

마우스에서 IL-1 β 가 염증의 발현에 미치는 영향에 관한 연구

윤 덕 상¹⁾ · 이 기 수²⁾

이 연구는 염증반응에서 IL- β 의 생성을 관찰하고, IL- β 가 조직에 미치는 효과를 관찰하여 염증반응에서 IL- β 의 역할을 검토할 목적으로 시행되었다.

실험동물은 웅성과 자성 마우스 각각 100마리를 대상으로 하였으며, 다음의 3단계 실험을 수행하였다.

- 리포다당(lipopolysaccharide, LPS)에 의한 염증발현 시스템을 확립하기 위한 면역 B-세포에 대한 영향평가, 세포독성 없이 최대의 IL- β 를 생성할 수 있는 LPS의 양 결정 및 LPS 투여로 생성되는 조직의 IL- β 를 동정하는 실험의 결과, LPS는 B-림포세포의 활성을 농도 의존적으로 높였으며, 10-50 μg 투여로 세포독성 없이 IL- β 를 최대로 생성함을 나타냈고, 여러 장기의 조직에서 IL- β 를 생성시키나 특히, 구강조직과 관절활액세포에서 많은 양을 생성함을 확인하였다.
- 관절강에 50 μg 의 LPS를 투여하고 IL- β 와 TNF α 의 경시적 생성량 변화를 관찰하는 실험에서, IL- β 는 투여 2시간 후에 증가되기 시작하여 4-5시간 경과 후에 최고농도에 도달하고, 점차 감소하여 24시간 경과 후에는 미량만이 존재하였으며, TNF α 는 투여 1시간 경과 후에 증가되기 시작하여 2-3시간 경과 후에 최고농도에 도달하고, 그 이후에 감소되기 시작하여 6시간 경과 후에는 미량만이 검출되었다.
- IL- β 를 정상조직에 투여하여 IL- β 의 효과를 관찰한 실험에서, 관절강에 투여하여 leucocyte의 수가 투여 4-5시간 경과 후에 최고치에 도달하고 36시간 경과 후에 대조군 수치에 도달하였으며, 세포기질인 proteoglycan의 소실은 15시간 경과 후 시작되어 45-60시간 경과 후에 최대되었고, 90시간 경과 후에 대조군 수치로 복귀함이 관찰되었으며, 구강조직에 투여하여 cyclooxygenase 대사산물(prostaglandin E₂)의 축적이 일정농도 한계에서는 농도 의존적으로 증가함을 나타냈다.

이상의 결과로부터 LPS로 유도된 마우스 관절염 활액에서 IL- β 는 염증반응 초기의 수 시간이내에 생성되어 4-5시간 경과후에 최대양이 생성되며, 염증 조직에서 leucocyte(염증세포)의 침윤, proteoglycan의 소실 및 cyclooxygenase 대사산물(PGE₂)의 축적을 유도하는, 즉 염증반응을 중재하는 사이토카인 중의 하나임이 확인되었다.

(주요단어 : IL- β , 염증, proteoglycan 소실, cyclooxygenase 대사산물(PGE₂))

I. 서 론

생체는 유해성 침해에 대항하여 그 내부환경의 항

상성을 유지하려는 기능을 가지고 있다. 유해성 침해에 대하여 조기에 대응하는 물질중에는 싸이토카인(cytokine)으로서 인터루이킨-1 베타(Interleukin-1 beta, IL-1 β)와 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)등이 있으며, 이들은 생체의 항상성 유지에 기여하는 국소호르몬이다¹⁾. IL-1 β 는 염증이나 면역반

¹⁾ 경희대학교 치과대학 교정학교실 전공의

²⁾ 경희대학교 치과대학 교정학교실 교수

용에 관련된 세포에 다양한 효과를 발휘하는 싸이토카인으로서²⁾ 치은의 섬유모세포를 자극하여 교원효소(collagenase)와 프로스타글란дин(prostaglandin)을 생성함으로써 치주조직의 파괴를 유발시키는 것으로³⁾ 알려져 있다. 또한 IL-1은 시험관실험에서 골의 광물질소실을 유발시킬 수 있는 잠재력을 가지고 있으며 종양파사인자등과의 상승작용으로 골흡수를 촉진시키기도 한다⁴⁾.

IL-1은 감염이나 외상에 대한 숙주의 반응을 조정하는 폴리펩타이드(polypeptide)로서 이의 가장 두드러진 생물학적 작용은 뇌세포, 섬유모세포, 활막(synovial)세포, 연골세포, 등과 같은 다양한 조직에서 arachidonate 대사산물을 유도하고, 림프구(lymphocyte)에서 lipoxygenase 산물을 유도한다. 국소적인 조직 손상에 대항하여 개체는 다양한 생물학적 반응을 나타내는 방어기전이 촉발된다. 이러한 반응은 조직 손상 후 수 시간 내에 발생하므로 급성 단계라고 일컬어지는데 주로 대사과정 변화와 혈관계 반응으로 구성된다. 이러한 일련의 과정에서 IL-1 β 는 감염이나 염증 및 면역반응을 유발하는 초기 급성 반응의 중요한 매개물질 중의 하나이다⁵⁾. 따라서 IL-1 β 는 염증의 초기에 합성되는 고분자 단백질로서 이의 생물학적 효과는 거의 모든 조직이나 장기에서 발현된다. IL-1 β 의 분비는 다양한 종류의 자극에 의하여 유발되며, 다른 종류의 싸이토카인에 의하여도 발현된다. Kaplan들⁶⁾은 IL-1의 전신적인 작용에 대하여 언급하고 이의 효과는 중추신경 뿐만 아니라 혈관 및 면역계에도 미친다고 하였다. 국소적 수준에서 IL-1은 백혈구를 유인하고 섬유모세포의 증식을 자극하며 골흡수를 유발하는 작용을 보인다. 따라서, 이는 염증 반응을 구성하는 주된 부분으로 보여진다.

Gowen들⁷⁾은 사람의 주상골(trabecular bone)로부터 추출된 골모세포양세포(osteoblast-like cell)를 다양한 용량의 IL-1과 함께 1-3일간 배양한 결과, 3일 후 이 세포들에 의한 [³H]Tdr의 흡수가 현저히 증가하고 세포 수가 많아졌다고 보고하였다. Boyce들⁸⁾은 정상적인 마우스에 IL-1을 주입시키면 3시간 후 PGE₂에 관련된 저칼슘증이 나타나고 24시간 후에는 과칼슘혈증(hypercalcemia)이 관찰된다고 하였다. Rafter⁹⁾는 시험관실험에서 활막강내의 섬유모세포들은 IL-1의 자극에 의하여 PGE₂와 교원효소가 생성되는데, 이는 염증이 있는 관절에서 다핵백혈구(polymorphonuclear leukocyte)가 IL-1의 주된 생성세포라고 하였다. 또한, Johnson들¹⁰⁾은 백서의 활막강내에

LPS(lipopolysaccharide)를 투여한 실험에서 섬유모세포가 IL-1을 분비한다고 하였다.

골에서는 골모세포가 IL-1의 표적으로 보여진다. 골흡수는 골모세포와 파골세포가 공존할 때만 발생한다. Dewhirst들¹¹⁾은 백서 테아의 장골을 IL-1 α 혹은 IL-1 β 와 PTH를 동시에 투여하고 배양하면 ⁴⁵Ca 유리에 대한 상호 상승작용이 나타나며, 아주 미량의 IL-1만 존재하여도 PTH와 더불어 현저한 골흡수가 유발된다고 하였다. Gowen들¹²⁾은 mouse calvarial assay system을 이용한 실험에서 IL-1에 의한 현저한 골흡수를 보고한 바 있다. 즉, IL-1은 calvarial cell에서 대량의 PGE₂ 유리를 자극하며 이러한 효과는 PTH에 의하여 배가된다고 하였다. 이러한 실험결과를 교정치료와 관련지어 볼 때, 미량의 매개물질만으로도 치조골의 골흡수를 충분히 유발시킬 수 있다는 점에서 중요한 의미를 가진다.

종양파사인자(TNF)는 골흡수를 촉진시키는 싸이토카인으로서 잘 알려져 있다. 이의 분자량은 17-KDa으로서 주로 단핵구와 대식구에 의하여 생성되며 염증과정에 주로 관여한다. 이는 혈관 내피세포를 자극하여 IL-1의 분비를 유도하며 백혈구의 유착을 증가시킨다¹³⁾. 염증에 수반되는 골흡수에 대하여 IL-1은 TNF보다 훨씬 강한 작용을 보인다. 그러나 Stashenko들⁴⁾의 보고에 의하면 시험관실험에서 IL-1 α 나 IL-1 β 를 TNF와 동시에 투여하면 파골세포의 형성이 촉진되며 이 두가지 싸이토카인은 상승효과를 보인다고 하였다.

