ORIGINAL ARTICLE

Effects of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MQ) on MCP-1 Induced THP-1 Migration

Si Hyun Kim¹, Bo Bin Park¹, Sung Eun Hong¹, Sung Ryul Ryu¹, Jang Ho Lee¹, Sa Hyun Kim¹, Pyeongjae Lee², Eun-Kyung Cho³, Cheol Moon¹¹Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon, Korea²School of Industrial Bio-Pharmaceutical Science, Semyung University, Jecheon, Korea³Department of Biomedical Laboratory Science, Kyungwoon University, Gumi, KoreaMCP-1에 의해 유도된 THP-1 유주에 미치는
2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MQ)의 영향김시현¹, 박보빈¹, 홍성은¹, 유성률¹, 이장호¹, 김사현¹, 이평재², 조은경³, 문 철¹¹세명대학교 임상병리학과, ²세명대학교 바이오제약산업학부, ³경원대학교 임상병리학과

ARTICLE INFO

Received April 29, 2019

Revised May 15, 2019

Accepted May 22, 2019

Key words

2-methoxy-1,4-naphthoquinone

Migration

Monocyte

Monocyte chemoattractant protein 1

ABSTRACT

This study examined the effects of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MQ) on the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)-induced migration of monocytes, which is an important phenomenon for the body defense and immune response. MQ is a major component extracted from *Impatiens balsamina* leaves, which have been used for many years in Asian medicine for the treatment of a range of diseases and pain. The cytotoxicity of MQ began to appear at a concentration of 10 μ M, and approximately 50% cytotoxicity was confirmed at 100 μ M. The MCP-1 induced migration of the THP-1 monocyte cell line increased after MQ treatment in a dose dependent manner and the largest increase was observed at 0.1 μ M. The level of cAMP expression decreased after a treatment with 0.1 μ M MQ. The phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (Erk1/2), a key signaling protein involved in the signaling pathway of C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2), a receptor for MCP-1, was increased by the simultaneous treatment of 0.1 μ M MQ. These results show that MQ increases the MCP-1-induced migration of THP-1, decreases the level of cAMP expression, and increases the level of Erk1/2 phosphorylation.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

단구는 골수에서 생성되는 혈구로써 선천면역계를 구성하는 주요 세포다. 혈액을 따라 신체를 순환하며 탐식 기능 수행 뿐 아니라, 조직으로 유주(migration)한 후에는 다양한 대식세포 혹은 수지상세포로 분화하여 조직에 침투한 외부 감염 인자 탐식,

조직 항상성 유지 등의 기능을 발휘한다[1]. 수지상세포는 외부 인자 탐식 후 T림프구에게 항원을 제시하여 선천면역과 후천면역의 매개자로서 역할을 수행한다. 그러므로, 단구의 활성화 기능에 대한 지식은 면역반응 전체를 이해하는 중요한 시작점이 된다. 나아가 단구의 활성화 기능을 강화 혹은 제어할 수 있는 기전을 통해 외부 침입 인자에 대한 방어를 강화하거나 면역반응을 조절할 수 있을 것으로 여겨진다. Monocyte chemoattractant protein-c (MCP-1)은 사람 암세포주 배양액에서 발견된 최초의 CC chemokine으로써 단구의 유주를 유발하는 기능을 지닌 암 유래 화학주성인자로 규명되었다[2]. 이후 단구 뿐

* Corresponding author: Cheol Moon

Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, 65 Semyeong-ro, Jecheon 27136, Korea

E-mail: antigene@semyung.ac.kr

* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7849-650X>

아니라 기억/활성 T세포, 자연살해세포, 그리고 비만세포 등도 MCP-1에 의해 유주현상을 일으킨다는 결과가 보고되었다[3-5].

