

Toll-like receptor 2, 3, 4의 신호전달체계 조절을 통한 curcumin의 항암 · 항염증 효과

윤형선^{1,*} · 강순아² · Daniel Hwang³

¹순천향대학교 의료과학대학 임상병리학과, ²서울벤처정보대학원대학교 발효식품과학과

³USDA, ARS, Western Human Nutrition Research Center and Department of Nutrition, University of California

Anti-cancer and Anti-inflammatory Effects of Curcumin by the Modulation of Toll-like Receptor 2, 3 and 4

Hyung-Sun Youn^{1*}, Soon Ah Kang², and Daniel Hwang³

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, SoonChunHyang University

²Department of Fermented Food Science, Seoul University of Venture and Information

³USDA, ARS, Western Human Nutrition Research Center and Department of Nutrition, University of California

Abstract Toll-like receptors induce innate immune responses recognizing conserved microbial structural molecules that are known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Ligand-induced homotypic oligomerization was found to proceed in LPS-induced activation of TLR4 signaling pathways. TLR2 is known to heterodimerize with TLR1 or TLR6 and recognize diacyl- or triacyl-lipopeptide, respectively. These results suggest that ligand-induced receptor dimerization of TLR4 and TLR2 is required for the activation of downstream signaling pathways. Therefore, receptor dimerization may be one of the first lines of regulation in the activation of TLR-mediated signaling pathways and induction of subsequent innate and adaptive immune responses. Here, we report biochemical evidence that curcumin from the plant *Curcuma longa* inhibits activation of NF-κB, expression of COX-2, and dimerization of TLRs induced by TLR2, TLR3 and TLR4 agonists. These results imply that curcumin can modulate the activation of TLRs and subsequent immune/inflammatory responses induced by microbial pathogens.

Key words: toll-like receptors, curcumin, LPS, MALP-2, poly[I:C], MyD88, TRIF

서 론

Toll-like receptors(TLRs)는 박테리아나 바이러스 등 병원균이 숙주의 몸속에 들어왔을 때, 병원균들이 가지고 있는 독특한 구조를 인식하여 선천성 면역(innate immunity) 반응과, 뒤이어 후천성 면역(acquired immunity) 반응을 유도하는 중요한 역할을 한다(1-4). TLRs는 macrophage나 dendritic cells와 같은 면역세포에서 주로 발견되는 Type I transmembrane 단백질이다. Toll이 발견되기 이전까지는 면역하면 주로 후천성 면역을 이야기 하였지만, Toll이 발견된 이후로 선천성 면역에 많은 관심을 가지게 되었다. Toll은 1991년에 처음으로 초파리(*Drosophila melanogaster*) 안에서 발견되었으며, 1997년에 초파리 Toll과 유사한 사람 Toll이 발견되었다(5). 그러므로 이러한 포유동물이 가지고 있는 Toll을 초파리 Toll과 구별하기 위하여 Toll-like receptor(TLR)라 명명하게 되었다. 현재까지 열 세개의 TLRs가 포유동물 세포 안에서 발견되었으며, 각각의 TLRs는 미생물들이 가지고 있는, 각각의 독특

한 구조를 인식하는 것으로 알려져 있다(1). TLR2는 TLR6 또는 TLR1과 이합체(dimerization)를 형성하여 diacyl 또는 triacyl lipo-protein을 인식한다(6). TLR4는 LPS, TLR3는 dsRNA, TLR5는 flagellin, TLR7과 TLR9은 ssRNA와 unmethylated CpG DNA를 각각 인식하는 것으로 알려져 있다.

TLRs는 일반적으로 MyD88(myeloid differential factor 88) 또는 TRIF(Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN-β) 신호 전달 체계를 가지고 있다. MyD88은 모든 포유동물에서 발견되는 TLRs의 TIR(Toll/IL-1R) 도메인에 붙는 어댑터 분자이다(1). MyD88은 IRAK-4(IL-1 receptor-associate kinase 4)를 유도하고, IRAK-4는 IRAK-1을 인산화시키며, IRAK-1의 분해를 유도한다. IRAK-1은 TRAF6(TNF receptor-associated factor 6)를 유도하며, TRAF6는 IKK(IκB kinase) 인산화 효소를 활성화시킨다. 활성화된 IKK 인산화 효소는 전사 요소 NF-κB(nuclear factor κB)를 활성화시킨다. 이러한 MyD88 신호 전달 체계의 활성화는 NF-κB의 활성화를 유도하여 결국 cytokine, cyclooxygenase-2(COX-2), inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 같은 염증을 유발하는 유전체들을 유도하여 암이나 질병을 유발한다(1).

