

창자 상피세포에서 철분 포획제에 의한 MIP-3 α /CCL20의 유도

이명수, 이현주¹, 한원철², 오재민³, 전창덕¹

원광대학교 의과대학 내과학교실, ¹미생물 및 면역학교실, ²병리학교실, ³해부학교실

간추림 : 본 연구실에서는 최근 박테리아의 철분 포획제 성분인 deferoxamine (DFO)이 창자 상피세포에서 CXCL-8 케모카인을 생산함으로써 염증 신호를 유발함을 보고하였다(Choi 등 2004). 또한 microarray 유전자 발현 검정법을 통해 창자 상피세포에서 DFO에 의해 CCL20의 발현이 증가됨을 확인하였다. 본 연구에서는 DFO에 의하여 실제로 CCL20가 생성되는지와 이때 생성된 CCL20가 CCR6를 발현하는 세포의 이동을 촉진할 수 있는지, 또한 DFO에 의한 CCL20 생성 기전이 어떻게 되는지에 대한 연구를 수행하였다. CCL20단백질의 증가는 mRNA 합성 증가와 일치하게 증가하였고, 실시간 RT-PCR을 이용해 정상적인 발현 변화를 확인하였다. CCL20 mRNA를 유도하는 DFO의 효과는 창자 상피세포 뿐만 아니라 혈액 단핵구와 단핵구 세포주에서도 관찰되었다. 약리학적 저해제를 이용하여 철분 포획제에 의한 CCL20 발현 증가에 관여하는 신호전달계를 관찰한 결과, 일부는 통상의 TNF- α 에 의한 신호전달과는 다른 경로를 통해 CCL20의 발현에 관여함을 알 수 있었다. 이러한 실험 결과들을 통해, 박테리아 산물 이외에도 철분 대사가 CCL20이나 다른 염증 매개 물질의 발현을 조절함으로써 창자 점막에서 숙주의 적응면역 반응의 개시에 직접적으로 관여함을 알 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 철분, 철분 포획제, MIP-3 α /CCL20, TNF- α , 적응면역

서 론

철분(Iron)은 세포의 성장과 분화 그리고 전자전달반응, 산소운반, 활성, 해독 작용 등의 다양한 생물학적 과정에 필수적인 영양요소이다(Crichton 등 1992). 따라서 세포의 대사나 성장을 위해 철분의 유용성을 유지하는 일은 원핵생물이나 진핵생물의 생존에 매우 중요하다. 또한, 철분은 면역기능의 조절에도 주요한 요소로 작용한다. 적절한 양의 철분 공급은 면역감독기능(immuno-surveillance)에 매우 중요한데, 이는 철분이 면역세포의 성장을 촉진시키거나 혹은 세포매개의 면역작용기(immune effector phase)와 사이토카인 활성화에 관여하기 때문이

다(Brieva 등 1984, Bierer 등 1990, Golding 등 1995, Weiss 등 1995, Gray 등 2002). 또한 철분은 Fenton 반응을 통해 하이드록시 라디칼을 형성하는 데 있어서 촉매역할을 함으로써, 세포독성에 대한 면역방어 기전에 직접적으로 관여하기도 한다(Marx 등 2002).

창자 상피세포는 장내 상주 세균이나 외부에서 들어오는 병원균이 가장 먼저 접하게 되는 장관의 점막 표면을 구성하고 있다. 창자 상피세포는 백혈구의 활성화에 영향을 주는 여러 전-염증성 사이토카인을 생산하여, 미생물이 감염된 초기에 숙주의 방어가 일어나도록 하는 중요한 곳이다(Finlay 등 1997). 이러한 자연면역 반응은 빠르게 세균을 제거하는 것이 매우 중요하다. CXCL 케모카인에 속하는 IL-8은 전-염증 사이토카인이나 세포자극에 반응하여 창자 상피세포에서 발현되고(Shapiro 등 1997, Roebuck 등 1999, Desbaillets 등 1999, Narayanan 등 1999), 이 케모카인은 급성염증반응의 주요 활성물질로 작용한

*이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행된 교신저자: 전창덕(원광대학교 의과대학 미생물 및 면역학교실) 전자우편: cdjun@wonkwang.ac.kr

다(Witko-Sarsat 등 2000). 저자들은 박테리아에서 유래한 철분 포획제(시테로포어)가 대표적인 CXC 케모카인 중의 하나인 IL-8을 창자 상피세포에서 생산함으로써 염증신호를 유발할 수 있으며, 이는 곧 숙주의 철분을 포획하는 것이 직접적으로 감염된 박테리아에 대해 자연면역 반응을 개시한다는 사실을 처음으로 밝힌 바 있다(Choi 등 2004).

장내에 감염된 병인성 미생물이 장 점막 표면에서 생존과 복제를 하기 위해서는 반드시 숙주의 철분을 필요로 하게 된다. 따라서 숙주와 감염된 미생물 사이에서 철분경쟁은 불가피하다. 실제로 병인성이 강한 미생물 계통일수록 숙주의 철분을 빼앗을 수 있는 효과적인 기작을 가지고 있는 것으로 보고되어 있는데 박테리아의 시테로포어가 가장 좋은 예이다(Weinberg 등 1989). 박테리아의 시테로포어는 다양한 종의 숙주에서 생산된 transferrin 단백질로부터 철분을 빼앗는 기능을 한다. 이는 곧 철분 포획제가 염증 과정을 조절하는 어떠한 매개 물질들을 변화시킬 수 있음을 의미한다(Weiss 등 1994, Saleppico 등 1996, Dlaska 등 1999, Tanji 등 2001). 따라서 점막면역에서의 철분의 역할과 더불어 철분 포획제가 점막의 자연면역과 적응면역을 연결하는 역할을 갖고 있는지를 설명하는 것은 매우 흥미로운 일이다.

최근의 연구에 따르면, 창자 상피세포가 MIP-3 α /CCL20라는 CC 케모카인을 생산함으로써 숙주의 적응면역에 관계된 신호전달 과정에서 중요한 기능을 할 수 있음을 제시해 주고 있다(Hieshima 등 1997, Schutyser 등 2003). CCL20 케모카인은 유일한 수용체인 CCR6를 통해서 미성숙 수지상 세포나, 작용기 T 림프구 혹은 메모리 T 림프구, 그리고 B 림프구에 주화성을 갖는다(Izadpana 등 2001, Fujie 등 2001, Sierro 등 2001, Schutyser 등 2003). 창자 상피세포에서 CCL20 유전자의 발현은 병인성 박테리아나 TNF- α 나 IL-1 β 와 같은 전-염증성 사이토카인에 의해서 증가한다(Izadpanah 등 2001, Fujii 등 2001, Sierro 등 2001). 그러나, CCL20 mRNA나 단백질의 발현이 세포내 철분의 양에 의해 조절되는지는 아직 밝혀지지 않았다.

따라서, 본 연구에서는 박테리아의 철분 포획제

성분인 deferoxamine (DFO)이 창자 상피세포에서 단일 자극원으로서 생물학적인 활성을 갖는 CCL20을 생산함으로써 숙주의 적응면역계에 관여하는 면역세포를 불러모을 수 있는지를 알아보았다. 우선 microarray 기초 실험을 통해 창자 상피세포에서 DFO에 의해 CCL20의 발현이 증가됨을 확인하였고(Choi 등 2004), 본 실험에서는 여러 신호전달 물질들이 철분 포획제에 의한 CCL20 발현 증가에 다양한 방식으로 관여함을 제시하였다. 일부는 통상의 TNF- α 에 의한 신호전달과는 다른 경로를 통해 CCL20의 발현에 관여함을 알 수 있었다. 또한, DFO를 처리하여 얻은 세포 배양액에 의해 CCR6를 발현하는 세포의 이동을 야기시킴을 알 수 있었다. 이러한 실험 결과들을 통해, 창자 상피세포에서 철분 대사가 CCL20이나 다른 염증 매개 물질을 조절함으로써 숙주의 자연면역과 적응면역 반응에 직접적으로 관여함을 알 수 있었다.

재료 및 방법

1. 시약 및 항체

Deferoxamine (DFO), ferric citrate (FC), mimosine (MIM), PHA, BAPTA-AM, thapsigargin, HerA, sodium orthovanadate (Na₃VO₄, VA), okadaic acid (OA), A23187, dbcAMP, 5-ASA, SASP, rabbit anti-goat IgG, p-NPP tablets 등은 Sigma Chemical Company (ST. Louis, MO)에서 구입하였으며, hIL-1 β , hTNF- α , hIL-2와 같은 재조합 단백질과 mouse anti-human CCL20 단클론 항체와 mouse anti-human CCR6-PE, mouse anti-CD3-FITC 다클론 항체는 R & D Systems Inc (Minneapolis, MN)에서 구입하였다. PP2, KT5720, PKC 저해제 (rottlerin, Gö6983, Gö6976), 그리고 MAPK 저해제 (SB202190, U0126, PD98059)는 Calbiochem-Behring Corp (La Jolla, CA)에서 각각 구입하였다.