2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MQ)는 봉선화(*Impatiens balsamina*) 잎에서 추출한 주요 성분이다. 봉선화는 다양한 질환과 피부 통증을 치료하기 위한 전통 약제로 사용되어왔다. 아시아와 중국에서 류마티스, 골절, 뱀독, 물고기 독 중독의 치료에 사용되었으며, 베트남에서는 봉선화 추출액을 발모 자극제로 사용하였다. MQ는 피부사상균, 효모와 같은 진균과 호기성, 편성 혐기성 및 혐기성 세균에 대한 항균력을 지니고 있음이 보고되었다[6-8]. 또한, 암세포에 대한 효과도 보고되었다. 사람 유방암세포주인 MDA-MB-231의 침습과 유주가 MQ에 의해 억제되었으며, 폐선암종(lung adenocarcinoma)의 세포자멸사를 유도하였다. 이 세포자멸사는 MQ에 의한 c-Jun N-terminal kinase (JNK)와 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달 경로를 통해 진행되었다[9,10]. Mori 등은 MQ가 Wnt 신호전달 중 TCF/ β -catenin의 전사 활성을 억제한다고 보고하였다[11]. 2003년에 RBL-2H3세포와 RAW264.7 세포에 대한 면역조절 기능도 보고되었다[12]. 최근에는 사람 혈액으로부터 분리한 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocytes, PMN)와 단구의 여러 활성에 MQ가 미치는 영향이 보고되었다. Jantan 등은 사람 탐식세포의 유주, 골수형과산화효소(myeloperoxidase, MPO) 활성, 호흡폭발(respiratory burst), 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성 등이 MQ에 의해 감소됨을 보고하였으며, MQ가 탐식세포의 선천반응을 조절하는 항염증 물질임을 제안하였다[13]. 이에 본 연구진은 MCP-1에 의해 유도된 단구세포주 THP-1의 유주에 MQ가 미치는 영향과 그 기전에 대해 알아보았으며, MQ가 MCP-1에 의한 유주현상을 증가시켰으며, 연관된 cAMP 발현을 감소시키고, Erk1/2 인산화는 증가시키는 경향을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시약

본 연구에서 사용된 시약은 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MQ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 Recombinant human CCL2 (MCP-1, BioLegend, San Diego, CA, USA)이다.

2. 세포 및 세포배양

사람 단핵구세포주 THP-1은 한국세포주은행(Korean Cell

Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 분양 받았다. Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with L-glutamine (Lonza, Walkersville, MD, USA)에 10% (v/v) Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1%(v/v) 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (Welgene, Daegu, Korea), 1% (v/v) non-essential amino acid (Welgene, Daegu, Korea)를 첨가하여 세포배양액으로 사용하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건을 갖춘 배양기를 이용하여 진행하였다.

3. MQ 세포독성 측정

THP-1 세포 1×10^4 개를 96-well plates에 seeding 하고 다양한 농도(0, 0.5, 1, 10, 100 μ M)의 MQ를 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. EZ-CyTox cell viability assay kit (Daeil Lab Servie, Seoul, Korea)을 이용하여, 제조사의 측정 방법에 따라 MQ의 THP-1에 대한 세포독성을 평가하였다.

4. Transwell migration assay

세포 유주 평가를 위해 5 μ m pore size의 falcon cell culture inserts (Corning Co., NY, USA)와 24 wells falcon companion tissue culture plate (Corning Co., NY, USA)를 사용하였다. 실험은 migration buffer (RPMI 1640, 10 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA)를 이용하여 진행하였고, 실험 전 세포는 migration buffer와 함께 37°C, 5% CO₂ 환경에서 overnight starvation 과정을 거쳤다. 이후 조건 당 2×10^5 의 THP-1 세포를 200 μ L의 유주완충액에 섞어 insert에 넣고, underwell에는 MCP-1이 첨가된 유주완충액 600 μ L를 넣었다. 준비된 insert를 각 underwell에 삽입하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 배양 후에 insert를 제거하고 underwell로 이동한 세포들을 trypan blue를 이용하여 염색 계수 하였다.