IL-1 β 와 TNF는 그 생물학적 작용의 다양성과 생성세포의 다양성^{14,15)}을 나타냄으로써 생체의 항상성을 유지시키는 기본적인 국소 호르몬의 일종일 것으로 생각되고 있다. 그러나, 생물학적 작용에 대한 연구결과는 대체로 시험관실험에서 얻은 것이며, 실제 생체에 이들의 투여는 어떤 생체 반응을 일으키는지에 대한 것은 아직 불명확하다. 또한 그 생성조절이 엄밀하게 제어되는 싸이토카인의 적절한 발현은 생체의 항상성 유지에 기여하지만, 과잉 생성 또는 장기간의 생성이 조직의 파괴나 염증과 같은 병적 상태의 악화에 어떻게 관여하는지에 대해서도 불명확하다.

교정적 치아이동은 치아주위조직의 염증반응에 의하여 이루어진다. 이 연구는 교정치료시 교정장치에 의한 물리적 자극에 의하여 발생되는 치아주위조직의 염증발현 기전에 싸이토카인이 중요한 역할을 한다는 가설을 구명하기 위한 연구의 일환으로 염증반응과 IL-1 β 와의 관계를 구명하기 위하여 다음의 목

표를 두고 시행하였다.

1. 조직에서의 염증발현 기전을 구명하기 위한 인위적인 “염증발현 시스템”을 확립한다.
2. 유도 염증부에서 IL-1 β 의 경시적 생성변화를 관찰한다.
3. IL-1 β 가 직접적으로 구강염증발현에 관여함을 증명하기 위하여, IL-1 β 를 구강조직에 직접 투여하여 그 효과를 관찰한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험동물은 자성과 옹성 ICR(Institute of Cancer Research, USA) 마우스 각각 100마리이었으며, 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자원센터에서 구입하여 실험기간동안 통상적인 실험실 관리에 따라 사육하면서 실험에 이용하였다.

모든 시약은 주로 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, 실험재료와 시약에 관한 사항은 연구방법과 함께 제시하였다.

2. 연구방법

1. “염증발현 시스템”的 확립

염증발현 물질로서 LPS(lipopolysaccharide)를 사용하였다. LPS는 *P. gingivalis*, *Escherichia coli*, 등과 같은 구강미생물에 의하여 생성되며, 염증을 유발시키고 끌흡수를 촉진시키는 리포다당이다. 이 물질을 이용한 “염증발현 시스템”的 일단을 해명하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다.

- 1) LPS 투여 및 LPS와 IL-1 β 의 병합투여가 leucocyte (monocyte)의 세포활성에 미치는 영향

leucocyte (monocyte)의 분리 및 배양

마우스의 구개점막에서 주사기로 채혈하여 혜파린 처리 후 RPMI-1640 배지를 1:4로 희석하고 Ficoll-Hipaque중첩법으로 처리한후, 800rpm으로 10분간 원심분리하여 monocyte층을 얻었다. 다시 RPMI-1640 배지로 3회 세척한 후, 부착된 monocyte 만을 limited dilution법으로 24 well plate (Nunc, Denmark)에 분

주하고, 5% 탄산까스 세포배양기에서 2시간 배양 후 부착된 세포만을 분리하여 실험에 사용하였다.

monocyte의 세포활성 검사

LPS를 이용하여 염증을 유발시키기 전에, 세포독성을 나타내지 않고 염증을 일으키는 적절한 LPS의 양을 찾기 위하여, LPS 단독투여 및 LPS와 IL-1 β 의 병합투여가 leucocyte의 세포활성에 미치는 영향을 관찰하였으며, 이를 위하여 MTT test를 실시하였다.

5% 탄산가스 세포배양기 속에서 96 microwell Plate(Nunc, Denmark)속에서 LPS 단독투여군은 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 20.0, 100.0, 200.0 μ g/ml의 LPS를, LPS와 IL-1 β 의 병합투여군은 LPS와 IL-1 β 를 각각 0과 0, 1.0과 0.2, 2.0과 0.5, 5.0과 1.0, 10.0과 2.0, 20.0과 5.0, 50.0 μ g/ml과 10.0 μ g/ml의 혼합액을 100 μ l/well 씩 첨가하고 배양하였다.

배양중인 leucocyte 배양액에 5 mg/ml의 MTT용액을 배양액의 1/10만큼 첨가하고, 37°C에서 4-6시간 배양한 후, 각 well로부터 MTT용액을 제거하고, DMSO를 넣고 진탕하여 잔존 MTT-formazan을 완전히 제거한 후, glycine 완충액(50 mM Glycine-NaOH)을 첨가하고 발색시켜 ELISA reader로 540 nm에서 세포활성을 측정하였다.

- 2) LPS가 배양 monocyte의 IL-1 β 생산에 미치는 영향

분리 배양중인 마우스 monocyte를 RPMI- 1640배지와 함께 24 well plate (Nunc)에 분주하고, 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 20.0, 100.0, 200.0 μ g/ml의 LPS를 100 μ l/well씩 첨가하여 2-24시간동안 배양한 후, 배양상등액을 채취하여 IL-1 β 의 생성량을 ELISA reader로 정량하였다.

- 3) LPS에 의한 B-림포세포(lymphocyte)의 활성화 검토

LPS가 면역세포를 자극하여 항체생산을 증가시키는지의 여부를 실험하기 위하여 자성(C57BL/6XC3H) F1 (B6C3F1) (17-22 g) mice의 비장세포(spleen cell)를 분리 배양하여 LPS에 의한 면역형성 세포의 수를 B-세포의 활성화 지표로 하였다.

비장세포를 RPMI 1640-10% fetal calf serum으로

회석하여 5×10^6 cells/ml의 농도로 조정하였다. 배양 (0.5 ml aliquot/well; 4 replicate wells /처리군)은 48-well cluster plate (Costar)에서 LPS (25 ug/ml, Sigma)를 첨가하고, 37°C에서 Bellco (Bellco Biotech., Vineland, NJ, USA) stainless-steel tissue 배양기 (압력 4-5 psi, 10% CO₂, 7% O₂ 그리고 83% N₂)에서 rocking(8-10 rocks/min)하면서 배양하였다. Polyclonal antibody의 반응성은 배양 후 2일째에 측정하였다. TNP (trinitrophenyl)-hapten 처리 sRBC에 대한 항체형성 세포 수를 Jerne plaque assay로 정량 하였으며 세포수는 hemacytometer¹⁷⁾로 측정하였다.

4) 구강조직에서 LPS에 의한 유도 염증시 IL-1 β 의 생성확인

RT-PCR법에 의한 IL-1 β mRNA의 전사 실험법 미량으로 발현되는 IL-1 β 를 증폭시켜 측정하기 위하여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 다음과 같이 실시하여 mRNA수준에서의 전사정도를 확인하였다. 이 방법은 Jacobson 등의 방법¹⁸⁾을 응용하여 사용하였다. 즉, 역전사효소 (reverse transcriptase)반응을 위하여 0.5 μ g의 total RNA를 Chirgwin등의 방법으로 분리하여¹⁹⁾, 1.0 μ g의 oligo dT (12에서 18 oligomer, Pharmacia)와 함께 64°C에서 10분간 보온하였다. 반응액을 얼음박스에서 식힌 후 역전사효소반응완충액¹⁸⁾, M-MLV reverse transcriptase 200 U, 1 mM deoxynucleotide 5'-triphosphate과 함께 37°C에서 60분간 보온하였다. 이렇게 하여 얻어진 cDNA를 0.1 μ g의 primer, 200 μ M dNTP, 0.1 U의 Taq DNA polymerase (Promega), 반응완충액 내에서 증폭시켰다¹⁸⁾. IL-1 β primer의 염기배열은 IL-1 β sense 5'-GCACTGTACGATCAC-TGAAGTGC ACGCTC와 IL-1 β antisense 5'-TA-GGATCCTGCAGTTATTAGGAAGACACAAATT GCATGG3'이었으며, PCR은 DNA thermal cycler (Takara Co., from Cetus Corporation, Norwalk, CT)를 사용하였으며 반응은 94°C에서 40 초, 62°C에서 40 초 그리고 72°C에서 60 초의 30 cycle을 하였다. 반응 산물은 즉시 전기영동으로 분석하였다.

