

□ 원 저 □

단핵식세포에서 내독소에 의한 인터루킨-8 유전자 발현 조절기전에 관한 연구*

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

유철규 · 서지영 · 김영환 · 한성구 · 심영수 · 한용철**

= Abstract =

Regulatory Mechanism of Lipopolysaccharide(LPS)-Induced Interleukin-8 Gene Expression in Mononuclear Phagocytic Cells

Chul-Gyu Yoo, M.D., Gee Young Suh, M.D., Young Whan Kim, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Yong Choi Han, M.D.

Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : In acute lung injury, activated neutrophils play an important role in tissue damage. For neutrophils to participate in lung inflammation, chemotactic factors released from mononuclear phagocytes are needed to bring these cells to the local site of inflammation, with interleukin-8 (IL-8) being one of the most specific and important chemotactic factors for neutrophils. IL-8 also induces the expression of adhesion molecules and activates neutrophils to release various inflammatory mediators. Lipopolysaccharide(LPS) is one of the most important causes of adult respiratory distress syndrome and can cause release of many inflammatory cytokines including IL-8 leading to acute lung injury. But little is known about the regulatory mechanism of LPS-induced IL-8 gene expression in mononuclear phagocytes.

Method : Human alveolar macrophages(HAM) and peripleral blood monocytes(PBMC) were isolated from healthy volunteers. Time and dose relationship of LPS-induced IL-8 mRNA expression was observed by Northern blot analysis. To evaluate the regulatory mechanism of LPS-induced IL-8 gene expression, pretreatment of actinomycin D(AD, 5µg/ml) and cycloheximide(CHX, 5µg/ml) was done and Northern blot analysis for IL-8 mRNA and ELISA for immunoreactive IL-8 protein in culture supernatant were performed.

Results :

1) In HAM, dose and time dependent LPS-induced IL-8 mRNA expression was observed with peak mRNA level at 8 hours post-stimulation.

* : 본 연구는 1993년도 서울대학교병원 일반연구비(연구번호 04-93-001)의 보조로 이루어 졌음.

** : 현재는 삼성의료원 내과 근무

2) In PBMC, dose and time dependent LPS-induced IL-8 mRNA expression was also observed with peak mRNA level at 4 hours poststimulation.

3) AD decreased expression of LPS-induced IL-8 gene expression at both mRNA and protein levels in both types of cells.

4) CHX decreased expression of LPS-induced IL-8 gene expression at protein level in both cell types but in HAM, superinduction of IL-8 mRNA was observed while decreased expression of IL-8 mRNA was observed in PBMC.

Conclusion : Time and dose dependent LPS-induced IL-8 gene expression was observed in mononuclear phagocytes which is at least partly regulated pretranslationally. LPS-induced IL-8 mRNA expression in HAM needs no *de novo* protein synthesis and may be under the control of a labile repressor protein while *de novo* protein synthesis may be needed in PBMC.

Key Words: LPS, IL-8 gene, Mononuclear phagocytic cells, Regulation

서 론

급성 및 만성 폐손상의 발병기전에는 염증반응이 중요한 역할을 하는데 특히 호중구에서 분비되는 단백질 분해효소, 엘라스타제(elastase), 산소기 등에 의한 염증반응으로 조직손상이 야기되는 것은 잘 알려진 사실이다¹⁾. 호중구가 조직내 염증반응에 관여하려면 혈액내에서 국소염증부위로 이동해야 하는데, 이때 단핵식세포에서 외부의 자극에 의해 분비되는 여러 화학주화인자(chemotactic factor)가 중요한 역할을 하며 이 중 호중구에 비교적 특이적으로 작용하는 주화인자인 인터루킨-8(이하 IL-8으로 약함)이 최근에 발견되어 현재 많은 연구자들의 관심을 끌고 있다²⁾. IL-8은 호중구에 대한 주화작용과 함께 호중구의 표면에 유착성 분자(adhesion molecule)의 발현을 촉진시켜³⁾, 호중구가 국소염증부위로 이동되는 것을 도와서 염증반응을 증폭시키는 간접작용 외에 호중구를 직접 활성화시켜 여러 염증매개성 물질을 분비⁴⁾하는 직접작용을 통해서도 염증반응에 관여한다.

최근들어 폐장의 대표적인 급, 만성 염증 질환인 성인성 호흡곤란증후군과 특발성 폐섬유증의 발병기전에서 IL-8의 중요한 역할을 시사하는 많은 연구결과가 알려지고 있다⁵⁻⁹⁾. 그러나 폐장의 급, 만성 염증질환의 원인 물질에 의한 IL-8의 분비 및 그 조절기전을 규명해야만 IL-8의 발병기전에서의 역할을 알 수 있다. 특발성 폐섬유증에서는 염증반응의 원인이 규명되어 있지 않지만

임상적으로 성인성 호흡곤란증후군의 가장 흔한 원인은 패혈증이다. 생체의 실험에서 그람음성균의 내독소가 여러 세포에서 IL-8을 분비시키고 실험동물에서도 내독소에 의해 혈중내 IL-8이 증가하는 것이 밝혀져 패혈증 시 내독소에 의해 분비되는 IL-8이 패혈증의 임상상에서 많은 역할을 하리라고 생각된다. 그러나 패혈증에 의한 성인성 호흡곤란증후군의 발병기전에서 IL-8의 역할을 명확하게 규명하고 이를 이용한 특이적 치료법의 개발을 위해서는 내독소에 의한 IL-8의 분비 및 그 조절기전의 이해가 반드시 선행되어야 할 것으로 생각된다.

최근 분자생물학적기법의 발달로 인해 IL-8의 cDNA가 클론(clone)되고¹⁰⁾, 유전자의 구조까지 밝혀져¹¹⁾, IL-8 유전자 발현의 기전에 대한 연구의 장이 열렸음에도 불구하고 내독소에 의한 IL-8의 분자생물학적 조절기전에 대한 연구는 미미한 상태이다. 이에 저자들은 사람의 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포에서 내독소에 의한 IL-8의 유전자 발현양상을 관찰하고 그 분자생물학적 조절기전을 규명하여 성인성 호흡곤란증후군을 위시한 염증성 폐질환에서 호중구에 의한 폐손상의 발병기전에 대한 이해를 넓히고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포의 분리

1) 폐포대식세포의 분리

적어도 6주동안 상기도감염의 병력이 없고 아무런 약

물도 복용하고 있지 않는 정상인을 대상으로 기관지폐포세척술(bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하였다. 즉, atropine과 demerol로 전처치한 후 lidocaine으로 국소마취를 시행하고 폐 우중엽의 양 분절에서 한 번에 50 ml의 생리식염수로 각 분절당 3~4번 기관지폐포세척술을 시행하여 총 300~400 ml의 기관지폐포세척액을 얻었다. 이 세척액을 거르로 거른뒤 4℃에서 1500rpm으로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시키고 1mM glutamine과 25mM HEPES가 들어있는 RPMI-1640에 100U/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 배양액으로 2번정도 세척한 후 일부를 취해 hemocytometer로 세포수를 측정하여 10⁶/ml로 세포수를 맞추었다. 같은 양을 35mm 플라스틱 배양접시에 분주하고 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양하여 폐포대식세포를 배양접시에 부착시키고 상층액을 제거하여 폐포대식세포만을 분리하였다.

