

Macrophage-like 세포로부터 Interleukin-1의 생성에 미치는 Histamine의 영향

오 찬 호 · 최 동 성
전주우석대학 생물공학과

Effect of Histamine on the production of Interleukin-1 from Macrophage-like Cell Line

Chan Ho Oh and Dong Seong Choi
Department of Biotechnology, Chonju Woo Suk University,
Chonju 565-800, Korea

ABSTRACT

This experiment was carried out to investigate the immuno-regulatory effects of histamine on IL-1 synthesis and Ca^{2+} uptake in P388D₁ macrophage-like cell line.

The addition of histamine (10^{-8} - 10^{-3} M) increased IL-1 production in P388D₁ cells, in a dose dependent manner, the treatment of EGTA (10^{-7} - 10^{-4} M) and Co^{2+} ion (10^{-5} - 10^{-4} M) decreased macrophage-derived IL-1 activity, and the pretreatment of histamine at the peak of 10^{-4} M significantly enhanced Ca^{2+} uptake to P388D₁ Cells.

These results suggested that exogenous histamine was effective on IL-1 production from macrophage and the intracellular Ca^{2+} uptake play a important role in histamine-stimulated IL-1 synthesis.

서 언

Histamine은 Catecholamine (Dopamine, Norepinephrine, Epinephrine 등), Indolamine(Serotonin, Melatonin등), Polyamine류 (Putrescine, Spermidine, Spermine등)와 더불어 생체내 미량생리활성아민으로 잘 알려져 있으며 포유 동물에서의 존재 부위는 경조직이외의 대부분의 조직, 혈액, 임파구및 위액, 타액등의 분비액중에 존재하고 있다. 또한 염증과 즉시형알레르기를 유발하는 원인물질로도 알려져 있으며(1, 2) 생체내에서는 L-Histidine으로부터 Histidine decarboxylase에 의하여 생성되어 조직에서는 mast cell(3), 혈액의 basophil(4)의 과립중에 저장되어 있다.

Histamine의 생리작용은 그 특이적인 수용체인 H_1 및

H_2 -receptor를 경유해서 일어나는데(5), H_1 -receptor를 경유하는 작용으로서는 기관지평활근의 수축(6), 폐혈관의 수축(7), 혈압강하(8), 혈관투과성항진(9) 등이 있으며, H_2 -receptor를 통해서는 위액분비의 촉진(10), 기관지 확장(11), 심방및 심실의 자동성항진(12) 및 호산구(Eosinophil), 호중구(Neutrophil)의 주화성 억제(13) 등의 생리작용이 알려져 있다. 또한 뇌-신경조직에도 새로운 수용체인 H_3 -receptor가 존재한다고 보고되어 있다(14). 최근에는 면역계에서 Histamine의 역할이 주목되고 있는데 임파구의 증식(15), 항체생성(16), Macrophage에 의한 보체산생(17), Suppressor T세포의 활성화(18)등 각종면역반응을 변동시킨다는 보고가 있다.

이와같이 다양한 작용을 가지고 있는 Histamine의 생성 기구로서는 비면역자극(외상, 독소등)및 면역자극(Ig

E-Ag 매개성 면역응답; 즉시형 Allergy)에 의하여 조직 mast cell 혹은 혈액 basophil의 탈과립과 동시에 세포외로 방출된다(19)고 알려져 있으며, 한편으로는 본 연구자들이 그외 Histamine의 생성경로를 검토한 바 있다. 즉, 면역담당세포인 Macrophage-T 임파구계를 통한 별도의 Histamine의 생합성경로를 밝혔으며(20), 또한 이렇게 내인적으로 만들어진 Histamine에 의하여 임파구유약화 반응을 조절하는 mechanism(21)에 대하여 보고한 바 있다. 이렇게 하여 생성된 Histamine의 생체내에서의 역할에 대해 좀 더 구체적으로 검토하기 위하여 본 연구에서는 주로 Macrophage의 각종 기능에 미치는 Histamine의 효과에 대하여 살펴보았는데, 특히 Macrophage에서 생성되는 Interleukin-1(IL-1)과 외인적인 Histamine의 효과 및 Macrophage-like cell line으로 알려져 있는 P388D₁ cell로의 Ca²⁺의 uptake에 미치는 Histamine의 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 실험방법