2. 세포 배양

창자 상피세포 (HT-29)와 단핵구 (THP-1)는 ATCC에서 분양받아 사용하였으며, CO₂ 세포배양기

(37°C, 5% CO₂)에서 FBS (10%), 페니실린 G (100 IU/mL), 스트렙토마이신 (100 µg/mL), 그리고 L-글루타민 (2 mM)을 첨가한 RPMI 배지에서 배양하였다. T-84와 Caco-2 역시 ATCC로부터 분양받아 위와 같은 조건으로 DMEM 배지에서 배양하였다. 혈액 단핵구는 건강한 사람의 혈액을 얻어 dextran과 Ficoll (Amersham Biosciences)을 이용해 원심 분리해 사용하였다. Log-phase에 해당하는 세포를 각각의 실험에 맞게 12-well, 6-well 혹은 60-mm dish에 접종하여 사용하였다.

3. CCL20 측정

HT-29 세포 배양액에 포함된 CCL20 농도 측정은 Sierro 등(Sierro 등 2001)의 방법에 따라 시행하였다. 요약하면, 96-well ELISA 플레이트 (Maxisorp™, Nunc, Denmark)에 CCL20에 특이적인 단클론 항체 (clone 67310.111, R & D Systems)를 2 µg/mL의 농도로 코팅하고, 얻은 배양액으로부터 생산된 CCL20을 측정하는 데 이용하였다. CCL20에 대한 다클론 항체 (R & D Systems)를 이용해 분리된 CCL20 단백질의 양을 확인하였다. 발색 반응은 AP 효소가 결합된 이차 항체 (Sigma)를 이용하였다. 반응 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). 분리된 CCL20 단백질의 농도는 재조합 CCL20 단백질 (R & D Systems)의 표준곡선을 사용해 계산하였다. 역치 농도는 0.25 ng/mL이었다.

4. RNA 분리 및 RT-PCR

60-mm dish에서 키운 창자 상피세포 (5 × 10⁶)와 혈액 단핵구 (5 × 10⁶) 혹은 단핵구 (THP-1, 5 × 10⁶)를 자극원이 포함된 배지에서 4~24시간 동안 배양시킨 후 easy-Blue™ (Intron Biotechnology, Korea)를 이용해 총 RNA를 분리해 사용하였다. AccuPower® RT premix (Bioneer, Taejon, Korea)를 이용해 역전사 반응을 시켜 cDNA를 얻어내었고, 20 µL의 cDNA product 중 2~5 µL를 주형으로 하여, CCL20의 발현은 5'-ATGTGCTGTACCAAGAGTTTG-3' (sense)와 5'-TTACATGTTCTTGACTTTTTACTGAGGAG-3' (antisense)를 이용하여 (Scapini

등 2001), 그리고 GAPDH의 발현은 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' (sense)와 5'-AGCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' (antisense)를 이용하여 확인하였다 (Choi 등 2004). PCR 온도는 denaturation (94°C, 30초), annealing (56°C, 30초), 그리고 extension (72°C, 30초)로 하여 30회 실시하였다. 예상 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여, Ethidium Bromide로 염색하여 각각 크기를 확인하였다, 291bp (CCL20), 306bp (GAPDH).

5. 실시간 정량 PCR

실시간 정량 PCR 분석은 MJ Research (Waltham, MA)의 DyNAMOTM SYBR® Green qPCR Kit와 DNA Engine Opticon®를 이용하였다. 위의 cDNA product 중 1 µL를 주형으로 하여, 각각 10 pmole의 primer와 1x qPCR master mix를 첨가해 총 10 µL를 사용하였고, Opticon의 fluorescence thermocycler를 이용해 초기 denaturation (95°C, 10분)에 이어, denaturation (95°C, 30초), annealing (56°C, 30초), 그리고 extension (72°C, 30초)를 50회 실시하였다. GAPDH로 정량화 시킨 CCL20 mRNA 수준을 대조군과 비교하였다. 유전자 발현 증가 정도는 다음의 등식을 이용해 계산하였다, fold change = 2^{-ΔΔCT}, ΔΔCT = (C_{T, Target} - C_{T, GAPDH})_{time x} - (C_{T, Target} - C_{T, GAPDH})_{time 0}, time 0는 자극원 처리를 하지 않은 샘플에서, GAPDH로 정량한 값이 표적유전자 발현의 1배가 되는 시간을 나타낸다 (Livak 등 2001).

6. 세포내 Ca⁺⁺ 측정

아르곤 레이저 (457, 488, 514 nm)가 장착된 동일초점 현미경 (LSM 410, CAPO 63/1.2 water, Zeiss)을 이용하였다. Ca²⁺ 측정을 위해 스캔 속도는 512 × 512 픽셀당 1.08 초로 하였고, 핀홀의 크기는 1 µM로 하였다. 배양한 세포에 2 µM의 fluo-3-AM을 넣고, 37°C에서 30분 가량 반응시킨 다음, 형광 염색된 세포만 동일초점현미경으로 488 nm에서 관찰하였다. 두 개씩의 평균 이미지당 스캔 속도는 2 내지 4초로 하였다. 488 nm에서의 형광 수치는 fluo-3가 방출하는 수치와 95% 가까이 일치하였다. 상대적인

형광 강도는 RFI (the relative fluorescence intensity) 로 나타내었다.

7. Chemotaxis assay

96-well chemoTx #106-5 microplate (Neuro Probe, Gaithersburg, MD)를 이용해 시험관내 화학주성 (chemotaxis)을 수행하였다(Liao 등 1999). 혈액 단핵구나 Epstein-Barr Virus가 감염된 B 림프구를

1% FBS, 10 mM HEPES가 함유된 RPMI 1640 배지에 2×10^6 cells/mL로 재부유시킨 후, 대조군 배지, 재조합 CCL20 단백질 (1 μ g/mL)을 첨가한 배지, DFO만을 처리해 얻은 세포 배양액, DFO와 철분을 함께 처리해 얻은 세포 배양액, 그리고 TNF- α (1 ng/mL)를 처리해 얻은 세포 배양액을 각각 chamber의 lower well에 넣은 다음, chamber의 upper well에 혈액 단핵구를 넣고 CO₂ 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)

