

비장, 골수세포 및 대식세포에서의 Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α)에 관한 연구

전북대학교 치과대학 치주과학교실 및 약리학교실*

송인택 · 오귀옥* · 김형섭

I. 서 론

감염, 종양, 물리적 자극과 같은 염증성 혹은 침윤성 자극이 있었을 때 속주의 반응으로 나타나는 세포 혹은 조직의 변화는 대부분의 경우 내인성 cytokine의 유리와 이들의 국소적 작용에 기인한다는 것이 알려졌다^{1,2,3)}.

내독서 lipopolysaccharide(LPS)로 대식세포를 자극하였을 때 유리되어 나오는 monokine중의 하나인 macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)는 생물학적 활성이 아직 잘 규명되지는 않았으나 cellular origin이나 몇가지 알려진 생물학적 기능상의 다양성으로 미루어 속주 염증반응의 여러 단계에서 중요한 위치를 차지하고 있을 것으로 여겨지는 small inducible cytokine superfamily의 하나이다^{4,5)}. SDS-PAGE에서 MIP-1 α 와 함께 8kDa doublet의 형태로 나타나는 MIP-1 β 는 아미노산 배열에 있어 57% homology를 보이며 기능상으로는 여러 면에서 서로 차이를 보이는 것으로 알려져 있어 이들 두 분자간의 관계규명에 많은 관심이 집중되고 있다^{8,9,10)}. 대식세포뿐 아니라 면역 network의 중심역할을 하는 T 임파구를 concanavalin A 혹은 anti-TCR monoclonal antibody로 자극하였을 때에도 MIP-1 α 및 MIP-1 β 가 유리되어 나오므로 MIP-1은 생체방어기전의 다양한 기능을 담당하는 cytokine으로 여겨진다고 보고되었다^{6,7,8)}.

순수 분리되는 native MIP-1 doublet(nMIP-1 α 와 nMIP-1 β 의 혼합물)의 몇가지 밝혀진 기염증성(proinflammatory) 기능으로는 생쥐와 토끼에 주사하였을 때 국소 염증반응을 유발시킨 것^{4,11)}과 토끼에 정맥 주사시 prostaglandin과 무관한 발열 반응을 유발시킨

것¹²⁾ 등이 있다. 이러한 염증성 반응은 시험관 실험에서도 입증이 되어 중성구에 대한 chemotaxis와 oxidative burst를 증가시켰다고 Wolpe 등⁵⁾이 보고하였으며 사람의 PMNs의 항균작용을 MIP-1 α 가 증가시킨 것으로 알려졌다(Oh 등, unpublished). 한편 기염증성 작용외에도 조혈기능에 대한 다양한 조절 기능이 밝혀졌다^{13,14)}.

최근 유전공학적 방법을 이용하여 제조된 순수 recombinant MIP-1 α (rMIP-1 α)와 1 β 를 이용한 실험을 통하여 확인된 사실중 하나는 조혈세포의 분화정도에 따라 두 분자가 서로 반대되는 작용을 나타내어 조혈기능의 positive와 negative regulator로서 각각 중요한 역할을 하고 있다는 것이다^{14,15)}. 그중 MIP-1 α 는 덜 분화된 progenitor cell에 대하여 분화 및 성장 억제 기능을 나타낸다는 시험관 및 생체실험 결과로부터 항암제나 방사선 치료시 정상 hemopoietic progenitor cell을 무차별적인 세포독성으로부터 보호할 목적으로 MIP-1 α 를 임상에 응용할 수 있을 것이라는 가능성이 제시되었고^{14,16,17,18)}, 매우 최근에는 동물실험을 통해 MIP-1 α 투여로 항암제에 의한 조혈 기능 저하를 감소시켰다는 보고도 있었다^{19,20)}. 한편 MIP-1은 종양세포에 대한 antibody-independent macrophage cytotoxicity를 증가시키고 대식세포의 여러 기염증성 물질(TNF, IL-1 α , IL-6)의 분비를 촉진시킨다는 Fahey 등¹⁵⁾의 보고로부터 MIP-1은 IL-1이나 IL-2처럼 autocrine 기능을 가지고 있는 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 첫째, 대식세포에서의 MIP-1 α 분비기전과 분비된 MIP-1 α 에 대하여 작용하기 위한 대식세포막의 receptor 존재여부를 확인하는 것이며 둘째, MIP-1 α 가 조혈기능의 억제인자로 작용한다는

사실에 기인하여 establish된 cell line이 아닌 정상 조혈장기로 부터 채취된 fresh한 골수와 비장세포에서 MIP-1 α 가 분비되는지의 여부와 이에 대한 receptor가 조혈세포에 존재하는지를 확인하고자 함에 그 연구목적을 두었다.