세포주 및 계대배양

마우스 Macrophage-like cell line인 P388D₁ 세포를 일본 나고야 대학의 Nakano 박사의 호의로 분양받아서 5% (v/v)의 FCS(Fetal Calf Serum; 56°C에서 30분간 처리하여 비동화시킴, MA Bioproduct사)를 함유하는 RPMI-1640배양액에 넣어 37°C의 CO₂-Incubator(5% CO₂-95% Air)내에서 배양했으며, 계대방법은 직경 100mm의 멸균 petri dish에 부착한 세포를 물리적으로 떼어내어 (rubber policeman사용) 200xg, 5분간 원심분리한 후 침전물(ppt)을 5% FCS-RPMI 1640배지에 현탁해서 세포수를 산출하고 배양용 dish에 적정량씩 넣어 실험에 사용하였다.

실험동물

실험에 사용한 마우스는 C3H/HeJ 계통의 순계마우스를 구입하여 생후 8~12주 형의 자웅마우스를 사용하였다.

세포세정액 및 배양액

세정액으로는 PBS(Phosphate-Buffered Saline, Sigma) 용액을 Autoclave 멸균(121°C, 20분) 했으며, 배양액으로는 RPMI-1640 배지에 L-glutamine 및 10% NaHCO₃를 첨가하여 사용하였다.

시약

Phytohemagglutinin(PHA)과 Lipopolysaccharide(LPS)는 Difco사, Histamine-2HCl, EGTA는 Sigma사, 그 외의 시약은 Wako사의 것을 구입하여 특급을 사용했다.

P388D₁ cell로부터 IL-1의 유도

5% FCS-RPMI 1640 배지중에서 증식시킨 P388D₁ 세포를 PBS(-) 용액으로 세척한 후, rubber policeman 을 이용하여 물리적으로 박리한 다음, 이 세포를 polypropylene제 원심 튜브에 옮기고 200xg, 5분간, 실온에서 원심분리를 행하였다. 침전물을 GIT 무혈청배지(일본제약)에 현탁하여 세포부유액을 조제하고 직경 35mm의 plastic dish(Nunc사)에 2.5×10⁶세포로 조정하여 Histamine등의 약물을 첨가(10⁻⁸~10⁻³M)한 후 37°C의 CO₂ Incubator내에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 다음 배양상등액을 원심관에 옮겨 400xg, 5분간 4°C에서 원심분리하여 상등액을 IL-1 활성측정용 시료로서 사용할 때 까지 -80°C에 동결보존하였다.

IL-1 활성의 측정

동결보존한 시료를 실온에서 해동시킨 후, 투석튜브에 넣어 4°C에서 투석을 행하였다. 투석은 약 10배량의 PBS 중에서 3시간, 다시 약 25배량의 RPMI-1640 배지중에서 하룻밤 정지한 후 각 시료를 여과멸균해서 활성측 사용하였다.

IL-1활성측정은 C3H/HeJ 마우스의 흉선 세포를 사용해서 PHA 의존적인 T임파구의 유약화반응에 대한 촉진 작용을 활성의 지표로 하였다(22). 경추탈구로 도살한 C3H/HeJ마우스로부터 흉선을 적출하여 cold PBS에 넣어 clean bench 내에서 stainless 제 mesh를 사용하여 조직을 세절·추출 조각을 기친 후, 흉선세포를 취하였다. 다음에 PBS로 2회 세척한 후, 1×10⁷세포/ml가 되도록 10% FCS-RPMI 1640 배지로 조정하여 세포현탁액을 조제하였다. microculture plate(96 well, flatbottomed, Costar 사)의 각 well에 세포현탁액 100μl (1×10⁶ 세포), 시료용액 50μl를 주입하고 총 200μl/well이 되도록 조정한 후, 37°C의 CO₂ Incubator내에서 48시간 배양한 다음 50μCi/ml의 [6-³H] Thymidine을 각 Well 당 10μl씩 첨가하고 재차 4시간 동안 배양을 계속하였다. 배양이 끝나면 cell harvester를 이용하여 세포를 각각 회수하고 [³H]-Thymidine의 흡수정도를 β-scintillation counter에서 측정하였으며 결과는 각각 3번 반복으로 수행한 것을 평균치(cpm) ± SEM으로 나타내었다.