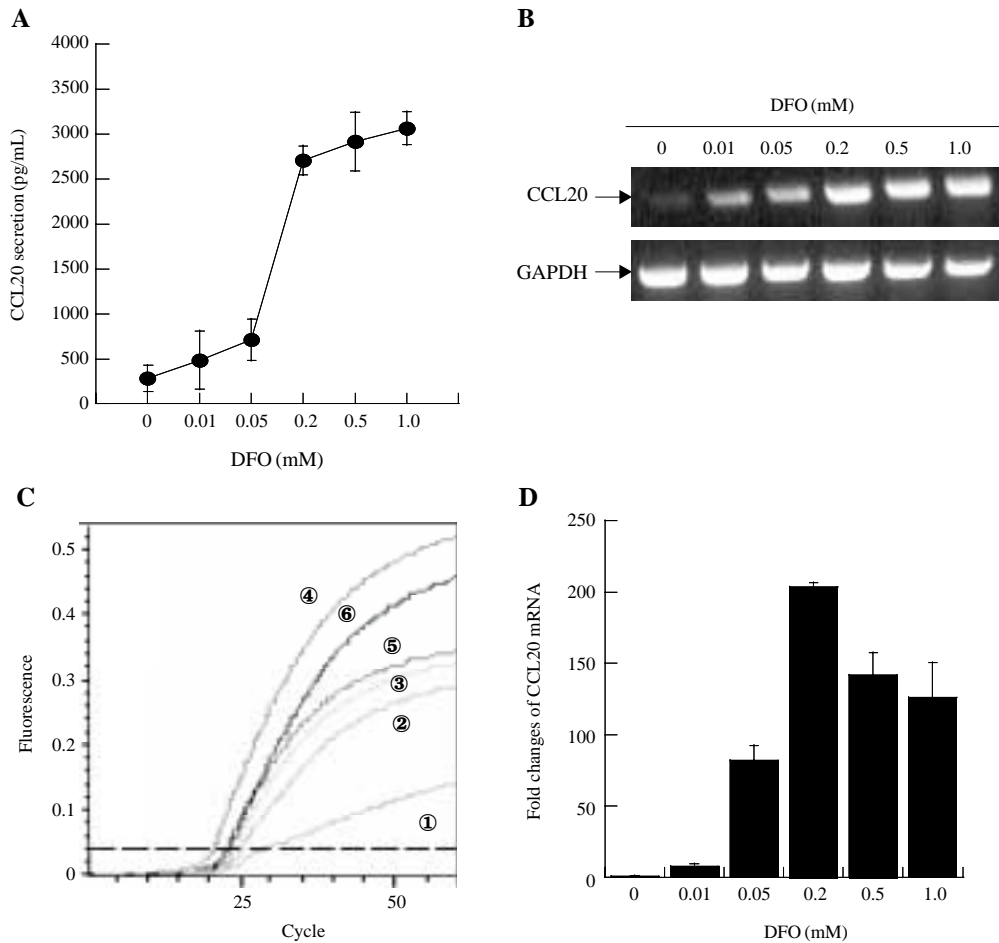


Fig. 1. Iron chelator induces CCL20 production in human intestinal epithelial HT-29 cells. Cells were treated for 20 h with the indicated concentrations of deferoxamine (DFO, 0~1 mM). Levels of CCL20 secretion and mRNA were determined by ELISA (A) and semi-quantitative RT-PCR (B), respectively. (C and D) Real-time quantitative RT-PCR was performed to confirm the results of the RT-PCR where the numbers 1, 2, 3, 4, 5 and 6, respectively, are the DFO concentrations, 0, 0.01, 0.05, 0.2, 0.5 and 1.0 mM (C). The data represented as the relative fold change of the initial CCL20 mRNA as normalized to GAPDH (D). Results are expressed as means \pm SD of three independent experiments.

에서 1~3 시간 동안 반응시켰다. 이동한 세포를 모아 CCR6항체를 이용해 형광 염색하여 flow cytometer로 이동한 세포의 수를 측정하였다.

8. Flow cytometric analysis

화학주성을 수행한 혈액 단핵구를 CD3 (FITC), CD19 (FITC) 그리고 CCR6 (PE)에 특이적인 항체로 각각 형광 염색하여 FACS Calibur (Becton Dickson, San Jose, CA)를 이용해 CD3와 CCR6를 발현하는 세포를 백분율로 나타내었다.

결 과

1. 인간의 창자 상피세포에서 CCL20 단백질의 생산과 mRNA의 축적에 있어 철분 포획제의 역할

실험 방법에서 언급한 바와 같이 인간 창자 상피 세포 (HT-29)를 배양하여 철분 포획제인 DFO를 처리했을 때, CCL20 단백질의 생산 (Fig. 1A)과 CCL20 mRNA의 축적 (Fig. 1B-D)이 현저히 증가되었다. CCL20 발현에 대한 DFO의 효과는 1 mM까지 농도

의존적으로 나타났으며, 최대 발현 유도는 0.2~1 mM에서 나타났고 이는 실시간 정량 PCR 을 통해서도 확인되었다 (Fig. 1C and D). DFO에 의한 CCL20 생산은 TNF- α (10 ng/mL)나 IL-1 β (1 ng/mL)에 비교할 만한 정도로 유도되었고, 이들 전-염증 사이토카인들과 함께 처리하였을 경우 CCL20 단백질의 생산은 부가적인 효과를 보였다 (Fig. 2A). 구조적으로 DFO와 차이를 갖는 철분 포획제인 미모신 (MIM) 역시 HT-29 세포에서 CCL20 단백질 생산을 유도하였다. 이와는 반대로 철분의 첨가 (FC, Fe³⁺, 0.5 mM)는 DFO나 MIM에 의한 CCL20 생산을 저해하였고 (Fig. 2B), 이는 철분 포획제가 HT-29 세포에서 세포내 철분에 특이적으로 작용함을 의미한다.

시간-의존적 실험을 통해 DFO가 서서히 CCL20 생산을 유도하고 최대 생산 유도는 처리후 8~12 시간 후에 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 3A). 이는 TNF- α 에 의한 CCL20 생산이 4시간 이내에 최대로 유도되는 것과는 다른 양상을 보였다. 또한, CCL20 단백질 생산 증가는 mRNA의 증가와 연관성을 나타냄을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B).

T84와 Caco-2 세포주를 이용하여 철분 포획제가

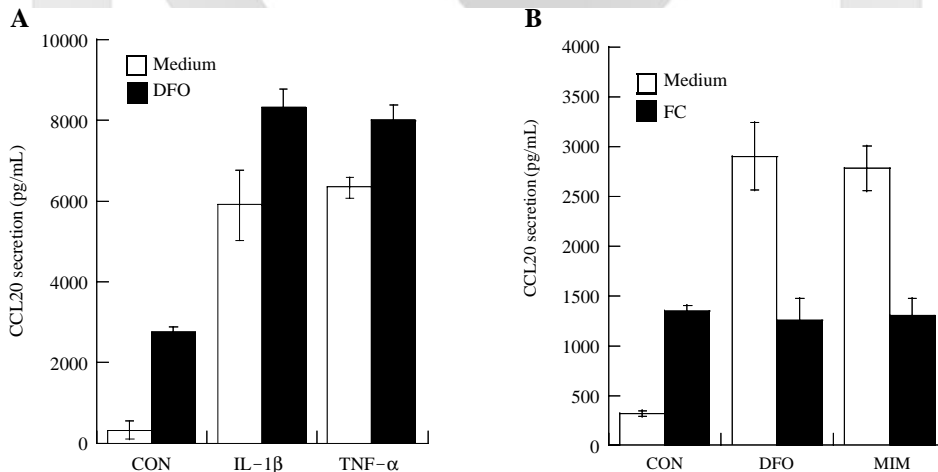


Fig. 2. Iron chelator-induced CCL20 production is up-regulated by proinflammatory cytokines but decreased by the addition of iron supplement. Cells were treated for 20 h with DFO (0.2 mM), IL-1 β (1 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL) (A), FC (Fe³⁺, 0.5 mM), MIM (0.2 mM) (B) or a combination thereof. The levels of CCL20 secretion were determined by ELISA. Results are expressed as means \pm SD of three independent experiments.

다른 타입의 상피세포에서도 CCL20 발현 유도에 비슷한 효과를 나타내는 지를 알아보았다. 0.2 mM의 DFO를 T84 세포에 처리했다. CCL20 발현 유도가 관찰되었고, Caco-2 세포의 경우에는 발현 유도가 이루어지지 않았다(Fig. 4A). CCL20은 염증 자극원에 의해 단핵구나 호중구 등에서 발현이 유도되는 주요 케모카인 중의 하나로 잘 알려져 있기 때문에(Scutysyer 등 2000, Scapini 등 2001, Scapini 등 2002, Akahoshi 등 2003), 우리는 DFO가 단핵구와 유사한 THP-1이나 혈액 단핵구에서도 이를 생산해 낼 수 있는지 알아보았다. Fig. 4B와 같이, 이러한 세포에서도 역시 DFO에 의해 CCL20 단백질과 mRNA가 효과적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 철분 포획제가 염증반응을 개시하고 유지함으로써 외부 병원성 미생물의 침입에 가장 먼저 직면하는 부위의 세포에 아주 광범위하게 관여함을 의미한다.

2. 창자 상피세포에서 철분 포획제에 의한 CCL20 생산 유도에 있어서 p38과 ERK1/2 인산화 효소의 역할

DFO에 의해 유도된 CCL20 생산은 p38 특이적

저해제인 SB202190 (20 μ M)과 ERK1/2의 선택적 저해제인 PD98059 (20 μ M) 혹은 U0126 (10 μ M)에 의해 강하게 저해되었으며, 이는 곧 이러한 인산화 효소가 DFO에 의한 CCL20 유도에 주요하게 작용함을 의미한다(Fig. 4). 그러나 이들 인산화 효소에 대한 저해제는 TNF- α 에 의한 CCL20 유도에는 약한 수준으로 영향을 주는 것으로 나타났고(Fig. 5), 이는 DFO에 의한 신호전달과 TNF- α 에 의한 경로가 다소 다른 양식으로 작용하여 CCL20 생산을 유도함을 알 수 있었다.

