<원 저>

Glatiramer acetate 투여에 의한 자가면역성 뇌척수염 마우스의 중추신경계에서의 NFκB 활성 억제

황인선 · 하단비 · 김대승 · 주해진 · 지영훈*

제주대학교 수의과대학 수의학과

(게재승인: 2011년 6월 9일)

Glatiramer acetate inhibits the activation of NFκB in the CNS of experimental autoimmune encephalomyelitis

Insun Hwang, Danbee Ha, Dae Seung Kim, Haejin Joo, Youngheun Jee*

College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

(Accepted: June 09, 2011)

Abstract : Glatiramer acetate (GA; Copaxone) has been shown to be effective in preventing and suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of multiple sclerosis (MS). It has been recently shown that GA-reactive T cells migrate through the blood-brain barrier, accumulate in the central nervous system (CNS), secrete antiinflammatory cytokines and suppress production of proinflammatory cytokines of EAE and MS. Development of EAE requires coordinated expression of a number of genes involved in the activation and effector functions of inflammatory cells. Activation of inflammatory cells is regulated at the transcriptional level by several families of transcription factors. One of these is the nuclear factor kappa B (NFκB) family which is present in a variety of cell types and involved in the activation of immune-related genes during inflammatory process. Since it is highly activated at site of inflammation, NFκB activation is also implicated in the pathogenesis of EAE. In this study, we examined whether the inhibition of NFκB activation induced by GA can have suppressive therapeutic effects in EAE mice. We observed the expression of NFκB and phospho-IκB proteins increased in GA-treated EAE mice compared to EAE control groups. The immunoreactivity in inflammatory cells and glial cells of NFκB and phospho-IκB significantly decreased at the GA-treated EAE mice. These results suggest that treatment of GA in EAE inhibits the activation of NFκB and phosphorylation of IκB in the CNS. Subsequently, the inhibition of NFκB activation and IκB phosphorylation leads to the anti-inflammatory effects thereby to reduce the progression and severity of EAE.

Keywords : experimental autoimmune encephalomyelitis, glatiramer acetate, NFκB, phospho-IκB

서 론

Glatiramer acetate(GA, Copaxone, Copolymer-1)는 4가지의 아미노산(L-alanine, L-lysine, L-glutamic acid, L-tyrosine)으로 구성된 합성 polypeptides 화합물이다. GA는 사람의 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)의 면역 조절 약물로서, T 림프구의 활성 및 증식을 저해하며, 염증성 사이토카인의 생산을 억제하고, 항염증성 사이

토카인의 생산을 유도하는 등의 다양한 기능을 수행하는 것이 보고되어 있으나 [21], GA의 치료 기전에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다.

GA는 사람에 있어 다발성 경화증 뿐만 아니라 다발성 경화증의 동물 모델인 자가 면역성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)에서도 치료효과를 가져 급성(acute) EAE의 발병을 억제할 뿐만 아니라, 만성(chronic), 재발성(relapsing) EAE의 회복

*Corresponding author

Tel: +82-64-754-3374, Fax: +82-64-756-3354

E-mail: yhj@jejunu.ac.kr

에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다 [23]. EAE는 중추신경계(central nervous system, CNS)에서 염증세포의 침윤과 수초 탈락이 특징이며, EAE의 진행은 CNS로의 자가반응성(autoreactive) T 세포의 이주가 주요한 원인으로 알려진 T 림프구 매개성 질병이다 [18]. GA의 다발성 경화증 및 EAE에 대한 치료 기전에 대해서는 다양한 연구가 있다 [1, 2, 14]. GA는 항원제시 세포(Antigen-presenting cell, APC)의 주요조직합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 분자 class II에 고친화력이 있어 [8], myelin 항원(myelin basic protein: MBP, proteolipid protein: PLP, myelin oligodendrocyte glycoprotein: MOG)과 경쟁적으로 결합하여, MBP 특이적 T 세포의 활성을 억제한다고 알려져 있다 [6]. 또한 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생산과 동시에 Th1 세포에서 Th2 세포로 변환(shift)을 유도하며, 사람의 수지상 세포(dendritic cells)와 큰포식세포(macrophages)로부터 IL-12와 TNF- α 의 생산, 분비를 억제시킨다고 알려져 있다 [25]. 이 중 가장 유력한 가설로서는 GA는 사람 및 동물에 투여되었을 때 Th2 타입의 GA 반응성 T 세포(GA-reactive T cells)를 생산하고, 이들 세포는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB)을 통과하여 CNS로 이주하여 항염증성 사이토카인을 분비함으로써 EAE 질병의 주요 염증 부위인 CNS에서 Interleukin(IL)-6, IL-12 등의 염증성 사이토카인과 Th17 세포의 발현 억제를 유도하여, EAE 질병의 진행을 직접적으로 억제한다는 “bystander effect” [1, 2, 5, 6, 17]. 그러나 이상의 GA의 치료 기전에 대한 다양한 연구에도 불구하고 GA의 항염증성 치료학적 기전에 영향을 미치는 인자에 대해서는 그 연구가 구체적으로 이루어지고 있지는 않아 그에 대한 보고가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 EAE에서 GA의 항염증성 기전에 영향을 미치는 면역관련 유전자의 주요 조절 인자의 발현에 대해 알아보려고 하였다.