II. 재료 및 방법

1) Cells

Murine macrophage cell line RAW 264.7(TB171 : American Type culture Collection, Rockville, MD)는 10% Fetal calf serum(FCS), 25mM HEPES buffer, 1mM sodium pyruvate, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle Medium(DMEM, Gibco)에서 배양하였고 세포자극은 1 μ g/ml lipopolysaccharide(LPS, E. coli 0127 : B8, Sigma)로 Northern analysis를 위한 경우는 2, 6시간, 수용체 결합분석을 위한 경우는 16시간 시행하였다. Femoral bone marrow cell과 splenocyte는 4 내지 6주된 C57B1/6 female mice로부터 얻었다.

2) Recombinant MIP-1 α 준비

Bovine papilloma virus expression system에 의해 준비된 purified rMIP-1 α 는 전북 치대 약리학 교실에서 공여받아 실험에 사용하였다.

3) RNA Blot Hybridization

RNA 추출

RNA를 분리 정제하기 위한 방법으로는 guanidium thiocyanate 추출방법을 사용하였고²¹⁾ RNA추출에 사용된 모든 용액은 diethylpyrocarbonate로 처리한 증류수로 준비하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 10 7 cell당 1ml의 용액 D(4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate pH 4, 0.1M 2-mercaptoethanol)를 첨가하였다. 50 μ l의 2M sodium acetate, pH 4, 500 μ l의 phenol, 100 μ l의 chloroform-isoamylalcohol 혼합물(49 : 1) 등을 계속적으로 첨가하여 혼합한 후 10초 동안 세게 진탕하고 15분 동안 얼음에 놓아둔 후 4°C에서 10,000g으로 20분 동안 원심분리하였다. 수용액층을 다른 microtube에 옮긴 후 500 μ l의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 1시간 이상

놓아둔으로써 RNA를 침전시켰다. 4°C에서 10,000g으로 20분 동안 원심분리한 후 침전물을 300 μ l의 0.1 U/ μ l RNAsin이 포함된 증류수에 녹이고 20 μ l의 3M sodium acetate, pH 5.2와 900 μ l의 100% ethanol을 첨가하여 -20°C에서 하루동안 놓아둔 후 4°C에서 10,000g으로 15분 동안 원심분리에 의해 얻어진 RNA 침전물을 70% ethanol로 1회 세척하여 진공 건조시켜 RNAsin이 0.1U/ μ l되게 포함된 증류수 20 μ l에 용해시켰다.

Formamide 전기영동 및 Blotting

RNA에 formaldehyde, formamide, MOPS를 혼합하여 55°C에서 15분간 denature시킨 다음, loading buffer를 혼합하여 1.4% agarose/formaldehyde gel에서 1×MOPS buffer(0.04M morpho-linopropanesulfonic acid, pH 7.0, 50mM sodium acetate, 5mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 전기영동하였다. 이 gel을 증류수로 짧은 시간 동안 세척한 후 20×SSC(3M sodium citrate, pH 7.0)에 30분간 soaking하여 Gene Screen Plus membrane에 overnight transfer한 다음 membrane을 2×SSC로 세척하여 공기 중에 건조시켜 80°C에서 2시간 동안 구웠다.

Hybridization

위에서 준비한 membrane을 sealable bag에 넣고 prehybridization 용액(50% formamide, 10% dextran sulfate, 10% SDS, 1M sodium chloride)으로 42°C에서 30분 동안 반응시킨 후 Multiprime DNA labelling kit(Amersham)와 [α - 32 P] dCTP(Amersham)를 사용하여 만든 radioactive probe를 최종 농도 hybridization 용액 ml당 4×10⁶cpm되는 양을 100°C에서 5분간 denature시켰다. 이 때 salmon sperm DNA도 같이 denature 시켜 hybridization solution에 첨가하여 42°C에서 진탕하면서 16~24시간 반응시켰다. Bag에 든 용액을 제거한 후 membrane을 제조회사의 설명서에 따라 세척하여 -80°C에서 X-Omat AR film(Eastman, Rochester, NY)에 5일 동안 감광시켰다.