3. 창자 상피세포에서 철분 포획제에 의한 CCL20 생산 유도에 있어서 세포 내 칼슘 조절자의 역할

칼슘은 칼슘-의존적 인산화 효소의 활성화에 필수적이기 때문에, 다음으로 DFO에 의한 CCL20 생산이 세포내 칼슘 조절자에 의해 어떻게 영향을 받는 지 알아보고자 하였다. 흥미롭게도, 세포내 칼슘 포획제로 알려진 BAPTA-AM의 경우 오히려 DFO에 의한 CCL20 생산을 증가시켰다. 반대로, 칼슘 ionophore인 A23187이나 IP3-의존적 세포내 칼슘 방출제인 thapsigargin의 경우에는 DFO에 의한 CCL20 생산을 효과적으로 감소시켰다(Fig. 6A). 이와 마찬

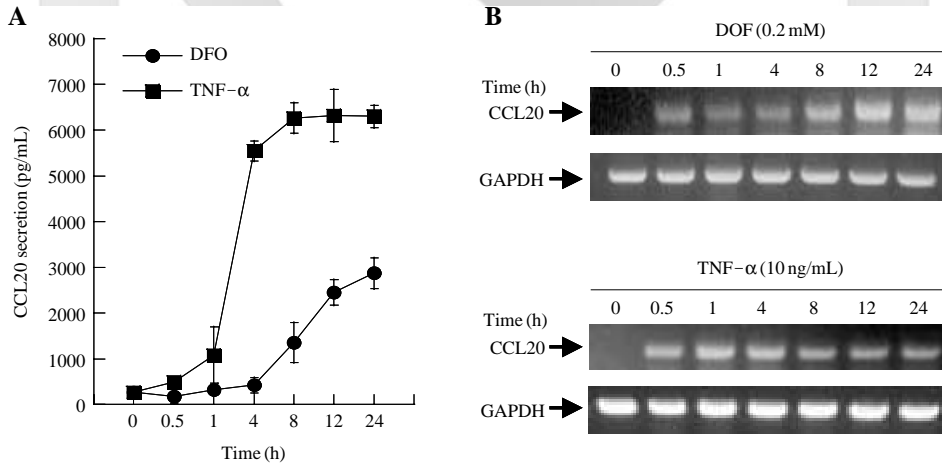


Fig. 3. Iron chelator induces CCL20 protein secretion and CCL20 mRNA accumulation in HT-29 cells in a time-dependent manner. Cells were incubated with DFO (0.2 mM) or TNF- α (10 ng/mL) for the indicated time periods. Levels of CCL20 protein (A) and mRNA (B) were determined by ELISA and RT-PCR, respectively. These data are representative of two independent experiments.

가지로 HT-29 세포에 DFO를 처리하면 A23187에 의해 유도되는 세포내 칼슘 이동을 크게 감소시켰다(Fig. 6B). A23187이나 thapsigargin처리는 TNF- α 에 의한 CCL20 생산 역시 현저히 저해하였는데(Fig. 6A), 이는 창자 상피세포에서 칼슘 신호가 철분 포획제나 TNF- α 에 의한 CCL20 생산에 역으로 작용함을 제시해 준다.

4. 창자 상피세포에서 철분 포획제에 의한 CCL20 유도에 PKC, PTK (티로신인산화 효소) 그리고 탈인산화 효소가 미치는 영향

서로 다른 PKC isotype에 대한 저해제들 중에서 오직 PKC δ 의 선택적 저해제인 rottlerin만이 DFO에 의한 CCL20 생산을 저해하였다(Fig. 7A). Rottlerin은 DFO에 대한 효과보다는 약한 정도이긴 하나 TNF- α 에 의한 CCL20 생산 역시 저해 하였는데 이는 창자 상피세포에서 CCL20 발현을 포함한 염증신호에 PKC δ 가 중요하게 작용함을 의미한다.

HT-29에서 DFO에 의한 CCL20 생산이 티로신 인산화 효소와 세린/트레오닌 인산화 효소의 활성을 필요로 하는 지를 알아보았다. 티로신 인산화 저해

제인 HerA (1 μ g/mL) 혹은 PP2 (10 μ M)를 전처리한 경우, DFO에 의해 유도되는 CCL20의 생산이 현저하게 감소되었다(Fig. 7B). 반면에 티로신 탈인산화 효소와 세린/트레오닌 탈인산화 효소에 특이적 저해제인 VA (20 μ M)나 OA (10 nM)를 각각 처리한 경우에는 DFO에 의한 CCL20 생산에 부가적인 효과를 나타내었다(Fig. 7B). 위의 두 탈인산화 효소에 대한 저해제 자체는 CCL20 생산에 거의 영향을 주지 않는 것으로 보아 티로신과 세린/트레오닌 인산화 효소는 HT-29에서 철분 포획제에 의한 CCL20 생산을 유도하는 데 있어서 필요한 신호전달 경로임을 알 수 있었다.

5. 철분 포획제에 의한 CCL20 생산 유도는 NF- κ B 비의존적이다.

5-ASA나 SASP와 같은 NF- κ B 저해제가 DFO나 TNF- α 에 의한 CCL20 생산을 저해하는 지를 알아보았다. Fig. 8에서 보여주는 바와 같이 오직 TNF- α 에 의한 CCL20 생산만이 5-ASA나 SASP에 의해 아주 현격하게 감소하였다. 이는 창자 상피세포에서 철분 포획제에 의한 CCL20 생산은 NF-

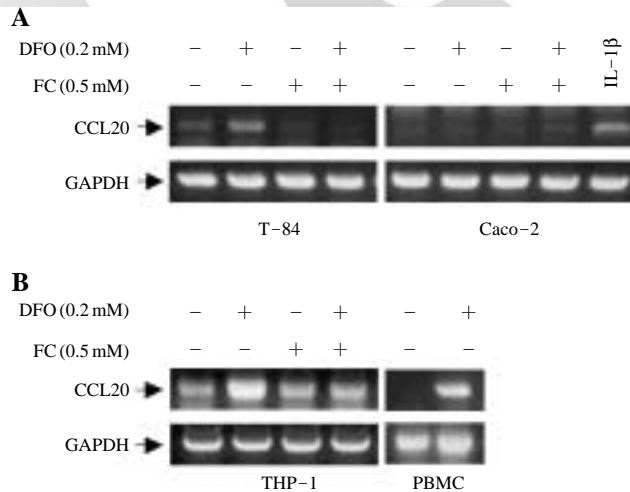


Fig. 4. Iron chelator up-regulates CCL20 mRNA in human Intestinal Epithelial Cells as well as in THP-1 and Peripheral Blood Mononuclear Cells. Human epithelial cells, T-84 and Caco-2 (A) and THP-1 and Peripheral Blood Mononuclear Cells (B) were treated for 20 h with deferoxamine (DFO, 0.2 mM) or DFO in combination with ferric citrate (FC, 0.5 mM). For some experiments, IL-1 β was treated for 20 h to reveal the positive control of CCL20 mRNA. Levels of mRNA were determined by semi-quantitative RT-PCR. These data are representative of three independent experiments.

κB 비의존적인 경로를 통해 이루어짐을 시사한다.

6. DFO를 처리한 HT-29 세포 배양액은 CCR6를 발현하는 세포의 이동을 유도한다.

마지막으로 DFO를 처리한 HT-29에서 얻은 배양액이 CCR6를 발현하는 세포의 이동을 야기시키는 지를 알아보았다. Fig. 9A에 보이는 바와 같이, 건강한 사람의 혈액 단핵구는 재조합 CCL20 단백질에 반응하여 이동하였고 이러한 세포 이동은 동일한 양의 재조합 CCL20 단백질을 첨가하여 농도구배를 없앨 경우, 억제되었다. 유사한 형태로, DFO만을 처리해 얻은 세포 배양액이나 TNF-α (1 ng/mL)를 처리해 얻은 세포 배양액 모두 재조합 CCL20 단백질과 비슷한 정도로 CCR6를 발현하는 세포의 이동을 야기시켰다. 이러한 세포 배양액에 의한 세포의 이동 또한 재조합 CCL20 단백질의 첨가에 의해 현저히 억제되었다. 어떠한 처리도 하지 않은 HT-29 세포 배양액 역시 어느 정도는 세포의 이동을 보였으나 이는 아마도 HT-29에서 일상적으로

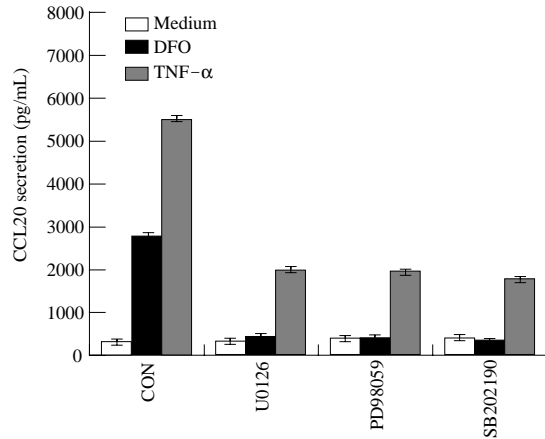


Fig. 5. Effects of MAPK manipulation on CCL20 release by iron chelator in HT-29 cells. Cells were pre-treated for 1 h with or without p38 kinase inhibitor, SB202190 (20 μM), or MEK1 inhibitors, U0126 (10 μM) and PD98059 (20 μM). The cells were then further incubated for 20 h with DFO (0.2 mM) or TNF-α (10 ng/mL). Levels of CCL20 protein were determined by ELISA. These data are representative of three independent experiments.