2) 말초혈액 단핵세포의 분리

Heparin으로 처리된 주사기로 정상인 자원자에서 약 100ml의 정맥혈을 채취하였다. 혈액을 생리적 식염수와 1:1 비율로 섞은 뒤 Ficoll-Hypaque으로 단핵세포층을 얻어 완전한 배양액에 재부양시키고 2~3회 씻어준 다음 10⁶/ml로 세포수를 조정하여 같은 양을 35mm 배양접시에 분주하고 1시간 배양하여 단핵세포를 배양접시에 부착시키고 상층액을 제거하여 림프구로부터 단핵세포를 분리하였다.

2. IL-8 mRNA 발현

1) 실험 조건

내독소에 의한 IL-8 유전자 발현의 용량-반응관계를 평가하기 위해서 세포배양액에 내독소(E.coli 0111B4)를 0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml의 농도로 첨가하고 8시간이 경과한 후 IL-8 mRNA에 대한 Northern Blot Analysis를 시행하였다. 내독소 투여후 시간경과에 따른 IL-8 유전자 발현의 변화를 평가하기 위하여 폐포대식세포와 단핵세포 배양액에 100 ng/ml의 내독소를 첨가하고 0, 2, 4, 8, 24 시간이 경과한 후 IL-8 mRNA에 대한 Northern Blot Analysis를 시행하였다. 내독소에 의한 IL-8 유전자 발현의 분자적 조절기전을 규명하기 위하여 폐포대식세포와 단핵세포를 전사(transcription) 억제제인 actinomycin D(5 μ g/ml)와 단백질 합성 억제제인 cy-

cloheximide(5 μ g/ml)로 각각 전처치한 후 내독소를 투여하고 각각에서의 IL-8 mRNA 발현을 비교하였다. actinomycin D는 내독소 투여 직전에 투여하였고 cycloheximide는 내독소 투여 1시간전에 투여하였다.

2) Northern Blot Analysis

Chomczynski와 Sacchi의 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출법¹²⁾을 이용하여 총 RNA를 추출하여 정량화한 뒤 동량의 RNA를 formaldehyde를 함유하는 1.2% agarose gel에 전기영동을 시행하여 분리시켰다. 전기영동 후 28S와 18S rRNA band의 정도로 동량의 RNA loading 여부를 관찰하였다. 전기영동한 gel의 RNA를 밤새 nylon membrane으로 transfer시키고, RNA가 transfer된 membrane을 UV crosslinking을 시행하여 RNA를 membrane에 고정시켰다. Pre-hybridization후 65℃에서 ³²P로 labeling한 사람 IL-8 cDNA를 표지자로 사용하여 hybridization을 시행하였다. IL-8 cDNA는 미국 NIH의 Dr. Crystal에게서 기증 받았다. cDNA의 labeling은 Random Primed DNA Labeling Kit를 이용하였다. Hybridization을 시행한 후 nylon membrane을 intensifying screen이 들어 있는 X-ray film cassette에 넣고 -70℃에서 1~2일간 autoradiography를 시행하고 laser densitometry로 정량하였다.

3. IL-8 단백질

대조군, 내독소 투여군, actinomycin D 전처치군, cycloheximide 전처치군으로 나누어 내독소를 투여하고 24시간이 경과한 후의 배양액을 사용할때까지 -70℃에서 보관하였다. 면역반응성(immunoreactive) IL-8은 각 sample을 duplicate하여 human IL-8 ELISA Kit (Amersham, UK)로 정량하였다.

결 과

1. 내독소 농도에 따른 IL-8 mRNA의 발현 양상

내독소 농도에 따른 IL-8 mRNA의 발현 양상을 관찰하기 위해 내독소를 0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml의 농도로 배양액에 첨가하고 4시간이 경과한 후에 Northern blot analysis를 시행하였다. 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 내독소 1ng/ml의 농도에서부터 IL-8

mRNA의 발현이 증가되었으며 내독소 농도의 증가에 따라 IL-8 mRNA 발현의 증가가 관찰되었다(Fig. 1, 2).

2. 내독소 자극의 시간에 따른 IL-8 mRNA의 발현 양상

내독소 자극의 시간에 따른 IL-8 mRNA의 발현 양상을 관찰하기 위하여 내독소를 100 ng/ml의 농도로 배양액에 첨가하고 0, 2, 4, 8, 24시간이 경과한 후 Northern blot analysis 를 시행하였다. 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포에서의 IL-8 mRNA 발현은 내독소 투여 2시간 후부터 증가되기 시작하여 24시간까지 지속되었다. 폐

포대식세포에서는 8시간, 말초혈액 단핵세포에서는 4시간에 각각 정점을 이루었다(Fig. 3, 4).

3. Actinomycin D와 Cycloheximide가 내독소에 의한 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향

폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 내독소에 의한 IL-8 mRNA의 발현은 actinomycin D 전처치로 억제 되었지만 cycloheximide 전처치로는 폐포대식세포에서는 약간 증가되었고 말초혈액 단핵세포에서는 약간 감소하는 양상이 관찰되었다(Fig. 5, 6).

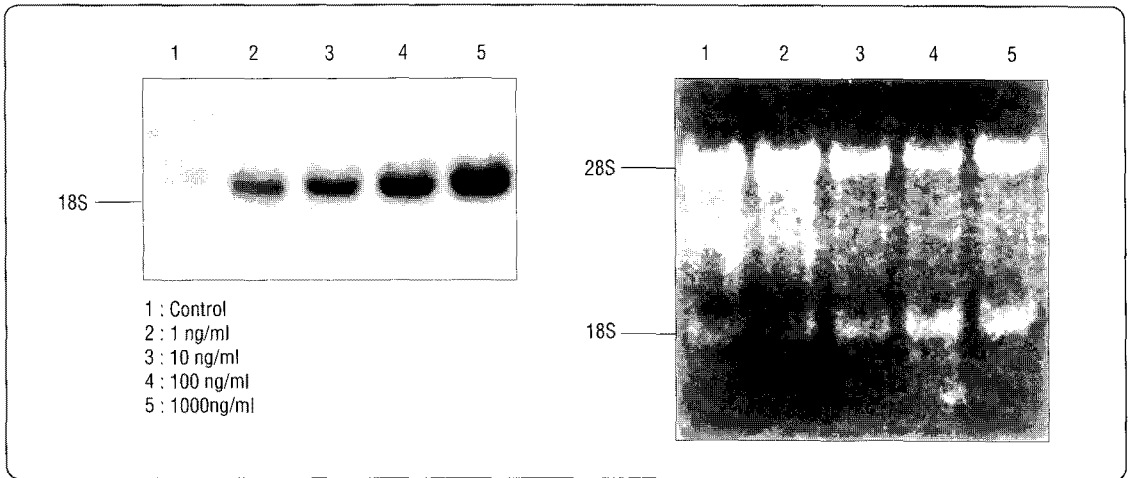


Fig. 1. Dose response of LPS-induced IL-8 mRNA expression in HAM.