- (1) 구강조직에 LPS를 0, 1.0, 1.5, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0 μ g을 주사하고 생산된 IL-1 β mRNA를 RT-PCR법으로 확인하였다.
- (2) 구강조직에 LPS 10.0 μ g을 주사하고 다른 조직

(말초혈액세포, 비장, 폐, 무릎관절, 다른구강조직)에 전이생성되는 IL-1 β mRNA를 RT -PCR법으로 확인하였다

2. LPS에 의한 유발염증 관절액에서 IL-1 β 와 TNF의 정량분석

LPS(Escherichia coli LPS 0111, B4; Difco Labs. Detroit, MI, USA) 10 μ g을 중류수로 회석하여 최종적으로 용액 20 μ l가 되도록(10 μ g of PBS /20 μ l of water) 조정하여, 이를 웅성 마우스 100마리의 관절 강에 주사하였다. 시간 별로 관절강에서 주사기를 사용하여 관절액을 모았으며, 4°C, 6000rpm에서 60분간 원심분리한 후, cell-free synovial fluid를 모아 -70°C에 보존하여 이를 시료로 하였다.

cell-free synovial fluid는 IL-1 β 와 TNF의 함량에 영향을 미치지 않는 10 U/ml hyaluronidase (Sigma)로 37°C에서 1시간동안 분해하였다.

IL-1 β EIA kit (Code No. IM1042)와 TNF EIA kit (Code No. IM-1121) (Immunotech 의 학생물연구소, Nagoya, Japan)와 Bacterial endotoxin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. Plate를 100 μ l의 0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.6)에 녹인 goat anti-mouse IL-1 β IgG, 또는 goat anti-mouse TNF IgG를 넣고 하룻밤동안 coating한 다음, PBS-Tween 20 (0.05 %)으로 닦아주고, 1% bovine serum albumin (BSA)함유 0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.6)로 blocking을 한 후, 각각 100 μ l의 시료들을 분주하고 4°C에서 하루 반동안 보온하고, biotinylated goat anti-mouse IL-1 β , 또는 sheep anti-mouse TNF (10 μ g/ml)로 coating하였다. 발색을 위하여 avidin-biotin-peroxidase complex (100 μ l; Vecstatin ABC kit; Vector Laboratories, Burlingham, CA)와 o-phenylene diamine (0.2 mg/ml)을 과산화수소(H₂O₂) 0.02 %함유 0.1M citrate buffer (pH 5.0)을 사용하여 ELISA reader (model 2550; Bio-Rad Laboratories)를 이용 490nm에서 측정하였다.

이때에 IL-1 β 와 TNF의 colorimetric assays를 위하여 총탄수화물과 단백질함량은 각각 Dubois등의 방법²⁰⁾과 Lowry방법²¹⁾으로 glucose (Glc)와 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하여 IL-1 β 와 TNF를 정량분석하였다.

3. IL-1 β 의 투여가 건강조직에 미치는 효과

재조합 IL-1 β 의 분리 정제

실체로 LPS에 의하여 유도된 구강염증부위로부터 생성된 다양한 종류의 싸이토카인으로부터 IL-1 β 만 순수 분리하는 것은 기술적으로 어려울 뿐만 아니라 그 생성량도 미량이다. 따라서 이미 알려진 마우스의 IL-1 β 의 cDNA를 이용하여 재조합 IL-1 β 를 생성하여 실험에 이용하였다. 마우스 재조합 IL-1 β (hrIL-1 β)는 IL-1 β cDNA를 가지고 있는 재조합 대장균을 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소의 박순희 연구팀으로부터 분양받아 세포추출물을 파쇄하여 재조합 IL-1 β 1을 정제하였다²²⁾. 비활성은 5.3×10^6 U/mg였으며 endotoxin 함량은 2.0 ng/mg 이하로 실험에 영향을 주지 않을 정도였다.

1) 관절강에 투여

재조합 IL-1 β (Pfizer Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan의 polymyxin B를 10 U/ml 함유), 또는 재조합 체에서 정제한 IL-1 β 50 pg를 관절강에 주사한 후, 시간 별로 주사기를 사용하여 관절강액을 모으고, 전체 synovial exudate cells을 분석하고 leucocyte의 수를 측정하였다.

또한, 염증발현에 대한 하나의 지표로서 proteoglycan 함량을 측정하였다. 관절강액의 계량한 후, 단백질 분해효소인 papain(생화학공업주식회사, Tokyo, Japan)으로 분해시킨 후, 남은 sulfated glycosaminoglycan을 1,9-dimethyl-methylene blue assay법으로 측정하였다¹⁶⁾. proteoglycan(PG) 함량은 시료 중량 mg 당 glycosaminoglycan μ g으로 정의하여 대조군에 대한 %로 표시하였다.

2) 구강조직에 투여

(1) 재조합 IL-1 β 의 cyclooxygenase-2 합성에 미치는 영향

Cyclooxygenase (prostaglandin endoperoxide synthase, E.C. 1.14.991, Cyclo-oxy)는 arachidonic acid를 prostaglandin H₂ (PGH)로 전환시키는 효소이며, PGH₂는 그후 여러 가지의 prostaglandin류로 다시 전환되어 Thromboxane A₂로 전환된다²³⁾. 구강조직에 재조합 IL-1 β 를 각각 0, 20 ng 및 과량인 50 μ g 투여하고, 24시간 후에 tissue extract를 만들어

cyclooxygenase-2에 대한 polyclonal antibody를 사용하여 Western blot analysis를 시행하여 cyclooxygenase-2의 농도를 분석하였다.

(2) 재조합 IL-1 β 에 의한 Arachidonic acid의 대사산물 생성에 미치는 영향

재조합 IL-1 β 를 각각 0, 0.01, 0.1, 1.0, 10, 및 100 ng 씩 구강점막이나 구개에 주사하고, 24시간동안 주사기를 사용하여 종창을 보이는 구강조직에서 조직액을 모았으며, 그 양이 적을 때에는 안구혈을 추가하였다. 구강염증 조직액을 Radioimmunoassay법²⁴⁾으로 처리하여 cyclooxygenase 대사산물, 즉 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성량을 정량하였다.

한편, 조직내의 tyrosine kinase에 의하여 cyclooxygenase 대사산물(PGE₂)의 생성이 조절되는지의 여부도를 관찰하기 위하여, 조직에 IL-1 β 를 투여한 후 tyrosine kinase인 erbstatin을 0.01, 0.1, 1.0 혹은 10.0 μ M 투여하고, 그리고 tyrphostin을 0.02, 0.2, 2.0 혹은 20.0 μ M 투여한 후, cyclooxygenase 대사산물(PGE₂)의 생성을 정량하였다.

III. 연구결과

1. LPS에 의한 염증발현 시스템 확립

1) LPS 및 IL-1 β 에 의한 분리 leucocyte (monocyte)의 세포활성

LPS의 투여량이 분리 monocyte의 세포활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT에 의한 세포활성 검사를 실시하였다. LPS의 투여량이 1.0 - 50 μ g/ml 까지는 투여하지 않은 군과 세포활성에 차이가 없었으나 200 μ g/ml에서는 현저한 세포활성의 감소를 나타냈다(Fig. 1) 따라서 50 μ g/ml 이내에서 조직에 LPS를 투여하는 것은 monocyte의 활성에 영향을 주지 않을 것으로 나타났다.

또한, LPS의 투여량이 상존하거나 생성되는 IL-1 β 의 양에 상관되어 monocyte의 세포활성에 영향을 주는지의 여부를 검정하기 위하여 MTT검사를 시행한 결과 50 μ g/ml의 LPS와 10 μ g/ml IL-1 β 의 병합투여는 분리된 leucocyte의 세포활성에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며(Fig. 2), 이는 50 μ g/ml까지의 LPS 투여는 생성되는 IL-1 β 가 10 μ g/ml 까지 될 때까지 monocyte의 세포활성에 영향을 주지 않을 것으로 나타났다.