EAE에서 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines) (IL-1 β , TNF: tumor necrosis factor- α , IL-12 등), 항염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokines)(IL-4, TGF- β : transforming growth factor- β , IL-10 등), 케모카인(chemokines)(IL-8, MIP-1 α : macrophage-inflammatory protein-1 α , MCP-1: macrophage-chemotactic protein-1 등), 세포부착분자(cell adhesion molecules)(ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1) 등의 면역관련 유전자의 발현은 염증세포의 활성화와 이주와 밀접하게 연관되어 있으며 [3, 21, 26], 염증세포의 활성화는 PTKs(protein tyrosine kinases) 등의 세포막 변화에 관여하는 키나아제, ERK(extracellular receptor-activated kinase), JNK(Jun N-terminal kinase) 등의 세포질 신호 전달 경로에 관여하는

키나아제, NF κ B(nuclear factor kappa B), NFAT (nuclear factor of activated T cells), AP-1(activation protein-1) 등의 핵내 전사 인자 등의 상호작용으로 조절되는 것으로 보고되고 있다 [7, 15]. 이들 중 EAE에 있어 면역관련유전자의 발현의 주요 조절 인자로는 대표적으로 NF κ B/I κ B family가 알려져 있다 [3, 13, 22]. 진핵생물의 전사인자인 NF κ B는 림프구, 단핵포식세포, 과립구 등 다양한 세포에서 발현되며, 세포질에서 억제성 단백질인 I κ B와 복합체로 비활성화 상태로 존재한다 [3]. 다양한 외부의 자극(Ags, cytokines 등)으로부터 NF κ B는 복합체로부터 분리되어 핵 내로 이동하여 활성화 상태로 되며, 활성화된 NF κ B는 동시 자극 분자(costimulatory molecules), 사이토카인(cytokines), 케모카인(chemokines), 염증성 효소(inflammatory enzymes) 등의 다양한 면역관련 유전자들을 조절한다 [10]. 한편 NF κ B의 활성화는 특정 I κ B kinases에 의한 I κ B의 인산화 후 분해(degradation)로 유도된다 [11]. 이러한 NF κ B의 활성화의 억제자인 PS-519의 투여 시 중추신경계의 염증세포의 침윤의 감소, 자가반응성 T 세포의 염증반응이 억제되어 EAE의 임상 증상을 경감시킨다는 보고가 있으며 [24], NF κ B가 결핍된 EAE 마우스에서는 질병의 진행 동안 염증세포의 활성화와 이주가 억제되어 질병의 발생과 진행을 억제한다고 한다 [12]. 또한 EAE 질병의 진행 동안 인산화된 I κ B의 발현은 염증을 유발하는 다양한 유전자들의 활성화와 밀접한 관련이 있고, EAE의 발생과 진행에 중요한 역할을 담당함을 보고한 바 있다 [13]. 따라서 본 연구에서는 염증성 사이토카인의 생산을 억제하여 EAE 질병의 진행을 억제하는 다발성 경화증의 면역조절 약물인 GA의 투여에 의한 EAE 마우스 모델에서 질병의 면역 및 염증 반응 동안에 NF κ B와 I κ B의 활성화된 형태인 phospho-I κ B의 발현 양상의 변화에 대하여 알아보려고 하였으며, 이로서 GA를 투여한 EAE 마우스 질병 모델에서의 GA의 치료학적 효과에 있어서 NF κ B 신호전달 경로에 의한 조절 기전에 대하여 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서는 6~8주령의 암컷 18~20 g C57BL/6 마우스를 Jackson Lab(USA)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 실험동물은 표준적인 사육조건으로서 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도를 $50 \pm 5\%$ 로 유지시키고 사료는 NIH-07 식이를 주었고, 음수는 자유급식하게 하였다. 본 연구를 위한 동물실험 계획서는 제주대학교 동물관리 및 사용위원회의 승인을 받았으며, 모든 실험은 제주대학교의 동물실험 규정에 따라 수행되었다.