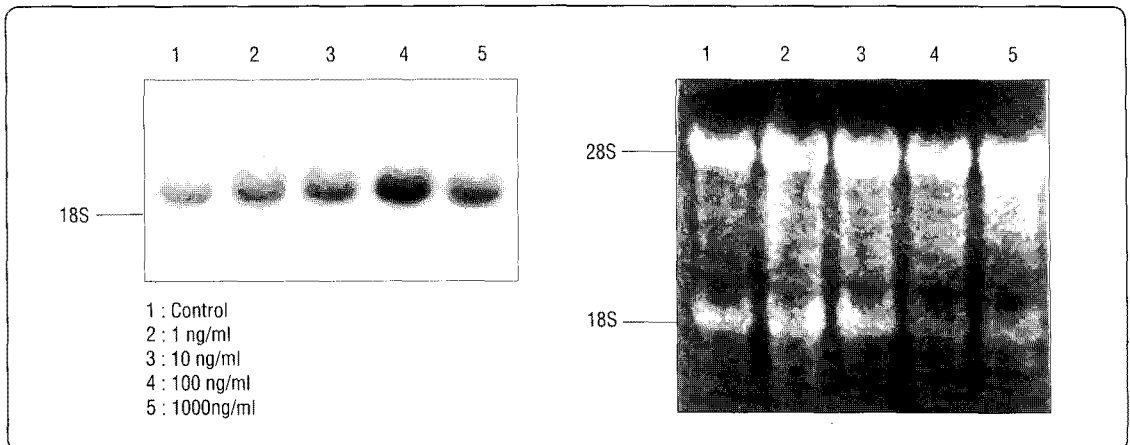


Fig. 2. Dose response of LPS-induced IL-8 mRNA expression in PBMC.

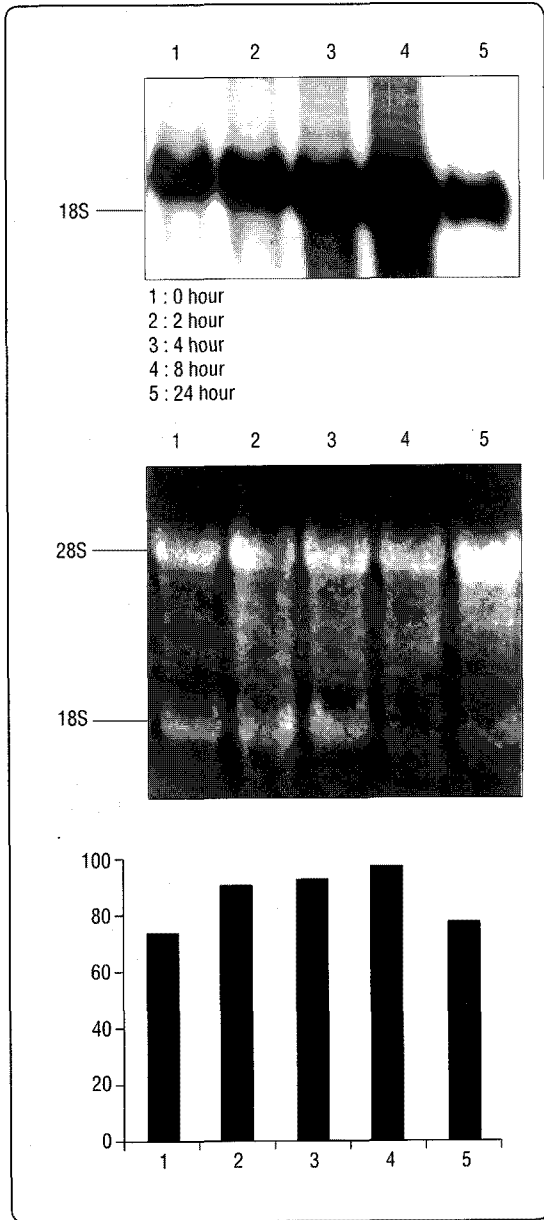


Fig. 3. Time response of LPS-induced IL-8 mRNA expression in HAM.

4. Actinomycin D와 Cycloheximide가 내독소에 의한 IL-8 단백질의 분비에 미치는 영향

폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 내독소 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 IL-8 단백질의 분비가 증가되었고 이는 actinomycin D와 cycloheximide

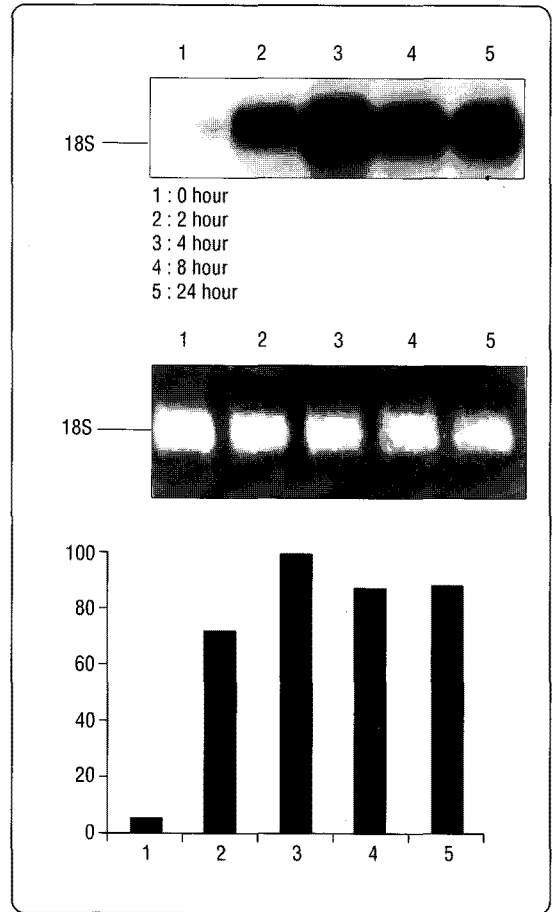


Fig. 4. Time response of LPS-induced IL-8 mRNA expression in PBMC.

전처치에 의해 유의하게 감소되었다(Fig. 7, 8).