TLR3 그리고 TLR4는 인터페론이나 인터페론에 의해서 유도되는 유전체들을 이끄는 TRIF를 통하여 MyD88에 독립적인 신호 전달 체계를 활성화시킨다(7). 또한 TRIF를 통한 신호 전달 체계는 늦은 NF-κB 활성화를 유도한다(8). TRIF은 TBK1(TANK-binding kinase 1) 또는 RIP1(receptor interacting protein 1)하고

*Corresponding author: Hyung-Sun Youn, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Soonchunhyang University, 646 Eupnae-Ri, Shinchang-Myun, Asan-Si, Chungnam 336-745, Korea

Tel: 82-41-530-3086; Fax: (82-41)-530-3085

E-mail: hyoun@sch.ac.kr

Received October 10, 2006; accepted January 16, 2007

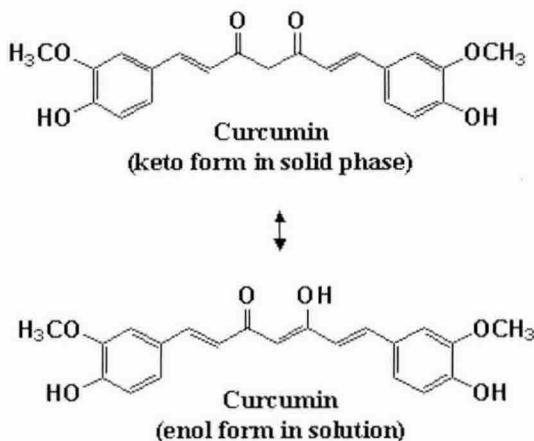


Fig. 1. The Structure of curcumin.

결합한다. TRIF의 C-말단 부분은 RIP1과 반응하여 NF- κ B 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다(8). 그래서 TRIF는 IRF3(IFN-regulatory factor 3) 활성화를 위해서 TBK1을 사용하고, NF- κ B 활성화를 위해서 RIP1을 사용하는 것으로 알려져 있다(7,9).

우리가 일상적으로 먹는 여러 식품 중에는 항암, 항염증 효과를 가지고 있는 phytochemicals라고 불리우는 여러 기능성 소재들이 포함되어 있다. 이러한 phytochemicals는 병원균과 같은 여러 pro-inflammatory 자극에 대해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제시키는 것으로 알려져 있다(10-14). 이러한 phytochemicals 중의 하나로 카레의 주성분인 curcumin(Fig. 1)이 있다. Curcumin은 *Curcuma longa* 식물체 안에서 발견되는 노란색을 띠고 있는 폴리페놀이다. Curcumin은 IKK β 의 억제를 통하여, LPS(lipopolysaccharide), PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate), TNF- α (tumor necrosis factor- α), hydrogen peroxide에 대해서 유도된 NF- κ B를 억제시키는 것으로 알려져 있다(15-17). Curcumin은 LPS에 대해서 유도된 COX-2와 iNOS의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다(11,18). 선행 연구에 의하면 curcumin은 LPS에 대해서 유도된 TLR4의 동종 이합체(homodimerization) 형성을 억제하여 NF- κ B 활성화를 억제한다는 것을 알아내었다(11). TLR4의 동종 이합체의 형성은 LPS에 대해서 유도된 TLR4 신호 전달 체계의 활성화를 위해서 필요한 것으로 알려져 있다(19,20). TLR2 또한 diacyl- 또는 triacyl-lipopptide를 인식하기 위하여 각각 TLR1 또는 TLR6와 이종 이합체(heterodimerization)를 형성하는 것으로 알려져 있다(6,21,22). 그래서 TLRs의 이합체 형성은 아마도 TLRs에 대해서 유도되는 신호 전달 체계의 활성화와 뒤이어 발생하는 선천성 면역반응과 후천성 면역반응을 유도하기 위해서 최초로 일어나는 반응 중 하나로 알려져 있다.

우리는 이번 연구를 통하여 curcumin이 여러 TLR agonists에 대해서 유도된 TLRs의 이합체의 형성과 NF- κ B 활성화를 억제시키는지를 알아보기자 하였다. 이러한 발견은 TLRs에 대해서 조절되는 염증반응이나 또는 뒤이어 발생하는 만성적인 질병들이 우리가 흔히 먹는 식품들에 포함되어 있는 phytochemicals에 대해서 조절되어질 수 있다는 중요한 가능성을 제시해 줄 수 있다고 할 수 있겠다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 curcumin은 Biomol(Plymouth Meeting, PA)로부터 구입하였다. MALP-2(Macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa), LPS 그리고 poly[I:C]는 Alexis Biochemical, List Biological Lab 그리고 Amersham Biosciences 회사로부터 각각 구입하였다. 항체 GFP(green fluorescent protein)는 Molecular Probes (Eugene, OR) 회사로부터 구입하였고, COX-2, IRAK-1 그리고 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA) 회사로부터 구입하였다. 그 밖의 다른 시약들은 Sigma-Aldrich 회사로부터 구입하였다.