GA 처치

GA(Copaxone; Teva Pharmaceutical Industries, Israel)는 phosphate buffered saline(PBS)에 희석하여 사용하였다. Jee 등 [14]의 보고에 따라, GA 투여는 마우스 당 0.5 µg/µL PBS의 농도로 EAE 유발 7일 전과 유발일 그리고 EAE 유발 7일 후에 등쪽 피하에 각각 투여하였고, GA를 투여하지 않은 대조군에서는 동량의 PBS만을 투여하였다.

EAE의 유도과 임상증상의 평가

마우스에서 EAE를 유도하기 위하여 각각의 마우스의 양쪽 엉덩이 둔부에 myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG, 200 µg; Bio Synthesis, USA)과 Mycobacterium tuberculosis H37Ra(500 µg; Difco, USA)를 함유한 complete Freund's adjuvant(CFA, Difco, USA)를 동일한 양을 혼합한 것을 면역원으로 사용하여 마우스당 100 µL을 주사하였다. 그리고 pertussis toxin 200 ng(List Biological Laboratories, USA)을 면역일과 면역 후 2일째 꼬리 정맥주사 하였다. 면역한 마우스는 매일 체중과 임상증상을 측정하였다. EAE의 진행은 특징적 임상증상에 따라 6단계로 나누었다: Grade(G)0: 무증상, G1: 꼬리마비, G2: 경도의 후지 마비, G3: 중증의 후지마비, G4: 사지마비, G5: 죽음, R0: 회복기 [19]. EAE를 유도한 마우스에서 임상증상이 G1-G2를 나타내는 시기를 질병 초기(early stage), 임상증상이 G3-G4를 나타내는 시기를 마비기(peak stage), 질병으로부터 회복되어 임상증상이 나타나지 않은(R0) 시기를 회복기(recovery stage)로 나누었다. 이 중 PBS를 투여한 EAE 마우스에서 임상증상이 가장 심각한 마비기(peak stage)에 도달하였을 때 GA 투여 마우스를 동시에 에테르로 마취하여 희생시켜 척수를 채취하였고, 파라핀 블록으로 제작할 조직은 10% 중성 포르말린으로 고정한 후, 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 3~5 µm의 두께로 조직 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시하였다.

마우스 척수의 핵과 세포질 단백질의 추출

모든 실험군의 척수 조직을 질병의 임상증상이 가장 심각한 마비기(peak stage)에 채취한 다음 용해액(lysis buffer)(40 mM Tris, 120 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/µL leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 10 µg/mL aprotinin; Sigma-Aldrich, USA)에 넣어 균질화기(homogenizer)로 마쇄하고, 12,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 취해 세포질 단백질을 추출하였다. 세포질 단백질을 제거한 후 buffer A(1 M HEPES, pH 7.5, 1 M KCl, 2 M MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, aprotinin, Na₃VO₄, 0.1%

NP-40; Sigma-Aldrich, USA)를 넣어서 강하게 흔들어(vortexing) 15분 동안 방치한 후, 12,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 그 다음 buffer B(1 M HEPES, 50% glycerol, 5 M NaCl, and 0.2 M EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, aprotinin, Na₃VO₄; Sigma-Aldrich, USA)를 넣어서 강하게 흔들어(vortexing) 15분 동안 방치한 후, 12,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 취해 핵 단백질을 추출하였다.

Western blot analysis

추출한 핵과 세포질 단백질은 정량하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(10% SDS-PAGE)를 이용하여 동일 양의 단백질을 전기 영동하였다. 분리된 단백질은 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 100 V에서 2시간 동안 전이시켰다. 그 후에 비 특이적 반응을 방지하기 위해 5% 탈지우유(nonfat milk)를 사용하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다 [13]. NFκB p65(1 : 500; sc-372), IκBα(1 : 500; sc-4094) 그리고 phospho-IκBα(1 : 500; sc-1014713) (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1차 항체로 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고, 2차 항체로는 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-mouse, rabbit IgG(1 : 1,000; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하여 45분간 실온에서 반응시켰다. 단백질 밴드(Protein band)는 암실에서 WEST-ZOL(Plus) Western Blot Detection System(iNtRON bio, USA)로 발현을 시켰다. 각각의 밴드의 밀도는 scanning laser densitometer(GS-700; Bio-Rad, USA)를 통해 얻었으며, ImageJ(National Institute of Health, USA)를 이용하여 분석하였다.