고 찰

1987년에 호중구에만 특이적으로 작용하는 새로운 주화인자가 발견되었는데¹³⁾, 분비되는 세포와 관찰된 기능에 따라 호중구 활성화인자(neutrophil activating factor, NCF)¹⁴⁾, 과립구 주화인자(granulocyte chemotactic factor, GCF)¹⁵⁾, 단핵세포유래 호중구 주화인자(monocyte-derived neutrophil chemotactic factor: MDNCF)^{10,13)}, 호중구 주화인자(neutrophil chemotactic factor, NCF)¹⁶⁾, 단핵세포유래 호중구 활성화펩티드(monocyte-derived neutrophil activating peptide, MDNAP) 등¹⁷⁾

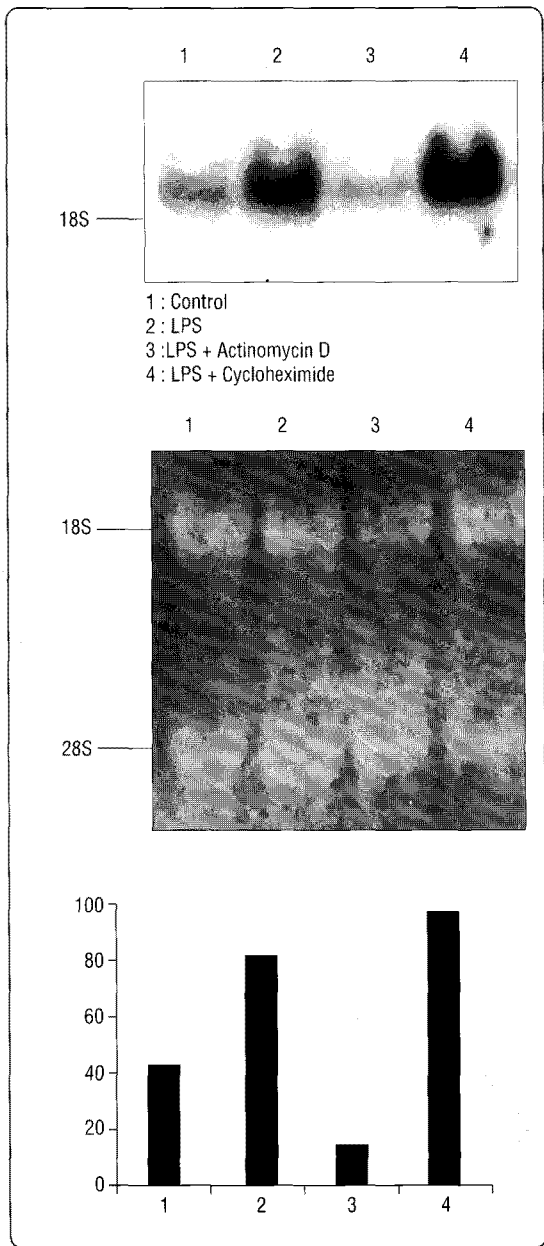


Fig. 5. Regulation of LPS-induced IL-8 mRNA expression in HAM.

여러 명칭으로 불리워 졌다. 그 후 이런 물질들이 모두 동일한 물질임이 밝혀져 현재는 호중구활성단백질-1 (Neutrophil activating peptide-1, NAP-1)¹⁸⁾과 IL-8¹⁹⁾으로 가장 많이 명명되고 있다. 많은 연구에 의해 여러 주화인자가 서로 구조와 기능이 비슷한 사실이 알려져 이

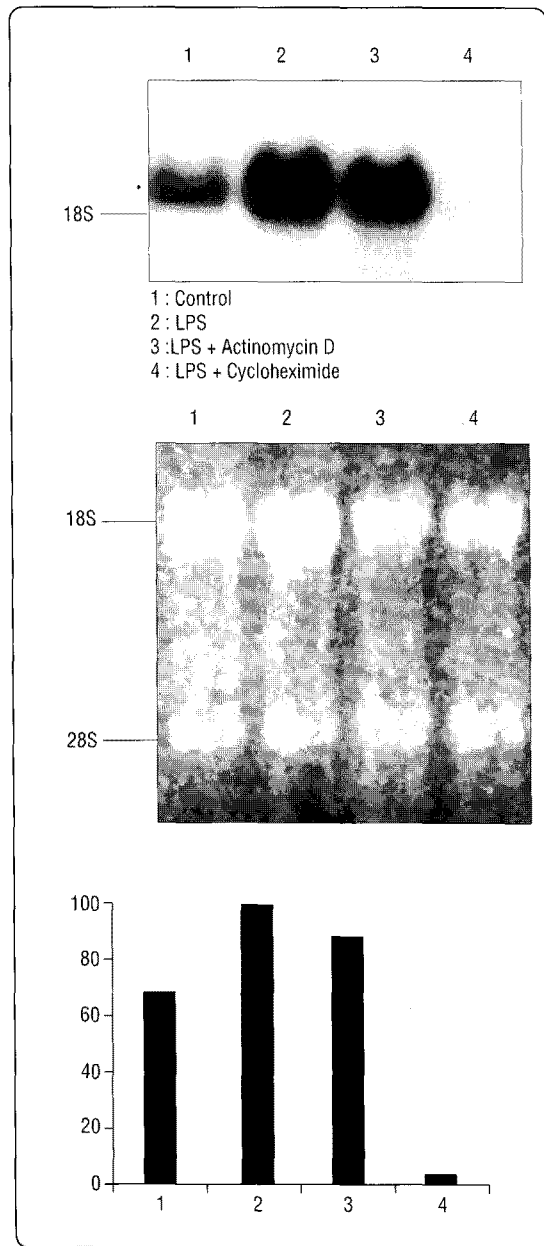


Fig. 6. Regulation of LPS-induced IL-8 mRNA expression in HAM.

를 chemokine(chemoattractant와 cytokine의 합성어)으로 부르게 되었으며 현재까지 사람에서는 18종의 chemokine이 알려져 있다. 이들은 아미노산 서열의 유사성, 4개의 cysteine 중 처음 두 cysteine 사이의 아미노산 유무, 유전자의 위치 등에 의해 다시 α 또는 CXC

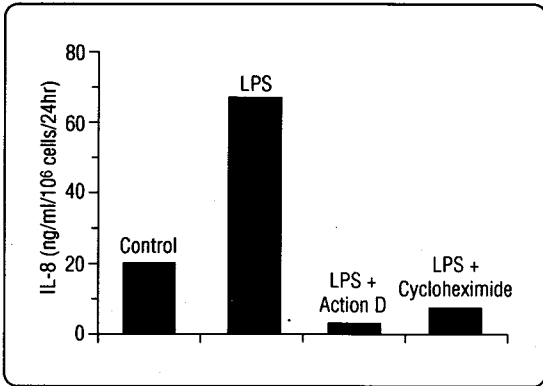


Fig. 7. Suppression of LPS-induced IL-8 Secretion by Actinomycin D & Cycloheximide in HAM.