세포 배양
RAW264.7 cell(a murine monocytic cell line, ATCC TIB-71)과 293T cell(human embryonic kidney)은 10%(v/v) FBS, 100 units/ml Penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양하였다. 또한 이 실험을 위해서, TLR4(Flag-, GFP-tagged), CD14, MD2(Flag-tagged) 단백질들이 안정되게 발현되도록 만들어진 Ba/F3 세포가 사용되었다(19). 세포들은 5% CO₂/air를 포함하고 있는 37°C 배양기 안에서 배양하였다.

Plasmid

NF- κ B 발광 plasmid는 F. Mercurio(Signal Pharmaceuticals, San Diego, CA)로 제공받았으며, heat shock protein 70- β -galactosidase plasmid는 R. Modlin(University of California, Los Angeles, CA)으로부터 제공받았다. MyD88 plasmid는 J. Tschopp(University of Lausanne, Lausanne, Switzerland)으로부터, IFN β PRD III-I 발광 plasmid와 TRIF plasmid는 K. Fitzgerald(University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA)로부터 그리고 IKK β plasmid는 M. Karin(University of California, San Diego, CA)으로부터 제공되었다. Transfection을 위한 모든 DNA는 EndoFree Plasmid Maxi kit(Qiagen)을 사용하여 준비되었다.

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

NF- κ B 발광효소 유전자 분석은 선행연구에서 사용한 방법에 의하여 분석하였다(23,24). 발광효소 plasmid와 HSP70- β -galactosidase plasmid는 Superfect transfection 시약(Qiagen, Valencia, CA)을 사용하여 세포 안으로 transfection시켰다. 신호 전달 체계의 구성요소인 여러 발현 plasmid나 같은 양의 empty vector를 transfection시켰다. 발광효소의 활성화는 Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI)을 사용하여 측정하였으며, Luminometer는 Centro LB 960(Berthold Technology, Bad Wildbad, Germany)을 사용하였다. 발광효소의 활성화는 β -galactosidase의 활성화를 측정하여 표준화시켰다.

면역암(immunoblotting)과 면역침강(immunoprecipitation) 방법

선행연구의 방법에 의하여 단백질 추출물들은 항체를 사용하여 면역침강시켰다(23,24). 용해된 면역 복합체들은 SDS-PAGE에서 분리되어 polyvinylidene difluoride membrane으로 전기영동에 의해서 이전되었다. Membrane은 0.1% Tween 20 그리고 5% 탈지 조제된 우유를 포함하고 있는 phosphate-buffered saline을 가지고 blocking하였다. Membrane은 1차 항체를 가지고 blotting하고, horseradish peroxidase와 복합된 2차 항체에 노출시킨 다음, ECL Western blot detection 시약을 사용하여 원하는 단백질을 구명하였다.