면역조직화학 염색

CNS에서 NFκB와 phospho-IκB의 분포 및 발현 양상을 관찰하기 위해 모든 실험군의 척수 조직 각각 세 절편을 질병의 임상증상이 가장 심각한 마비기(peak stage)에 채취하여, 10% 중성 포르말린에 고정하고, 파라핀에 포매하여 절편을 만들어 슬라이드를 제작하였다. 조직 절편은 파라핀을 제거한 후, 0.3% 과산화수소에서 20분간 침적하여 내인성 과산화효소를 제거하였다. 그 후 비 특이적 면역반응을 방지하기 위해 blocking goat serum을 30분간 반응시켰다. 이를 제거한 후 1차 항체인 NFκB p65(1 : 200; sc-372)와 phospho-IκBα(1 : 200; sc-1014713) (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1시간 실온에서 반응시킨 후 biotinylated anti-mouse 또는 rabbit IgG(Vector Laboratories, USA)를 실온에서 45분 동안 반응시켰다. 이어서 Avidin-Biotin Complex(ABC) reagents(Vector

Laboratories, USA)로 45분간 실온에서 반응시켰으며, 면역 반응이 끝난 조직은 3, 3'-diaminobenzidine(DAB; Vector Laboratories, USA) 용액에서 발색시켰다. 각 단계 사이에는 PBS로 충분히 세척하였다. 양성반응을 나타낸 조직을 헤마톡실린(hematoxylin)(Sigma-Aldrich, USA) 용액으로 대조염색하고, 에탄올(ethanol)과 크실렌(xylene)으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다. 각각의 양성 세포의 수는 400배의 광학 현미경으로 관찰하였으며, ImageJ (National Institute of Health, USA)를 이용하여 분석하였다.

통계처리

각 실험결과는 평균값 $\pm$ 표준오차로 나타내었고, Student *t*-test를 이용하여 통계처리한 후 $p < 0.05$, $p < 0.005$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

GA 투여에 따른 EAE 마우스에서의 NF κ B와 phospho-I κ B의 발현 양상

EAE를 유도한 마우스의 척수 조직에서 GA 투여에 따른 NF κ B와 phospho-I κ B의 단백질 발현 양의 변화를 알아보기 위해 Western blot analysis를 실시하였다. NF κ B,

Fig. 1. Expression of nuclear (A) and cytoplasmic NF κ B (B), I κ B α , phospho-I κ B (C) and β -actin in the spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) controls (Vehicle) and glatiramer acetate (GA) treated mice (GA) in EAE peak stages. Tissue lysates were prepared from the spinal cord and immunoblotted with anti-NF κ B (A and B), I κ B α , phospho-I κ B (C) and β -actin antibody. The density of each band was measured and plotted in the graph. Ratios of nuclear and cytoplasmic NF κ B/ β -actin proteins (arbitrary units) are plotted on the ordinate during EAE peak stage (A~C). Phosphorylated-I κ B was normalized against unphosphorylated I κ B α . Ratios of phosphorylated/unphosphorylated proteins (arbitrary units) are plotted on the ordinate during EAE peak stage. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ significantly different from EAE controls by Student's *t*-test.

IκBα와 phospho-IκB는 각각 약 65 kD, 38 kD와 41 kD에서 밴드가 관찰되었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 정상 마우스에서 핵 내로 이동하는 NFκB의 낮은 발현은 EAE 질병이 가장 심각한 마비기(peak stage)의 EAE 마우스에서 증가하였으며(Fig. 1A, lane 1), GA 투여 마우스에서는 그 발현이 감소하였다(Fig. 1A, lanes 2 and 3). 또한 핵 내로 이동하는 NFκB의 양적 변화를 밴드(band)의 밀도 분석을 한 결과, PBS를 투여한 EAE 마우스(vehicle)에 비해 GA 투여 마우스에서 49% 유의성 있게 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A, $p < 0.05$).