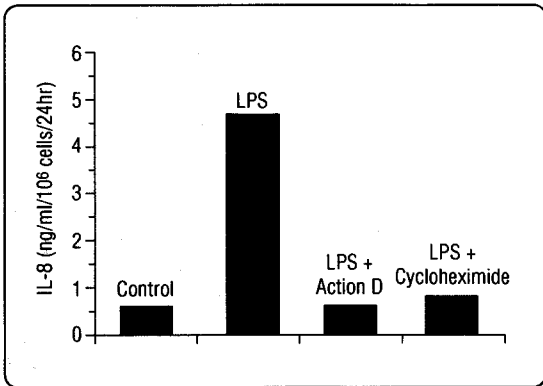


Fig. 8. Suppression of LPS-induced IL-8 Secretion by Actinomycin D & Cycloheximide in PBMC.

chemokine과 β 또는 CC chemokine 두개의 소그룹으로 나뉘어 진다. chemokine에 속하는 물질은 모두 단백질 구조상 4개의 cysteine이 동일한 위치에 있는 것을 특징으로 하는데 CXC chemokine은 첫 두 cysteine 사이에 하나의 다른 아미노산이 있고²⁰⁾, 사람의 4번 염색체에 유전자가 위치하며 주로 호중구에 대한 주화작용을 통해 염증을 증폭시키는 공통점을 갖고 있는데, IL-8외에도 혈소판내의 혈소판 염기성 단백질(platelet basic protein, PBP), 결합조직 활성화펩티드 III (connective tissue activating protein-III, CTAP-III), 혈소판 제 4인자(platelet factor 4, PF4), PBP나 CTAP-III의 분해산물인 β -thromboglobulin (β -TG)과 NAP-2, γ -IP-10과 gro, 흑색종 성장활성인자 (melanoma growth-stimula-

ting activity, MGSA) 등이 CXC chemokine 가족에 속한다^{2,21)}. CC chemokine은 첫 두 cysteine 사이에 아미노산이 없고 사람의 17번 염색체에 유전자가 위치하며 주로 단핵세포에 대한 주화작용을 보이는 특징을 가지고 있고 MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 등이 이에 속한다²¹⁾.

IL-8은 과거에는 주로 단핵식세포에서만 생성된다고 알려져 있었는데 그후 많은 연구에 의해 다양한 자극으로 다른 세포에서도 생성이 가능한 것으로 밝혀졌다. 호중구^{22~24)}와 전통적으로 면역기능에 관여하는 세포인 T-림프구²⁵⁾, 단핵식세포외에도 피부의 섬유아세포²⁶⁾, 폐섬유아세포²⁷⁾, 혈관내피세포^{28~30)}, 폐상피세포³¹⁾, 종피세포³²⁾, 활액막세포³³⁾, 신장의 혈관간세포 (mesangial cell)³⁴⁾, 여러 암세포주 등²⁵⁾에서 적절한 자극에 의해 IL-8이 생성된다는 것이 확인되어 이런 세포들도 단순히 염증반응의 bystander가 아닌 능동적인 참여자라는 사실을 시사하고 있다. IL-8 발현의 증가는 세포에 따라 약간의 차이를 보이는데 단핵세포에서는 LPS, TNF와 IL-1에 의해 폐포대식세포에서는 LPS, TNF, IL-1³⁵⁾, respiratory syncytial virus³⁶⁾, zymosan³⁷⁾, 플라스틱 표면의 부착 등³⁸⁾에 의해 IL-8의 발현이 증가되지만 기관지상피세포에서는 LPS에 의해 IL-8 발현의 증가가 관찰되지 않는다.

IL-8의 대표적인 기능으로는 호중구에 특이적인 주화작용을 들 수 있다. 호중구 표면의 유착성 분자인 CD18/11a, CD18/11b, CD18/11c의 발현이 IL-8에 의해 촉진되고^{3,39)}, 호중구와 혈관내피세포의 유착이 항 IL-8항체로 억제된다는 사실은 호중구 이동의 선행 단계인 호중구와 혈관내피세포사이의 유착에도 IL-8이 관여한다는 사실을 뒷받침하는 소견이다. 이외에도 IL-8은 호중구를 직접 활성화시켜 호중구의 형태학적 변화, 저장된 과립내 효소들의 분비와 산소기(oxygen free radical)의 생성을 자극하여 직접 조직의 손상을 가져오는 기능도 가지고 있다²⁾. 이상의 사실로 볼 때, IL-8은 염증반응의 여러 단계에 관여하여 염증반응을 증폭시키는 역할을 하는 것으로 판단된다.

많은 연구에 의해 IL-8이 여러 염증성 질환의 발병전에 관여할 가능성이 시사되고 있다. 특발성 폐섬유증의 병변은 폐포내에 침윤된 호중구에 의한 폐포의 손상

과 이에 수반되는 비정상적인 복구와 섬유화를 특징으로 하고 있는데⁴⁰⁾, 호중구의 침윤은 폐포대식세포에서 분비되는 호중구 주화인자에 의한 것으로 이해되고 있다⁴¹⁾. 최근들어 특발성 폐섬유증환자의 기관지폐포세척액에서 정상인에 비해 IL-8 단백질 증가되어 있고 폐포대식세포의 IL-8 mRNA 발현도 정상인에 비해 증가되어 있으며 이는 기관지폐포세척액의 호중구수 및 질병의 정도와 유의한 상관관계를 보여 특발성 폐섬유증의 발병기전에서 IL-8의 중요한 역할을 시사하고 있다^{5~6)}. 그러나 이러한 현상이 특발성 폐섬유증의 이차적인 현상일 가능성을 완전히 배제할 수 없어 향후 이에 관한 검증이 필요 할 것으로 생각된다. 기관지 천식에서도 IL-8의 역할을 시사하는 소견들이 많이 알려져 있는데 천식환자의 기도상피세포에서 IL-8의 발현이 증가되어 있고⁴²⁾, 이는 부신피질 호르몬제에 의해 억제되어 천식에서 부신피질 호르몬의 효과는 IL-8 유전자 발현의 억제에 의함을 시사하고 있다⁴³⁾. IL-8이 류마티스 관절염 환자의 단핵세포 특히 병변의 국소부위인 활액막의 단핵세포에서 증가되어 있고⁴⁴⁾, 건선의 피부병변에서도 IL-8의 존재가 확인되었으며⁴⁵⁾, 급성체장염 환자의 혈청에서도 증가되어 있어⁴⁶⁾, IL-8은 폐질환뿐 아니라 거의 모든 종류의 염증성 질환에 관여할 것으로 추측되고 있다.

성인성 호흡곤란증후군의 발병기전은 확실히 밝혀져 있지는 않지만 여러 염증세포에서 분비되는 염증매개성 물질이 최소한 일부 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 호중구 주화작용을 보이는 IL-8이 이에 관여함을 시사하는 많은 연구결과가 알려져 있다. 즉, 성인성 호흡곤란증후군 환자의 기관지폐포세척액내에 호중구에 대한 주화작용을 보이거나 호중구를 활성화시키는 물질의 존재가 알려졌고⁷⁾, 실험동물에 IL-8을 투여하면 성인성 호흡곤란증후군과 유사한 병태생리학적 변화가 관찰되며⁸⁾, 임상적으로 성인성 호흡곤란증후군의 가장 흔한 원인인 패혈증 환자의 기관지폐포세척액에서 IL-8의 증가가 관찰되고 IL-8이 증가된 환자의 예후가 더 불량한 것으로 알려졌는데⁹⁾, 이러한 사실들은 성인성 호흡곤란증후군의 발병기전에 IL-8이 깊이 관여할 가능성을 보여주는 결과이다.