Ca²⁺ uptake의 측정

P388D₁ cell로의 Ca²⁺ uptake 측정은 Hyslop등의 방법 (23)에 준하여 행하였다. 계대배양시킨 P388D₁ 세포를 Modified Gey's Buffer(MGB)로 수집한 후, 400×g, 5분간, 4℃에서 원심분리로 2회 세척하고 1×10⁶ 세포/ml가 되도록 조정 한 다음, 12℃에 보존하였다. 측정용 세포부유액 10ml(1ml×10개)당 62.5μCi의 ⁴⁵Ca을 30μl, 각농도의 Histamine (10⁻⁷~10⁻³M)과 Negative control로서 MGB액을 각각 100μl씩 가하고 37℃의 water bath에서 180분간 진탕배양한 후, 반응이 끝난 상태의 시료액을 Whatman GF/C 여지를 이용하여 0.5ml의 cold MGB액으로 세척하면서 세포를 수집하였다. 다음에 여지를 vial 병에 넣고 protosol 1ml를 가하여 55℃에서 10분간 가운용해한 후, 9ml의 scintillation cocktail (PPO:POPOP=4g : 0.1g을 Xylene 1l에 용해)을 넣어 Liquid Scintillation counter (LSC)에서 ⁴⁵Ca의 uptake를 cpm으로 구하였다.

통계분석

실험은 각각 3번 반복으로 수행하여 그 결과를 cpm 평균치 ±SEM으로 표시한 후, 이것을 student's t-test를 이용하여 유의차 검정을 행하였다.

결과 및 고찰

P388D₁ Macrophage-like 세포로부터 생성되는 IL-1 활성에 미치는 외인성 Histamine의 영향

Fig. 1에는 P388D₁ 세포배양계에 각 농도 (10⁻⁸~10⁻³M)의 Histamine을 첨가하여 IL-1 활성을 측정 한 결과를 나타내었는데 Histamine 첨가에 의해 농도의존적으로 IL-1 생성이 증가되었으며 특히 10⁻⁴M의 Histamine을 첨가하면 대조군(negative control로서 RPMI 1640 배지만 첨가)에 비하여 약10배의 IL-1 활성이 증가되었다.

다음에는 Histamine의 첨가시간에 대한 IL-1 생성의 효과를 Fig. 2에 나타내었다. Histamine(10⁻⁴M)을 P388D₁ 세포배양계시와 동시에 첨가한 후, 12, 34, 36 및 48시간 동안 배양한 결과는 배양개시 24시간 및 36시간 후에 IL-1 활성이 크게 증가하였다. 그러나 48시간동안 배양하면 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