한편, 정상 마우스에서 세포질에 존재하는 NFκB의 낮은 발현도 EAE 마우스(Fig. 1B, lane 1)에서는 증가하였다. 그리고 GA 투여 마우스에서는 세포질의 NFκB의 발현이 EAE 마우스에 비해 감소하였으며(Fig. 1B, lanes 2 and 3), 세포질에 존재하는 NFκB의 발현 양을 밴드(band)의 밀도 분석을 한 결과, 유의성은 없었으나 EAE 마우스

스에 비해 GA 투여 마우스에서 28% 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 또한 NFκB의 핵 내 이동은 IκB의 인산화 후 분해로 유도되는데, EAE 질병의 마비기(peak stage)에 인산화 된 IκB, 즉 phospho-IκB와 IκBα의 발현은 증가하였으며, GA 투여 마우스에서는 phospho-IκB와 IκBα 단백질이 미약하게 발현됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C, lanes 1~3). 그리고 IκB의 전체 단백질 중에 인산화된 phospho-IκB의 양적 변화를 밴드(band)의 밀도 분석을 한 결과, 정상 마우스에서 낮은 발현을 보였던 인산화된 phospho-IκB는 마비기(peak stage)의 EAE 마우스에 증가하였으며, GA 마우스에서는 EAE 마우스에 비해 65% 유의성 있게 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C, $p < 0.005$).

이상의 결과로부터 EAE 마우스에서 GA 투여에 따른 NF-κB와 phospho-IκB의 단백질 발현의 억제는 GA가 염증 세포의 활성화와 이주에 관련이 있는 NF-κB의 전사활

Fig. 2. Immunohistochemical detection of NFκB in the spinal cords of EAE controls (A and B: Vehicle) and GA treated mice (C and D: GA). At the peak of EAE, NFκB immunoreactivities were strong and could be detected in perivascular clusters of inflammatory cells (arrows in A and B) and glial cells in the parenchyma of EAE controls. Weak NFκB immunoreactivity was seen in perivascular clusters of inflammatory cells (arrows in C and D) and glial cells in the parenchyma of GA treated mice.

성의 억제를 유도하여, EAE의 임상 증상을 감소시키고, 질병의 회복에 영향을 미침을 알 수 있었다.

GA 투여에 따른 EAE 마우스의 중추신경계에서의 NFκB와 phospho-IκB의 양성 세포의 분포 및 수적 변화

EAE를 유도한 마우스의 척수 조직에서 GA 투여에 따른 NFκB와 phospho-IκB의 분포 및 수적 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 NFκB 면역염색의 결과, EAE 질병이 가장 심각한 마비기(peak stage)에 EAE 마우스에서 지주막하강으로 침윤한 다수의 양성 세포를 관찰할 수 있었고, 척수 실질 부위와 혈관 주변부에 침범한 큰포식세포와 T 림프구 등의 다수의 염증세포와 별아교세포와 미세아교세포 등의 신경아교세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다(Figs. 2A and B). 그러나 GA 투여 마우스에서는 이와 같은 양성반응이 약하게 관찰되었다(Figs. 2C

and D). 또한 EAE 마우스와 GA 투여 마우스에서 NFκB 양성 세포의 수를 ImageJ 분석 프로그램을 이용하여 분석한 결과, NFκB의 양성 세포의 수는 GA 투여 마우스에서는 37 ± 6 개/mm²로서 EAE 마우스의 143 ± 11 개/mm²에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table 1).

Fig. 3에서 보는 바와 같이 EAE 질병이 가장 심각한 마비기(peak stage)의 마우스의 척수조직에서의 phospho-IκB의 면역염색의 결과는, NFκB의 면역염색 결과와 거의 일치하였으며, EAE 마우스에서 척수 실질 부위와 혈관 주변부에 침범한 큰포식세포와 T 림프구 등의 염증세포와 별아교세포와 미세아교세포 등의 신경아교세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었으며(Figs. 3A and B), GA 투여 마우스에서는 이와 같은 양성 반응은 약화되었다(Figs. 3C and D). 그리고 phospho-IκB 양성 세포의 수는 GA 투여 마우스에서는 23 ± 3 개/mm²로 EAE 마우스의 80 ± 14 개/mm²에 비해 유의성 있는 감소를 나타내

Fig. 3. Immunohistochemical detection of phospho-IκB in the spinal cords of EAE controls (A and B: Vehicle) and GA treated mice (C and D: GA). At the peak of EAE, phospho-IκB immunoreactivity was strong and could be in perivascular clusters of inflammatory cells (arrows in A and B) and glial cells in the parenchyma of EAE controls. Weak phospho-IκB immunoreactivity was seen in perivascular clusters of inflammatory cells (arrows in C and D) and glial cells in the parenchyma of GA treated mice. Scale bars = 30 μm (A and C), 60 μm (B and D).