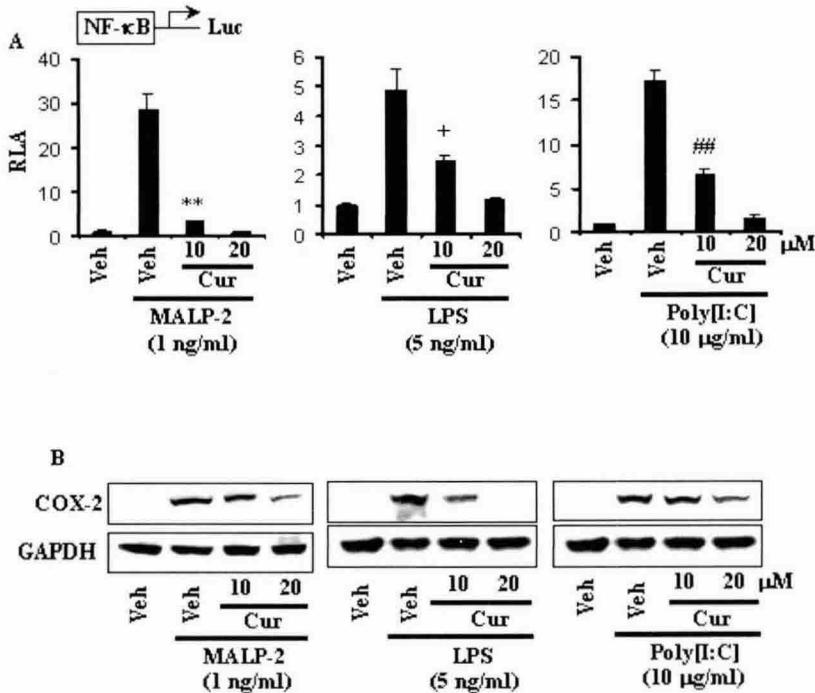


Fig. 2. Curcumin inhibits the activation of NF-κB and the expression of COX-2 induced by MALP-2, LPS, or poly[I:C]. (A) RAW264.7 cells were transfected with NF-κB luciferase reporter plasmid and pre-treated with curcumin for 1 hr, and then treated with MALP-2, LPS, or poly[I:C] for an additional 6 hr. Cell lysates were prepared and luciferase and β-galactosidase enzyme activities were measured as described in “Materials and Methods”. Relative luciferase activity (RLA) was normalized with β-galactosidase activity. Values are mean ± SEM (n=3). **: Significantly different from MALP-2 alone, $p < 0.01$. +: Significantly different from LPS alone, $p < 0.05$. ##: Significantly different from poly[I:C] alone, $p < 0.01$. (B) RAW264.7 cells were pretreated with curcumin for 1 hr and then further stimulated with MALP-2, LPS, or poly[I:C] for 6 hr. Cell lysates were analyzed for COX-2 and GAPDH protein by immunoblots. Veh: vehicle, Cur: curcumin.

결과 및 고찰

Curcumin의 TLR agonists에 의해 유도된 NF-κB, IRF3의 활성화와 COX-2의 발현 억제 효과

Curcumin은 LPS, TNFα, PMA, 그리고 H₂O₂ 등 여러 자극제에 의해서 유도된 NF-κB 활성화를 억제시키는 것으로 알려져 있다(15-17). 본 연구에서 curcumin은 RAW264.7 세포 안에서 MALP-2(TLR2와 6 agonist), LPS(TLR4 agonist) 그리고 poly[I:C](TLR3 agonist)에 의해서 유도된 NF-κB 활성화와 COX-2 발현을 억제하였다(Fig. 2A-F). 또한 curcumin은 LPS(TLR4 agonist)와 poly[I:C](TLR3 agonist)에 의해서 유도된 IRF3 활성화를 억제하였다(Fig. 3A,B). TLRs는 MyD88 신호 전달체계를 통하여 NF-κB 활성화를 유도하고, TRIF 신호 전달체계를 통하여 NF-κB와 IRF3 활성화를 유도한다. 그러므로 이러한 모든 결과는 curcumin이 여러 TLR agonists에 의해서 유도된 신호 전달체계를 억제한다는 것을 의미한다.

Curcumin의 MyD88과 TRIF에 의해서 유도된 NF-κB 활성화 억제효과 및 TRIF에 의해서 유도된 IRF3 활성화 비억제 효과

Curcumin은 MyD88이나 IKKβ의 overexpression에 의해서 유도된 NF-κB 활성화를 억제하였다(Fig. 4A,B). 이러한 결과는 curcumin이 TLRs의 MyD88를 통한 신호전달체계를 억제한다는 것을 의미한다. 이전의 연구들에 의하면 curcumin은 NF-κB 활성화를 위한 canonical 신호 전달체계 안에서 key kinase인 IKKβ의 억제를 통하여 여러 pro-inflammatory 자극에 의해서 유도된 NF-κB를 억제시키는 것으로 알려져 있다(15-17).

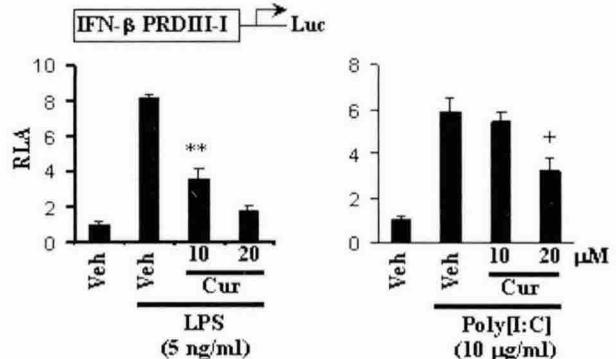


Fig. 3. Curcumin inhibits LPS- or poly[I:C]-induced IRF3 activation. RAW264.7 cells were transfected with IFNβ PRDIII-I promoter with specific IRF3 binding site (IFNβ PRDIII-I) luciferase reporter plasmid and pre-treated with curcumin for 1 hr and then treated with LPS or poly[I:C] for an additional 6 hrs. Relative luciferase activity (RLA) was determined by normalization with β-galactosidase activity. Values are mean ± SEM (n = 3). **: Significantly different from LPS alone, $p < 0.01$. +: Significantly different from poly[I:C] alone, $p < 0.05$. Veh: vehicle, Cur: curcumin.