P388D₁ 세포에 의한 IL-1유도에 미치는 EGTA 및 코발트 이온 (Co²⁺)의 효과

Histamine의 면역세포에 미치는 작용에 있어서 세포내로의 칼슘이온 (Ca²⁺)의 유입이 필요한 지의 여부를 검토할

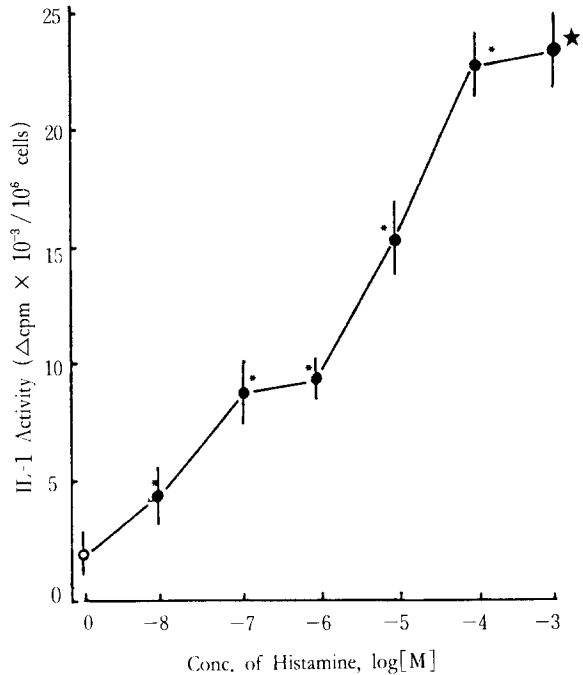


Fig. 1 Effects of histamine on IL-1 production from macrophage-like p388D₁ cells (Dose dependency)

Each point represents the mean±SEM of the values from three experiments. * P<0.05 as compared with the medium (RPMI-1640) treated control group.

목적으로 배양액중의 칼슘이온을 chelate하기 위하여 EGTA를 첨가한 결과를 Fig. 3에 나타내었으며, 또한 칼슘이온채널의 저해제인 Co²⁺를 P388D₁ 세포배양계에 첨가하여 검토한 결과를 Fig. 4에 표시하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양액중에 첨가한 EGTA는 10⁻⁷M에서 10⁻⁴M까지 농도 의존적으로 Histamine에 의한 IL-1 생성을 저하시켰으며 EGTA 10⁻⁴M을 첨가하였을 경우에 약 50%의 IL-1 활성의 감소를 나타내었다.

또한 Co²⁺의 첨가에 의한 IL-1활성에 미치는 영향은 Fig. 4의 결과에서 보는 바와 같이 Co²⁺ 5×10⁻⁴M 까지 농도의존적으로 Histamine의 첨가효과를 저해했으며 5×10⁻⁴M이상의 농도에서는 완전히 Histamine에 의한 IL-1 생성이 억제됨을 알 수 있다.

Fig. 5에서는 Fig. 3의 Histamine(10⁻⁴M) 첨가에 의해 증가된 IL-1 활성이 EGTA(10⁻⁴M)를 첨가하면 억제되는

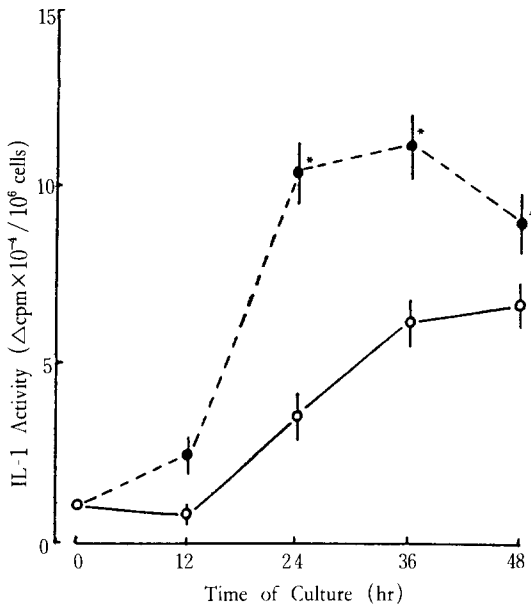


Fig. 2 Effect of histamine on IL-1 production from macrophage-like P388D₁ cells as a function of culture time (Time course) None (○), Histamine 10⁻⁴M (●)

결과를 보다 구체적으로 파악하기 위하여 세포배양시간을 달리하여 (24시간, 36시간) Histamine을 첨가하지 않은 상태, 즉 배지만의 첨가군에서도 EGTA의 영향이 발휘되는지의 여부를 검토하였다. 결과는 P388D₁ 세포의 자발적인 IL-1 생성에는 EGTA가 효과가 없었다.

이상의 결과에서 무첨가군(배지만의 첨가)에 있어서는 IL-1생성에 칼슘이온이 아무런 효과가 없었던 점으로 미루어 보아 Histamine에 의한 IL-1생성에는 배양액중의 칼슘이온의 세포내로의 유입이 중요한 역할을 담당하고 있다고 추정된다.

