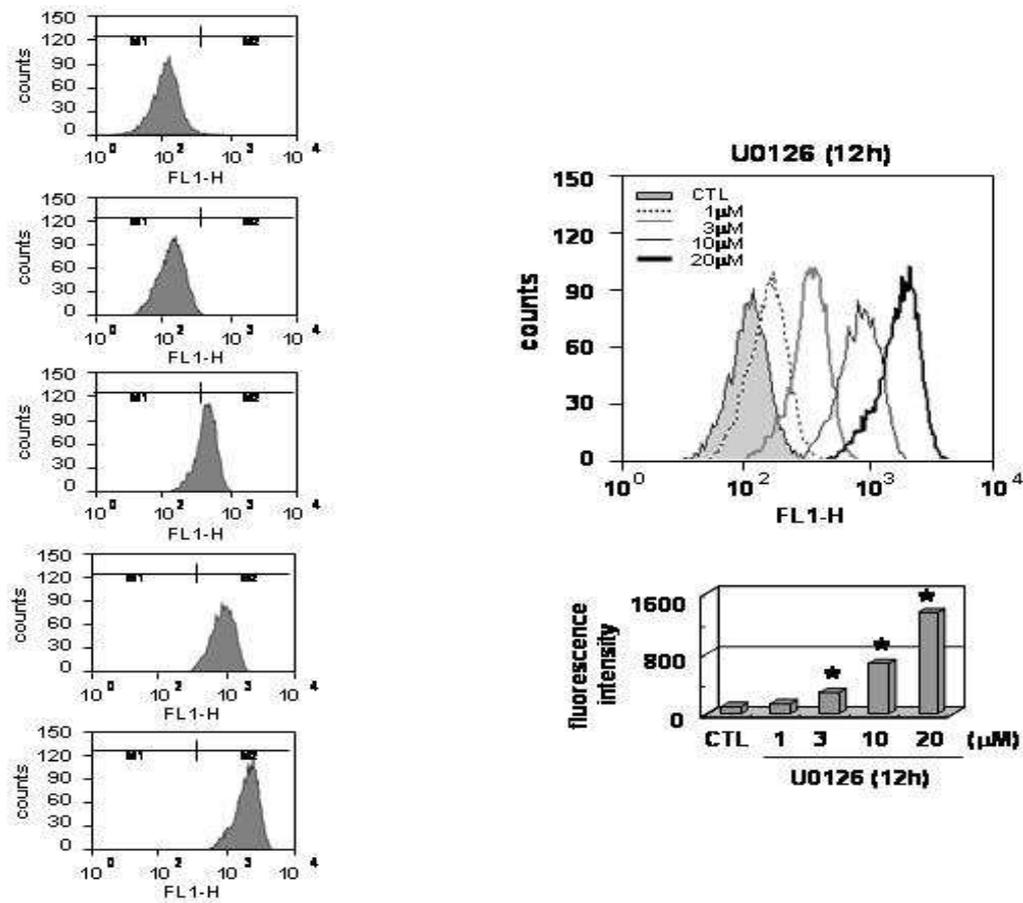


Fig. 4. Expression of CD62L by U0126 in U937 cells. U937 cells were treated with U0126 - 1, 3, 10, 20 μM for 12 h. CD62L protein was detected using mouse anti-CD62L antibody and FITC-labeled anti-mouse IgG antibody. CD62L expression was analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of 3 separate experiments. * $P < 0.05$ vs control.

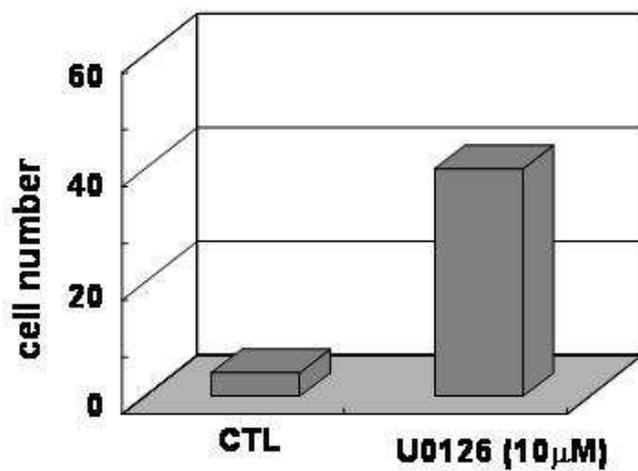


Fig. 5. Effect of U0126 on adhesion of U937 cells to endothelial cells. U937 cells were treated with U0126 (10 μM) for 12 h. U937 cells and bEnd.3 cells were co-cultured for 2h after treatment.

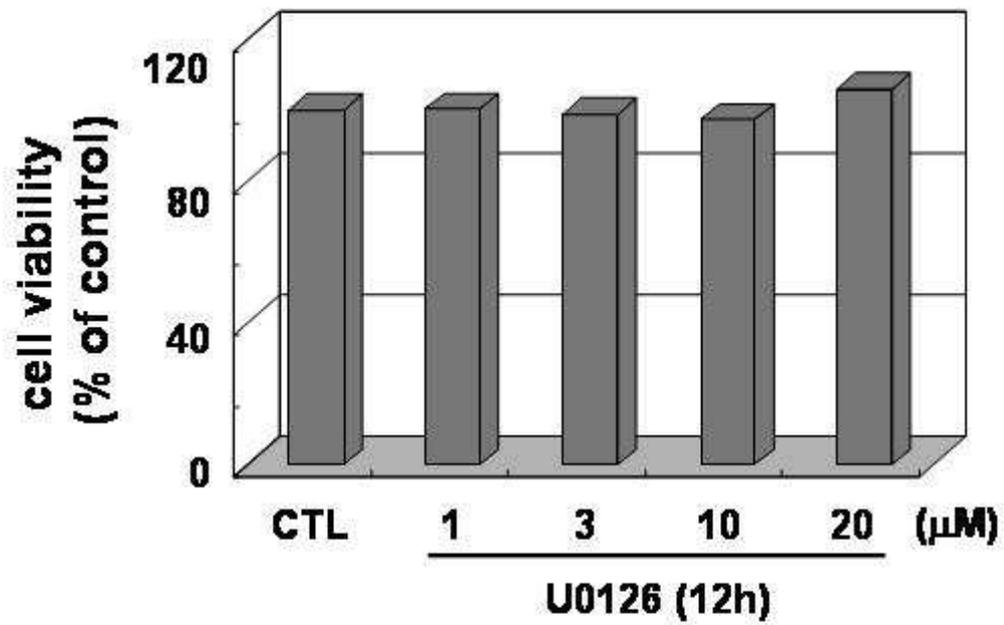


Fig. 6. Effect of U0126 on the cell viability in U937 cells. U937 cells were treated with U0126 - 1, 3, 10, 20 μM for 12 h. After 12h, cell viability was determined by MTT assay. * $P < 0.05$ vs control.