Recombinant MIP-1의 Radioactive Iodine 표지

Enzymobead iodination reagent(Bio-Rad)를 이용하여 Na¹²⁵I로 rMIP-1 α 를 표지시켰다. 즉, rMIP-1 α 5 μ g과 2.5mCi Na¹²⁵I(ICN Radiochemicals)를 50 μ l의 Enzymobead suspension과 혼합한 후 9 μ l의 6% D-glucose를 첨가함으로써 iodination반응을 개시하

였다. 실온에서 30분간 반응하도록 방치한 다음, 25 μ l의 10%의 sodium azide/0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.0를 첨가함으로써 반응을 종료시켰다. Sephadex G-25 column(Pharmacia Chemicals)을 이용해 gel filtration chromatography함으로써 표지되지 않은 125 I를 125 I-rMIP-1 α 와 분리하였고 0.1ml 분획은 gamma counter로 radioactivity를 측정하였다. 표지된 rMIP-1 α 의 순도를 검사하기 위해 10,000 cpm의 125 I-rMIP-1 α 를 12%~20% gradient SDS-PAGE하여 건조시킨 다음 -80°C에서 하루동안 X-Omat AR film(Eastman Kodak)에 노출시켰다.

Receptor Binding Assay

Receptor binding assay는 Ohara와 Paul의 방법²²⁾에 따라 10^6 세포와 125 I-rMIP-1 α 를 410 μ l의 RPMI 1640 medium(Gibco)/10% FCS/0.02% sodium azide/20mM HEPES(pH 7.0)와 함께 4°C에서 2시간 계속적으로 혼합시켜 주면서 incubation하였다. 100 μ l씩 3 aliquots를 silicon oil DC 550(Serva)와 white light paraffin oil(Fisher-scientific)이 84 : 16으로 혼합된 혼합 oil 200 μ l위에 올려 놓고 원심분리함으로써 125 I-rMIP-1 α 의 세포결합부분(bound)과 유리된 부분(free)을 분리하였다. 원심분리후 dry ice에서 tube를 5분간 얼린 후 tube를 slicing함으로써 cell pellet과 상층액 부분을 분리하였다. cell pellet과 상층액 부분의 radioactivity를 gamma counter로 각각 count한 후 Scatchard plot analysis하여 세포당 receptor의 수와 평행해리상수, kd값을 환산하였다.

III. 연구성적

1) 대식세포에서의 MIP-1 α mRNA 발현

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7은 LPS 1 μ g/ml로 자극하였을 경우 자극 2시간 후에 이미 MIP-1 α 의 mRNA가 발현 유도되었으며 6시간 후에는 더욱 증가하였다. 하지만 면역 억제제로 알려져 있는 cyclosporin A 투여로 발현정도가 감소되지는 않았다 (Fig. 1).

2) 골수 및 비장세포에서의 MIP-1 α mRNA 발현

Fig. 2에서와 같이 resting상태의 골수 및 비장에서 모두 약하나마 MIP-1 α mRNA가 발현 유도되었고

Fig. 1. MIP-1 α mRNA expression from murine macrophage cell line RAW 264.7
LPS : 1 μ g/ml
CSA : cyclosporin A 0.2 μ g/ml

Fig. 2. MIP-1 α mRNA expression from mouse spleen and bone marrow cell cl27-48 : MIP-1 α cDNA transfected mouse fibroblast c 127 clone.
PBS : phosphate buffered saline

그 정도는 비장세포가 약간 높았다. 하지만 myelosuppressive activity를 in vivo에서 나타내는 것으로 알려진 lactoferrin이나 ferritin의 투여로 mRNA 발현이 증가되지는 않았다.

3) rMIP-1 α 에 대한 Radioiodine 표지

Receptor binding assay를 위하여 rMIP-1 α 를 radioactive iodine 125 I로 표지한 후 순수분리하여 autoradiogram으로 나타낸 것이 Fig. 3이다.

모든 radioactivity가 MIP-1 α 와 동일한 8kDa위치에 single band로서 나타났다. Sephadex G-25 column에서 용출된 total radioactivity는 10⁸ cpm/ θ g of rMIP-1 α 로 산출되었고 이 수치를 binding experiment의 125 I-rMIP-1 α 농도로 이용하였다.