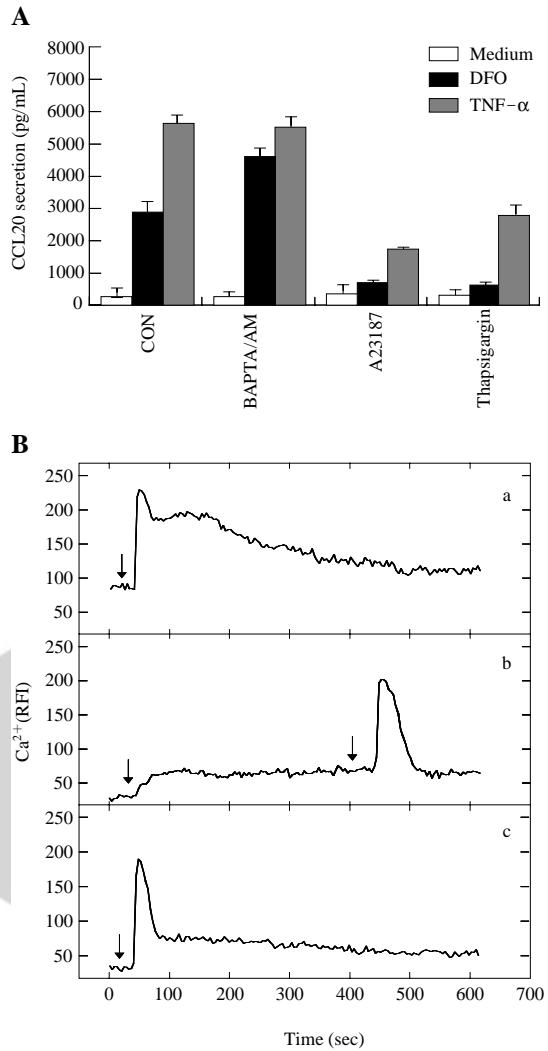


Fig. 6. (A) Effects of calcium manipulation on CCL20 release by iron chelator in HT-29 cells. Cells were pre-treated for 1 h with or without BAPTA/AM (10 μM), A23187 (10 μM) or thapsigargin (1 μM). Then the cells were further incubated for 20 h with DFO (0.2 mM) or TNF-α (10 ng/mL). Levels of CCL20 protein were determined by ELISA. These data are representative of three independent experiments. (B) Effect of iron chelator on the change of $[Ca^{2+}]_i$ induced by calcium ionophore in HT-29 cells. Cells were treated with A23187 (10 μM) (a) or DFO (0.2 mM) for 400 s followed by A23187 (b), or pretreated with DFO for 30 min, and then treated with A23187 (c). Each trace is a single cell representative of three independent experiments. RFI is an abbreviation of relative fluorescence intensity.

생산되는 CCL20이나 IL-8을 포함한 케모카인의 작용 때문으로 보인다. Fig. 9B에 의하면, 대략적으로 혈액 단핵구내의 림프구 중 20% 정도가 CCR6를 발현하는 것으로 나타났고 DFO를 처리한 HT-29 세포 배양액으로 화학주성을 시킨 후, 이동한 세

포를 flow cytometer로 확인한 결과 이동된 세포에 CCR6를 발현하는 세포의 비율이 더 많은 것으로 보아 DFO를 처리한 HT-29 세포 배양액이 생물학적인 활성을 띠는 CCL20 단백질을 생산하고 있음을 확인할 수 있었다.

Epstein-Barr Virus를 감염시켜 불멸화 시킨 B 림프구의 경우 CCR6의 발현이 증가되고 따라서 이 림프구는 이 수용체의 리간드에 대해 강한 반응성을 갖는다는 기존의 보고에 기초하여(Nakayama 등 2002), 우리는 이러한 세포가 대조군 배지와 비교하여 DFO를 처리한 HT-29 세포 배양액에 의해 효과적으로 이동이 이루어짐을 확인하였다(Fig. 9C). 이러한 결과들로 볼 때, DFO를 처리한 HT-29 세포 배양액에 의한 혈액 단핵구나 Epstein-Barr Virus에

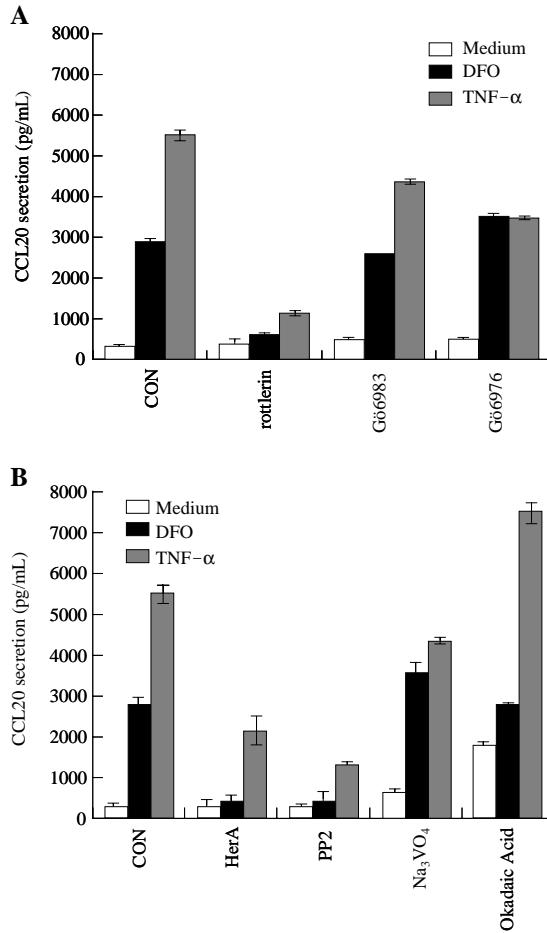


Fig. 7. Effects of PKC, PTK, and protein phosphatase modulators on CCL20 release by iron chelator in HT-29 cells. Cells were pre-treated for 1 h with or without selective PKC inhibitors (12 μM of rotterlin, 100 nM of Gö6983 and Gö6976) (A), inhibitors of tyrosine kinases (1 μg/mL of HerA and 10 μM of PP2), tyrosine phosphatases (20 μM of Na₃VO₄) or serine/threonine phosphatases (10 nM of Okadaic Acid) (B). The cells were then further incubated for 20 h with DFO (0.2 mM) or TNF-α (10 ng/mL). Levels of CCL20 protein were determined by ELISA. These data are representative of three independent experiments.

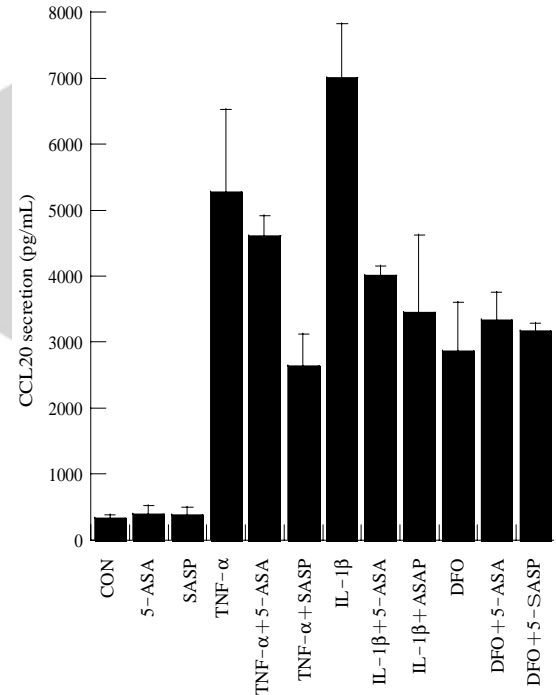


Fig. 8. Effects of NF-κB inhibitors on CCL20 release by iron chelator in HT-29 cells. Cells were pre-treated for 1 h with or without 5-ASA (10 mM) or SASP (5 mM). Then the cells were further incubated for 20 h with DFO (0.2 mM), TNF-α (10 ng/mL) or IL-1β (1 ng/mL). Levels of CCL20 protein were determined by ELISA. These data are representative of three independent experiments.