D. U0126에 의한 ERK MAPK의 활성 변화

U937 세포에서 U0126이 MEK1/2와 ERK의 활성화에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 U0126을 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 시간별로 처리한 후 western blot을 통해 관찰한 결과, MEK1/2의 활성 및 ERK 활성이 2시간에서 많이 억제되었는데 그 억제된 정도가 12시간까지 지속되는 것을 관찰하였다. U0126을 1, 3, 10, 20 μM 농도별로 12시간 처리한 후 western blot으로 관찰한 결과, U0126의 농도 의존적으로 ERK의 활성이 억제되었다 (Fig. 7).

E. U0126에 의한 부착분자 증가와 ROS와 PKC와의 연관성

특정 자극에 의한 부착분자의 발현에 ROS, PKC, PI3K, NF- κ B 등의 pathway가 관여한다고 보고가 되어 있다. 따라서 U0126에 의한 부착분자의 발현 증가에 ROS, PKC, PI3K, NF- κ B 등이 관여하는지 각각의 억제제를 사용하여 알아보았다. U937 세포에 항산화제와 PKC, PI3K, PKC, NF- κ B의 억제제를 30분 전 처리를 한 후 U0126 (10 μM)을 12시간동안 처리하여 flow cytometry를 통해서 관찰하였다. 그 결과, PI3K 억제제와 NF- κ B 억제제는 부착분자의 발현 변화에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 8). 그러나 항산화제인 trolox (50 μM)와 PKC- δ 억제제인 rottlerin (3 μM)를 처리했을 때 U0126에 의한 부착분자의 발현 증가가 억제되었다 (Fig. 9).

F. U0126에 의한 다른 세포주에서 세포부착분자의 발현변화

U0126에 의한 부착분자의 발현증가가 U937 세포에서 특이적으로 나타나는 현상인지 알아보기 위해 T 세포인 Jurkat 세포, 뇌혈관 세포인 bEnd.3 세포, 그리고 섬유아세포인 NIH3T3 세포에서 U0126에 의한 부착분자의 발현변화를 flow cytometry와 confocal microscope를 통해서 관찰하였다. 그 결과, Jurkat 세

포에 U0126을 1, 3, 10, 20 μM 처리했을 때 CD11b가 증가하였고 (Fig. 10), 다른 MEK1/2 억제제인 PD98059를 10, 20 μM 처리했을 때에도 CD11b가 증가하였다 (Fig. 11). 또한 ERK의 활성이 억제되었다 (Fig. 12). 그러나 bEnd.3 세포와 NIH3T3 세포에 U0126을 처리했을 때에는 ICAM-1의 발현이 증가되지 않았다 (Fig. 13).

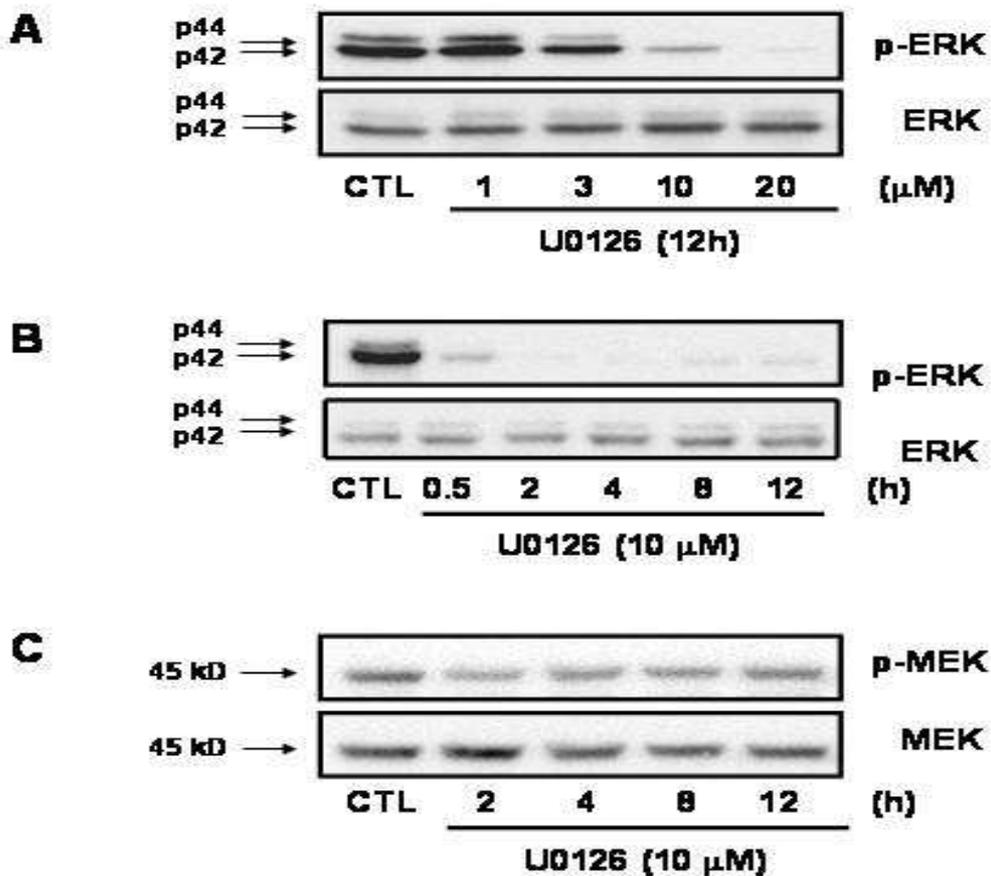


Fig. 7. Activation of ERK and MEK by U0126 in U937 cells. (A) U937 cells were treated with U0126 - 1, 3, 10, 20 μ M for 12 h. (B) U937 cells were treated with U0126 (10 μ M) for indicated times (0.5, 2, 4, 8, 12 h). ERK activation was examined by western blotting using phospho-ERK antibody. (C) U937 cells were treated with U0126 - 1, 3, 10, 20 μ M for 12 h. MEK activation was examined by western blotting using phospho-MEK antibody.