Table 1. Semiquantitative analysis of NFκB and phospho-IκB

Positive cells ^a	NFκB		Phospho-IκB	
	Vehicle	GA	Vehicle	GA
	143 ± 11	37 ± 6**	80 ± 14	23 ± 3**

^aImmunohistochemistry was performed on spinal cords of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) control (Vehicle) and glatiramer acetate (GA) treated mice (GA). Cells were counted as described in Materials and Methods. Results are the average and SE value in each experimental group. ** $p < 0.005$, significant differences from EAE control (Vehicle).

었다(Table 1). 따라서 중추 신경 조직의 실질 내 큰포식 세포와 T 림프구와 등의 염증세포의 침윤, 그리고 내인성 신경아교세포의 활성화가 특징인 EAE 질병 모델에서, GA 투여에 따른 이들 세포에서의 NFκB와 phospho-IκB에서 양성 반응의 감소 결과는 Western blotting에서 나타난 NFκB와 phospho-IκB 발현 양의 감소와 일치함을 확인 할 수 있었다.

이상의 결과로 GA는 EAE 질병 마비기(peak stages)에 중추신경계의 병변 부위에 NFκB와 phospho-IκB를 발현하는 염증세포의 수를 감소시키며, 이들 염증세포의 수적 감소로 GA의 항염증성 치료기전에 의해 EAE의 회복을 야기시키는 것으로 사료된다.

고 찰

GA의 다발성 경화증 및 EAE에 대한 치료 기전은 GA는 다양한 myelin 항원과 경쟁적으로 결합하여, myelin 특이적 T 세포의 활성을 억제하고, GA 반응성 T 세포의 활성을 촉진하고 [6, 17], Th1 사이토카인에서 Th2 사이토카인으로의 변환(Th1-Th2 shift)을 특징으로 하며, IL-4와 같은 항염증성 사이토카인의 분비를 증가시키며, TNF-α와 IFN-γ [1, 2, 14, 16, 25]. 다발성 경화증 및 EAE 마우스에서 GA 투여시 활성화된 GA 반응성 T 세포는 IL-4, 5, 10, TGF-β 등의 항염증성 사이토카인의 발현을 촉진하고, IL-6, IL-17, IL12/IL-23 등의 염증성 사이토카인의 발현을 억제한다고 알려져 있다 [9]. GA 반응성 T 세포의 CNS에서의 침윤은 내인성 별아교세포, 미세아교세포(resident astrocytes, microglia)로부터의 TGF-β와 IL-10 등의 항염증성 사이토카인을 발현을 증가시키고, IL-12와 TNF-α 등의 염증성 사이토카인의 발현을 억제시킨다 [25]. 따라서 이러한 항염증성의 치료 효과 기전을 가지는 GA는 CNS의 자가면역성 염증성 질병인 EAE 마우스에서 항염증성 효과를 매개하여 질병의 발생과 진행을 억제한다 [23].

자가면역성 질병의 발달은 사이토카인(cytokines), 케모카인(chemokines), 동시 활성화 분자(costimulatory molecules), 항원 수용체(Ag receptors) 등의 다양한 면역관련 유전자들의 발현과 관련이 있으며, 이들 유전자들의 발

현은 염증세포의 활성화와 이주에 주요 역할을 한다 [3, 10, 22, 26]. 또한 면역관련 유전자들의 발현의 조절은 NFκB, AP-1, NF-IL-6 등의 여러 인자들의 상호작용으로 인해 조절되는데 [7, 15], 이들 중 NFκB는 상피 조직, 근육 조직, 신경 조직, 면역 계통의 조직 등 다양한 조직에서 발현되며[4, 12, 20], 특히 신경 조직, 면역 계통의 조직에서 발현되는 NFκB는 다양한 기작을 통해 CNS의 자가면역성 염증 반응을 조절한다 [12]. 또한 NFκB는 염증세포의 활성화와 관련하는 사이토카인(cytokines), 염증성 효소(inflammatory enzymes) 등과 염증세포의 이주와 관련하는 케모카인(chemokines), 부착 분자(adhesion molecules) 등과 관련한 유전자의 조절로 EAE 질병의 발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 [3, 22, 26].