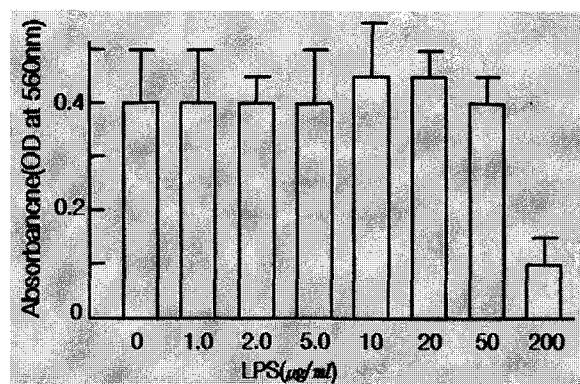


Fig. 1. MTT test of LPS on mouse monocytes.
As a negative control, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS gave significant inhibition of activity.
Each point represents the mean \pm S.D. of 5 experiments.

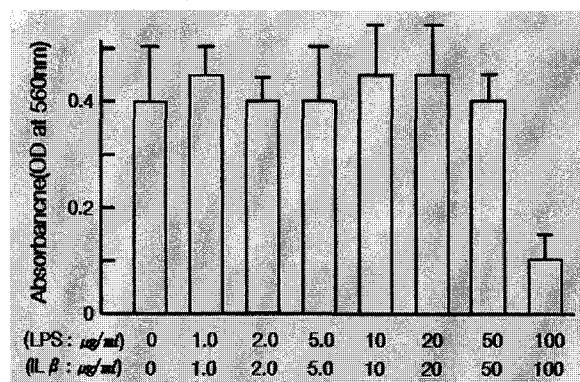


Fig. 2. MTT test of LPS and IL-1 β on mouse monocytes.
As a negative control, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS gave significant inhibition of the activity.
Each point represents the mean \pm S.D. of 5 experiments.

다. 따라서 이 두가지의 세포활성검사를 통하여 LPS를 이용한 염증유발시험은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이내의 투여량으로 하였다.

2) LPS에 의한 mouse monocyte의 IL-1 β 단백질 생성 효과

5%탄산가스 세포배양기에서 배양된 96 microwell (Nunc, Denmark) Plate에 여러가지 농도의

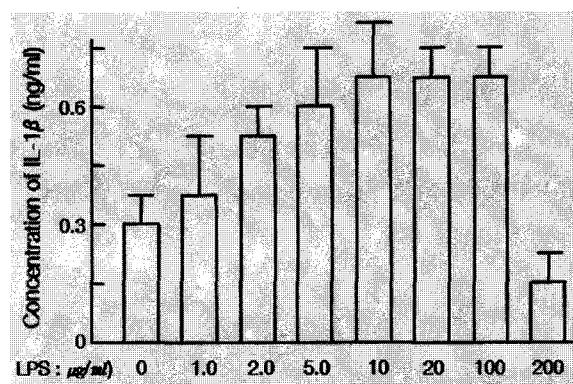


Fig. 3. Effect of various concentrations of LPS on IL-1 β production of monocytes.
As a negative control, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS gave significant inhibition of the activity.
Each point represents the mean \pm S.D. of 5 experiments.

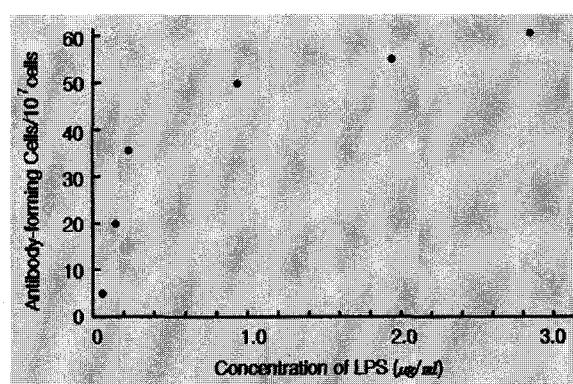


Fig. 4. Dose-dependent B-lymphocyte-stimulating activity of LPS

LPS를 첨가하여 RPMI-1640배지에서 배양시킨 뒤, IL-1 β 농도를 ELISA법으로 정량하였다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 LPS 농도 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 농도의존적으로 생성촉진 효과가 있으며, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 유사한 정도로 IL-1 β 가 생성되었으며, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 생성이 억제되었다.

3) LPS에 의한 면역 B세포(Lymphocyte B) 활성화 효과

LPS가 면역계 세포의 활성에 미치는 영향을 검사하는 것은 이 물질에 의한 유발 염증에서 면역계 세

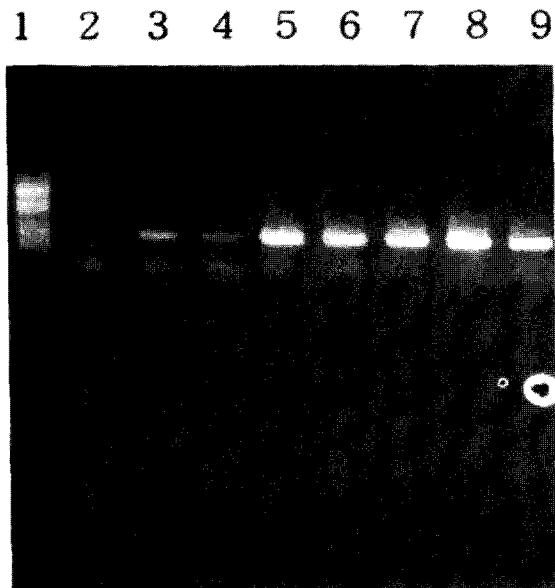


Fig. 5. IL-1 β mRNA production induced by LPS injection.

Excess amounts of LPS were injected to the mouse oral tissue. mRNA was then isolated and amplified with each primers. Results show the PCR amplification of cDNA for β -actin, and for the macrophage products. Lane 1, molecular marker of 1 kb ladder; lane 2, without LPS injection(LPS 0 μ g); lane 3, 1.0 μ g; lane 4, 1.5 μ g; lane 5, 5.0 μ g; lane 6, 10 μ g; lane 7, 20 μ g; lane 8, 25 μ g; lane 9, 50 μ g.

포의 활성화를 평가하는데 중요성이 있다. 마우스의 비장세포를 대상으로 LPS를 투여한 후, 총 세포수에 대한 polyclonal antibody를 형성한 비장세포의 수를 지수로 하여 B-림파구의 활성화로 표현하여 그 결과를 Fig. 4에 제시하였다. LPS의 농도가 1.0 μ g/ml 까지는 LPS의 농도의존적으로 급격한 항체형성 세포수가 증가하였으며, 1.0 - 3.0 μ g/ml 까지는 항체형성 세포수가 완만한 증가를 보였으며, B 임파구를 자극하는데 필요한 최소농도는 약 0.18 μ g/ml이었다.

LPS와 같은 리포다당은 마우스에 이식된 sarcoma-180과 같은 종양 세포를 억제하는 것으로 알려져 있으며²⁵⁾, 이들의 종양 세포에 효과는 직접적인 cytotoxic 효과는 없으나 종양 세포 억제 효과에 의한 것이며, 이 효과는 숙주의 면역계 활성화에 의하여 이루어진다. 이 실험에서는 LPS가 역치가 있는 농도의존적

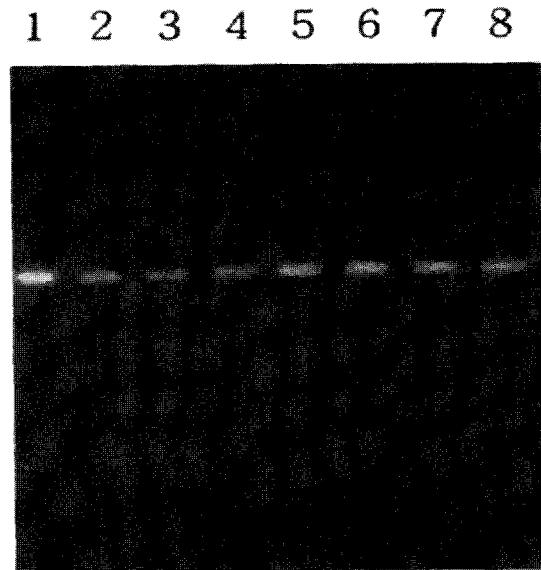


Fig. 6. IL-1 β mRNA production Induced by LPS injection in various tissue.

10 μ g of LPS was injected to the mouse oral tissue. mRNAs were isolated then in various tissues and amplified with each primer. Results show the PCR amplification of cDNA of IL-1 β mRNA. Lane 1, oral tissue; lane 2, peripheral blood cell; lane 3, spleen; lane 4, lung; lane 5, knee joint; lane 6-8, oral tissue.

으로 B-림파구의 항체형성을 촉진하는 것으로 나타났다.