Curcumin은 또한 TRIF에 의해서 유도된 NF-κB 활성화는 억제하였지만(Fig. 4C), TRIF에 의해서 유도된 IRF3 활성화는 억제시키지 못하였다(Fig. 4D). IKKβ가 curcumin의 분자학적인 타깃이기 때문에 TRIF에 의해서 유도된 NF-κB가 curcumin에 의해서 억제되었다. 그러나, TRIF에 의해서 유도된 IRF3 활성화가 cur-

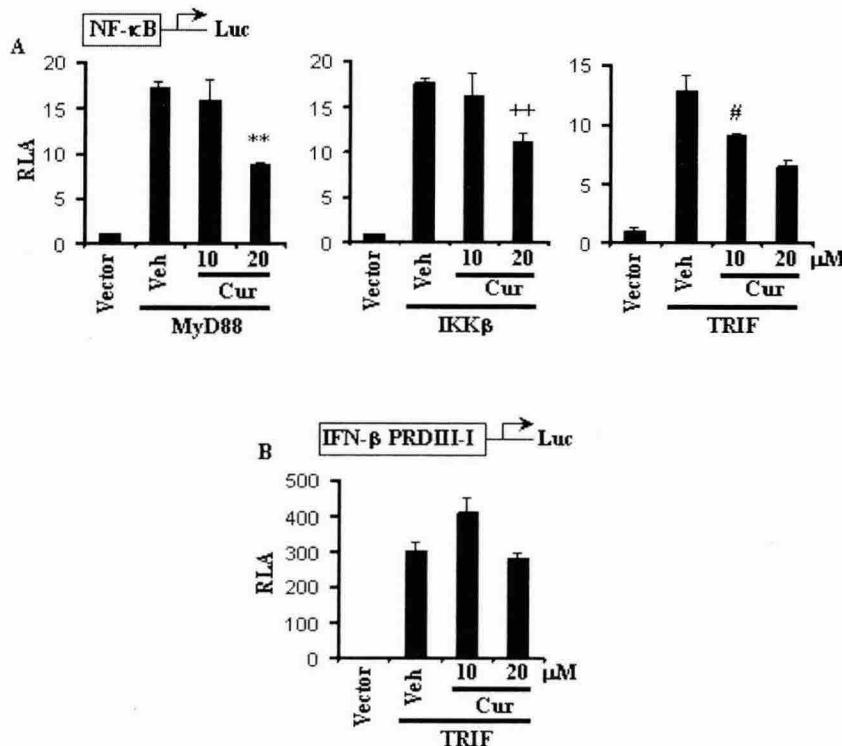


Fig. 4. Curcumin inhibits the activation of NF-κB induced by the overexpression of MyD88, IKK β , or TRIF, but it does not inhibit the activation of IRF3 induced by the overexpression of TRIF. (A) 293T cells were co-transfected with NF-κB-luciferase reporter plasmid and an expression plasmid for MyD88, IKK β , or TRIF. pcDNA was used as a vector control for MyD88 and IKK β and pCMV for TRIF. After 24 hr, cells were treated with curcumin for 6 hr. Relative luciferase activity (RLA) was determined by normalization with β -galactosidase activity. Values are mean \pm SEM ($n = 3$). **: Significantly different from MyD88 plus vehicle, $p < 0.01$. ++: Significantly different from IKK β plus vehicle, $p < 0.01$. #: Significantly different from TRIF plus vehicle, $p < 0.05$. (B) 293T cells were co-transfected with IRF3 binding site (IFN- β PRDIII-I)-luciferase reporter plasmid and an expression plasmid for TRIF. After 24 hr, cells were treated with curcumin for 6 hr. Relative luciferase activity (RLA) was determined by normalization with β -galactosidase activity. Values are mean \pm SEM ($n = 3$). The panels are representative data from more than three independent experiments. Veh: vehicle, Cur: curcumin.

cumin에 의해서 억제되지 못하였다는 것은, 또 다른 분자학적인 타깃이 TRIF 위에 존재한다는 것을 의미한다. 아마도 또 다른 타깃은 TLR complex가 될 것이다(11).