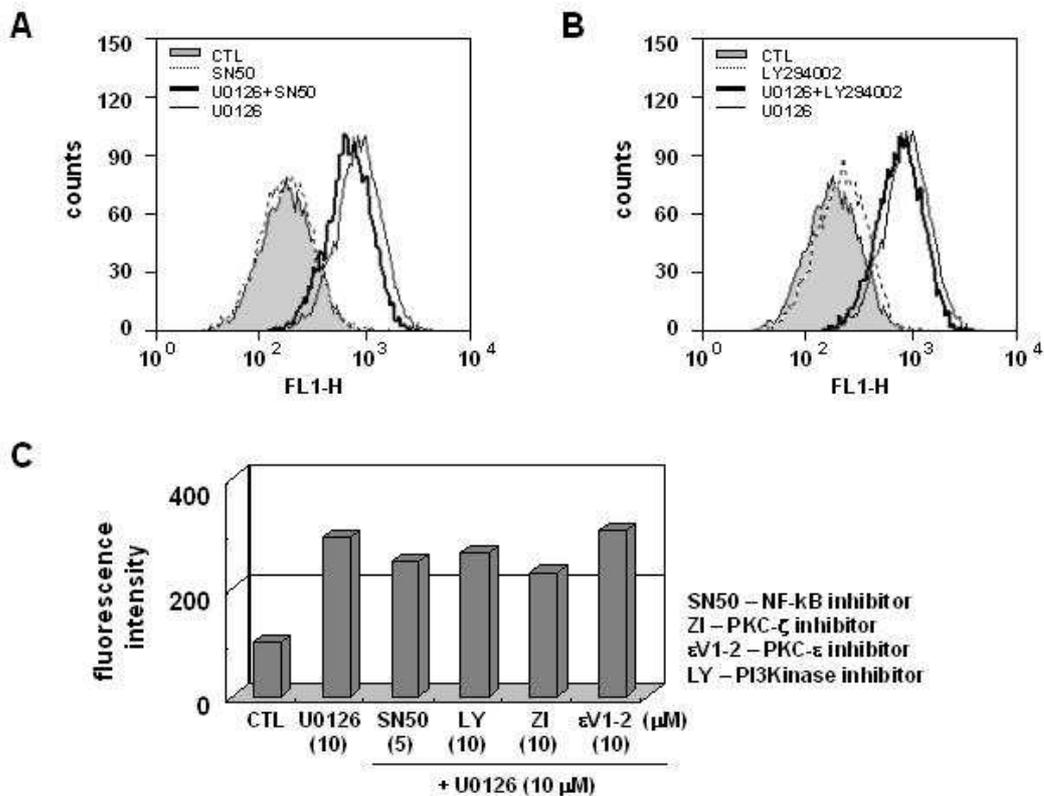


Fig. 8. Effect of LY90062, SN50 and PKC inhibitors on U0126-induced CD11b expression in U937 cells. U937 cells were pretreated with PI3K inhibitor (LY90062 50 μM) NF-κB inhibitor (SN50 5 μM) and PKC inhibitors (Myristoylated PKC-εV1-2 10 μM, PKC-ζ inhibitor 10 μM) plus U0126 (10 μM) for 12 h. CD11b protein was detected using mouse anti-CD11b antibody and FITC-labeled anti-mouse IgG antibody. CD11b expression was analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of 3 separate experiments.

* P<0.05 vs control.

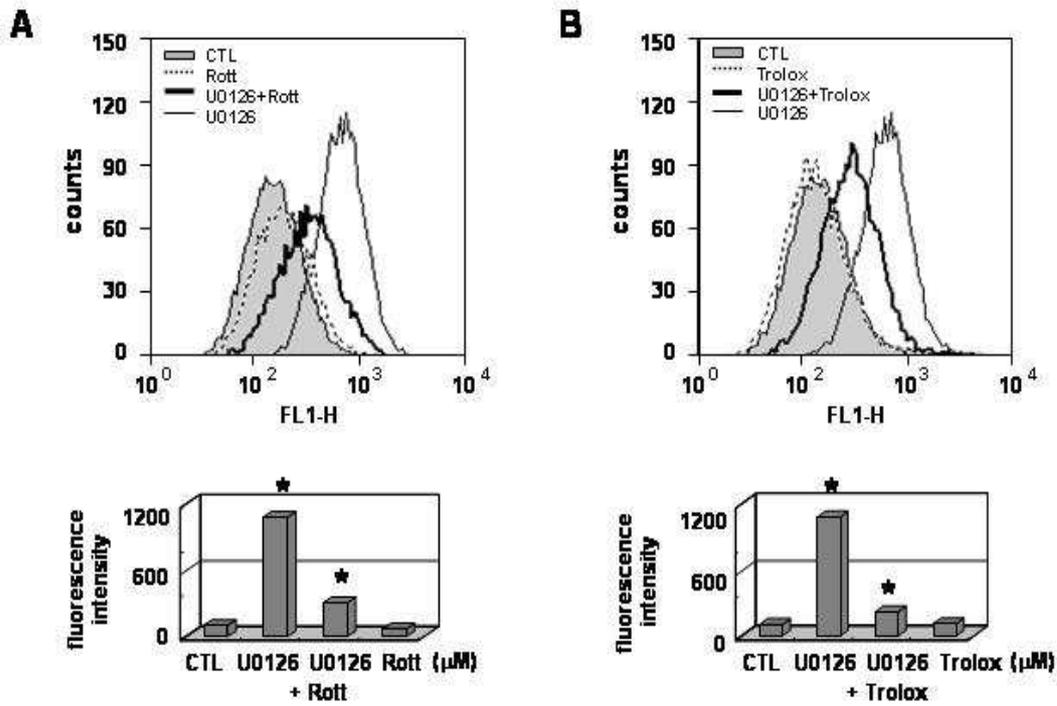


Fig. 9. Effect of rottlerin and trolox on U0126-induced CD11b expression in U937 cells. U937 cells were pretreated with PKC- δ inhibitor (rottlerin 3 μ M) and antioxidant (trolox 50 μ M) plus U0126 (10 μ M) for 12 h. CD11b protein was detected using mouse anti-CD11b antibody and FITC-labeled anti-mouse IgG antibody. CD11b expression was analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of 3 separate experiments.

* $P < 0.05$ vs control.