IV. 총괄 및 고안

Fig. 3. Autoradiograph of pure ^{125}I -rMIP-1 α analyzed by SDS-PAGE.

4) Receptor Binding Assay

모든 binding experiments에서 nonspecific binding값을 제거하기 위하여 100배 농도의 unlabeled rMIP-1 α 를 첨가하여 동일하게 실험하는 것으로 항상 병행하였다. LPS로 자극한 RAW 264.7은 스스로 많은 양의 MIP-1 α 를 유리하므로 이 MIP-1 α 가 receptor에 binding하는 것을 제거하기 위하여 항상 acid wash하여 실험에 사용하였고²³⁾ 골수나 비장세포도 마찬가지로 처리하여 사용했다. Table 1에서와 같이 LPS로 자극한 RAW 264.7의 MIP-1 α 에 대한 receptor의 친화력은 0.91nM이었고 세포당 receptor 수는 378개로 나타났다. 골수, 비장세포에서는 각각 receptor 수가 33, 11개로 나타났다.

Table 1. Summary of results obtained in receptor binding experiments*

Cell Tested	Stimulator	kd(M)	Receptor (sites/cells)
RAW 264.7	LPS ^b	0.91×10^{-9}	378
Bone marrow cell	—	—	33
spleen cell	—	—	11

* : Representative result for three independent experiments.

^b : RAW 264.7 cells were stimulated with LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 16 hours.

자극받지 않은 macrophage에서는 거의 mRNA 발현이 안되던 MIP-1 α 가 LPS 자극으로 2시간 만에 크게 message 증가를 보인것은 Gram 음성세균들의 감염이 주종을 이루는 치주질환에서 MIP-1 α 가 숙주반응을 나타내는 중요 cytokine의 하나일 가능성이 높음을 암시한다. 또한 MIP-1 α 는 항원자극에 의하여 helper T cell과 cytolytic T cell에서도 유리되는 바⁸⁾ 복잡한 생체반응이 일어나고 있는 구강내에서 이러한 cytokine의 역할을 규명하는 일은 의미있으리라 여겨진다. T 임파구에서의 MIP-1 mRNA 발현에 대하여 cyclosporin A가 억제작용을 나타내었던 Kwon과 Weissman⁸⁾의 결과와는 달리 대식세포에서는 cyclosporin A가 LPS의 작용을 억제하지 못하였다. cyclosporin A의 면역억제 작용이 이미 대식세포 밖으로 유리된 cyclophilin이란 물질과의 상호관계에 의한다고 한 Sherry 등¹⁰⁾의 보고와 대식세포의 자극에 대한 세포반응 자체 MIP-1 α mRNA 발현을 억제하지 못한 본 실험의 결과와는 일치한다고 할 수 있다.

자극 받지 않은 상태의 골수와 비장에서 MIP-1 α mRNA message가 발현된 본 실험의 결과는 혈액세포 생산에 균형을 유지하기 위하여 이 cytokine이 negative regulator로서 작용하리라는 Graham 등¹⁷⁾의 예견과 일치하는 결과이며 myelosuppressor라고 알려진 물질로도 mRNA 발현이 증가되지 않은 것은 lactoferrin이나 ferritin의 억제작용에 MIP-1 α 가 중간에 매개하지 않는다는 의미로 해석된다.

또한 MIP-1 α 를 유지하는 대식세포에 MIP-1 receptor가 존재한다는 사실은 MIP-1 α 의 대식세포에 대한 다양한 생물학적 활성으로부터 이미 그 존재가 예전되었으며 이 pleiotropic cytokine은 paracrine, endocrine 외에도 autocrine fashion으로 origin이 되는 세포에 작용을 한다고 한 Fahey 등¹⁵⁾의 추측에 대한 확실한 증명이 될 수 있다. 따라서 MIP-1은 염증반응에 참여할 수 있는 대식세포의 수를 증가시킬 뿐 아니라 대식세포의 활성화에도 관여함으로써 MIP를 생산하는 대식세포에 feedback control로써 original signal을 증폭시키는 역할을 한다고 추정된다.