4) LPS에 의한 mouse 조직의 IL-1 β 생산을 mRNA 전사수준에서 확인

LPS가 mouse 조직에서 IL-1 β 를 생산하는지 혹은 장기별로 생산능에 차이가 있는지의 여부를 확인하기 위하여 조직액의 PCR증폭을 통하여 IL-1 β mRNA의 전사수준을 확인하였다.

LPS의 농도를 달리하여 구강조직에 투여한 실험에서는 LPS를 1.0과 1.5 μ g 투여한 경우에 미약한 전사수준을 보였으나 5.0, 10, 20, 25 및 50 μ g에서 뚜렷하게 많은 전사를 나타냈다(Fig. 5). 이 결과는 Fig. 3에서 나타난 LPS의 양에 의존적으로 monocyte의 IL-1 β 생산이 나타났으며, 10 μ g에서 100 μ g까지는 유사한 정도로 IL-1 β 가 생산된다는 결과와 유사한 결과가 나

Table 1. Time lapse of production of IL-1 β and TNF during the course of lipopolysaccharide (LPS)- induced arthritis.

The contents of IL-1 β and TNF in synovial fluid from mice at indicated time intervals after the intra-articular injection of 10 μ g of LPS were described. Each point represents the mean \pm s.d. of 5 experiments from separate joints.

	Time (h)												
	0	1	2	3	4	5	6	9	12	18	24	36	48
IL-1 β (μ g/joint)	0.01	0.05	0.10	0.15	0.93	0.93	0.71	0.64	0.41	0.26	0.05	0.05	0.03
TNF α (μ g/joint)	0.01	0.33	1.25	0.96	0.38	0.12	0.05	0.03	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03

타났다.

또한, 구강조직, 혈액, 비장, 폐, 무릎관절에 10 μ g의 LPS를 투여한 후, 각 장기별로 생성되는 IL-1 β 의 mRNA전사량을 조사하였다(Fig. 6). 조사한 각 장기별로 IL-1 β 의 mRNA전사량에 차이가 있음이 확인되었으며, 혈액, 비장 및 폐조직보다는 구강조직과 무릎관절에서 더 많은 IL-1 β 의 mRNA전사량을 보였다.

이상의 결과로부터 monocyte에 세포독성을 나타내지 않는 양의 LPS투여로 염증을 유발시키고 염증부에서 IL-1 β 의 생산을 확인할 수 있었으며, 특히 구강조직과 관절강에서 IL-1 β 의 생산이 다른 조직에 비하여 많음을 확인였다.

2. LPS에 의한 관절강 유발염증에서 IL-1 β 와 TNF의 생성 변화

LPS 10 μ g을 증류수로 희석하여 최종적으로 용액 20 μ l가 되도록 조정하여, 이를 웅성 마우스 100마리의 관절강에 주사하고, 시간 별로 수집된 관절액에서 IL-1 β 와 TNF를 정량하여 Table 1과 Fig. 7에 제시하였다.

IL-1 β 는 LPS 주사 1시간 후부터 증가하기 시작하여 4-5시간 경과에서 최고치에 달하고 18시간 경과 후까지 점차 감소하여 24시간 이후에는 미량만이 검출되었고, TNF는 1시간 경과 후 증가 시작하여 2-3시간경과 후에 최고치에 달하였다가 6시간 경과 후까지 급격한 감소를 보였으며, 그이후의 경과시간 후에는 미량 만이 검출되었다. 이러한 결과는 초기 염증조직에서 TNF가 IL-1 β 보다 더 많이 생성되고, 염증발현 2-3시간내에 TNF가 최고로 반응하는 반면에, IL-1 β 는 4-5시간내에 최고로 반응함을 의미하며, 반응기간은 IL-1 β 가 더 오랫동안 임을 나타낸다.

이 결과로부터 IL-1 β 는 염증반응에서 수시간이내

최고로 반응하는 싸이토카인중 하나라는 것을 확인할 수 있었으며, IL-1 β 를 인위적으로 건강한 구강 및 다른 조직에 투여하였을 때 나타나는 염증현상을 실험해 볼 필요가 있을 것으로 사료되었다.

3. IL-1 β 의 투여가 생체조직에 미치는 영향

이상의 실험결과에서 LPS로 유발시킨 구강조직과 관절강의 염증부에서 IL-1 β 가 특징적으로 많이 생성된다는 사실이 확인되었다. 이 실험은 재조합 IL-1 β 을 건강한 관절강과 구강조직에 투여한 후, 염증에서 나타나는 몇 가지의 현상, 즉 백혈구수의 변화, 세포기질인 proteoglycan의 함량변화 및 prostaglandin의 생산을 분자생물학적 방법으로 조사하여 IL-1 β 가 염증에 관여함을 확인하기 위하여 시행되었다.

1) 관절강에 미치는 영향

mouse의 관절강에 재조합IL-1 β 를 50 pg 투여하고 시간경과에 따라 출현하는 leucocyte의 수를 산출하여 Fig. 8에, proteoglycan의 함량변화를 Fig. 9에 제시하였다.

재조합 IL-1 β 투여 후 5시간 경과후 최고치에 도달하여 점차감소를 보이다가 36시간 경과 후에 정상치로 복귀하였다. 이 결과를 관절강염에서 IL-1 β 의 생성량이 4-5시간 경과 후에 최고치에 달한다(Fig.5)는 결과와 연관되어 볼 때, 염증조직에서 leucocyte가 IL-1 β 의 생산에 관여하는 주요 세포일 가능성을 시사하였다. 한편, proteoglycan의 함량은 15시간 경과 후부터 감소하기 시작하여 45시간경에 최저치를 기록하였으며 90 시간경과 후 정상치에 근접하였다. 이 결과는 염증조직에서 IL-1 β 와 같은 싸이토카인이 먼저 작용하고 그 이후에 조직의 변성이 시작됨을 시사한다.

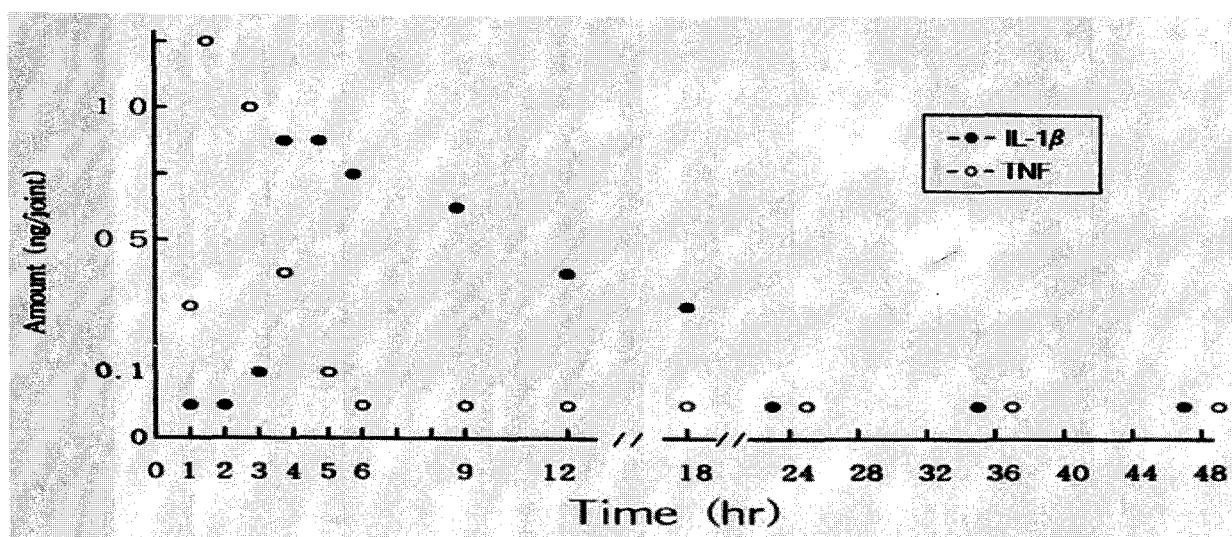


Fig. 7. Kinetics of IL-1 β and TNF production during the course of LPS-induced inflammation in synovial fluid from mice after the intra-articular injection of 10 μ g of LPS. Each point represents the mean \pm s.d. of 5 experiments from separate joints.