5. cAMP 분비량 측정

THP-1 세포주를 96 well plate에 2×10^5 cells/well로 seeding 후 조건별로 MCP-1과 MQ를 처리하였다. 4시간 후 96 well plate를 원심분리 하고 상층액을 얻어 cAMP 측정용 ELISA kit (CELL BIOLABS, San Diego, CA, USA)를 이용하여 cAMP를 정량하였다. 제조사의 측정 방법에 의거 실험을 진행하였다.

6. Western blot을 통한 단백질량 및 인산화정도 분석

THP-1 세포주를 60 mm 배양 접시에 2×10^6 cells/well로 seeding 후 MCP-1을 100 ng/mL 농도로, MQ를 다양한 농도 (0, 0.1, 1, 10 μ M)로 2시간 동안 처리해 주었다. PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer를 이용해 세포를 용해시키고 19,000 g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 단백질의 농도는 Lowry protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용해 정량하였고, 30 μ g의 단백질을 10% acrylamide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 nitro-cellulose membrane에 transfer하고 5% skim milk를 이용해 실온에서 1시간 blocking 후 각각 pErk1/2, Erk, GAPDH에 특이적인 1차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight 동안 반응시켰다. 1차 항체와 반응이 끝나면 3회 세척 후 2차 항체와 실온에서 2시간 동안 반응 시키고, 다시 3회 세척한 후 ECL kit (Thermo, Waltham, MA, USA)와 반응시켜 Chemi Doc (BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용해 단백질의 양 및 인산화 정도를 측정하였다. Erk1/2 인산화 변화의 정량화는 Image Lab version 5.2.1 (BioRad, Hercules, CA, USA) 프로그램을 이용했다.

7. 통계분석

실험결과는 mean $\pm$ SD로 표현하였다. 통계 프로그램(SPSS version 14.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여

Figure 1. Cytotoxicity of MQ to THP-1 cells. 1×10^4 THP-1 cells were cultured with various concentrations of MQ (0, 0.1, 0.5, 1, 10 μ M) for 24 hours. The cell viability was measured by measuring the absorbance at 450 nm after incubating with WST reagent for an additional 2 hours. Values present mean $\pm$ SD of three separate experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01).

ANOVA 방식 혹은 Student's t-test 방식으로 통계 처리하였다. P < 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. MQ의 세포독성 평가

THP-1 세포를 MQ와 함께 24시간 배양했을 때, 10 μ M 농도에서 세포독성이 나타나기 시작하여 100 μ M의 농도에서 약 40% 정도의 세포독성이 나타났다. 반면에 0.1과 1 μ M 사이의 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았다(Figure 1).

2. MQ에 의한 세포 유주 증가

다양한 농도의 MQ (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M)를 MCP-1과 함께 처리해 주고 4시간 후에 underwells로 이동한 세포를 계수하였다. MQ 농도에 비례하여 MCP-1 유도 세포 유주가 증가하였다(Figure 2). 0.001 μ M 농도에서부터 유주가 증가하기 시작하여, 0.1 μ M 농도에서 가장 큰 증가가 관찰되었으며, 1 μ M 농도에서는 증가 추세가 감소하였다. 10 μ M MQ 처리 시에는 MCP-1 단독 처리군과 비슷한 정도를 나타냈고, 100 μ M 을 처리했을 때는 MCP-1 단독 처리 조건에 비해 오히려 감소하였다.

3. MQ에 의한 cAMP 발현 변화

THP-1 세포를 MCP-1 및 MQ 처리 시, cAMP 발현의 변화를 ELISA 기법으로 측정하였다. 96-well plates에 2×10^5 /well의 THP-1 세포를 seeding 하고, MCP-1 단독 혹은 여러 농도의

Figure 2. Increase of MCP-1 induced THP-1 migration by MQ. THP-1 cells are incubated with or without MCP-1 (100 ng/mL). The cells incubated with MCP-1 are simultaneously treated with various concentrations of MQ (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M). After 4h of incubation, the cells of underwells were counted through trypan blue exclusion counting method. Values present mean $\pm$ SD of three separate experiments (* P < 0.05, ** P < 0.01).