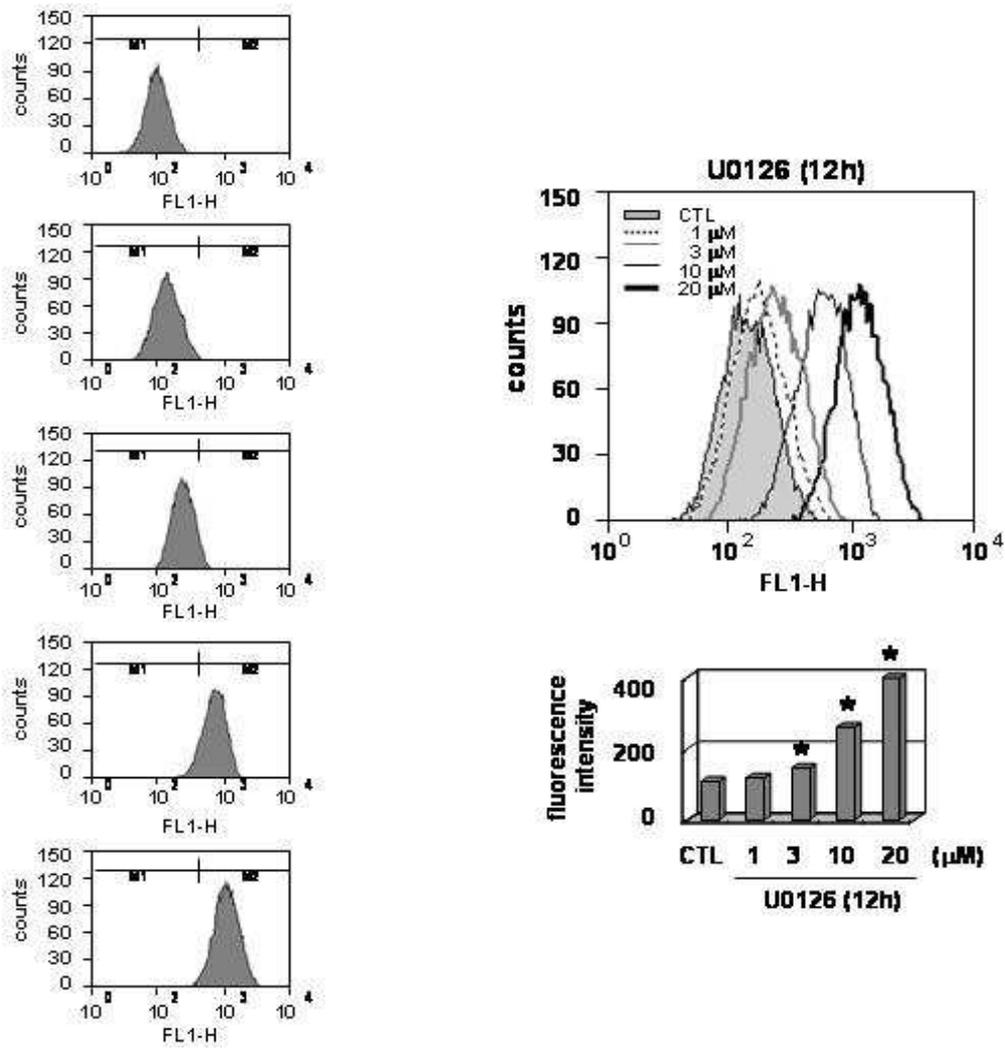


Fig. 10. Expression of CD11b by U0126 in Jurkat cells. Jurkat cells were treated with U0126 - 1, 3, 10, 20 μM for 12 h. CD11b protein was detected using mouse anti-CD11b antibody and FITC-labeled anti-mouse IgG antibody. CD11b expression was analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of 3 separate experiments. * $P < 0.05$ vs control.

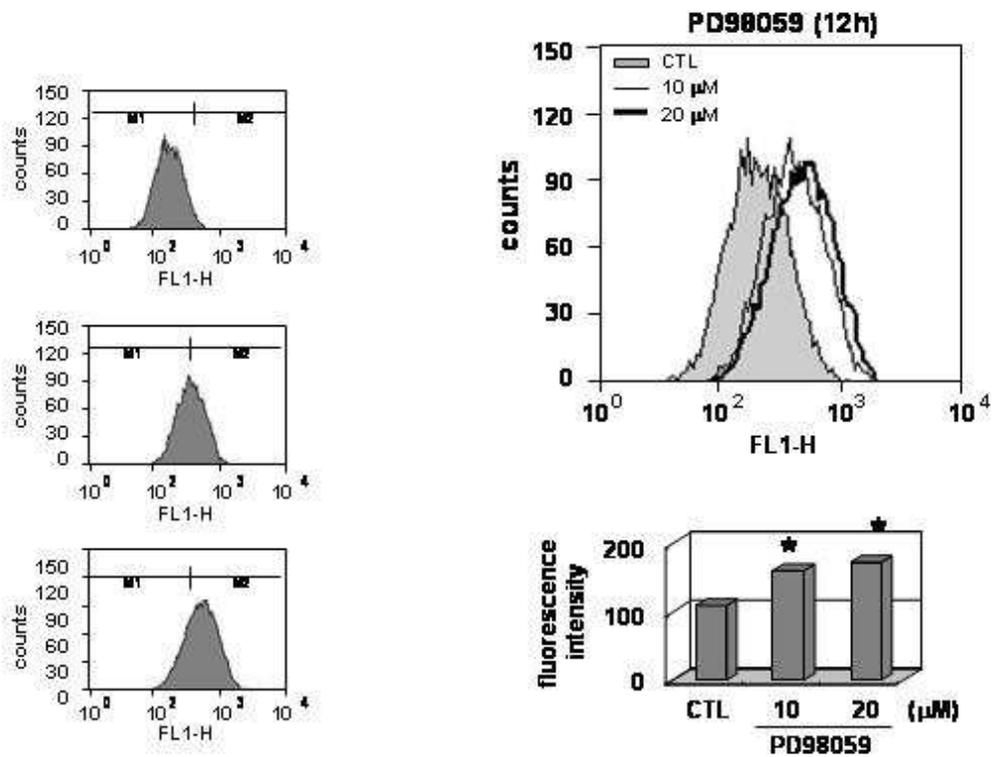


Fig. 11. Expression of CD11b by PD98059 in Jurkat cells. Jurkat cells were treated with PD98059 - 10, 20 μM for 12 h. CD11b protein was detected using mouse anti-CD11b antibody and FITC-labeled anti-mouse IgG antibody. CD11b expression was analyzed by flow cytometry. Data shown are representative of 3 separate experiments. * P<0.05 vs control.

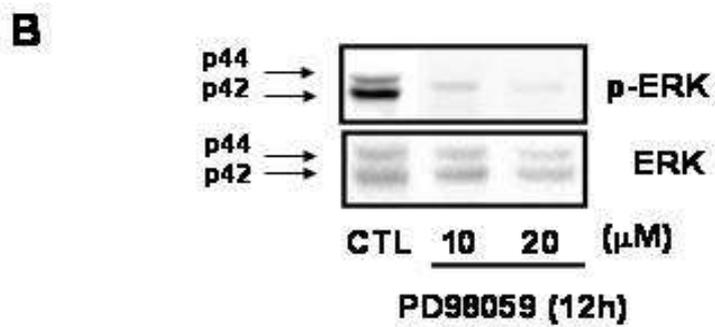
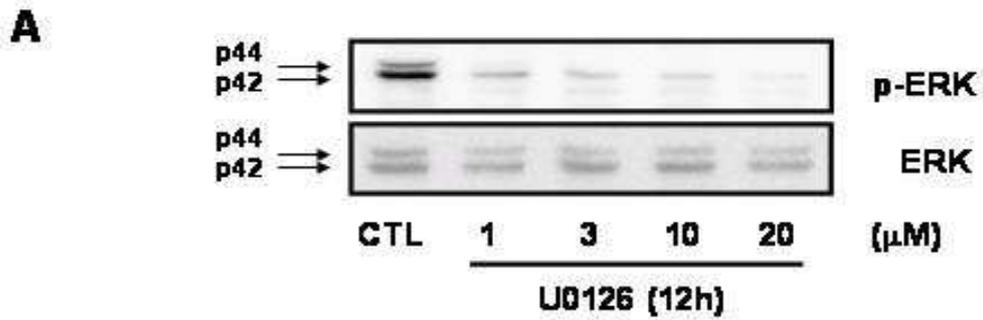


Fig. 12. Activation of ERK by U0126 in Jurkat cells. (A) Jurkat cells were treated with U0126 - 1, 3, 10, 20 μM for 12 h. (B) Jurkat cells were treated with U0126 (10 μM) for indicated times (2, 4, 8, 12h). ERK activation was examined by western blotting using phospho-ERK antibody.