따라서 다음에는 실제 P388D₁ 세포내로 유입되는 Ca²⁺을 동정하는 실험을 ⁴⁵Ca radio isotope를 사용하여 실시하였다.

P388D₁ 세포로의 Ca²⁺ uptake에 미치는 Histamine의 효과

Fig. 6에서는 전술한 바와 같이 실제로 P388D₁ 세포로 Ca²⁺이 유입되는 과정을 Histamine 농도를 다르게 하여 살펴보았다. Ca²⁺ uptake의 측정은 ⁴⁵Ca를 사용하여 P388D₁ 세포부유액에 pulse해서 진탕배양기로 반응시킨 다음, 액체 Scintillation counter로서 측정 하였으며, 이때

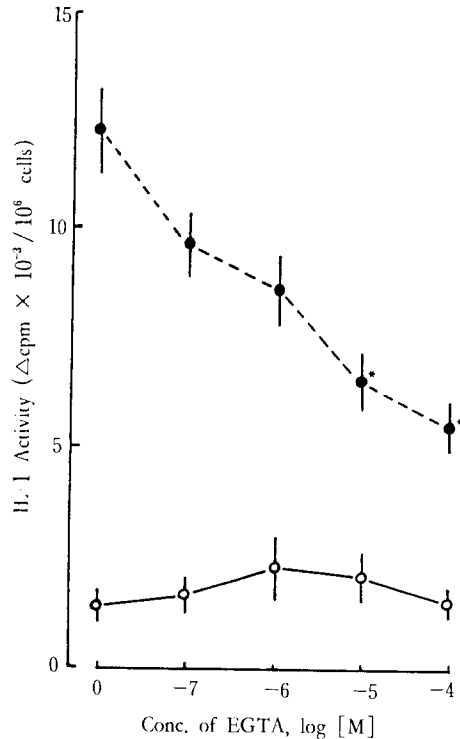


Fig. 3 Effects of EGTA on IL-1 production from P388D₁ cells None (○) Histamine 10⁻⁴ (●)

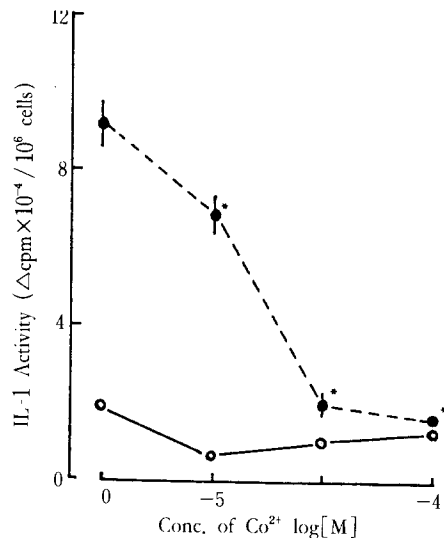


Fig. 4 Effects of Co²⁺ on IL-1 production from P388D₁ Cells. None (○), Histamine 10⁻⁴M (●)

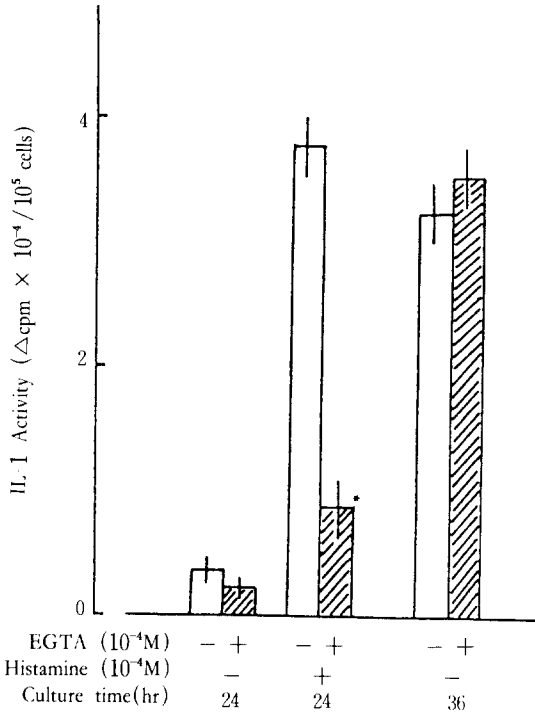


Fig. 5 Effects of EGTA on IL-1 production from histamine-added P388D₁ cells.