MQ (0, 0.1, 1, 10 μ M)를 동시에 처리해 주었다. 4시간 배양 후 상층액을 얻어 ELISA kit 제조사의 실험방법에 따라 cAMP 농도를 측정하였다. 세포 단독 배양의 조건에서는 약 4.8 nM의 cAMP가 측정되었다. MCP-1 단독 처리 시에는 약 4.4 nM의 cAMP가 측정되었고, 0.1 μ M MQ 동시 처리 시에는 4.18 nM로 더욱 감소하였다. 1 μ M, 10 μ M의 MQ는 cAMP의 발현을 MCP-1 단독 처리 조건 정도로 증가시켰다(Figure 3).

4. MQ에 의한 Erk1/2 의 인산화 변화

Erk1/2의 인산화는 western blot 기법을 통해 평가했고, Erk의 양에 대한 인산화 변화 정도를 그래프로 나타냈다(Figure 4). MCP-1 처리 시, Erk1/2 인산화는 세포 단독 조건에 비해 2배 정도 증가하였다. 0.1 μ M MQ를 MCP-1과 동시에 처리해 주었을 경우, 세포 단독 조건에 비해 5배, MCP-1 단독 처리 조건에 비해서는 3배 가량 증가하였다. MQ의 농도를 1 μ M, 10 μ M로 처리했을 경우에는 0.1 μ M MQ에 비해 인산화 정도가 감소했다.

고 찰

골수에서 생성되는 단구는 혈액을 통해 신체를 순환하다가 조직 및 림프기관으로 이동하여, 대식세포 혹은 수지상세포로 분화한다[14]. 평소에는 조직 내의 대식세포 수를 보충해 주지만, 염증이 발생한 조직으로 이동할 경우 염증에 대한 반응에 참여한다. 이러한 면역세포의 조직 이동은 케모카인(chemokines)에 의해 발생한다. 케모카인 수용체는 이러한 면역세포의 이동에 있어 중요한 신호전달 과정을 활성화 시킨다. 단구가 염증조직으로 이동하기 위해서는 다량의 CC chemokine family

receptor 2 (CCR2)를 발현해야 한다. 염증반응 중 발현이 증가하는 케모카인인 MCP-1은 CCR2에 결합하여 유주현상을 일으킨다[15]. MCP-1을 통한 단구의 유주현상은 감염 및 조직손상으로 인한 염증에 대한 적절한 대응을 위해 중요하다.

본 연구는 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MQ)이 MCP-1에 의해 유도된 단구의 유주에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 진행되었다. 과거부터 아시아 지역과 중국에서 류마티스, 골절, 피부통증 등에 민간요법으로 사용되어 온 봉선화(*Impatiens balsamina*) 잎에서 유래한 MQ는 진균 및 다양한 세균에 대한 항균효과를 나타낸다고 보고되었다. 암세포 세포자멸사 유도와 함께 침습과 유주에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 면역세포에 대한 효과는 2003년에 RBL-2H3 세포의 과립 분비 억제와 RAW264.7 세포의 nitrite 생성 억제 등이 보고되었다[12]. 최근에는 사람 탐식세포의 선천면역반응을 조절하는 기능이 보고되었다[13]. 본 연구에 앞서 단구세포주인 THP-1의 유주현상을 야생 생강 추출물 zerumbone이 감소시킨다는 보고를 했던 바[16], 동일한 평가방법을 이용하여 단구의 유주에 MQ가 미치는 영향과 기전에 대한 연구를 진행하였다.

우선, MQ에 의한 세포독성 발생 여부를 살펴보았다. THP-1 세포주를 다양한 농도의 MQ와 함께 24시간 동안 배양한 후, water soluble tetrazolium (WST) 을 첨가하여, 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 0.1, 0.5 및 1 μ M의 MQ를 처리하였

Figure 3. Decrease of cAMP expressions after treatment of MQ. THP-1 cells were incubated with MCP-1, and both reagents for 4 h. After incubation, supernatants were obtained and cAMP concentration was measured through ELISA method. Values present mean $\pm$ SD of three separate experiments (* P <0.05, ** P <0.01).