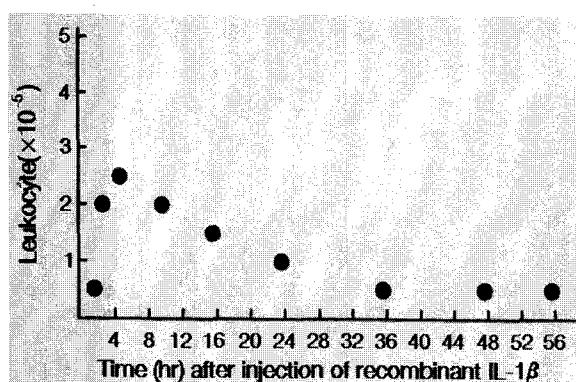


Fig. 8. The time lapse of proliferation of leucocyte cells induced by intra-articular injection of 50 pg of recombinant IL-1 β .

The leucocytes present in the joints were predominantly (>95%) neutrophils during the first 5 h. Values represent the mean \pm S.D. of 5 experiments from separate joints. Zero denotes the injection of the vehicles. $P < 0.05$, compared with value for the vehicles.

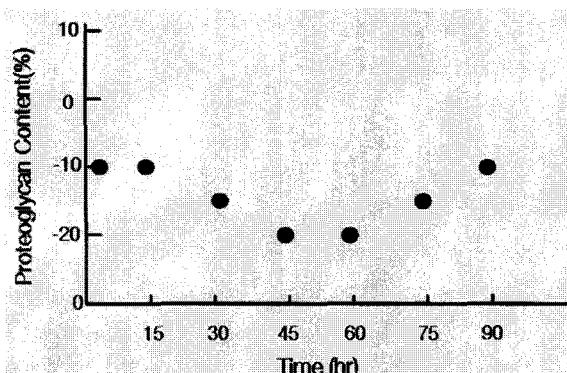


Fig. 9. The time lapse of the loss of proteoglycan (PG) induced by intra-articular injection of 50 pg of recombinant IL-1 β .

Values represent the mean \pm S.D. of 5 experiments from separate joints. Zero denotes the injection of the vehicles. $P < 0.05$, compared with value for the vehicles.

2) 구강조직에 미치는 영향

(1) cyclooxygenase 의 발현

구강조직액에 재조합 IL-1 β 를 0, 20ng 및 과량인

50 μ g 투여하고 arachidonic acid가 prostaglandin으로 대사되는 과정에 관여하는 효소인 cyclooxygenase-2에 대한 polyclonal antibody를 Western blot 분석을 통하여 동정하였다(Fig. 10).

IL-1 β 처리군 (20 ng for 24 h)에서는 분자량 약 70 kDa의 cyclooxygenase-2의 밴드가 보이지만, IL-1 β

를 처리하지 않은 군에서는 단백질 밴드가 검출되지 않았다. 그러나, 과량의 IL-1 β 처리군 (50 μ g for 24 h)에서는 분자량이 약 40 kDa과 30 kDa의 2개 단백질이 출현하여 cyclooxygenase-2가 어떠한 이유로 분해된 듯하였다. 이 결과는 cyclooxygenase-2의 생성이 IL-1 β 에 의해 크게 영향을 받는다는 것을 강력하게 시사하는 것이며, 그러나, 과잉의 IL-1 β 는 cyclooxygenase-2를 분해하는 결과를 나타내어 이에 대한 기전의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

(2) prostaglandin의 생성

구강조직에 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 ng의 재조합 IL-1 β 를 투여하고 cyclooxygenase의 대사산물인 prostaglandin E₂의 양적 변화를 정량하여 Fig. 11에 제시하였다. IL-1 β 의 양이 0.1 ng부터 유의성 있게 생성되며, 100 ng까지 농도 의존적으로 PGE₂가 생성되었다. 이는 염증부에서 IL-1 β 의 성생량에 따라 골흡수에 영향을 주는 PGE₂가 생성됨을 시사한다.

(3) IL-1 β 에 의하여 유도된 Cyclooxygenase-2에 대한 tyrosine kinase의 영향

Cyclooxygenase는 내피세포에서 두 가지 형태로 존재하며 endotoxin이나 염증성 싸이토카인에 의한 유도는 tyrosine kinase에 의해 억제된다는 사실이 알려져 있다²⁶⁾. 또한 Cyclooxygenase (prostaglandin endoperoxide synthase, E.C. 1.14.991, Cyclo-oxy)효소는 arachidonic acid를 prostaglandin H₂로 전환시키는 효소로, PGH₂는 그 후 여러가지의 prostaglandin류로 다시 전환되어 Thromboxane A₂로 전환된다²³⁾. Cyclo-oxy는 적어도 두 개 이상의 isoform으로 존재한다²⁷⁾. Cyclooxygenase-1 (Cyclo-oxy-1)은 endothelial cell에 존재하며 Cyclooxygenase-2(Cyclo-oxy-2)는 염증 전구 자극 물질(pro-inflammatory substance)에 의해 유도되는데 여기에는 mitogen²⁸⁾, cytokine²⁹⁾, LPS³⁰⁾등에 의해 유도된다³¹⁾. 폐조직에 있는 Cyclo-oxy의 경우 isoform들의 발현조절에 관한 구체적인 정보가 얻어진 바 없으나, 인체의 폐 macrophage를 LPS로 자극을 주면 Cyclo-oxy-2가 발현된다³²⁾.

최근 다른 연구에서도 수종의 cytokine류가 폐상피 세포에서 Cyclo-oxy를 유도하고 tyrosine kinase에 의해 조절됨을 보고하고 있다. 그러므로 이 연구에서도 억제제인 tyrosine kinase (erbstatin, tyrphostin

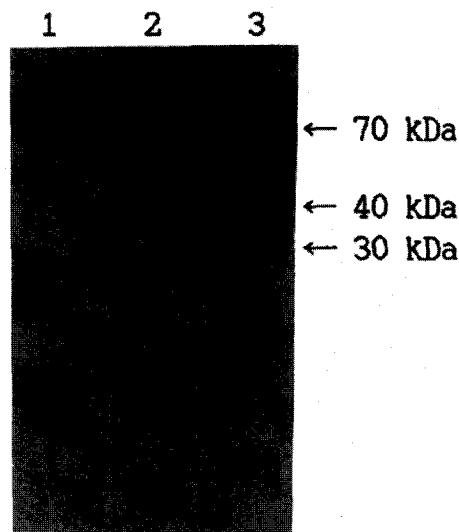


Fig. 10. Western blot analysis using polyclonal antibodies to cyclooxygenase-2 of tissue extracts from IL-1 β -treated and untreated mouse.

Equal amounts of protein were loaded in all lanes. Control untreated tissues at 24h (lane 1) contained no cyclooxygenase-2 protein. In contrast, IL-1 β -injected (20 ng for 24 h) tissue contained cyclooxygenase-2 protein (lane 2). Lane 3, 50 μ g IL-1 β -injected.

AG126)를 사용해서 구강내에서의 반응을 검토하였다. 즉 구강내 세포에서 IL-1 β 에 의해 Cyclooxygenase-2가 유도되며 억제제인 tyrosine kinase에 의해서 어떠한 영향을 받는지는 구강 염증과 관련하여 중요한 문제로 사료된다.

IL-1 β 에 의한 Cyclooxygenase-2활성은 tyrosine kinase저해제에 의해서 크게 저해를 받았다(Fig.12와 Fig.13). 즉, PGE₂의 구강조직내 축적은 erbstatin (10.0 μ M농도에서 45%억제)과 tyrphostin (20 μ M 농도에서 60%억제)에 의해 역시 용량 의존적으로 억제를 받았다. 이러한 억제효과를 주기위한 이상의 2 가지 억제제의 최소농도는 각각 1.5 μ M (erbstatin)과 2.7 μ M (tyr-phostin)로 확인되었다. 이와 같은 결과는 구강염증세포에서 IL-1 β 에 의한 Cyclooxygenase-2 단백질의 유도발현이 tyrosine kinase의 활성에 의해 조절된다는 사실을 강하게 시사하는 것이다.