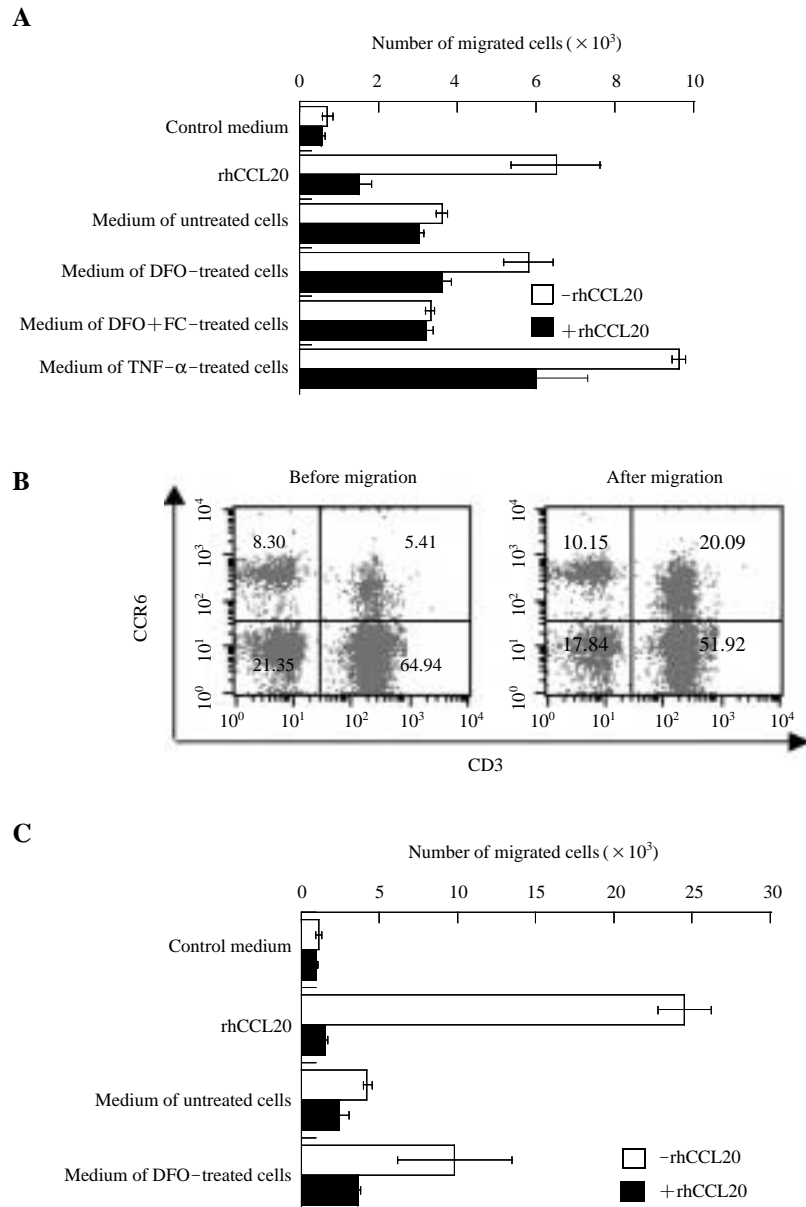


Fig. 9. Medium from DFO-treated HT-29 cells triggers migration of CCR6 expressing cells. (A) Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (2×10^6 cells/mL) were resuspended in chemotaxis medium as described in the *Materials and Methods*. Cells were applied to the upper wells of the chemoTx #106-5 chemotaxis chamber. Control medium, rhCCL20 (100 ng/mL), or basal medium of untreated, DFO-, DFO plus FC- or TNF- α -treated HT-29 cells in complete RPMI 1640 were applied to the bottom wells. When specified, rhCCL20 (100 ng/mL) (■) was mixed with cells during assay to eliminate CCL20 gradients. The results are representative of two independent experiments. (B) The migrated cells in the bottom wells of above (A) were collected, counted, and stained with CD3-FITC and CCR6-PE for flow cytometric analysis. Results are representative of two independent experiments. (C) The migration of EBV-immortalized B cells was determined as described in (A) above. Results are representative of three independent experiments.

의한 불멸화 B 림프구의 이동이 CCL20의 활성화에 특이적이고 의존적으로 이루어짐을 알 수 있었다.

고 찰

철분은 미생물에 필수적인 영양 요소이다(Weinberg 등 1978, Neilands 등 1981). 철분 공급이 제한된 환경에서 이를 얻어내기 위해 미생물은 여러 도구를 발달시켰다. 철분 공급과 운반은 주로 ‘수용체’나 미생물의 외막과 내막에 위치하는 ‘통로’에 관련된 물질과 ‘시테로포어’를 통해 이루어진다. 이러한 물질들은 철분에 특이적이고 높은 친화력을 가지며 주로 철분을 얻어낼 수 있는 환경으로 분비되어 철분을 운반하고 이를 이용해 복제와 성장에 이용하게 된다(Marx 등 2002).

철분은 숙주의 면역-감독 기능에 매우 중요한데, 이는 철분이 면역세포의 성장을 촉진시키거나 혹은 세포매개의 면역작용기와 사이토카인 활성화에 관여하기 때문이다(Laskey 등 1988, Seligman 등 1992). 철분결핍이나 철분과다는 T, B, NK 세포의 증식과 활성화에 변화를 초래하여 결국 이 두 가지 상황은 모두 면역세포에 모호한 효과를 나타낸다(Mainou-Rowler 등 1985, Brekelmans 등 1994). 본 연구에서 우리는 박테리아의 시테로포어 성분인 DFO가 창자 상피세포에서 특이적으로 CCL20 케모카인의 발현을 촉진시켜 CCR6를 발현하는 혈액 단핵구나 EBV로 불멸화된 B 림프구의 화학주성을 일으킬 수 있음을 확인하였다. CCL20 발현이나 CCR6 발현세포의 이동은 장내에서 적응면역 반응을 유도하는 데 필수적이다. 몇몇 사람들의 연구에 따르면, 철분과 철분 포획제 모두 염증매개체를 조절하거나 염증 반응을 변화시키는 것으로 알려져 있긴 하지만(Weiss 등 1992, O'Brien-Ladner 등 1998), 철분 포획제 자체가 통상의 면역 자극원 혹은 염증 자극원이 없이도 적응면역 반응을 일으킬 수 있음은 본 연구자들에 의해 처음으로 확인되었다.

Time-course 실험에 의하면, 창자 상피세포에서 철분 포획제에 의한 CCL20 생산은 TNF- α 에 의한 경우보다 더 느리게 유도되었는데 이는 결국 TNF-

α 나 IL-1 β 와 같은 전-염증 사이토카인에 의한 신호전달 경로와 DFO에 의해 유도되는 CCL20 발현이 조금은 다른 경로를 통해 이루어짐을 제시한다. 이에 대한 근거로 Fig. 8에서 보여주는 바와 같이 창자 상피세포에서 철분 포획제에 의한 CCL20 생산은 NF- κ B에 특이적인 저해제에 의한 영향을 받지 않는 것으로 보아, NF- κ B 전사 활성화에 비의존적으로 이루어짐을 확인할 수 있었다. Choi 등의 보고(2004)에서도 철분 포획제에 의한 IL-8 생산이 I- κ B 분해, ELISA에 기초한 NF- κ B 결합 활성화 그리고 NF- κ B 루시퍼라아제에 의한 유전자 발현 등에 비의존적으로 이루어짐을 확인한 바 있다. 이러한 결과들을 토대로 우리는 본 실험에서 세포내 철분 불균형에 의해 일어나는 신호전달 기작에 대해서 즉, 철분 포획제에 의해 유도되는 CCL20 생산에 있어서 주요하게 관련되는 신호전달 체계를 알아보고자 하였다.

어떠한 기작을 통해 철분 포획제가 CCL20 생산을 유도하는 지 알아보기 위해서 먼저 세포내 신호전달에 관련된 분자들의 작용을 저해할 수 있는 약리물질을 처리하여 그 효과를 ELISA를 통해 확인하였다. p38이나 ERK 저해제 처리는 철분 포획제에 의한 CCL20 생산을 억제하였고, TNF- α 에 의한 경우는 약하게 억제하였는데 이는 MAPK 경로가 철분 포획제에 의한 CCL20 생산에 주요한 물질로 작용하고 있음을 시사해준다. TNF- α 에 의한 케모카인 발현에는 주로 두 가지의 신호전달 경로를 필요로 하는데 이는 MAPK와 NF- κ B를 통해 이루어진다. 그러나 MAPK와 NF- κ B 저해제에 의해 IL-8 발현이 완전히 억제된다는 기존의 보고와(Bian 등 2001), 철분 포획제는 다르게 작용하는 것으로 보아 p38/ERK와 NF- κ B의 활성이 특히 창자 상피세포에서 특이적이고 분리된 경로로 관여함을 예측할 수 있었다.