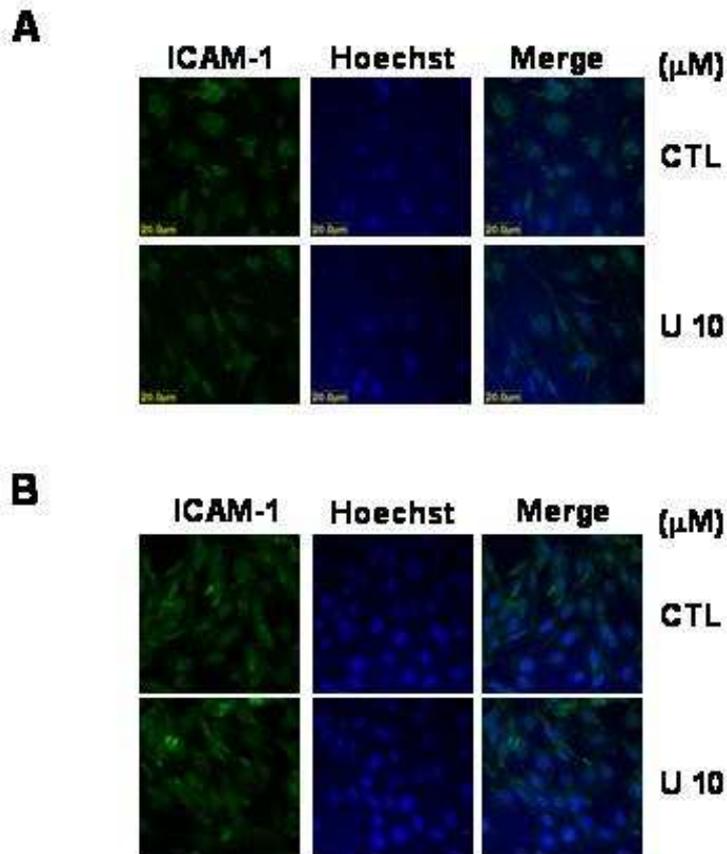


Fig. 13. Expression of ICAM-1 by U0126 in bEnd.3 & NIH3T3 cells. (A) bEnd.3 cells and (B) NIH3T3 cells were treated with U0126 (10 μM) for 12h. ICAM-1 protein was detected as green stains using anti-ICAM-1 IgG and fluorescein-labeled anti-rabbit antibody (Alexa 488). Nuclei were stained blue by hoechst to identify all present cells.

IV. 고찰

염증반응은 세포나 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상이나 자극을 받게 되면 즉각적으로 이에 대한 반응을 일으켜 손상을 극소화하고 더 나아가서 손상된 부위를 원상으로 회복시키려는 과정을 말한다. 염증반응은 특히 혈관이 있는 조직의 손상이 있을 때 일어나며, 반응의 주요역할을 하는 것이 혈관이기 때문에, 염증은 손상에 대한 혈관조직의 반응이라고 할 수 있다. 염증은 손상원인을 감소시키고, 제거하여 조직손상을 원상으로 복구시키려는 것이기 때문에 본질적으로는 인체에 유리한 것이고 방어역할을 한다. 그러나 경우에 따라서는 염증반응 자체가 치명적 결과를 가져오기도 하고 후산물로서 필요 없는 물질의 생성에 따른 장기나 기관의 기능장애 등의 후유증을 남겨 불리한 결과를 남기기도 한다. 염증반응은 혈관 손상이 왔을 때 혈류를 통해 이동하던 백혈구들이 혈관 벽 내로 침투해가는 침윤과정을 일으키게 되는데 이러한 과정에 세포 부착분자들이 관여하게 된다. 침윤과정에 관여하는 부착분자들에는 immunoglobulin superfamily, integrin family, 그리고 selectin이 있다. 손상부위로부터 분비되는 TNF- α 나 IL-1 β 와 같은 proinflammatory cytokine이나 chemokine에 의해 백혈구는 chemotaxis를 일으키고 부착분자의 발현을 촉진시킴으로써 혈관벽으로 부착을 시작하게 된다. Selectin은 혈관 손상 초기에 염증이 일어난 부위의 혈관벽에 백혈구들이 달라붙게 하는 분자로 혈관벽과의 상호작용이 느슨하여 백혈구가 혈관벽을 굴러가게 하는 rolling 현상에 작용을 한다. 백혈구 세포의 integrin은 혈관 내피세포의 ICAM-1이나 VCAM-1의 수용기로 이들 분자와의 상호작용을 통하여 구르던 백혈구들이 혈관벽에 단단히 결합해 혈관벽 내로 들어갈 수 있게 하는 역할을 한다. 이러한 과정을 firm adhesion 이라고 하는데 이로 인해 부착된 백혈구과 내피세포간의 상호작용이 커져서 혈관내벽을 통과하여 혈관벽 안으로 이동하게 되는 transmigration 과정을 일으키게 된다. 혈관벽 내로 이동한 백혈구는 혈관벽 안의 염증 반응에 의하여 대식세포로 분화를 일으키고, foam cell로 변하여 더욱 강력한 염증반응을 일으키며, NADPH oxidase나 gelatinase,

collagenase와 같은 protease의 분비를 유도하여 조직 손상을 가속화시킨다.

염증반응에 관여하는 세포 부착은 bronchial asthma, rheumatoid arthritis, atopical dermatitis, tumor metastasis, 그리고 allograft rejection에 관여한다고 알려져 있으며 (Springer 등, 1990; Wegner 등, 1990; Isobe 등, 1992), 백혈구의 침윤반응은 흔한 autoimmune endocrine diseases로 알려진 autoimmune thyroid disease (AITD)에서 관찰된다. 또한 염증반응에 관여하는 부착분자는 asthma, atherosclerosis, inflammatory bowel disease, acute respiratory distress syndrome, ischemia reperfusion injury, 그리고 autoimmune disease와 같은 다양한 inflammatory disease에서 발현된다고 알려져 있다 (Roebuck 등, 1999). 부착분자의 하나인 ICAM-1은 다양한 염증반응과 면역반응에 관여한다고 알려져 있는데 (Staunton 등, 1988), 증가된 ICAM-1의 발현은 rheumatoid arthritis, psoriasis, atherosclerosis와 같은 다양한 autoimmune diseases와 pathologic inflammatory disorders의 development에 관여한다고 보고 되어 있다 (Davies, 등 1993; Szekanecz 등, 1994). 또한 염증반응은 허혈성 뇌혈관질환의 혈관병변과 뇌혈류 장애로 인한 지속적인 이차적인 손상부위에서 나타나게 되는데 이차적 손상과정은 뇌조직 및 뇌혈관에서의 염증반응에 의해 가속화 된다. 예를 들어 brain ischemic model에서 leukocyte adhesion receptor에 특이적인 monoclonal antibody를 처리하게 되면 염증에서 나타나는 침윤반응 및 조직 손상을 감소시킨다고 보고 되어 있다. 이와 같은 보고들을 통하여 여러 염증 및 면역관련 질병에 부착분자가 관여하며, 여러 질병에서 발현되는 부착분자의 증가를 조절하는 것이 질병의 치료에 중요하다는 사실을 알 수 있다.