따라서 본 연구에서는 염증성 사이토카인의 생산을 억제하여 EAE 질병의 발병과 진행을 억제하는 GA의 투여에 의한 EAE 마우스 모델에서 염증 세포의 활성화와 이주에 관련하는 면역관련 유전자들의 발현을 매개하는 NFκB/IκB 단백질의 발현 양상을 알아보고자 하였다. 그 결과, EAE 마비기(peak stage) 동안 NFκB와 phospho-IκB의 발현 양은 GA 투여 마우스에서 EAE 마우스에 비해 유의성 있는 감소를 보였고, 이로써 EAE에서 GA 투여시 NFκB의 활성화와 IκB의 인산화(phospho-IκB)의 감소는 GA의 항염증성 치료 효과가 염증 세포의 활성화, 이주와 관련이 있는 NFκB와 phospho-IκB 단백질의 활성화 억제와 관련이 있음을 알 수 있었다. 또한 EAE 질병 마비기(peak stage)에 GA 투여에 따른 NFκB와 phospho-IκB의 분포 및 발현 양상을 EAE 마우스의 척수조직에서 확인한 결과, EAE 마우스에서는 척수 실질 부위와 혈관 주변부에 침범한 큰포식세포와 T 림프구 등의 다수의 염증세포와 별아교세포와 미세아교세포 등의 신경아교세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었으나, GA 투여 마우스에서는 이와 같은 양성반응이 약하게 관찰되었으며, 또한 GA 투여 마우스에서 NFκB와 phospho-IκB의 양성 세포의 수는 EAE 마우스에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이로써 EAE 질병 발병기의 NFκB와 phospho-IκB를 발현하는 양성세포는 큰포식세포와 T 림프구 그리고 내인성 신경아교세포집단이며, GA 투여

에 따른 NF κ B와 phospho-I κ B의 발현하는 세포의 양성 반응의 감소는 GA 항염증성 치료 효과와 NF κ B/I κ B 단백질의 발현 세포의 반응 억제와 밀접한 관련이 있음을 알려준다.

한편, EAE 질병의 진행 동안에 I κ B의 발현에 대한 우리의 이전 연구에서 EAE 질병의 마비기(peak stage) 동안에 I κ B의 발현은 I κ B의 인산화의 증가와 동시에 I κ B의 분해가 유도되어, 그 발현 양이 감소될 것으로 생각되나, 혈관으로부터 이주하거나 척수 실질에 침윤되는 재순환하는 염증 세포의 증가로 인해 I κ B는 재생성되어 짐으로서, EAE 질병의 전 단계에서 I κ B의 발현 양에는 큰 변화가 없는 것으로 추정되어졌었다 [13]. 본 연구에서는 EAE 질병의 마비기(peak stage) 동안에 GA의 투여는 염증세포의 수적 감소를 유도함으로써 세포질에서의 I κ B의 발현 양은 GA 투여 마우스에서 EAE 마우스에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다.

이상의 결과들로부터 GA 투여에 따른 NF κ B와 phospho-I κ B 발현의 감소는 EAE에서 GA의 항염증성 치료 효과가 염증세포의 활성화 이주와 밀접하게 관련이 있는 NF κ B/I κ B 단백질의 활성화 억제와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있으며, 따라서 본 연구는 EAE 마우스 모델에서 GA의 항염증성 치료학적 효과의 조절 기전에 영향을 미치는 구체적인 면역관련 인자들에 관한 중요한 보고가 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 염증성 사이토카인의 생산을 억제하여 EAE 질병의 진행을 억제하는 다발성 경화증의 면역조절 약물인 GA의 투여에 의한 EAE 마우스 모델의 마비기 동안에 염증세포의 활성을 조절하는 면역관련 유전자의 주요 조절 인자인 NF κ B와 I κ B의 활성화된 형태인 phospho-I κ B의 발현 양상의 변화에 대하여 알아보고자 하였다. 그 결과 EAE의 마비기 동안 CNS에서 핵과 세포질의 NF κ B와 인산화된 phospho-I κ B의 발현 양은 GA 투여마우스에서 EAE 마우스에 비해 유의성 있는 감소를 보였으며, 척수 실질 부위와 혈관 주변부에 침범한 큰포식세포와 T 림프구 등의 염증세포와 별아교세포와 미세아교세포 등의 신경아교세포에서 NF κ B와 phospho-I κ B의 양성 반응은 GA 투여 마우스에서 EAE 마우스에 비해 약화됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 GA는 EAE 마우스의 CNS에서 염증세포의 활성화, 이주와 관련이 있는 NF κ B의 활성화와 I κ B의 인산화(phospho-I κ B)의 감소를 유도하였고, EAE 마우스에서의 GA의 항염증성 치료학적 효과는 이들 NF κ B/I κ B 단백질의 활성화 억제와 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(KRF-2006-E00366)의 연구비 지원을 받아 연구되었음.