일반적으로 IL-8의 발병기전에서의 역할을 명확하게

규명하고 이를 치료에 이용하기 위해서는 IL-8의 분비 및 그 조절기전의 이해가 반드시 선행되어야 한다. 하지만 IL-8 유전자 발현의 분자생물학적 조절기전에 관해서는 그리 많이 알려져 있지 못한 실정이다. IL-8의 유전자 구조를 보면 5'-flanking region에 IL-1, TNF, PMA에 대한 response element가 있어 자극물질에 따른 IL-8 유전자 발현의 조절기전이 각각 다를 가능성을 생각할 수 있다²⁵⁾. 실제로 실험에 사용한 세포와 자극물질에 따라 상이한 결과가 알려져 있다. 즉, 섬유육종 세포주에서 TNF, IL-1과 PMA 자극에 의한 IL-8 유전자의 발현은 단백질 합성 억제제인 cycloheximide에 의해 항진되어 IL-8의 분자생물학적 조절기전에서 억제 단백질 (repressor protein)의 존재가 시사되고 있으며²⁵⁾, IL-1으로 사람의 혈관내피세포를 자극하였을 때 IL-8 발현의 증가는 전사 자체의 증가에 의한 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾. 폐장에서 면역기능과 염증반응의 중추적 역할을 하는 폐포대식세포와 그 전구세포인 말초혈액 단핵세포에서 대표적인 폐의 염증성 질환인 성인성 호흡곤란증후군의 원인인 내독소에 의한 IL-8 유전자 발현의 조절기전에 대한 연구는 미미한 상태이다. 내독소에 의한 IL-8 유전자 발현의 분자생물학적 조절기전을 밝히는 것은 성인성 호흡곤란증후군을 위시한 여러 염증성 질환에서 조직손상의 기전에 대한 이해를 넓히는 일인 동시에 특이적 치료법의 개발에 앞서 반드시 선행되어야 할 과제로 생각되어 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 constitutive IL-8 mRNA 발현의 정도가 실험마다 많은 차이를 보였는데 이는 대상 사람에 따른 차이일 가능성과 함께 IL-8은 표면부착에 의해 mRNA 발현이 증가되는 것으로 잘 알려져 있는데³⁸⁾, 본 연구에서는 단핵식세포의 분리를 위해 플라스틱부착법을 이용하였기 때문에 세포부착에 의한 활성화의 차이에 기인할 가능성도 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 IL-8 mRNA의 발현이 내독소 투여후 4~8시간에 정점을 이루고 내독소의 용량 증가에 따라 증가하는 양상이 관찰되었는데 이는 다른 연구자들의 결과와 같다^{35,48)}. 단핵식세포에서는 내독소에 의해 TNF, IL-1이 분비되기 때문에 본 연구의 결과만으로 단핵식세포에서 내독소에 의한 IL-8 mRNA 발현의 증가가 내독소의 직접 작용에 의한 것인

지 또는 내독소에 의해 분비된 TNF, IL-1 등의 물질에 의한 결과인지를 구별하기는 곤란하다. 이의 감별을 위해 항 후 TNF와 IL-1에 대한 항체로 전처리한 후 내독소에 의한 IL-8 mRNA 발현을 관찰하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

일반적으로 유전자 발현은 전사, nuclear processing, cytoplasmic stability, translation의 단계에서 조절되고 있다. 본 연구에서는 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 내독소에 의한 IL-8 mRNA 발현과 IL-8 단백질의 분비가 전사 억제제인 actinomycin D에 의해 모두 감소하였다. 따라서 이들 세포들에서 내독소에 의한 IL-8 유전자 발현의 증가는 적어도 일부는 translation 이전의 수준에서 조절됨을 알 수 있다. 그러나 본 연구의 결과만으로 내독소에 의한 IL-8 유전자 발현의 증가가 전사 자체의 증가에 기인하는지 혹은 mRNA 안정성의 증가에 의한 것인지 구분할 수는 없다. 다른 연구자의 결과에 의하면 한 섬유육종 세포주에서 IL-1에 의한 IL-8 유전자 발현의 증가는 적어도 일부는 전사증가에 의한다는 결과가 있는 반면에 HL-60세포에서는 PMA나 내독소 자극에 의하여 mRNA의 안정성이 증가된다는 보고가 있다⁴⁹⁾. 이의 구별을 위해서는 유전자 전사 속도와(nuclear run off assay) mRNA의 안정성을(mRNA stability assay) 직접 측정해야 하며 이는 추후에 연구되어야 할 과제라고 생각된다.

단백합성 억제물질인 cycloheximide가 IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향은 사용된 세포, 자극, cycloheximide를 투여한 시간에 따라 다양한 결과가 알려져 있다. 즉, 말초혈액 단핵세포에서는 cycloheximide 전처치로 LPS나 PMA에 의한 IL-8 mRNA는 억제되었고⁵⁰⁾, IL-1에 의한 IL-8 mRNA induction에는 아무런 영향을 못 미쳤으며⁵¹⁾, IL-2에 의한 IL-8 mRNA는 superinduction이 되었다⁵²⁾. 또한 동일한 세포와 동일한 자극물질을 사용한 경우에도 cycloheximide를 첨가한 시간에 따라서 mRNA의 발현이 억제 혹은 증가될 수 있다는 흥미로운 결과가 있어⁵³⁾, cycloheximide를 사용하는 실험들의 결과를 해석하는데 있어서 더욱 주의를 요한다. 본 연구에서는 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포를 cycloheximide로 전처리한 후 내독소로 자극하였을때 IL-8 단백질은 모두에서 감소하였지만 IL-8 mRNA는 폐포대식세포