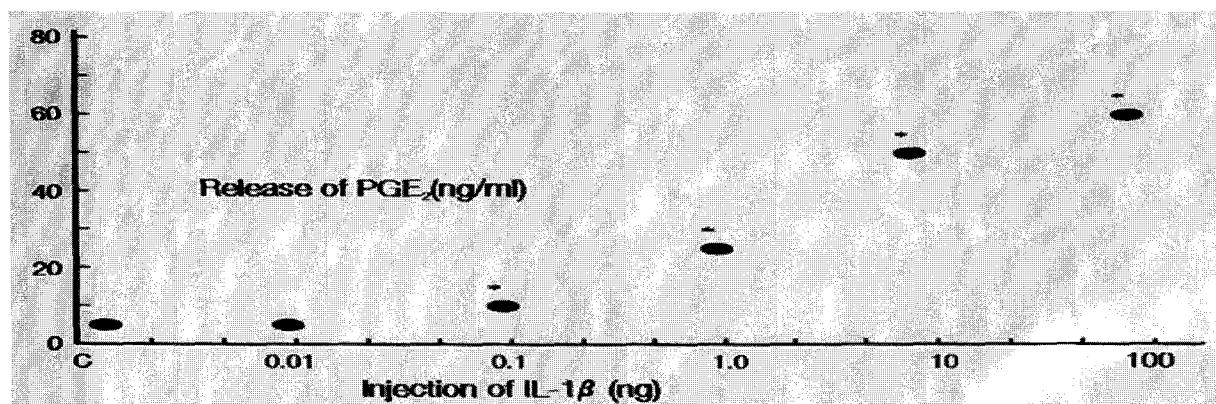


Fig. 11. Dose-dependent increase in the accumulation of cyclooxygenase metabolites in IL-1 β -activated oral tissue.

The accumulation of cyclooxygenase metabolites(PGE₂) was measured after 24 h of IL-1 β -injection. Cyclooxygenase activity in IL-1 β -treated tissue at 24 h was measured by the formation of exogenous arachidonic acid (30 μ M; 15 min). Data are expressed as mean \pm S.E., mean from 5 determinations from at least 5 separate experimental days. * P<0.05 when compared to untreated cells at 24 h(C).

IV. 총괄 및 고안

1. IL-1 β 의 생물활성

IL-1 β 와 TNF는 전혀 다른 유전자산물로 그 구조상의 유사성은 없으며, 각각에 대한 수용체(receptor)를 가지고 있음에도 불구하고 이들의 표적세포 및 생물활성에는 중복되는 점이 많다^{14,15)}. 이들의 생물작용은 중추신경계, 대사계, 면역계등 광범위하며 다른 싸이토카인을 유도하는 작용을 모두 가지고 있다. 더우기 이들은 표적세포에 그 생물활성을 상승적으로 작용시키는 효과를 가지고 있다. 환언하면 이들의 싸이토카인에 의해 유도되는 생체반응은 매우 중요하기 때문에 지원기전(back up mechanism)이 작용하여 확실하게 발현되도록 프로그램되어 있는 것으로 생각된다. 따라서 병적인 상태에 있어서 이들 싸이토카인의 관여를 검토하기 위해서는 그 발현과 생성사실의 해명 뿐 아니라, 양자간의 상호작용, 즉 싸이토카인 네트워크³³⁾을 고려하여 검토해야 할 것으로 보인다.

2. 생체작용에 있어서 양면성

IL-1 β 는 TNF와 더불어 생체방어 반응에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있으며 여기에는 여러종류의 생성조절기구가 존재하여 정교한 균형이 존재하고 있다. 그러나, 일단 이 균형이 깨지면 싸이토카인의 양성 송환기전(positive feed-back mechanism)이

작동하여 그 생성 저지가 조절이 안되며 여러가지 생체내 물질들이 생성되어 본래는 생체의 항상성에 작용하는 싸이토카인이 수중의 질환에서 중심적인 역할을 하게된다. 그 구체적인 예로서 IL-1 β 와 TNF가 서로 생성을 유도시켜 상승적으로 작용하여 병태의 진행에 있어서 중심적인 역할을 하게 되는 것으로 생각된다. IL-1 β 와 TNF생성의 음성 송환기전(negative feed-back mechanism)으로서는 steroid hormone, transforming growth factor β (TGF β), IL-1 α 와 IL-1 β 의 receptor antagonist (IL-1ra), 가용성 TNF receptor 등을 들 수 있지만³⁴⁾, 생체 내에서의 그 상세한 생성조절기구 및 작용에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

IL-1과 TNF는 염증성 싸이토카인으로서의 역할만이 아니라 다양한 작용을 가지고 있다. 인체의 질환에 대해 IL-1, TNF의 관여는 다음과 같다.

1) 패혈증성 쇼크

패혈증성 쇼크는 생체안에 들어간 엔도톡신(endotoxin)(LPS)에 의하여 일어나는, 다장기부전을 수반하는 질환이다. 동물에 IL-1, TNF를 투여하면 쇼크 상태가 재현되고 IL-1이나 TNF의 항체를 투여하면 쇼크상태나 치사율이 개선되며, 실제 쇼크환자의 혈청에서 보이는 생체반응이 IL-1이나 TNF의 시험관 실험에서의 생물학적 작용과 같다는 점으로부터 엔도톡신으로 유도되는 IL-1, TNF가 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 생각된다³⁵⁾.

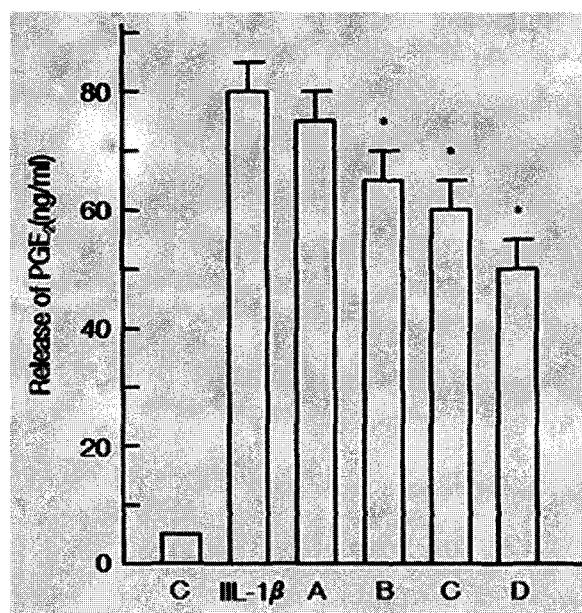


Fig. 12. Dose-dependent inhibition of the accumulation of cyclooxygenase metabolites by erbstatin in IL-1 β -injected oral tissue.

The accumulation of cyclooxygenase metabolites (PGE₂) was measured after 24 h of IL-1 β -injection. Cyclooxygenase activity in IL-1 β -treated tissue at 24 h was measured by the formation of exogenous arachidonic acid (30 μ M: 15 min). Data are expressed as mean \pm S.E., mean from 5 determinations from at least 5 separate experiments. * P<0.05 when compared to untreated cells at 24 h(C).

- A, IL-1 β + 0.01 μ M erbstatin;
- B, IL-1 β + 0.1 μ M erbstatin;
- C, IL-1 β + 1.0 μ M erbstatin;
- D, IL-1 β + 10.0 μ M erbstatin.

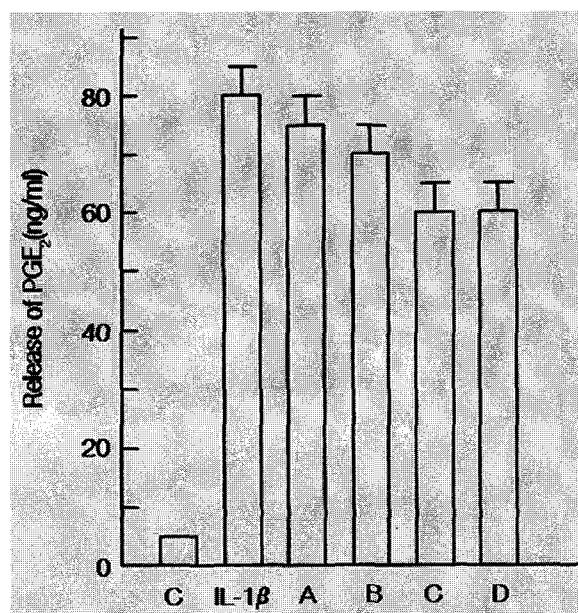


Fig. 13. Dose-dependent inhibition of the accumulation of cyclooxygenase metabolites by tyrphostin in IL-1 β -injected oral tissue.

The accumulation of cyclooxygenase metabolites (PGE₂) was measured after 24 h of IL-1 β -injection. Cyclooxygenase activity in IL-1 β -treated tissue at 24 h was measured by the formation of exogenous arachidonic acid (30 μ M: 15 min). Data are expressed as mean \pm S.E., mean from 5 determinations from at least 5 separate experiments. * P<0.05 when compared to untreated cells at 24 h(C).