참고문헌

1. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**, 10821-10826.
2. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R. Bystander suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cell lines and clones of the Th2 type induced by copolymer 1. *J Neuroimmunol* 1998, **91**, 135-146.
3. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997, **336**, 1066-1071.
4. Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HGW, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004, **119**, 285-298.
5. Chen M, Gran B, Costello K, Johnson K, Martin R, Dhib-Jalbut S. Glatiramer acetate induces a Th2-biased response and crossreactivity with myelin basic protein in patients with MS. *Mult Scler* 2001, **7**, 209-219.
6. Duda PW, Schmied MC, Cook SL, Krieger JJ, Hafler DA. Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2000, **105**, 967-976.
7. Flores N, Durán C, Blasco MR, Puerta C, Dorado B, García-Merino A, Ballester S. NF κ B and AP-1 DNA binding activity in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003, **135**, 141-147.
8. Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Gurevich E, Pecht I, Brautbar C, Kwon OJ, Brenner T, Arnon R, Sela M. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells - specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**, 4872-4876.

9. **Gran B, Tranquill LR, Chen M, Bielekova B, Zhou W, Dhib-Jalbut S, Martin R.** Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology* 2000, **55**, 1704-1714.
10. **Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ.** NF-κB and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 1993, **143**, 1-62.
11. **Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA.** Rapid proteolysis of IκB-α is necessary for activation of transcription factor NF-κB. *Nature* 1993, **365**, 182-185.
12. **Hilliard B, Samoilova EB, Liu TST, Rostami A, Chen Y.** Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-κB-deficient mice: roles of NF-κB in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* 1999, **163**, 2937-2943.
13. **Hwang I, Jee Y.** Expression and Localization of phospho-IκB in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Korean J Vet Res* 2005, **45**, 7-15.
14. **Jee Y, Piao WH, Liu R, Bai XF, Rhodes S, Rodebaugh R, Campagnolo DI, Shi FD, Vollmer TL.** CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contribute to the therapeutic effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol* 2007, **125**, 34-42.
15. **Liang Q, Bueno OF, Wilkins BJ, Kuan CY, Xia Y, Molkentin JD.** c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J* 2003, **22**, 5079-5089.
16. **Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S, Lahat N.** Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol* 1998, **92**, 113-121.
17. **Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, Wiendl H, Then Bergh F, Dose T, Wekerle H, Hohlfeld R.** Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1-reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**, 7452-7457.
18. **Raine CS, Traugott U.** Experimental autoimmune demyelination. Chronic relapsing models and their therapeutic implications for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1984, **436**, 33-51.
19. **Riminton DS, Körner H, Strickland DH, Lemckert EA, Pollard JD, Sedgwick JD.** Challenging cytokine redundancy: inflammatory cell movement and clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis are normal in lymphotoxin-deficient, but not tumor necrosis factor-deficient, mice. *J Exp Med* 1998, **187**, 1517-1528.
20. **Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T.** Activation of innate immunity system during aging: NF-κB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev* 2008, **7**, 83-105.
21. **Schrempf W, Ziemssen T.** Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2007, **6**, 469-475.
22. **Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D.** Targeted disruption of the p50 subunit of NF-κB leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995, **80**, 321-330.
23. **Teitelbaum D, Fridkis-Hareli M, Arnon R, Sela M.** Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses. *J Neuroimmunol* 1996, **64**, 209-217.
24. **Vanderlugt CL, Rahbe SM, Elliott PJ, Dal Canto MC, Miller SD.** Treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the proteasome inhibitor PS-519. *J Autoimmun* 2000, **14**, 205-211.
25. **Vieira PL, Heystek HC, Wormmeester J, Wierenga EA, Kapsenberg ML.** Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J Immunol* 2003, **170**, 4483-4488.
26. **Wingren AG, Parra E, Varga M, Kalland T, Sjögren HO, Hedlund G, Dohlsten M.** T cell activation pathways: B7, LFA-3, and ICAM-1 shape unique T cell profiles. *Crit Rev Immunol* 1995, **15**, 235-253.