많은 종류의 cytokine이 target cell에 대하여 mitogenic effect 혹은 phenotypic change를 일으키거나

자극에 대한 반응의 조건을 변화시키는 직접적인 작용을 하고 다른 한편으로 host mediator를 유리하도록 하여 또다른 생물학적 반응을 일으키도록 간접적으로 반응을 나타낸다. MIP-1 α 도 대식세포의 tumor cell killing(antibody-independent mechanism)을 직접 일으키면서 대식세포로부터 여러 cytokine의 유리, 특히 TNF의 분비를 촉진함으로써 tumor의 suppression에 기여한다고 보여지며 염증반응에 대한 것도 마찬가지로 IL-1 α 나 IL-6와 같은 기염성 cytokine을 분비시킴으로써 직접 작용외의 간접적인 작용을 나타내기도 한다. 또한 MIP-1 α 는 MIP-1 β 와 여러가지 생물학적 활성에 있어 때로는 같은 작용을 또는 antagonistic 작용을 나타냄으로써^{14, 15)} 이들 cytokine이 국소염증을 증폭시키는 외에도 fine-tuning하여 복잡한 생체반응의 homeostasis를 이루는 것으로 사료된다.

골수와 비장은 mouse에서 가장 중요한 hemopoietic organ으로 in vivo 투여시 rMIP-1 α 는 골수와 비장에서 모두 myeloid progenitor cell의 수 및 cycling rates를 감소시켰다고 보고한 Maze 등¹⁶⁾의 결과와 MIP-1 α 의 in vivo 및 ex vivo myelosuppressive effect에 관한 여러 보고들^{14, 17, 18, 27)}로 미루어 볼때 골수와 비장세포에 MIP-1 α receptor가 존재한다는 것은 MIP-1 α 의 작용이 적어도 myeloid progenitor에 대한 직접작용에 의해서 일어난다는 것을 뒷받침한다. 그러나 한편으로 MIP-1 α 의 in vivo myelosuppressive action이 accessory cell에 의한 간접작용에 의하여서도 나타날 가능성을 배제할 수는 없다. 현재로선 MIP-1 α 의 작용이 in vivo에서 accessory cell에 의하여 매개된다는 증거가 전혀 없는 상태이나 in vivo에서 mouse T cell line에 대한 억제효과가 보고된 적이 있으므로³⁾ 간접작용에 의한 myelosuppressive action의 가능성도 충분히 있을 수 있다고 사료된다.

MIP-1 α 외의 in vivo myelosuppressor로 알려진 물질로써 lactoferrin^{28, 29)}과 H-ferritin^{30, 31)}을 들 수 있는데 lactoferrin의 작용기전은 progenitor에 대한 직접작용이 아니라 mononuclear phagocytes로부터 IL-1등의 growth factor 유리를 억제함으로써 나타나는 간접작용으로 알려져 있고 H-ferritin은 in vitro에서 progenitor에 대한 직접적인 억제작용을 나타내는 것으로 보고되었으며^{26, 27)} H-ferritin의 작용

일부는 ferroxidase activity를 나타냄으로써 기인한다고 Broxmeyer 등³¹⁾은 보고하였다. 따라서 이러한 myelosuppressor의 작용이 대식세포의 MIP-1 α 분비에 의하여 유도되는지를 관찰한 본 실험의 결과에서 보면 어느것도 MIP-1 α mRNA 발현을 촉진시키지 못한 것으로 보아 MIP-1 α 는 이들의 영향을 받지 않을 뿐 아니라 lactoferrin이나 ferritin 작용 또한 MIP-1 α 에 의한 작용은 아니라는 결론을 얻을 수 있다.

MIP-1 α 의 myelosuppressive effect 기전과는 무관하게 항암제 및 방사선 치료시에 피할 수 없이 나타나는 무차별적 세포독성으로부터 조혈장기의 hemopoietic progenitor cell을 보호하기 위하여 MIP-1 α 를 임상에 응용할 수 있는 여지가 충분히 있다. 최근 rhMIP-1 α 를 투여한 mouse에서 cell cycle-specific drug인 cytosine arabinoside의 독작용으로부터 myeloprotective effect를 나타내었다는 보고²⁰⁾가 이에 대한 가능성을 더욱 크게 하고 있지만 MIP-1 α 는 mouse에서 기염증성 효과도 함께 유발시킬 수 있으므로^{4, 5, 9)}, MIP-1 α 를 생체에 적용시킬 경우 부작용을 세밀히 관찰할 필요가 있고 임상에 광범위하게 응용하기 전에 preclinical study가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

MIP-1 α 의 기능이 부분적으로 알려져 있는 중요 lymphoid organ인 골수 및 비장과 대식세포에서의 MIP-1 α 유전자 발현정도와 이에 대한 수용체의 존재여부를 관찰함으로써 MIP-1 α 의 미확인된 생물학적 활성을 규명하고 이를 임상에 적용하기 위하여 순수분리된 recombinant MIP-1 α 를 이용, 다음의 실험결과를 얻었다.