Curcumin의 ligand에 의해서 유도된 TLRs의 이합체 형성 억제 효과

다음 실험으로, TLRs에 의해서 유도되는 신호 전달 체계의 활성화와, 뒤이어 발생하는 선천성 면역반응과 후천성 면역반응을 유도하기 위해서 최초로 일어나는 반응 중 하나로 알려져 있는 이합체의 형성을 curcumin이 억제시키는지를 알아보았다. 선행 연구에서 발표된 바와 같이 curcumin은 LPS에 의해서 유도된 TLR4의 이합체의 형성을 억제시켰다(Fig. 5A). 이 실험을 위해서 TLR4 (Flag-, GFP-tagged), CD14, MD2(Flag-tagged) 단백질들이 안정되게 발현되어지도록 만들어진 Ba/F3 세포가 사용되었다. Curcumin은 또한 같은 세포에서 LPS에 의해서 유도된 IRAK-1 degradation을 억제하였다(Fig. 5B).

TLRs는 또한 ligand에 독립적인 forced dimerization에 의해서 신호전달체계의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다(5,25,26). 그러므로 본 연구에서 co-immunoprecipitation과 immunoblotting에 의해서 TLR2와 TLR6의 이종 이합체의 형성이 curcumin에 의해서 억제되는지를 알아보았다. 이 실험을 위해서 HA-tagged TLR2와 Flag-tagged TLR6가 293T 세포 안으로 transfection되었으며, immunoprecipitation과 immunoblotting으로 TLR2와 TLR6의 이합

체의 형성을 알아보았다. 그 결과 TLR2는 TLR6와 이종 이합체를 형성하였으나, 이종 이합체의 형성은 curcumin에 의해서 억제되지 않았다(Fig. 5C). 그러나, RAW세포 안에서 curcumin은 MALP-2에 의해서 유도된 IRAK-1 degradation을 억제시켰다(Fig. 5D). IRAK-1은 MyD88 신호전달 체계에서 IKK β 위에 놓여있었다. 그러므로 curcumin이 LPS 나 MALP-2에 의해서 유도된 IRAK-1 degradation을 억제시켰다는 것은 curcumin의 분자학적인 타깃이 IKK β 에 부가적으로 IRAK-1위에 놓여 있다는 것을 의미한다고 할 수 있겠다.

많은 식물들에는 병원균들에 의해서 유도된 NF-κB의 활성화를 억제하는 효과를 가지고 있는 phytochemicals가 포함되어 있다(1,2,21,22,24). 이러한 phytochemicals 중에서는 Michael addition에 의해서 sulphydryl 그룹에 반응할 수 있는 구조를 가지고 있는 폴리페놀이나 sesquiterpene lactone 등이 많이 있다(25-28). α,β -Unsaturated carbonyl group을 가지고 있는 curcumin은 IKK에 있는 cysteine의 sulphydryl(-SH) 그룹에 붙어서 IKK 인산화효소의 효과를 억제시키는 것으로 알려져 있다(29,30). Sesquiterpene lactone 중의 하나인 helenalin은 p65/NF-κB 안에 있는 두 개의 cysteine(Cys38, Cys120)에 붙어서 NF-κB의 DNA 결합을 억제시키는 것으로 알려져 있다(25,28). 또한 선행 연구에 의하면 Michael addition 반응을 유도할 수 있는 구조를 가지고 있는 curcumin과 helenalin은 LPS에 의해서 유도된 TLR4의 동종 이합체의 형성을 억제시켜 그 결과로 신호전달체계의 활성화를 억제시키는 것을