본 논문에서는 human monocyte cell line인 U937 세포에서 MEK 1/2 inhibitor U0126에 의한 세포부착분자의 발현변화를 연구하였다. 그 결과, U0126을 농도별로 처리했을 때 U0126에 의하여 CD11b와 CD62L이 증가하는 것을 관찰하였다. U937 세포에서 U0126에 의해 증가된 부착분자가 혈관내피세포로의 부착에 관여하는지 알아보기 위해 U937 세포와 혈관내피세포인 bEnd.3 세포를 같이 배양하여 부착정도를 확인하였다. 그 결과, U0126에 의해 U937 세포와 혈관

내피세포간의 부착이 증가된 것을 관찰하였다. 그리고 세포부착분자의 증가에 따른 U0126의 영향이 세포의 사멸이나 성장 등에 무관하다는 것을 cell viability를 통해 확인하였다. 이로써 U0126이 U937 세포에서 부착분자의 발현을 증가시키고 이로 인해 내피세포와의 부착성을 증가시킴을 시사하였다.

염증반응에 의한 부착분자의 발현 조절기전으로는 PKC나 PI3Kinase, ROS, NF- κ B 그리고 MAPKinse가 중요하다고 보고 되어 있다. 관련 보고들을 살펴보면 다음과 같다. Human monocyte 세포에서 lactosylceramide를 처리했을 때 PKC α/ϵ 의 활성을 통해서 PECAM-1의 발현을 증가시키고, monocyte 세포와 내피세포간의 부착을 증가시킨다고 알려져 있다 (Gong 등, 2004). Human endothelial cell line인 ECV304 세포에서 PMA나 TNF- α 에 의해 발현이 증가된 ICAM-1이 AP-1의 활성화와 JNK pathway를 통해서 일어난다고 보고 되어 있으며 (Hirotosugu 등, 1999), HUVEC 세포에서 thrombin에 의해 발현된 ICAM-1이 PKC- δ 와 p38 MAPK에 의한 NF- κ B의 활성을 통해 증가한다고 보고 되어 있다 (Rahman 등, 2001). Human epithelial cell인 NCI-H292 세포에서 Interferon- γ 에 의해 발현된 ICAM-1이 PKC- α 에 의해 활성화되어 monocyte와의 부착을 증가시킨다고 알려져 있고 (Chang 등, 2001), 혈관 염증반응에서 cytokine에 의해 증가된 VCAM-1의 발현이 ERK-independent하게 NF- κ B가 활성화되어 증가하며, 혈관 손상과 회복과 같은 병적 과정에 관여하는 angiotensin II에 의해 더욱 증가된다고 보고 되어져 있다 (Jiang 등 2004). Neutrophil에서 IL-1 β 를 처리하면 p38 MAPK를 통해 CD11b가 증가된다고 보고 되어 있고 (Suzuki 등, 2001), asthma mouse model의 폐 조직에서 ERK를 통해 증가한 VCAM-1이 염증반응을 증가시킨다고 보고 되어 있다 (Martin 등, 2004). 염증반응에서 neutrophils의 활성은 NADPH oxidase에 의해 superoxide를 포함한 ROS를 많은 양을 분비하게 되는데 이러한 ROS의 생성이 p38 MAPK와 PKC를 활성화시켜서 CD11b를 증가시킨다고 알려져 있다 (Wang 등, 2003). 이러한 보고들을 바탕으로 U0126에 의한 부착분자의 증가에 PKC나 PI3Kinase, NF- κ B의 활성화와 ROS의 생성이 관여하는지, 또한 ERK 억제제로 사용하는 U0126이 MEK

과 ERK의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. U0126에 의해 증가된 CD11b의 발현이 rottlerin과 항산화제를 처리하였을 때 감소되는 것을 통하여 U0126에 의한 부착분자의 발현 증가에 PKC- δ 의 활성화와 ROS의 생성이 관여할 것이라 추정되었다. 그리고 western blot으로 MEK과 ERK의 활성이 U0126의 농도가 증가함에 따라 억제되는 것을 관찰함으로써 ERK의 활성 억제가 U0126에 의해 증가하는 부착분자에 관여할 것이라 추정되었다.

U0126은 MEK1/2와 ERK MAPK 억제제로 사용되는데, 많은 보고에서 U0126이 ERK의 활성을 억제함으로써 질병이나 자극에 의한 손상을 감소시킨다고 밝혀져 있다. MAPK pathway는 inflammatory response동안에 중요하며, pro-inflammatory cytokine의 분비 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Bruce 등 2000). Breast, ovarian, 그리고 lung tumor cell line에 anti-cancer drug인 paclitaxel를 처리하면 microtubule assembly와 pro-apoptotic signaling pathway, prosurvival MEK/ERK pathway가 활성화된다고 알려져 있다. 그래서 paclitaxel과 MEK/ERK inhibitor를 같이 처리하게 되면 prosurvival MEK/ERK pathway가 억제되어 paclitaxel의 cell death효과를 더욱 증폭시킬 수 있다고 보고 되어 있다. 이로써 paclitaxel과 MEK/ERK inhibition은 새로운 anticancer strategy로 이용될 수 있다고 말하고 있다. Acute myeloid leukemia cell line에서도 U0126을 처리하게 되면 활성화된 MEK 1/2를 억제하여 myeloid leukemia의 apoptosis를 유발시킴으로써 보호 효과를 나타낸다고 보고 되어 있다. U0126에 의한 손상 보호 효과는 in vivo model에서도 많이 보고 되어 있다. Focal cerebral ischemia model에서 ERK의 활성화를 U0126을 처리하여 억제했을 때 Elk-1이 억제되고 IL-1 β 의 분비를 억제해서 ischemic brain injury를 감소시킨다고 보고 되어 있으며 (Alessandrini 등, 1999; Namura 등, 2001; Wang 등, 2004), Rat primary cultured cortical neurons에서 U0126을 처리했을 때, oxidative stress에 대하여 MAPK/ERK kinase를 억제함으로써 neuroprotection하다고 보고 되어 있다 (Takumi 등, 2000). 또한 TPA에 의해 유도된 귀부종이 U0126을 처리하여 ERK MAPK를 억제했을 때 감소되는 것을 통해서 inflammation 치료의 새