세포내 칼슘의 일시적인 증가가 창자 상피세포에서 철분 포획제에 의한 CCL20 생산을 역으로 조절한다는 것은 매우 놀라운 일이다. 이러한 결과는 T84 창자 상피세포에서 A23187이나 thapsigargin에 의해 IL-8 유전자의 발현이 증가된다는 보고(Yu 등 2001)와 위 상피세포에서 헬리코박터 파일로리에

의한 IL-8 생산이 BAPTA-AM, TMB-8과 같은 세포내 칼슘 포획제에 의해 완전히 억제된다는 보고 (Nozawa 등 2002)와는 다른 결과를 보여준다. 이러한 차이는 비록 칼슘 자체는 CCL20 발현을 유도하는 신호로 작용하지만 철분 포획제에 대해서는 길항적으로 직접 작용할 수 있다는 사실로 설명할 수 있다. 실제로 우리는 HT-29나 T84에 A23187을 단독으로 처리했을 때 CCL20을 증가시키기를 확인하였다 (자료미제공). DFO처리는 A23187이나 thapsigargin에 의한 칼슘 스파이크를 감소시켰는 데 (Fig. 6), 이는 곧 칼슘과 철분 결핍 사이의 cross-talk을 의미한다.

PKC는 창자 상피세포에서 IL-8 생산에 중요한 조절자로 알려져 있지만 TNF- α 나 IL-1 β 에 의한 IL-8의 발현에는 PKC 비의존적임이 보고되었다 (Gross 등 1995). PKC δ 저해제인 rotterlin의 경우, 포획제에 의한 CCL20 생산을 효과적으로 억제하였고, TNF- α 에 의한 CCL20 생산 역시 약간은 감소하였다. 이는 염증신호 유도에 있어서 PKC δ 가 중요한 요소로 작용할 수 있음을 시사한다. 그러나, 여러 연구에 따르면 rotterlin의 효과는 PKC δ 억제에 항상 일관성을 보이지는 않기 때문에 (Davis 등 2000, Susarla 등 2003), DFO나 TNF- α 에 의한 CCL20 생산에 미치는 rotterlin의 효과는 좀 더 연구가 필요할 것으로 보인다.

HerA는 PKC나 PKA에는 영향을 주지 않는 src 티로신 인산화 효소에 대한 저해제이다 (Beales 등 1997). 본 연구에 따르면, HerA를 전처리한 경우 철분 킬레이제의 효과가 완전히 억제되는 것으로 보아 PTK 활성이 철분 포획제 관련 신호전달에 중요한 요소임을 추측할 수 있었다. 반대로 탈인산화 효소에 대한 저해제인 OA나 VA의 경우에는 자체로도 CCL20 생산을 유도하고 또한 철분 포획제에 의한 생산도 증가시켰는 데, 이러한 결과들은 이들이 TNF- α , IP-10 그리고 IL-8 등과 같은 염증단백질의 축적을 촉진시킨다는 기존의 보고들과 일치하는 것을 보여준다 (Tebbo 등 1994, Sonoda 등 1997). OA나 VA는 ERK1의 인산화를 유도하는 물질로 잘 알려져 있는데 (Sonoda 등 1997), 이는 아마도 이러한

약리물질들이 인산화된 ERK나 관련된 여러 단백질의 반감기를 연장시켜 CCL20 유전자의 활성을 더 오래 유지시키는 것으로 보여진다.

철분 포획제가 단핵구 세포주나 혈액 단핵구와 같은 타입의 세포에서도 CCL20 발현을 유도한다는 사실은 매우 흥미로운 일이다. 이는 곧 철분 포획제에 의해 유도되는 염증신호가 병원성 미생물의 도전에 직면하는 첫번째 경로가 되는 이러한 세포에 포괄적인 연관성을 가지고 있음을 시사한다 (Kunkel 등 1990). 그러나 Human Umbilical Vein Endothelial Cells의 경우에 철분 포획제를 고농도 (~1 mM)로 처리하여도 CCL20 생산을 유도하지 않는 것으로 보아 다양한 자극에 의해 Human Umbilical Vein Endothelial Cells에서 CCL20가 발현된다는 보고 (Hromas 등 1997, Dieu-Nosjean 등 2000)에 비추어 볼 때, 철분 포획제에 의한 CCL20 생산은 세포 특이적인 것으로 보인다. 게다가 철분 포획제에 대한 세포의 반응성 정도는 세포의 분화 정도에 따라 다르다는 것을 Caco-2를 통해 알 수 있었다. 또 한가지 흥미로운 점은 철분 보충(FC)도 마찬가지로 창자 상피세포에서 CCL20 생산을 어느 정도 유도한다는 것이다. 반면에 단핵구나 혈액 단핵구에서는 반응을 보이지 않았다. 이러한 결과는 철분결핍이나 철분과다상황 모두가 장의 점막 표면에서, 특히 염증반응을 유도하는 데 작용할 수 있음을 시사한다. 이와 관련하여 철분을 경구 투여로 보충하는 경우, 염증성 장질환을 악화시키거나, 염증이 일어난 점막에 철분함량이 증가되어 있다는 보고가 있었다 (Millar 등 2000).

창자 상피세포가 적응면역 반응에 주요한 사이토카인을 분비하지 않는 반면, 최근의 보고에 따르면 장내 세균감염이나 박테리아산물 그리고 전-염증 자극원에 의해서 CCL20의 생성으로 적응면역 반응에 관계된 면역 세포를 불러 모은다는 사실이 보고되었다 (Izadpanah 등 2001, Sierro 등 2001, Fujie 등 2001, Nakayama 등 2002). DFO를 처리한 HT-29 세포 배양액에 의해 혈액 단핵구나 Epstein-Barr Virus에 의한 불멸화 B 림프구의 이동이 효과적으로 이루어지는 것으로 보아, 철분결핍 상황이 직접적으로

적응면역을 개시하는 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

지금까지 우리는 창자 상피세포에서 세포내의 철분결핍이 CCL20 mRNA와 단백질의 생산을 유도함을 보고하였다. 또한, 이는 NF- κ B의 비의존적인 경로를 통해 이루어지고, 칼슘이나 MAPK, PKC 그리고 PTK 등 다양한 경로를 포함하고 있음을 확인하였다. 이러한 결과들은 창자 상피세포에 감염된 박테리아에 의해 야기되는 철분결핍 상태가 통상의 면역 자극이나 염증 자극이 없이도 CCL20과 같은 케모카인의 발현을 유도해 자연면역이나 적응면역을 일으킬 수 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Akahoshi TT, Sasahara R, Namai T, Matsui H, Watabe H, Kitasato M, Inoue, Kondo H : Production of macrophage inflammatory protein 3 α (MIP-3 α) (CCL20) and MIP-3 β (CCL19) by human peripheral blood neutrophils in response to microbial pathogens. *Infect Immun* 71 : 524-526, 2003.
- Beales IL, Calam J : Stimulation of IL-8 production in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori*, IL-1 β and TNF- α requires tyrosine kinase activity, but not protein kinase C. *Cytokine* 9 : 514-520, 1997.
- Bian ZM, Elner SG, Yoshida A, Kunkel SL, Su J, Elner VM : Activation of p38, ERK1/2 and NIK pathways is required for IL-1 β and TNF- α -induced chemokine expression in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 73 : 111-121, 2001.
- Bierer BE, Nathan DG : The effect of desferriethiocin, an oral iron chelator, on T-cell function, *Blood* 76 : 2052-2059, 1990.
- Brekelmans P, van Soest P, Leenen PJ, van Ewijk W : Inhibition of proliferation and differentiation during early T cell development by anti-transferrin receptor antibody. *Eur J Immunol* 24 : 2896-2902, 1994.
- Brieva JA, Stevens RH : Involvement of the transferrin receptor in the production and NK-induced suppression of human antibody synthesis. *J Immunol* 133 : 1288-1292, 1984.
- Choi EY, Kim EC, Oh HM, Kim S, Lee HJ, Cho EY, Yoon KH, Kim EA, Han WC, Choi SC, Hwang JY, Park C, Oh BS, Kim Y, Kim KC, Park KI, Chung HT, Jun CD : Iron chelator triggers inflammatory signals in human intestinal epithelial cells: involvement of p38 and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J Immunol* 172 : 7069-7077, 2004.
- Crichton RR, Ward RJ : Iron metabolism—new perspectives in view. *Biochemistry* 31 : 11255-11264, 1992.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P : Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351 : 95-105, 2000.
- Desbaillets I, Diserens C, de Tribolet N, Hamou MF, Van Meir EG : Regulation of interleukin-8 expression by reduced oxygen pressure in human glioblastoma. *Oncogene* 18 : 1447-1456, 1999.
- Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Zlotnik A, Caux C : Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 192 : 705-718, 2000.
- Dlaska M, Weiss G : Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 162 : 6171-6177, 1999.
- Finlay BB, Falkow S : Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61 : 136-169, 1997.
- Fujiie S, Hieshima K, Izawa D, Nakayama T, Fujisawa R, Ohyanagi H, Yoshie O : Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 in mucosal epithelial cells through NF- κ B. *Int Immunol* 13 : 1255-1263, 2001.
- Golding S, Young SP : Iron requirements of human lymphocytes: relative contributions of intra- and extra-cellular iron. *Scand J Immunol* 41 : 229-236, 1995.
- Gray CP, Arosio P, Hersey P : Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells. *Blood* 99 : 3326-3334, 2002.
- Gross V, Andus T, Daig R, Aschenbrenner E, Scholmerich J, Falk W : Regulation of interleukin-8 production in a human colon epithelial cell line (HT-29). *Gastroenterology* 108 : 653-661, 1995.
- Hieshima K, Imai T, Opendakker G, Van Damme J, Kusuda J,