1. 대식세포 line인 RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 MIP-1 α mRNA가 발현 유도되었으며 이것이 면역억제제인 cyclosporin A로 억제되지 않았다.
2. Resting 상태의 골수와 비장세포에서도 MIP-1 α mRNA가 발현되었으나 lactoferrin이나 ferritin 같은 in vivo myelosuppressor 투여로 그 정도가 증가하지 않았다.
3. 방사능 125 I로 표지된 rMIP-1 α 를 이용하여 시행한

RAW 264.7 세포의 K_d 값이 0.91nM, 세포당 receptor수는 378개로 측정되었고, 끌수와 비장세포에서는 세포당 각각 33, 11개의 receptor가 측정되었다.

참고문헌

- Sherry, B., and Cerami, A. : Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J. Cell. Biol.* 107 : 1269, 1988.
- Le, J., and Vilcek, J. : Biology of disease-tumor necrosis factor and interleukin 1 : cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.* 56 : 234, 1984.
- Wong, G. G., and Clark, S. C. : Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol. Today.* 9 : 137, 1988.
- Wolpe, S. D., and Cerami, A. : Macrophage inflammatory protein 1 and 2 : members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 3 : 2565, 1989.
- Wolpe, S. D., Davatelas, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D. G., Nguyen, N. T., Moldawer, L. L., Nathan, C. F., Lowry, S. F., and Cerami, A. : Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167 : 570, 1987.
- Oh, K. O., Zhou, Z., Kim, K. K., Samanta, H., Fraser, M., Kim, Y. J., Broxmeyer, H. E., and Kwon, B. S. : Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein-1a. *J. Immunol.* 147 : 2978, 1991.
- Kwon, B. S., Kestler, D. P., Zelig, E., Oh, K. O., and Wakelchik, M. : Expression characteristics of two potential T-cell mediator genes. *Cell. Immunol.* 121 : 414, 1989.
- Kwon, B. S., and Weissman, S. M. : cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 1963, 1989.
- Davatelas, G., Wolpe, S. D., Luedke, C., Tekamp-Olson, P., Merryweather, J., Hermsen, K., Gallegos, C., Coit, D., and Cerami, A. : Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage Inflammatory protein(MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167 : 1939, 1988.
- Sherry, B., Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., Davatelas, G., Masiarz, F., Coit, D., and Cerami, A. : Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 β . *J. Exp. Med.* 168 : 2251, 1988.
- Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A., and Tuomanen E. : The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram positive meningitis. *J. Exp. Med.* 171 : 439, 1990.
- Davatelas, G., Wolpe, S. D., Sherry, B., Dayer, J. M., Chicheportiche, R., and Cerami A. : Macrophage inflammatory protein-1 : a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science* 243 : 1066, 1989.
- Broxmeyer, H. E., Sherry, B., Lu, L., Copper, S., Carow, C., Wolpe, S. D., and Cerami A. : Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory proteins 1 and 2 on colony granulocyte/macrophage progenitor cells. *J. Exp. Med.* 170 : 1583, 1989.
- Broxmeyer, H. E., Sherry, B., Lu, L., Cooper, S., Oh, K. O., Tekamp-Olson, P., Kwon, B. S., and Cerami A. : Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood.* 76 : 1110, 1990.
- Fahey, T. J. III, Tracey, K. J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L.S., Jones, W. G., Shires, G. T., Cerami, A., and Sherry B. : Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J. Immunol.* 148 : 2764, 1992.