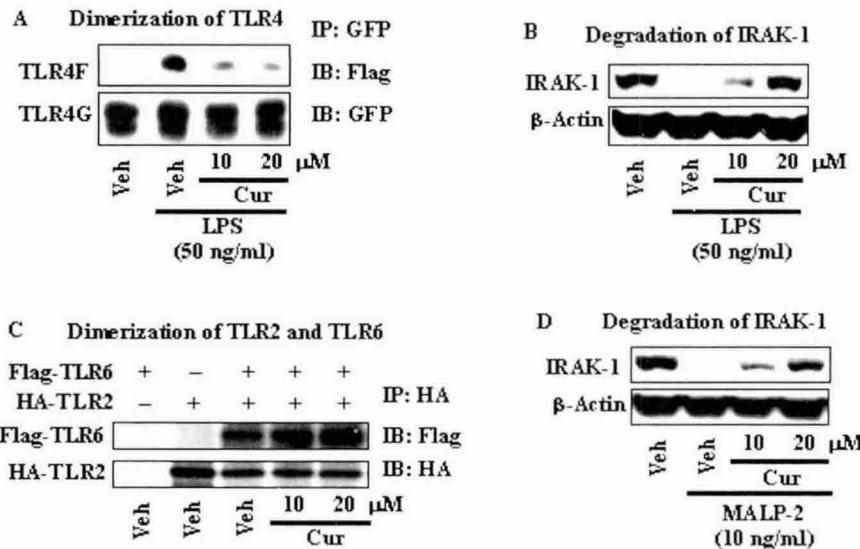


Fig. 5. Curcumin inhibits ligand-dependent TLR4 dimerization, but it does not inhibit ligand-independent dimerization of TLR2 and TLR6. (A) Ba/F3 cells expressing TLR4-Flag (TLR4F), TLR4-GFP (TLR4G), MD2-Flag (MD2F), CD14, and NF-κB luciferase were pre-treated with curcumin for 1 hr and then treated with LPS for 20 min. Cells were then subjected to immunoprecipitation with anti-mouse GFP antibody and immunoblotted with anti-Flag (upper) or anti-rabbit GFP (lower) antibody. (B) The same Ba/F3 cells in Fig. 5A were pre-treated with curcumin for 1 hr and then treated with LPS for 30 min. Cell lysate was subjected to SDS-PAGE and probed with anti-IRAK-1 (upper) or β-actin (lower) antibody. (C) 293T cells were co-transfected with pDisplay-HA-TLR2 and pDisplay-FLAG-TLR6. After 24 hr, cells were treated with curcumin for 3 hr. Cell lysates were immunoprecipitated with HA antibody. Co-immunoprecipitated proteins were immunoblotted with FLAG antibody and reprobed with HA antibody. (D) RAW264.7 cells were pre-treated with curcumin for 1 hr and then treated with MALP-2 for 30 min. Cell lysate was subjected to SDS-PAGE and probed with anti-IRAK-1 (upper) or β-actin (lower) antibody. Veh: vehicle, Cur: curcumin.

알아내었다(11).

TLRs는 세포막의 바깥쪽에 여러 개의 leucine이 반복적으로 나타나고 cysteine이 풍부한 지역이 있으며 또한 세포막 안쪽에는 TIR(Toll/IL-1R homologous) 지역을 가지고 있는 세포막을 통과하는 Type I 단백질이다. 그러므로 TLRs는 세포막의 안과 밖으로 여러 개의 cysteine을 가지고 있다. 이러한 cysteine들은 아마도 두 개의 TLRs가 결합하기 위하여 이형화물(disulfide) 결합을 형성할 것으로 알려져 있다(27). 이러한 TLRs의 이합체(homodimerization)의 형성은 TLR agonists에 의해서 유도된 TLRs 신호 전달 체계의 활성화를 위해서 필요한 것으로 알려져 있다.

TLR2는 diacyl- 또는 triacyl-lipopptide를 인식하기 위하여 각각 TLR1 또는 TLR6와 이종 이합체(heterodimerization)를 형성하는 것으로 알려져 있다(6,21,22). 또한 TLR2는 ligand에 독립적인 forced dimerization에 의해서도 TLR1과 TLR6와 이합체를 형성하여 신호전달체계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(23). 부가적으로 TLR4도 ligand에 독립적으로 동종 이합체를 형성하여 NF-κB 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다(25). 그러므로 TLRs 이합체의 형성은 신호전달체계의 활성화나, 타깃 유전자의 발현을 위해서 중요한 최초의 반응중의 하나이다. 본 연구 결과 LPS에 의해서 유도된 TLR4의 이합체의 형성은 curcumin에 의해서 억제되었다(Fig. 5A). 그러나 293T cell에서 ligand에 독립적인 TLR의 overexpression에 의한 TLR2와 TLR6의 이합체의 형성은 curcumin에 의해서 억제되지 못하였다. 비록 curcumin이 ligand에 독립적인 forced dimerization에 의한 TLR2와 TLR6의 이합체의 형성을 억제하지는 못하였지만, 우리는 curcumin이 agonist에 의해서 유도된 TLR2와 TLR6의 이합체의 형성을 억제할 것이라는 가능성을 배제할 수는 없을 것이다. 왜냐하면 curcumin은 MALP-2에 의해서 유도된 IRAK-1 degradation을 억제하였기 때문에, curcumin의 분자학적인 타깃이 IKKβ 이외에 IRAK-1 위에

도 존재한다는 것을 알 수 있기 때문이다. 그러므로 RAW264.7 cells에서 MALP-2에 의해 유도된 TLR2와 TLR6의 이합체 형성을 co-immunoprecipitation으로 보고자 하였으나, 세포 안에서 자체적으로 발현하는 TLRs의 단백질양이 충분하지를 않기 때문에 이합체의 형성을 볼 수 없었다. 그래서 TLR4 stable cells과 같이 앞으로 TLR2와 TLR6 stable cells을 이용한 실험이 필요할 것으로 생각한다.