로운 목표가 될 것이라고 보고 되어 있다 (Jaffee 등 2000). 그리고 trauma후에 hydrocortisone과 U0126을 함께 처리하게 되면 circulating neutrophil에서 ROS의 생성을 억제함으로써 보호 효과를 나타낸다고 알려져 있다. Traumatic brain injury model의 mouse brain에서 U0126에 의한 ERK의 억제는 brain injury에서 pathophysiology에 중요한 역할을 하는 MMP-9의 level과 blood-brain barrier의 손상, 그리고 trauma후의 조직부종을 감소시켰으며, 또한 U0126을 처리했을 때, tight junction protein인 ZO-1의 분열을 개선시켰다. 이로써 U0126의 traumatic brain injury를 위한 새로운 치료 물질로 사용될 수 있을 것이라 보고 되었다. 이와 같이 U0126이 여러 inflammatory disease에서 ERK를 억제함으로써 보호효과를 나타낸다고 알려져 있는 반면, 우리의 실험 결과에서는 U0126을 처리했을 때 오히려 염증반응을 증가시킬 수 있는 부착분자의 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. 그러나 T 림프구 세포와 혈관내피세포와 섬유아세포에서 U0126을 처리했을 때 부착분자의 발현변화를 관찰한 결과, T 림프구 세포에서만 U0126에 의한 부착분자의 발현증가 현상이 나타나고, 혈관내피세포와 섬유아세포에서는 나타나지 않는 것을 관찰하였다. 이로써 U0126에 의한 현상이 세포에 따라 다르게 나타나는 현상일 가능성이 시사되었다. 그러므로 U0126을 치료목적으로 이용할 경우에는 U0126을 처리했을 때 세포에 따라 나타나는 부착분자의 발현증가를 염두에 두어야 할 것이라 생각된다.

이상의 결과를 종합하면, 단핵구 세포인 U937 세포에서 U0126에 의하여 부착분자 발현이 증가하였다. 그리고 U0126에 의한 adhesion molecules의 증가작용이 ERK의 활성을 억제하는 작용과 correlation이 좋으므로 두 작용이 서로 연관되어 있을 것으로 추정된다.

V. 결 론

본 논문에서는 혈액세포에서 MEK1/2 억제제 U0126에 의하여 부착분자 발현이 증가하는 현상을 확인하였고, 또한 U0126을 처리했을 때 ERK MAPK가 농도 의존적으로 감소되는 현상을 관찰함으로써 U0126에 의한 부착분자 발현이 ERK MAPK와 연관성이 있음을 시사하였다. 혈액세포에서 U0126에 의한 영향을 관찰한 결과, U937 세포에서 CD11b와 CD62L을 증가시켰고, U0126을 처리했을 때 농도 의존적으로 ERK MAPK의 활성을 감소시켰다. U0126에 의해 혈액세포와 혈관내피세포간의 부착이 증가하는 것을 통해, U0126에 의한 부착분자의 발현이 혈관내피세포로의 부착성을 증가시킴을 시사하였다. U0126에 의한 부착분자의 발현 증가에 항산화제와 PKC- δ 억제제를 처리하였을 때, 증가된 부착분자가 감소하는 것을 관찰함으로써, U0126에 의한 부착분자의 증가과정에 PKC- δ 의 활성화와 ROS의 생성이 관여하고 있을 가능성이 시사되었다. U0126을 처리하여 T 림프구 세포인 Jurkat 세포와 혈관내피세포인 bEnd.3 세포, 그리고 섬유아 세포인 NIH3T3 세포에서 부착분자의 발현을 관찰하였다. 그 결과, 같은 혈액세포인 Jurkat 세포에서 U0126에 의해 CD11b가 증가하였고, bEnd.3 세포와 NIH3T3 세포에서는 U0126에 의한 부착분자가 증가하지 않았다. 그러므로 U0126에 의한 부착분자의 증가발현이 세포에 종류에 따라 다르게 나타나는 현상일 수 있음이 추정되었다.

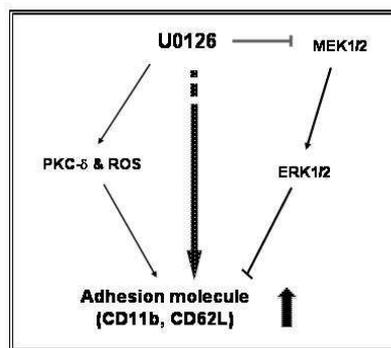


Fig. 14. Diagram of U0126-induced adhesion molecule expression.

참고 문헌

1. Elangam CS, Qualls CW, Dahlgren RR: Cell adhesion molecules-Update. *Ver Pathol* 34:61-73, 1997
2. Ni H, Ergin M, Tibudan SS, Denning MF, Izban KF, Alkan S: Protein kinase C-delta is commonly expressed in multiple myeloma cells and its downregulation by rottlerin causes apoptosis. *Br J Haematol* 121(6): 849-856, 2003
3. Kobuchi H, Roy S, Sen CK, Nguyen HG, Packer L: Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am. J. Physiol* 277:C403-C411, 1999
4. Chang YJ, Holtzman MJ, Chen CC: Interferon- γ - induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. *J Biol Chem.* 277:7118-7126, 2001
5. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, DK, Kyriakopoulos A: The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol.* 171:223-229, 1993
6. Jiang B, Xu S, Hou X, Cohen RA: Angiotensin II differentially regulates Interleukins-1 β -induced iNOS and VCAM-1 expression- Role of p38 MAPK. *J Biol Chem.* 279(19):20363-20368, 2004
7. Wang ZQ, Wu DC, Huang FP, Yang GY: Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain reseach* 996:55-66, 2004
8. Satoh T, Nakatsuka D, Watanabe Y, Nagata I, Kikuch Hi, Namura S: Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured

cortical neurons. *Neuroscience Letters* 288:163-166, 2000

9. Wang YH, Wang WY, Liao JF, Chen CF, Hou YC, Liou KT, Chou YC, Tien JH, Shen YC: Prevention of macrophage adhesion molecule-1 (Mac-1)-dependent neutrophil firm adhesion by taxifolin through impairment of protein kinase-dependent NADPH oxidase activation and antagonism of G protein-mediated calcium influx. *Biochemical Pharmacology* 67:2251-2262, 2004
10. Roebuck KA, Finnegan A: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* 66:876-888, 1999
11. Chatterjee S: Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1523-1533, 1998
12. Stanimirovic DB, Wong J, Shapiro A, Durkin JP: Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebromicrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochir. Suppl.* 70:12-16, 1997
13. Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F, Long CS: Expression and regulation of adhesion molecules in cardiac cells by cytokine: response to acute hypoxia. *Circ. Res.* 82:576-586, 1998
14. Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM: Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule-1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 10:182-191, 1998
15. Sampath D, Castro M, Look DC, Hotzman MJ: Constitutive activation of an epithelial signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in asthma. *J. Clin. Invest.* 103:1353-1361, 1999