에서는 superinduction이 되었고 말초혈액 단핵세포에서는 억제되어 동일한 계열의 세포인 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포에서 cytokine 분비와 그 조절기전에 차이를 보이고 있다. 이런 결과는 다른 실험에서도 관찰된다. 즉, 내독소에 의한 IL-8 유전자 발현이 말초혈액 단핵세포에서는 prostaglandin E₂에 의해 억제되었지만 폐포대식세포에서는 억제되지 않았으며⁵⁴⁾ 말초혈액 단핵세포는 내독소에 의한 IL-6 생성이 거의 없었던 반면 폐포대식세포는 내독소에 의한 IL-6 생성의 증가를 보였고⁵⁵⁾, 내독소에 의한 종양괴사인자- α (TNF- α) mRNA의 발현이 prostaglandin E₂와 dexamethasone에 의해 말초혈액 단핵세포에서는 심하게 억제되었지만 폐포대식세포에서는 미미한 감소만 보였고⁵⁶⁾, 내독소에 의한 종양괴사인자의 mRNA 발현 및 단백질 분비는 말초혈액 단핵세포에서 보다는 폐포대식세포에서 월등히 많이 관찰되었다⁵⁷⁾. 이런 차이점은 이 두 세포간의 분화 정도의 차이거나 말초혈액 단핵세포가 폐포대식세포로 되는 사이에 접할 수 있는 여러 자극(stimuli)들에 활성화되어 서로 다른 반응성을 보였을 가능성을 고려할 수 있다. 이상의 결과를 종합하면 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 내독소에 의해 IL-8 mRNA의 발현과 IL-8 단백질의 분비가 증가되었는데, 이는 일부 translation 이전 수준에서(pre-translational level) 조절되며 폐포대식세포에서는 *de novo* 단백질합성과는 관계가 없고 불안정한 억제인자 (labile repressor)의 조절을 받고 있고 말초혈액 단핵세포에서는 지속적인 *de novo* 단백질합성이 중요할 것으로 생각된다. 항 후 각 세포에서 IL-8 유전자 발현에 관여하는 이들 단백질의 성상에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 : 급성 폐손상에서는 호중구가 조직손상에 중요한 역할을 하는데 호중구는 외부자극에 의해 단핵식세포에서 분비되는 여러 화학주화인자에 인하여 국소 염증부위로 이동하며, 이중 대표적인 물질이 호중구에 비교적 특이적으로 작용하는 IL-8이다. IL-8은 호중구에 대한 주화작용외에 호중구 표면에 유착성 분자의 발현을 증가시키고 호중구 자체를 활성화 시키는 등 직,간

접적으로 염증반응에 관여한다. 그러나 아직까지 급성 폐손상의 표본인 성인성 호흡곤란증후군의 가장 흔한 원인인 내독소에 의한 단핵식세포에서 IL-8의 분자생물학적 조절기전에 대한 연구는 많지 않은 실정이다.

방법 : 정상인의 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포를 분리하여 내독소에 의한 IL-8 mRNA 발현양상을 관찰하기 위하여 내독소의 여러 농도와 배양시간에 따라 IL-8 mRNA에 대한 Northern blot analysis를 시행하였다. 내독소에 의한 IL-8 유전자 발현의 분자생물학적 조절기전을 규명하기 위해 actinomycin D와 cycloheximide로 전처리한 후 내독소에 의한 IL-8 mRNA와 배양액에서 면역반응성 IL-8을 측정하기위해 각각 Northern blot analysis와 ELISA를 시행하였다.

결과 :

1) 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 내독소에 의한 IL-8 mRNA의 발현은 내독소 1 ng/ml의 농도에서부터 증가되었으며 내독소 농도의 증가에 따라 증가되었다. 또한 내독소에 의한 IL-8 mRNA의 발현은 내독소 투여 2시간후부터 증가되기 시작하여 24시간까지 지속되었으며 폐포대식세포에서는 8시간, 말초혈액 단핵세포에서는 4시간에 각각 정점을 이루었다

2) actinomycin D는 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 IL-8 유전자 발현을 mRNA와 단백질 수준에서 억제시켰다.

3) cycloheximide는 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 IL-8 유전자 발현을 단백질 수준에서는 억제시켰으나 mRNA 발현은 폐포대식세포에서는 약간 증가시켰고 말초혈액 단핵세포에서는 약간 억제시켰다.

결론 : 폐포대식세포와 말초혈액 단핵세포 모두에서 내독소에 의해 IL-8 mRNA의 발현과 IL-8 단백질의 분비가 증가되었는데 이는 일부 전사이전 수준에서 (pre-translational level) 조절되며 폐포대식세포에서는 de novo 단백질합성과는 관계가 없고 불안정한 억제인자 (labile repressor)의 조절을 받고 있고 말초혈액 단핵세포에서는 지속적인 de novo 단백질합성이 중요한 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Tate BM, Repine JE: Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **128**:552, 1983
- 2) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/Interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* **84**:1045, 1989
- 3) Detmers PA, Lo SK, Olsen-Edgbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA: Neutrophil-activating protein 1-interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* **171**:1152, 1990
- 4) Leonard E, Yoshimura: Neutrophil attractant/activation protein-1(NAP-1[Interleukin-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**:479, 1990
- 5) Carre PC, Mortenson RL, King TE, Noble PW, Sable CL, Riches WL: Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **88**:1802, 1991
- 6) Joseph L, Standiford T, Rolfe M, Kunkel S, Strieter R: Neutrophilic alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis:the role of interleukin-8. *Am Rev Respir Dis* **145**:1433, 1992
- 7) Cohen AB, Macarthur C, Idell S, Maunder R, Martin T, Dinarello CA, Griffith D, McLarty J: A peptide from alveolar macrophages that releases neutrophil enzymes into the lung in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **137**:1151, 1988
- 8) Rot A:Some aspects of NAP-1 pathophysiology: Lung damage caused by a blood-borne cytokine. *Adv Exp Med Biol* **305**:127, 1991
- 9) Steinberg RB, Goodman RB, Maunder RJ, Martin TR, Milberg JA, Whitcomb ME, Hudson LD: In-

- terleukin-8 levels in bronchoalveolar lavage fluid correlate with ARDS secondary to sepsis. *Am Rev Respir Dis* **145**:Supp A465, 1992
- 10) Matsushima K, Marishita K, Yoshimura T, Lauw S, Kobayashi W, Lew W, Apella E, King NF, Leonard EF, Oppenheim JJ: Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor and induction of MDNCF mRNA by interleukin-1 and TNF. *J Exp Med* **167**:1883, 1988
 - 11) Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K: Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* **143**: 1366, 1989
 - 12) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156, 1987
 - 13) Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Apella E, Oppenheim JJ, Leonard EF: Purification of human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:9233, 1987
 - 14) Walz A, Peveri H, Aschauser H, Baggiolini M: Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **149**: 755, 1987
 - 15) Van Damme J, Van Becuman A, Openakker, Bilau A: A Novel NH₂-terminal sequence-characterized human monokine possessing neutrophil chemotactic skin-reactivity and granulocytosis-promoting activity. *J Exp Med* **167**:1364, 1988
 - 16) Strieter RM, Kunkel SL, Showell JJ, Remick DG, Phan SH, Ward PH, Marks RM: Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF, IL-1, and LPS. *Science* **243**:1467, 1989
 - 17) Schroeder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E: Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* **139**:3474, 1987
 - 18) Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K: The neutrophil-activating peptide is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* **243**:1464, 1989
 - 19) Westwick J, Li SW, Camp RD: Novel neutrophil-stimulating peptides. *Immunol Today* **10**:146, 1989
 - 20) Nicod L: Cytokines 1; Overview. *Thorax* **48**:600, 1993
 - 21) Baggiolini M, Dahinden CA: CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* **15**:127, 1994
 - 22) McCain RW, Dessypris EN, Christman JW: GM-CSF stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce IL-8 in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**:28, 1993
 - 23) Costella M, Bazzoni F, Ceska M, Ferro I, Baggiolini M, Giorgio B: IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes: The chemoattractant fMLP induces the gene expression and release of IL-8 through a Pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol* **148**:3216, 1992
 - 24) Strieter RM, Kasahara K, Allen R, Showell HJ, Standiford TJ, Kunkel SL: Human neutrophils exhibit disparate chemotactic factor gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **173**:725, 1990
 - 25) Mukaida N, Hishinuma A, Zachariae C, Oppenheim JJ, Matsushima K: Regulation of human interleukin 8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for Interleukin-8. *Adv Exp Med Biol* **305**:31, 1991
 - 26) Strieter RM, Phan SH, Showell HJ, Remick DG, Lynch JP, Genord M, Raiford C, Eskandari M, Marks RM, Kunkel SL: Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in hu-