Histamine(10⁻⁷M에서 10⁻³M)을 첨가한 결과 농도가 증가됨과 더불어 세포내의 Ca²⁺ uptake양이 상승되었다. 또한 10⁻³M의 Histamine을 첨가해서 배양을 계속하면 대조군(배지만 첨가)에 비하여 배양 90분후까지 세포내로의 Ca²⁺ 유입이 증가된다.

이상의 결과에서 외인성의 Histamine첨가에 의하여 P388D₁ 세포로부터 IL-1생성이 증가됨을 파악하였으며, 특히 배양개시 24시간이후에 크게 상승되었다. 또한 이때에 세포내 second messenger로 잘 알려져 있는 cAMP가 macrophage로부터의 IL-1 생성에 영향을 미친다는 보고(25)도 있으며, 이러한 Histamine에 의한 macrophage로부터의 IL-1생성에는 세포내로 유입되는 Ca²⁺이 중요한 역할을 담당하고 있음이 시사되었다. 이는 또다른 macrophage의 기능으로서 종양세포에 대한 세포상해작용에도 Ca²⁺이 중요한 역할을 담당하고 있다는 보고(26)와 연관성이 있는 것으로 사료되는데 생체내 중요한 면역조절물질로 알려져 있는 IL-1의 생성이상이 류마치스성관절염(27), 치주위염(28)등의 면역질환을 유발시킨다는 보고에 비추어 보아 이들 질환의 근본적인

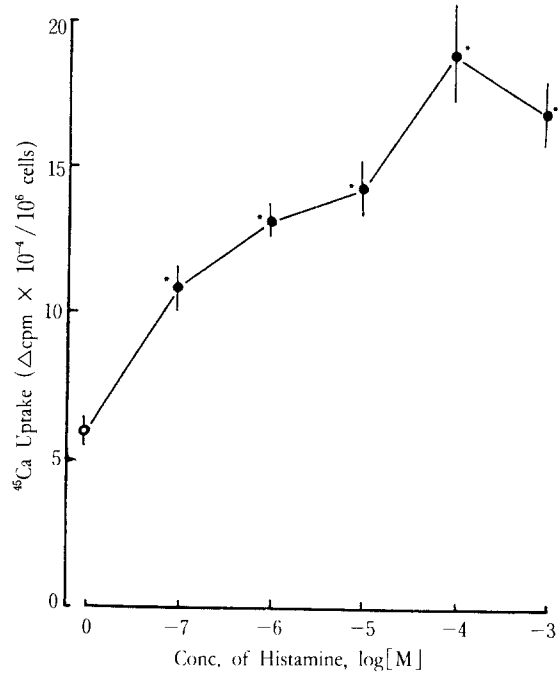


Fig. 6. Effects of exogenously added histamine on Ca²⁺ uptake to P388D₁ cells.

치료및 응용면에 특히 IL-1의 생성기구및 그 조절기구를 파악 하는데 본 실험 결과가 기초자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

생체내 중요한 면역조절물질의 하나인 IL-1은 주로 Macrophage로부터 분비되어 각종 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있는데 이러한 Macrophage에 의한 IL-1 생성에 미치는 Histamine의 효과를 검토하고자 Macrophage-like cell line인 P388D₁ 세포를 계대배양하여 실험을 수행하였다.

P388D₁ 세포에 의한 IL-1생성에 미치는 Histamine의 첨가효과는 10⁻⁸M~10⁻³M에 이르기까지 전 범위에서 농도의존적으로 IL-1생성을 촉진시켰으며 첨가후 배양시간에 있어서는 24~36시간이 가장 크게 상승되었다.

Histamine에 의한 Macrophage로부터의 IL-1생성은 EGTA 및 Co²⁺의 첨가로 인하여 농도의존적으로 저하되었으며 이 결과는 Histamine의 IL-1 생성촉진작용이 세포내로의 Ca²⁺ uptake가 signal 역할을 하고 있음을 시사한

다.