Figure 4. Increase of phosphorylation of Erk1/2 induced by MCP-1 after treatment of MQ. Changes in the phosphorylation patterns of Erk1/2 proteins after MQ and MCP-1 treatment were analyzed. Erk1/2 phosphorylation was increased by MCP-1 and MQ treatment. The most increased phosphorylation was observed when 0.1 μ M of MQ was treated. The graph shows the degree of phosphorylation of Erk1/2 relative to Erk1/2.

을 때 THP-1의 viability는 세포 단독 조건과 거의 비슷하였다. 그러나, 10 μM 부터 약한 세포독성이 관찰되었고, 100 μM 에서는 세포단독 조건에 비해 약 50% 정도의 세포독성이 관찰되었다(Figure 1).

이후, transwell system을 이용하여 유주현상에 미치는 MQ의 영향을 살펴보았다(Figure 2). MCP-1 단독 처리 조건과 비교하여, 0.001 μM 의 MQ를 동시에 처리해 주었을 때 유주현상이 증가하였다. 이러한 유주증가 현상은 처리해 주는 MQ의 농도에 비례하여 관찰되었으며, 0.1 μM 의 MQ 처리 시 가장 증가하였다. 1 μM 농도부터는 증가세가 감소하였으나 여전히 MCP-1 단독 조건 보다는 높은 유주현상을 일으켰다. 10 μM 을 처리해 주었을 때는 MCP-1 단독 처리 조건과 거의 비슷한 정도의 유주현상이 관찰되었고, 100 μM 에서는 유주현상이 감소되었다. 세포독성 실험에서 확인한 바와 같이, 10 μM 부터 관찰되는 유주현상의 변화는 세포독성이 나타나기 때문으로 사료된다. 최근에 Septama 등은 MQ에 의한 PMN 세포 유주현상 감소를 보고했다. 그들은 0.63 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 PMN세포의 화학주성 현상이 감소하기 시작해서 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 60% 정도 감소함을 보고하였다. Septama 등은 사람 혈액에서 분리한 PMN세포를 사용하였으며, 화학주성인자로 formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)를 사용하였다. 유주 유발 시간도 1시간으로 본 연구진의 4시간에 비해 짧았다. 그들이 사용한 fMLP는 화학주성인자의 기능을 지니고 있지만, 주로 PMN 세포 즉, 호중구에 작용하여 탈과립 및 과산화물 생성 등을 유발하는 것으로 알려져 있다[17]. 또한, Septama 등은 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 MQ가 각각 26, 49, 60%의 유주현상 감소를 유발한다고 보고했으나, 이 농도는 본 연구진이 사용한 농도에 비해 매우 높다. 이러한 이유로 Septama 등의 결과와 본 연구의 결과 간 차이가 발생했을 것으로 사료된다.

세포독성 실험결과와 유주현상 실험결과에 근거하여, MQ에 의한 MCP-1 유도 유주현상 증가 효과의 기전을 알아보기 위해 진행한 실험에서는 가장 높은 유주현상 증가를 나타낸 농도인 0.1 μM 부터 사용하였다. 분명한 세포독성을 나타내는 것으로 여겨지는 100 μM 농도는 더 이상 처리하지 않았다. 우선, cAMP 발현 변화를 평가하였다. cAMP는 세포 활성화에 대한 다양한 기능을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 백혈구, 암세포를 비롯한 다양한 세포의 부착과 유주현상이 cAMP 증가에 의해 감소되는 결과들이 보고되었다[18-21]. ELISA를 통해 세포배양액에 분비된 cAMP의 양을 측정된 결과 유주를 증가시켰던 0.1 μM 농도 처리 조건에서 MCP-1 단독 처리 조건에 비해 cAMP 발현이 더욱 감소하였다(Figure 3). MQ의 농도를 1 μM