16. Stanciu LA, Djukanovic R: The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. *Eur. Respir. J.* 11:949-957, 1999
17. Watanabe T, Fan J: Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathway in atherogenesis. *Int. J. Cardiol.* 66:S45-55
18. Welty SE, Rivera JL, Elliston JF, Smith CV, Zeb T, Ballantyne CM, Montgomery CA, Hansen TN: Increases in lung tissue expression of intercellular adhesion molecule-1 are associated with hyperoxic lung injury and inflammation in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9:393-400, 1993
19. Green CE, Pearson DN, Camphausen RT, Staunton DE, Simon SI: Shear-Dependent Capping of L-selectin and P-selectin Glycoprotein Ligand 1 by E-selectin Signals Activation of High-Avidity β 2-Integrin on Neutrophils. *The Journal of Immunology.* 172:7780-7790, 2004
20. Jaffee BD, Manos EJ, Collins RJ, Czerniak PM, Favata MF, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM: Inhibition of MAP Kinase kinase (MEK) Results in an Anti-inflammation Response *in Vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268:647-651, 2000
21. Gong N, Wei H, Chowdhury SH, Chatterjee S: Lactosylceramide recruits PKC α/ϵ and phospholipase A₂ to stimulate PECAM-1 expression in human monocytes and adhesion to endothelial cells. *PNAS.* 101:6490-6495, 2004
22. Rahman A, Anwar KN, Uddin S, Xu N, Ye RD, Platanias LC, Malik AB: Protein Kinase C- δ Regulates Thrombin-Induced ICAM-1 Gene Expression in Endothelial Cells via Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 21:5554-5565, 2001
23. Duan W, Chan JH, Wong CH, Leung BP, Wong SF: Anti-Inflammatory Effects of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Inhibitor U0126 in an

Asthma Mouse Model. *The Journal of Immunology* 172:7053-7059, 2004

24. Martin AP, Coronel EC, Sano GI, Chen SC, Vassileva G, Claudia CC, Sedgwick JD, Frenette PS, Lipp M, Furtado GC, Lira SA: A Novel Model for Lymphocytic Infiltration of the Thyroid Gland Generated by Transgenic Expression of the CC Chemokine CCL21. *The Journal of Immunology* 173:4791-4798, 2004
25. Sachs UJ, Chavakis T, Fung L, Lohrenz A, Bux J, Reil A, Ruf A, Santoso S: Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1-dependent leukocyte adhesion. *Blood* 104:727-734, 2004
26. Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Hato F, Sakamoto C, Takahashi T, Tatsumi N, Kitagawa S: Selective Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Human Neutrophils Stimulated by IL-1 β . *The Journal of Immunology* 167:5940-5947, 2001
27. Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A: Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *PNAS*. 98:11569-11574, 2001
28. Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA, Bonventre JV: MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *PNAS*. 96:12866-12869, 1999
29. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR: PD 098059 is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase *in Vitro and in Vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 270:27489-27494, 1995
30. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:7686-7689, 1995

31. McGilvray ID, Lu Z, Wei AC, Rotstein OD: MAP-Kinase Dependent Induction of Monocytic Procoagulant Activity by β 2-Integrins. *Journal of Surgical Research* 80:272-279, 1998
32. Mori T, Wang X, Aoki T, Lo EH: Downregulation of Matrix Metalloproteinase-9 and Attenuation of Edema via Inhibition of ERK Mitogen Activated Protein Kinase in Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* 19:1411-1419, 2002
33. Giagulli C, Scarpini E, Ottoboni L, Narumiya S, Butcher EC, Constantin G, Laudanna C: RhoA and α PKC Control Distinct Modalities of LFA-1 Activation by Chemokines: Critical Role of LFA-1 Affinity Triggering in Lymphocyte in Vivo Homing. *Immunity* 20:25-25, 2004
34. Zubkov AY, Rollins KS, Parent AD, Zhang J: Mechanism of Endothelin-1-Induced Contraction in Rabbit Artery. *Stroke* 31:526-533, 2004
35. Kerr AH, James JA, Smith MA, Willson C, Court EL, Smith JG: An Investigation of the MEK/ERK Inhibitor U0126 in Acute Myeloid Leukemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010:86-89, 2003
36. Zubkov AY, Rollins KS, McGehee B, Parent AD, Zhang JH: Relaxant Effect of U0126 in Hemolysate-, Oxyhemoglobin-, and Bloody Cerebrospinal Fluid-Induced Contraction in Rabbit Basilar Artery. *Stroke* 32:154-161, 2001
37. Gundersen Y, Vaagenes P, Myhre O, Andersen JM, Pharo A, Haugen AH, Valoe E, Opstad PK: Hydrocortisone and the Mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 acutely suppress reactive oxygen species generation from circulating granulocytes after gunshot injuries in the pig. *Crit Care Med* 31:166-170, 2003
38. Lagaud GJ, Lam E, Lui A, Breemen CA, Laher I: Nonspecific Inhibition of

Myogenic Tone by PD98059, a MEK1 inhibitor, in Rat Middle Cerebral Arteries. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257:523-527, 1999

39. James JA, Smith MA, Court EL, Ching CY, Willson C, Smith JG: An investigation of the effects of the MEK inhibitor U0126 on apoptosis in acute leukemia. *The Hematology Journal* 4:427-432, 2003
40. Yacoub A, Han SI, Caron R, Gilfor D, Grant SM, Dent P: Sequence Dependent Exposure of Mammary Carcinoma Cells to Taxotere and the MEK1/2 inhibitor U1026 Causes Enhanced Cell Killing in Vitro. *Cancer Biology & Therapy* 2:670-676, 2003
41. Verkleij SB, Post JA: Peroxynitrite activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) via a MEK-independent pathway: a role for protein kinase C. *FEBS Letters* 499:21-26, 2001

- ABSTRACT -

**U0126, MEK1/2 inhibitor, Induces Adhesion Molecules Expression
in Human Blood Cells**

Sung Lyea Park,

Department of Medical Sciences

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Chang-Hyun Moon)

*B*₂-Integrin (CD11b) and L-selectin (CD62L) adhesion molecule play crucial roles in monocyte transmigration and adherence to endothelial cells, causing inflammatory responses in vascular lesion. MAPKinase pathway has been known to be activated in inflammatory responses. In this study, we investigated the expression of adhesion molecule by MEK1/2 inhibitors such as U0126 in human blood cells, U937 cells. Cell viability was determined by MTT assay. The expression of adhesion molecule was observed by flow cytometry. Adhesion molecules were time- and dose-dependently increased by U0126. U0126 decreased ERK activity in a concentration-dependent manner. To investigate the mechanism of U0126-induced adhesion molecules, we examined the effects of various inhibitors such as LY294002

(an inhibitor for PI3Kinase), trolox (antioxidant), rottlerin (an inhibitor for PKC- δ), and SN50 (an inhibitor for NF- κ B) on U0126-induced adhesion molecule expression. Adhesion molecule expression was attenuated by rottlerin and trolox. In addition, to examine cell type specificity of U0126 effect on adhesion molecule, we investigated ICAM-1 expression in other cells including human T cells, brain endothelial cells and fibroblast cells. In bEnd.3 cells and NIH3T3 cells, U0126 had no effect on ICAM-1 expression. These results indicate that expression of adhesion molecule was increased by MEK1/2 inhibitors, such as U0126, in human blood cells and the expression of adhesion molecules may involve the downregulation of ERK MAPK pathway.

Key words : U0126, human blood cell, adhesion molecule, ERK