16. Maxe, R., Sherry, B., Kwon, B. S., Cerami, A., and Broxmeyer H. E. ; Myelosuppressive effects in vivo of purified recombinant murine macrophage inflammatory protein-1 α . *J. Immunol.* 149 : 1004, 1992.
17. Grahmam, G. J., Wright, E. G., Hewick, R., Wolpe, S. D., Wilkie, N. M., Donaldson, D., Lorimore, S., and Pragnell I. B. ; Identification and characterization of an inhibitor of haematopoietic stem cell proliferation. *Nature.* 344 : 422, 1990.
18. Bodine, D. M., Crosier, P. S., and Clark S. C. : Effects of hematopoietic growth factors on the survival of primitive stem cells in liquid suspension culture. *Blood.* 78 : 914, 1991.
19. Lord, B. I., Dexter, T. M., Clements, J. M., Hunter, M. A., and multipotent hematopoietic cells from the cytotoxic effects of hydroxyurea in vivo. *Blood.* 79 : 2605, 1992.
20. Dunlop, D. J., Wright, E. G., Lorimore, *, Graham, G. J., Holyoake, T., Kerr, D. J., Wolpe, S. D., and Pragnell I. B. ; Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of SCI/rhMIP 1 α in vivo. *Blood.* 79 : 2221, 1992.
21. Chomczynski, P., and Sacchi N. ; Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156, 1987.
22. Ohara, J., and Paul W. E. ; Receptors for B-cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage. *Nature.* 325 : 537, 1987.
23. Tsudo, M., Kozak, R. W., Goldman, C. K., and Wladman T. A. ; Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2 : a potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 9694, 1986.
24. Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A., and Cerami A. ; Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysacca-
- ride-activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 3511, 1992.
25. Broxmeyer, H. E., Sherry, B., Cooper, S., Ruscetti, F. W., Williams, D. E., Arosio, P., Kwon, B. S., and Cerami A. ; Macrophage inflammatory protein(MIP)-1 β abrogates the capacity of MIP-1 α to suppress myeloid progenitor cell growth. *J. Immunol.* 147 : 2586, 1991.
26. Broxmeyer, H. E. ; Iron-binding proteins and the regulation of hematopoietic cell proliferation/differentiation. In *Iron in Immunity, Cancer and Inflammation.* M. deSousa and J. H. Brock, eds. John Wiley, London, p. 199, 1989.
27. Broxmeyer, H. E. ; Suppressor cytokines and regulation of myelopoiesis : biology and possible clinical uses. *Am. J. Pediatr. Hematol/Oncol* 14 : 22, 1991.
28. Gentile, P. S., and Broxmeyer H. E. ; Suppression of myelopoiesis by administration of human lactoferrin in vivo and the comparative action of human transferrin. *Blood* 61 : 982, 1983.
29. Broxmeyer, H. E., Williams, D. E., Hangoc, G., Cooper, S., Gentile, P., Shen, R-N., Ralph, P., Gillis, S., and Bicknell D. C. ; The opposing actions in vivo on murine myelopoidsis of purified preparations of lactoferrin and the colony stimulating factors. *Blood Cells* 13 : 31, 1987.
30. Broxmeyer, H. E., Williams, D. E., Geissler, K., Hangoc, G., Cooper, S., Levi, S., and Arosio P. ; Suppressive effects in vivo of purified recombinanthuman H-subunit(acidic) ferritin on murine myelopoiesis. *Blood* 73 : 74, 1988.
31. Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Levi, S., and Arosio P. ; Mutated recombinant human H-ferritins and myelosupprission in vitro and in vivo : A link between H-ferritin ferroxidase activity and interactios with iron. *Proc. Natl Acad. Sci. USa* 88 : 770, 1991.

—Abstract—

STUDIES ON THE MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN-1 α IN BONE MARROW, SPLEEN, AND MACROPHAGE

In - Taeck Song, Kwi - Ok Oh*, Hyung - Sup Kim

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chonbuk National University

**Dept. of Pharmacology, College of Dentistry, Chonbuk National University*

Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) from activated T cell or macrophage, which is small inducible cytokine of unknown biological function, has been shown to display inflammation chemokinetic activities, as well as myelosuppressive effect on more immature progenitor cells.

In this paper we show the MIP-1 α mRNA expression and the presence of MIP-1 α binding sites from murine macrophage cell line RAW 264.7 and primary cells of mouse bone marrow and spleen.

MIP-1 α mRNA was induced from LPS-stimulated RAW 264.7, but not inhibited by cyclosporin A treatment, and also was expressed from mouse splenocytes and bone marrow cell which were not increased by ferritin or lactoferrin treatment. The results of receptor binding assay showed that radiolabeled RAW 264.7 cell with kd value of 0.91 nM, and binding sites per cell of 378. bone marrow cell and splenocyte also appeared to have MIP-1 α binding sites 33 and 11 per cell, respectiviy.