과 10 μM 으로 올려 처리하였을 때는 cAMP 발현량이 MCP-1 단독 처리 조건과 유사했다. 이 결과는 1, 10 μM MQ 처리 시 MCP-1 단독 처리 조건 수준으로 유주현상이 관찰되었던 결과와 상관성이 있는 것으로 보인다. 다음으로, MCP-1에 의해 단구 및 대식세포 내에서 유발되는 대표적인 신호전달 단백질인 Erk1/2의 인산화가 MQ에 의해 어떻게 영향을 받는지 알아보았다[22]. Erk1/2는 MAPK의 한 종류로써, JNK1과 p38과 함께 MCP-1에 의해 인산화되어 단구의 유주에 관여하는 것으로 알려져 있다[23]. Cambien 등에 의하면, MCP-1에 의해 발생한 Erk1/2의 인산화는 pertussis toxin (PTX) 처리에 의해 감소했지만, JNK1과 p38의 인산화는 영향을 받지 않았다. PTX는 MCP-1과 CCR2 결합 이후에 발생하는 G-단백질의 활성을 억제하는 기능이 있는바, Erk1/2의 인산화가 MCP-1 처리에 보다 더 직접적인 영향을 받는다고 볼 수 있다. 더욱이, JNK1과 p38의 인산화는 Erk1/2에 비해 늦게 발생하며, Syk 억제제와 Src 억제제에 의해 감소하기 때문에 Erk1/2의 인산화와 달리 더 복잡한 과정을 거쳐 활성화 되는 것으로 저자들은 보았다. 또한 PTX에 의해 MCP-1 유도 유주현상이 완전히 차단되는 현상으로 미루어 보아, MCP-1에 의한 유주현상에는 Erk1/2이 보다 더 직접적으로 관여할 가능성이 높다. 본 연구에서도, MCP-1 단독 처리 시 Erk1/2의 인산화가 발생했으며, MQ 0.1 μM 을 동시에 처리해 주었을 때 인산화가 더욱 증가하였다(Figure 4). MQ 0.1 μM 동시 처리 시, MCP-1 단독 처리에 비해 2배 이상 증가했음을 확인하였고, 0.1 μM 만큼은 아니지만, 높은 MQ 농도 조건에서도 MCP-1 단독 조건 보다 높은 Erk1/2 인산화를 관찰할 수 있었다. 이러한 패턴은 cAMP 발현 변화 패턴과 유사한 것으로 보여진다.

이번 연구를 통해, MCP-1에 의해 유도된 THP-1 세포주의 유주현상이 MQ에 의해 증가되는 경향을 관찰하였다. Zerkon bone과는 정반대의 효과를 나타내는 MQ는 봉선화 잎에서 추출한 주요 성분으로써 항진균, 항균 효과를 나타냄이 보고되었으며, 항알러지 및 항염증 기능을 지니고 있음이 알려져있다. 이러한 MQ의 MCP-1 유도 유주현상의 강화 기능은 MCP-1에 의한 면역세포의 이동을 증가시켜 세균에 대한 방어를 강화할 수 있는 가능성을 시사한다. 2011년 Balamayooran 등[24]은 *Escherichia coli* 감염 시 호중구의 유주에 MCP-1이 중요한 역할을 한다는 점을 보고하였다. 또한, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* 감염 중 단구 및 대식세포에 의한 세균 제거와 동물의 생존에 MCP-1과 수용체인 CCR2가 관여함이 보고되었다[25-29]. 즉, MQ 처리를 통한 면역반응 강화를 유도하

여 세균감염을 보다 더 효과적으로 제어할 수 있는 가능성을 의미한다.