- Tei H, Sakaki Y, Takatsuki K, Miura R, Yoshie O, Nomiyama H : Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 272 : 5846-5853, 1997.
- Hromas R, Gray PW, Chantry D, Godiska R, Krathwohl M, Fife K, Bell GI, Takeda J, Aronica S, Gordon M, Cooper S, Broxmeyer HE, Klemsz MJ : Cloning and characterization of exodus, a novel β -chemokine. *Blood* 89 : 3315-3322, 1997.
- Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF : Regulated MIP-3 α /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 : G710-719, 2001.
- Kunkel SL, Strieter RM, Chensue SW, Basha M, Standiford T, Ham J, Remick DG : Tumor necrosis factor- α , interleukin-8 and chemotactic cytokines. *Prog Clin Biol Res* 349 : 433-444, 1990.
- Laskey J, Webb I, Schulman HM, Ponka P : Evidence that transferrin supports cell proliferation by supplying iron for DNA synthesis. *Exp Cell Res* 176 : 87-95, 1988.
- Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM : CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein-3 α . *J Immunol* 162 : 186-194, 1999.
- Livak KJ, Schmittgen TD : Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25 : 402-408, 2001.
- Mainou-Fowler T, Brock JH : Effect of iron deficiency on the response of mouse lymphocytes to concanavalin A: the importance of transferrin-bound iron. *Immunology* 54 : 325-332, 1985.
- Marx JJ : Iron and infection: competition between host and microbes for a precious element. *Best Pract Res Clin Haematol* 15 : 411-426, 2002.
- Millar AD, Rampton DS, Blake DR : Effects of iron and iron chelation in vitro on mucosal oxidant activity in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 14 : 1163-1168, 2000.
- Nakayama T, Fujisawa R, Izawa D, Hieshima K, Takada K, Yoshie O : Human B cells immortalized with Epstein-Barr virus upregulate CCR6 and CCR10 and downregulate CXCR4 and CXCR5. *J Virol* 76 : 3072-3077, 2002.
- Narayanan PK, LaRue KE, Goodwin EH, Lehnert BE : Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. *Radiat Res* 152 : 57-63, 1999.
- Neilands JB : Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* 50 : 715-731, 1981.
- Nozawa Y, Nishihara K, Peek RM, Nakano M, Uji T, Ajioka H, Matsuura N, Miyake H : Identification of a signaling cascade for interleukin-8 production by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 64 : 21-30, 2002.
- O'Brien-Ladner AR, Blumer BM, Wesselius LJ : Differential regulation of human alveolar macrophage-derived interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α by iron. *J Lab Clin Med* 132 : 497-506, 1998.
- Roebuck KA : Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 19 : 429-438, 1999.
- Saleppico S, Mazzolla R, Boelaert JR, Puliti M, Barluzzi R, Bistoni F, Blasi E : Iron regulates microglial cell-mediated secretory and effector functions. *Cell Immunol* 170 : 251-259, 1996.
- Scapini P, Crepaldi L, Pinardi C, Calzetti F, Cassatella MA : CCL20/macrophage inflammatory protein-3 α production in LPS-stimulated neutrophils is enhanced by the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and IFN- γ through independent mechanisms. *Eur J Immunol* 32 : 3515-3524, 2002.
- Scapini P, Laudanna C, Pinardi C, Allavena P, Mantovani A, Sozzani S, Cassatella MA : Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α)/CCL20 and MIP-3 β /CCL19. *Eur J Immunol* 31 : 1981-1988, 2001.
- Schutysse E, Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Conings R, Put W, Wuyts A, Proost P, Van Damme J : Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3a from normal and transformed cells. *J Immunol* 165 : 4470-4477, 2000.
- Schutysse E, Struyf S, Van Damme J : The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 14 : 409-426, 2003.
- Seligman PA, Kovar J, Gelfand EW : Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology* 60 : 19-26, 1992.

- Shapiro L, Dinarello CA : Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production. *Exp Cell Res* 231 : 354-362, 1997.
- Sierro F, Dubois B, Coste A, Kaiserlian D, Kraehenbuhl JP, Sirard JC : Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 13722-13727, 2001.
- Sonoda Y, Kasahara T, Yamaguchi Y, Kuno K, Matsushima K, Mukaida N : Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF- κ B activation. *J Biol Chem* 272 : 15366-15372, 1997.
- Susarla BT, Robinson MB : Rottlerin, an inhibitor of protein kinase C δ (PKC δ), inhibits astrocytic glutamate transport activity and reduces GLAST immunoreactivity by a mechanism that appears to be PKC δ -independent. *J Neurochem* 86 : 635-645, 2003.
- Tanji K, Imaizumi T, Matsumiya T, Itaya H, Fujimoto K, Cui X, Toki T, Ito E, Yoshida H, Wakabayashi K, Satoh K : Desferrioxamine, an iron chelator, upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in a human macrophage cell line. *Biochim Biophys Acta* 1530 : 227-235, 2001.
- Tebo JM, Hamilton TA : Okadaic acid stimulates inflammatory cytokine gene transcription in murine peritoneal macrophages. *Cell Immunol* 153 : 479-491, 1994.
- Weinberg ED : Iron and infection. *Microbiol Rev* 42 : 45-66, 1978.
- Weinberg ED : Iron, asbestos, and carcinogenicity. *Lancet* 1 : 1399-1400, 1989.
- Weiss G., Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H : Iron modulates interferon- γ effects in the human myelomonocytic cell line THP-1. *Exp Hematol* 20 : 605-610, 1992.
- Weiss G, Wachter H, Fuchs D : Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunol Today* 16 : 495-500, 1995.
- Weiss G., Werner-Felmayer G, Werner ER, Grunewald K, Wachter H, Hentze MW : Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J Exp Med* 180 : 969-976, 1994.
- Wesselborg S, Bauer MK, Vogt M, Schmitz ML, Schulze-Osthoff K : Activation of transcription factor NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem* 272 : 12422-12429, 1997.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L : Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80 : 617-653, 2000.
- Yu Y, Chadee K : Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 161 : 3746-3752, 1998.
- Yu Y, De Waele C, Chadee K : Calcium-dependent interleukin-8 gene expression in T84 human colonic epithelial cells. *Inflamm Res* 50 : 220-226, 2001.

Abstract

Iron Chelator Induces MIP-3 α /CCL20 in Human Intestinal Epithelial Cells: Implication for Triggering Mucosal Adaptive Immunity

Myeong-Su Lee, Hyun-Ju Lee¹, Won-Cheol Han², Jae-Min Oh³, Chang-Duk Jun¹

*Department of Internal Medicine, ¹Department of Microbiology and Immunology,
²Department of Pathology, ³Department of Anatomy, Wonkwang University School of Medicine*

A previous report by this laboratory demonstrated that bacterial iron chelator (siderophore) triggers inflammatory signals, including the production of CXC chemokine IL-8, in human intestinal epithelial cells (IECs). Microarray-based gene expression profiling revealed that iron chelator also induces CC chemokine MIP-3 α /CCL20. As CCL20 is chemotactic for the cells involved in host adaptive immunity, this suggests that iron chelator may stimulate IECs to have the capacity to link mucosal innate and adaptive immunity. The basal medium from iron chelator deferoxamine (DFO)-treated HT-29 monolayers was as chemotactic as rhCCL20 at equivalent concentrations to attract CCR6⁺ cells. The increase of CCL20 protein secretion appeared to correspond to that of CCL20 mRNA levels, as determined by real-time quantitative RT-PCR. The efficacy of DFO at inducing CCL20 mRNA was also observed in human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and in THP-1 cells, but not in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). Interestingly, unlike other proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , a time-dependent experiment revealed that DFO slowly induces CCL20, suggesting a novel mechanism of action. A pharmacologic study also revealed that multiple signaling pathways are differentially involved in CCL20 production by DFO, while some of those pathways are not involved in TNF- α -induced CCL20 production. Collectively, these results demonstrate that, in addition to some bacterial products known to induce host adaptive immune responses, direct chelation of host iron by infected bacteria may also contribute to the initiation of host adaptive immunity in the intestinal mucosa.

Key words : Iron, Iron chelator, MIP-3 α /CCL20, Deferoxamine, TNF- α , Adaptive immunity