요약

TLRs는 병원균이 숙주의 몸 속에 들어 왔을 때, 병원균들이 가지고 있는 독특한 구조를 인식하여 선천성 면역반응과 뒤이어 후천성 면역반응을 유도하는 중요한 역할을 한다. 우리는 이번 실험을 통하여 curcumin이 선행연구에서 밝혀낸 TLR4 뿐만 아니라 TLR2와 TLR6 그리고 TLR3를 또한 분자학적인 타깃으로 할 수 있다는 것을 알아내었다. Curcumin이 MALP-2(TLR2,6 agonist)에 의해서 유도된 IRAK-1 degradation을 억제시켰다. 이러한 결과는 curcumin의 분자학적인 타깃이 IRAK-1위에 놓여 있으며, TLR2와 TLR6가 될 것이라는 가능성을 제시해 준다고 할 수 있다. 또한 curcumin은 viral 자극제인 poly[I:C](TLR3 agonist)에 의해서 유도된 IRF3나 NF-κB 활성화를 억제하였지만, TRIF에 의해서 유도된 IRF3 활성화는 억제시키지를 못하였다. 이러한 결과 또한 TLR3 자체가 curcumin의 분자학적인 타깃이라는 가능성을 제시해 준다고 할 수 있겠다. 이러한 결과를 종합해 볼 때, curcumin의 분자학적인 타깃이 IKKβ 이외에 모든 TLRs가 될 수 있다는 가능성을 제시해 준다고 할 수 있겠다. 이러한 결과는 curcumin이 그램음성균 뿐만 아니라 바이러스나 박테리아 등 여러 병원균들로부터 유도되는 염증반응이나 만성적인 질병들을 조절할 수 있다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있겠다.

감사의 글

본 연구는 오뚜기 주식회사의 연구비지원(2006년)에 의해 수행된 과제의 일부로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17: 1-14 (2005)
2. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145 (2001)
3. O'Neill LA. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol.* 25: 687-693 (2004)
4. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol. Interv.* 3: 466-477 (2003)
5. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394-397 (1997).
6. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol.* 166: 15-19 (2001)
7. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B, and IFN-regulatory factor 3, in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 171: 4304-4310 (2003)
8. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschoopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* 5: 503-507 (2004)
9. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4: 491-496 (2003)
10. Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: Molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J. Immunol.* 175: 3339-3346 (2005)
11. Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem. Pharmacol.* 72: 62-69 (2006)
12. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 768-780 (2003)
13. Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappa B as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit. Care Med.* 31: S105-S111 (2003)
14. Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, Hwang DH. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem. Pharmacol.* 72: 850-859 (2006)
15. Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1665-1676 (2000)
16. Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, Sartor RB. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J. Immunol.* 163: 3474-3483 (1999)
17. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J. Biol. Chem.* 270: 24995-25000 (1995)
18. Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 206: 533-540 (1995)
19. Saitoh S, Akashi S, Yamada T, Tanimura N, Kobayashi M, Konno K, Matsumoto F, Fukase K, Kusumoto S, Nagai Y, Kusumoto Y, Kosugi A, Miyake K. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int. Immunol.* 16: 961-969 (2004)
20. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol.* 12: 186-192 (2004)
21. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* 13: 933-940 (2001)
22. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* 169: 10-14 (2002)
23. Lee JY, Zhao L, Youn HS, Weatherill AR, Tapping R, Feng L, Lee WH, Fitzgerald KA, Hwang DH. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J. Biol. Chem.* 279: 16971-16979 (2004)
24. Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, Sizemore N, Hwang DH. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278: 37041-37051 (2003)
25. Rhee SH, Hwang D. Murine Toll-like receptor 4 confers lipopolysaccharide responsiveness as determined by activation of NF kappa B and expression of the inducible cyclooxygenase. *J. Biol. Chem.* 275: 34035-34040 (2000)
26. Zhang H, Tay PN, Cao W, Li W, Lu J. Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett.* 532: 171-176 (2002)
27. Tao X, Xu Y, Zheng Y, Beg AA, Tong L. An extensively associated dimer in the structure of the C713S mutant of the TIR domain of human TLR2. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 299: 216-221 (2002)