그러나, 단구에 대한 MQ의 기능 확인을 위해 추가적인 연구는 필수적이다. 우선, 혈액에서 분리한 단구를 이용한 연구가 필요할 것으로 여겨진다. 본 연구에서 사용된 세포주가 생리적인 단구에 비해 MQ의 독성에 보다 더 높은 저항성을 지닐 가능성을 확인해야 할 것으로 생각된다. 그리고, MQ에 의해 발생한 유주현상 증가 기전을 보다 명확히 밝히는 연구가 진행되어야 한다. cAMP 발현 변화의 기전과 그에 따른 신호전달 과정에 대한 자세한 연구도 요구되며, 특히, MCP-1에 의해 활성화 되는 것으로 알려진 Erk1/2 이외에 p38 MAPK와 c-Jun N-terminal protein kinase (JNK)의 활성 변화와 그에 따른 세포 활성의 변화를 확인하는 과정도 차후 MQ의 기능에 대한 확인과 그 응용에 있어 매우 중요한 기반을 제공해 줄 것이다.

요 약

본 연구는 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MQ)이 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)에 의해 유도된 단구 유주에 미치는 효과를 알아보고자 진행되었다. 단구의 유주(migration) 현상은 신체 방어와 면역반응에 중요한 현상이다. MQ는 아시아권 국가에서 다양한 질병과 통증 치료에 민간 요법으로 오랫동안 사용되었던 봉선화(*Impatiens balsamina*) 잎 으로부터 추출한 주요 성분이다. 단구 세포주 THP-1를 이용하여 실험을 진행하였으며, MQ의 세포독성, MCP-1에 의해 유도된 유주 현상에 미치는 영향을 transwell system을 이용하여 확인하였다. MQ 작용기전을 이해하기 위해 cAMP 발현 및 Erk1/2 인산화를 각각 ELISA, Western-blot 기법을 통해 분석하였다. MQ의 단구 세포주 THP-1에 대한 MQ의 세포독성은 10 μ M 농도에서 나타나기 시작했으며, 100 μ M 농도에서 약 50% 가량의 세포독성을 확인했다. 염증성 화학주성 인자 MCP-1에 의해 유도된 단구 세포주 THP-1의 유주현상은 MQ 처리 후 농도증가에 비례하여 증가하였으며, 0.1 μ M 농도의 MQ를 처리했을 때 가장 높은 증가를 보였다. MCP-1 단독 처리 시 감소하는 cAMP의 배양액 내 발현은 MQ 동시 처리 시 더욱 감소하였고, 유주현상과 마찬가지로 0.1 μ M 농도에서 가장 감소하였다. MCP-1의 수용체인 C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2) 신호전달 과정에 관여하는 주요 신호전달 단백질인 Erk1/2의 인산화도 0.1 μ M MQ 동시 처리 시 증가하였다. 이상의 결과를 통해 MQ가 MCP-1에 의해 유도되는 THP-1 세포주의 유주현상을 증가시키며, 연관된 cAMP 발현

을 감소, Erk1/2 인산화는 증가시키는 경향을 확인하였다.

Acknowledgements: This paper was supported by the Semyung University Research Grant of 2017.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Kim SH¹, Professor; Park BB¹, Undergraduate student; Hong SE¹, Undergraduate student; Ryu SR¹, Professor; Lee JH¹, Professor; Kim SH¹, Professor; Lee PJ², Professor; Cho EK³, Professor; Moon C¹, Professor.