- man fibroblasts. *J Biol Chem* **264**:10521, 1989
- 27) Rolfe MW, Kunkel SL, Standiford TJ, Chensue SW, Allen RM, Evanoff HL, Phan SH, Strieter RM: Pulmonary fibroblast expression of Interleukin-8: A model for alveolar macrophage-derived cytokine networking. *Am J Respir Cell Mol Biol* **5**:493, 1991
 - 28) Schroder JM, Christophers E: Secretion of novel and homologous neutrophil-activating peptides by LPS-stimulated human endothelial cells. *J Immunol* **142**:244, 1989
 - 29) Strieter RM, Wiggins R, Phan BL, Wharran BL, Showell HJ, Remick DG, Chensue SW, Kunkel SL: Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **162**: 694, 1989
 - 30) Gimbrone MA, Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE, Hebert CA, Yip YK, Leung DW, Lowe DG, Kohr WJ, Darbonne WC, Bechtol KB, Baker JB: Endothelial Interleukin-8: A novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* **246**: 1601, 1989
 - 31) Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP, Toews GB, Westwick J, Strieter RM: Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line: A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* **86**:1945, 1990
 - 32) Goodman RB, Wood RG, Martin TR, Hanson-Painton O, Kmasewitz GT: Cytokine-stimulated human mesothelial cells produce chemotactic activity for neutrophils including NAP-1/IL-8. *J Immunol* **148**:457, 1992
 - 33) DeMarco D, Kunkel SL, Strieter RM, Basha M, Zurier RB: Interleukin-1 induced gene expression of neutrophil activating protein (Interleukin-8) and monocyte chemotactic peptide in human synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **174**:411, 1991
 - 34) Brown Z, Fairbanks L, Strieter RM, Neild GH, Kunkel SL, Westwick J: Human mesangial cell derived interleukin 8 and interleukin 6: Modulation by an interleukin 1 receptor antagonist. *Adv Exp Med Biol* **305**:137, 1991
 - 35) Strieter RM, Chensue SW, Standiford TJ, Basha MA, Showell HJ, Kunkel SL: Disparate gene expression of chemotactic cytokines by human mononuclear phagocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **166**:886, 1990
 - 36) Becker S, Quay J, Soukup J: Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *J Immunol* **147**:4307, 1991
 - 37) Rankin JA, Sylvester I, Smith S, Yoshimura T, Leonard EJ: Macrophages cultured in vitro release leukotriene B₄ and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J Clin Invest* **86**:1556, 1990
 - 38) Standiford TJ, Kunkel SL, Kasahara K, Milia MJ, Rolfe MW, Strieter RM: Interleukin-8 gene expression from human alveolar macrophages: the role of adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol* **5**:579, 1991
 - 39) Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ: Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* **254**:99, 1991
 - 40) Cantin AM, Noth SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG: Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **79**:1665, 1973
 - 41) Hunninghake GW, Gadek JE, Fales HM, Crystal RG: Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **68**:259, 1980
 - 42) Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S: Expression of the potent inflammatory cytokines granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor

- and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* **89**:1001, 1992
- 43) Kwon OJ, AU BT, Collins PD, Baraniuk JN, Adcock IM, Chung KF, Barnes PJ: Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells. *Immunology* **81**:389, 1994
 - 44) Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini M: Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **87**:463, 1991
 - 45) Schroeder JM, Christophers E: Identification of Cades arg and an anionic neutrophil-activating peptide(ANAP) in psoriatic scales. *J Invest Dermatol* **87**:53, 1986
 - 46) Gross V, Andressen R, Leser HG, Ceska M, Liehl E, Lausen M, Farthmann EH, Scholmerich J: Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* **22**:200, 1992
 - 47) Sica A, Matsushima K, Van Damme J, Wang JM, Polentaurtti N, Dejana E, Colotta F, Mantovani A: IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells. *Immunology* **69**:548, 1990
 - 48) Strieter RM, Chensue SW, Basha MA, Standiford TJ, Lynch JP, Baggiolini M, Kunkel: Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor- α , lipopolysaccharide, and interleukin-1 β . *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**:321, 1990
 - 49) Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K: Properties of the novel proinflammatory supergene 'intercrine' cytokine family. *Annu Rev Immunol* **9**:617, 1991
 - 50) Libler JM, Kunkel SL, Burdick MD, Standiford TJ, Rolfe MW, Strieter RM: Production of IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 by peripheral blood monocytes. *J Immunol* **152**:241, 1994
 - 51) Colotta F, Borre A, Wang JM, Tattanelli M, Maddalena F, Polentaurtti N, Peri G, Mantovani A: Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* **148**:760, 1992
 - 52) Gusella GL, Musso T, Bosco MC, Espinoza-Delgado I, Matsushima K, Varesio L: IL-2 up-regulates but INF- γ suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J Immunol* **151**:2725, 1993
 - 53) Osipovich OA, Fegedinhg KV, Misuno NI, Kolesnikova TS, Savostin IK, Sudarikov AB, Voitenok NN: Differential action of cycloheximide and activation stimuli on transcription of tumor necrosis factor- α , IL-1 β , IL-8, and P53 genes in human monocytes. *J Immunol* **150**:4958, 1993
 - 54) Standiford TJ, Kunkel SL, Rolfe MW, Evanoff HL, Allen RM, Strieter RM: Regulation of human alveolar macrophage- and blood monocyte-derived interleukin-8 by prostaglandin E2 and dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**:75, 1992
 - 55) Kotloff RM, Little J, Elias JA: Human alveolar macrophage and blood monocyte interleukin-6 production. *Am J Respir Cell Mol Biol* **3**:497, 1990
 - 56) Strieter RM, Remick DG, Lynch JP, Genord M, Raiford GC, Spengler R, Kunkel SL: Differential regulation of tumor necrosis factor-alpha in human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes: A cellular and molecular analysis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1**:57, 1989
 - 57) Martinet Y, Yamauchi K, Crystal RG: Differential expression of tumor necrosis factor/cachectin gene by blood and lung mononuclear phagocytes. *Am Rev Respir Dis* **138**:659, 1988