P388D₁ 세포로의 Ca²⁺ uptake 양을 동정한 결과는 Histamine 의 10⁻⁷M에서 10⁻³M까지 농도의존적으로 Ca²⁺ 유입이 촉진되는 결과를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. T. B. Casale, D. Wood, H. B. Richerson, S. Trapp, W. J. Metzger, D. Zavala, and G. W. Hunninghake (1987) *J. Clin. Invest.*, **79**, 1197
2. S. R. Durham, T. H. Lee, O. Cromwell, R. J. Shaw, T. G. Merrett, J. Merrett, P. Cooper, and A. B. Kay (1984) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **74**, 49
3. R. W. Shayer(1956) *Am. J. Physiol.*, **186**, 199
4. C. F. Code(1937) *J. Physiol. Lond.*, **89**, 257
5. J. W. Black, W. A. M. Duncan, C. J. Durant, C. R. Ganellin, and E. M. Parsons (1972) *Nature*, **236**, 385
6. N. Chand, and P. Eyre(1975) *Agents actions*, **5**, 277
7. A. Tucker, E. K. Weir, J. T. Reeves, and R. F. Grover (1977) *Am. J. Physiol.* **61**, 101
8. J. W. Black, D. A. A. Owen, and M. E. Parsons(1975) *Br. J. Pharmacol.*, **54**, 319
9. K. P. Bhargava, R. Nath, and G. Palit(1977) *Br. J. Pharmacol.*, **59**, 349
10. J. W. Black, W. A. M. Duncan, C. J. Durant, C. R. Ganellin, and E. M. Parsons (1972) *Nature*, **236**, 385
11. J. M. Drazen, C. S. Venugopalan, and N. A. Soter (1978) *Am. Rev. Respir. Dis.*, **117**, 479
12. R. Levi, A. Giotti(1967) *Experientia*, **23**, 66
13. S. Ting, and B. Zweiman (1981) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **68**, 65
14. S. Ishikawa, and M. Sperelakis(1987) *Nature*, **327**, 158
15. A. M. Badger, J. Young, and G. Poste(1983) *Clin. Exp. Immunol.*, **51**, 178
16. T. Ariga, M. Nakanishi, T. Ohishi, Y. Sakiyama, and S. Matsumoto(1987) *Agerugi*, **36**, 101
17. A. Falus, and K. Meretey(1988) *Mol. Immunol.*, **25**, 1093
18. R. E. Rocklin, and A. Haberek-Davidson(1981) *J. Clin. Immunol.*, **1**, 73
19. T. Ishizaka, K. Ishizaka, R. P. Orange, and K. F. Austen(1970) *J. Immunol.*, **104**, 335
20. C. Oh, S. Suzuki, I. Nakashima, K. Yamashita, and K. Nakano(1988) *Immunology*, **65**, 143
21. C. Oh, H. Okamoto, and K. Nakano(1989) *Agric. Biol. Chem.* **53**, 377
22. S. B. Mizel, J. J. Openheim, and D. L. Rosenstreich (1978) *J. Immunol.*, **120**, 1497
23. P. A. Hyslop, D. B. Hinshaw, I. U. Schraufstatter, L. A. Sklar, R.G. Spragg, and C. G. Cochane(1986) *J. Cell. Physiol.*, **129**, 356
24. N. Zurgil, and N. Zisapel(1985) *FEBS*, **185**, 257
25. P. J. Knudsen, C. A. Dinarello, and T. N. Strom (1986) *J. Immunol.*, **137**, 3189
26. S. D. Somers, J. E. Weiel, T. A. Hamilton, and D. O. Adams(1986) *J. Immunol.*, **136**, 4199
27. H. B. Fell, and R. W. Jubb (1977) *Arthritis Rheumatism*, **20**, 1359
28. J. E. Horton, L. G. Raisz, H. A. Simmons, J. J. Openheim, and S. E. Mergenhagen (1972) *Science*, **177**, 793

(Received: June 11, 1990 Revised: July 30, 1990
Accepted: August 27, 1990)