REFERENCES

1. Yona S, Jung S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 2010;17:53-59.
2. Mantovani A. Biology of disease, tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest*. 1994;71:5-16.
3. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J*. 1994;13:1055-1060.
4. Allavena P, Bianchi G, Zhou D, van Damme J, Jilk P, Sozzani S, et al. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol*. 1994;24:3233-3236.
5. Petersen LJ, Brasso K, Pryds M, Skov PS. Histamine release in intact human skin by monocyte chemoattractant factor-1, RANTES, macrophage inflammatory protein-1 alpha, stem cell factor, anti-IgE, and codeine as determined by an ex vivo skin microdialysis technique. *Allergy Clin Immunol*. 1996;98:790-796.
6. Su BL, Zeng R, Chen JY, Chen CY, Guo JH, Huang CG. Antioxidant and antimicrobial properties of various solvent extracts from *Impatiens balsamina* L. stems. *J Food Sci*. 2012;77: C614-619.
7. Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Simultaneous determination of three naphthoquinones in the leaves of *Impatiens balsamina* L. by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal*. 2010;21:444-450.
8. Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Comparison of antimicrobial activities of naphthoquinones from *Impatiens balsamina*. *Nat Prod Res*. 2012;26:1119-1124.
9. Liew K, Yong PV, Lim YM, Navaratnam V, Ho AS. 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Toxicol In Vitro*. 2014;28:335-339.
10. Ong JY, Yong PV, Lim YM, Ho AS. 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) induces apoptosis of A549 lung adenocarcinoma cells via oxidation-triggered JNK and p38 MAPK signaling pathways. *Life Sci*. 2015;135:158-164.
11. Mori N, Toume K, Arai MA, Koyono T, Kowithayakorn T,

- Ishibashi M. 2-methoxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Impatiens balsamina* in a screening program for activity to inhibit Wnt signaling. *J Nat Med.* 2011;65:234-236.
12. Reanmongkol W, Subhadhirasakul S, Panichayupakaranant P, Kim KM. Anti-allergic and antioxidative activities of some compounds from Thai medicinal plants. *Pharm Bio.* 2003;41:592-597.
13. Septama AW, Panichayupakaranant P, Jantan I. In vitro immunomodulatory effect of lawsone methyl ether on innate immune response of human phagocytes. *J Young Pharm.* 2019; 11:62-66.
14. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology.* 2006;211:609-618.
15. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19:71-82.
16. Kim SH, Kim SH, Ryu SR, Lee PJ, Moon C. Inhibitory effects of zerumbone on MCP-1-induced THP-1 migration. *Korean J Clin Lab Sci.* 2018;50:177-182.
17. Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, Spisani S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol.* 2006;534:1-11.
18. Elerink JGR, van Uffelen BE. The role of cyclic nucleotides in neutrophil migration. *Gen Pharmac.* 1996;27:387-393.
19. Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Bio Chem.* 1997;272:24141-24144.
20. Lorenowicz MJ, Fernandez-Borja M, Hordijk PL. cAMP signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Biol.* 2007;27:1014-1022.
21. Quinn SN, Graves SH, Dains-McGahee C, Friedman EM, Hassan H, Witkowski P, et al. Adenylyl cyclase 3/adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) complex mediates the anti-migratory effect of forskolin in pancreatic cancer cells. *Molecular Carcinogenesis.* 2017;56:1344-1360.
22. Wain JH, Kirby JA, Ali S. Leukocyte chemotaxis: Examination of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase activation by monocyte chemoattractant proteins-1, -2, -3 and -4. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:436-444.
23. Cambien B, Pomeranz M, Millet MA, Rossi B, Schmid-Alliana A. Signaling transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. *Blood.* 2001;97:359-366.
24. Balamayooran G, Batra S, Balamayooran T, Cai S, Jeyaseelan S. Monocyte chemoattractant protein 1 regulates pulmonary host defense via neutrophil recruitment during *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* 2011;79:2567-2577.
25. Winter C, Taut K, Srivastava M, Langer F, Mack M, Briles DE, et al. Lung-specific overexpression of CC chemokine ligand (CCL) 2 enhances the host defense to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice: role of the CCL2-CCR2 axis. *J Immunol.* 2007;178:5828-5838.
26. Winter C, Herbold W, Maus R, Langer F, Briles DE, Paton JC, et al. Important role for CC chemokine ligand 2-dependent lung mononuclear phagocyte recruitment to inhibit sepsis in mice infected with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2009;182:4931-4937.
27. Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, et al. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. *J Immunol.* 2004;172:398-409.
28. Kurihara B, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997;186:1757-1762.
29. Nakano Y, Kasahara T, Mukaida N, Ko YC, Nakano M, Matsushima K. Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor. *Infect Immun.* 1994;62:377-383.