- A, IL-1 β + 0.02 μ M tyrphostin;
- B, IL-1 β + 0.2 μ M tyrphostin;
- C, IL-1 β + 2.0 μ M tyrphostin;
- D, IL-1 β + 20.0 μ M tyrphostin.

IL-1, TNF로 유도되는 쇼크상태는 이들 사이토카인을 동시에 투여한 경우 증대되며 2개의 사이토카인이 각각을 유도시키는 사실로부터 실제 쇼크상태에서는 3개의 사이토카인이 상승작용을 할 것으로 기대된다. 최근 동물모델에서 IL-1ra나 가용성TNF receptor가 쇼크상태를 개선한다는 보고도 있으며 쇼크관련 연구는 더 진행되어야 할 것이다.

2) 발열

IL-1은 가장 중요한 내인성 발열인자 (endogenous pyrogen: EP)로서 생각되고 있다³⁶⁾. IL-1은 매

우 미량(2-3 ng/kg체중)으로 발열을 일으키며 IL-1에 의한 발열은 IL-1ra 또는 cyclooxygenase 억제제의해서 억제된다. 한편, 염증 및 IL-1에 의한 발열은 cyclooxygenase 억제제로 억해되는 점, IL-1이 뇌혈관관문을 통과하지 못하는 점을 감안하면 말초에서 생성된 IL-1은 순환혈액 중에 들어가 제3뇌실 주위에 분포하는 organ vasculosum laminae terminalis (OVLT)에 작용하여 PGE₂생성을 유도하고 이것이 시상하부에 작용하여 발열을 일으킬 것으로 생각된다. 그러나 복막염발열 모델에 있어서 말초혈액에 IL-1을 검출할 수 없었으며 (측정한계 20 pg/ml), 그

럼에도 IL-1ra의 정맥주사로 이 발열반응은 억제되었다. 그런데 LPS를 정맥주사한 경우에 일어나는 발열도 IL-1ra주사로는 억제시키지 못한다는 보고가 있어 말초에서 생성된 IL-1이 발열인자로서 중추에서 작용하고 있는지는 의문이다. 시상하부에는 IL-1 receptor가 검출되며 중추신경 내의 microglia세포나 성상세포에도 IL-1생성능이 확인되고 있으나³⁷⁾ 말초에서 생성된 어떤 미지의 물질이 중추에 작용하여 결국 IL-1이 중추에서 생성되어 발열을 일으키는 것으로 추정된다. 그러나 전혀 다른 기전이 존재할 가능성도 있다. 일반적으로 염증모델에서의 발열이 IL-1ra의 뇌실내 투여로 억제될 것인가는 흥미로운 연구과제가 될 것이다.

TNF도 발열활성을 가지고 있으며 100~500 ng/kg 체중의 TNF를 정맥주사하면 IL-1과 같은 발열양상을 보인다. 단, TNF의 발열활성은 IL-1에 비하여 약하며, IL-1과 같은 정도의 발열활성을 나타내기 위해서는 약 10~100배 투여가 필요하다.

3) 만성관절류마チ스(Rheumatoid arthritis; RA)

RA는 관절활막에 염증을 나타내는 만성 염증성 질환으로 활막에는 혈관신생, 림프구침윤, 활막세포의 증식이 보인다. 이들 병태에 관련된 싸이토카인으로서 IL-1, TNF등의 염증성 사이토카인을 들 수 있다³⁸⁾. 실제로 IL-1과 TNF가 RA환자의 활막조직이나 활막조직을 일차로 배양한 배양상청액, 관절액에서 검출되어 면역조직학적으로도 활막에 존재함이 확인되었다. 나아가서 활막세포나 활막조직에서의 IL-1, TNF유전자의 발현도 확인되고 있다. 또한 관절액 및 혈청중의 이들 생성양은 관절염의 진행정도를 나타내는 진단지표로서의 가능성도 제시되고 있다.

3. 염증성 싸이토카인으로서의 기능해석

IL-1과 TNF의 염증성 싸이토카인으로서의 역할에 대해서는 여러 보고가 있으나 염증발생과정에서 이들 싸이토카인이 어떻게 생성되어 염증반응에 관여하는가 하는 의문에 대한 싸이토카인의 역할을 해명하는 데는 그 싸이토카인이 어떠한 염증상태에서 생성되는가를 고찰할 필요가 있다.

마우스 관절강에 LPS 10 μ g을 투여하여 인위적으로 유발시킨 관절염에서 관절액의 IL-1 β 와 TNF α 의 경시적 변화를 관찰한 결과 IL-1 β 의 활성은 염증 4시간후에 최고치에 도달하여 18시간까지 효력이 지속

되고, TNF α 는 염증 2시간 후에 최고치에 도달하여 5시간후까지 활성이 지속되는 것으로 보아, 염증발현에서 TNF α 가 먼저 분비되고 그후 IL-1 β 가 분비되던가, 혹은 TNF α 가 IL-1 β 의 생성에 영향을 줄 것으로 사료된다. IL-1 β 의 생체조직에 대한 영향을 검토하기 위하여 IL-1 β 를 생체에 투여한 결과, leucocyte의 증식, 세포기질인 proteoglycan의 분해 및 prostaglandin의 합성이 촉진되는 효과를 관찰하였으며, 이러한 반응은 조직의 염증반응에서도 마찬가지 현상을 관찰할 있으므로 IL-1 β 는 염증반응에 주요한 역할을 하는 사이토카인중 하나일 것임을 확인하였으며, 동시에 IL-1 β 의 생체조직에 대한 효과의 일부도 확인하였다. 또한 염증세포의 침윤과 함께 IL-1 β 과 TNF α 의 활성이 시작되는 것으로 보아 염증세포가 이들 사이토카인의 활성에 지대한 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이러한 결과로부터 LPS에 의한 세포 침윤 유도 과정에서 IL-1 β , TNF α 가 동시에 세포침윤을 일으키는데 중요한 역할을 담당하고 있으며, LPS염증에 있어서 세포침윤은 이들 2가지의 싸이토카인에 거의 전면적으로 의존하고 있을 것으로 생각된다. 또한, IL-1ra를 투여한 경우에 보이는 LPS에 의한 구강조직액 중의 TNF α 생성량은 LPS단독투여의 경우와 차이가 없었고 생체실험에서는 IL-1으로부터의 TNF의 생성유도는 없는 것으로 사료되었다.

V. 결 론

생체는 염증성 침해에 대하여 그 내부 환경을 항상적으로 유지하는 기전을 발휘하여 그 개체를 방어한다. 이들 침해에 대하여 초기에 대응하는 싸이토카인으로서 인터루이킨-1 β (IL-1 β)와 종양괴사인자(TNF)를 들 수 있다. 염증 발생 과정에서 이들 싸이토카인이 생성되고 염증화하는 역할을 해명하는데는 이들이 어떠한 염증 상태에서 생성되는가를 구명할 필요가 있다. 이 연구는 IL-1 β 의 생물 활성과 병리학적 작용에 대하여 염증 발현과 관련하여 그 기능을 생화학적 및 분자생물학적 수준에서 검정하기 위하여 시행하였다.

마우스의 관절강 내에 LPS 10 μ g을 투여하여 유발시킨 관절염에서 IL-1 β 생성량은 4~5시간 경과 후 최대인 0.93 μ g/관절강이 검출되었고 24시간 경과 후에는 검출되지 않게 되었으며, TNF α 는 2~3시간 경과 후 최대치에 도달한 후 6시간 경과 후에는 정상치에 복귀함으로서 이들이 염증의 초기에 깊이 관여하

는 매개물질임이 확인되었다.

IL-1 β 를 건강한 관절강에 투여하면, 4~5시간 경과 후에 leucocyte의 수가 최대로 증가하였다가 36시간 경과 후에 정상수치로 복귀하였고, proteoglycan 소실은 15~30 시간 후에 최대치에 도달한 90시간 후에 정상치로 복귀하였으며, 구강조직에 투여하면, IL-1 β 의 양의존적으로 PGE₂가 생성되었다. 이상의 결과로부터 IL-1 β 는 염증반응의 초기에 관여하는 매개물질 중 하나이며, 세포기질의 분해와 PGF₂ 생성에 관여하여 염증반응의 심화와 연관되어 있는 사이토카인 중 하나인 것으로 확인되었다.

교정적 치아이동시 기계적 자극에 의하여 말초신경 축색돌기의 압박과 변형으로 신경섬유에 함유되어 있던 신경전달물질이 유리되고 이에 대한 반응으로 치아주위조직의 혈관이 확장되며 대식구와 임파구의 아주 및 이들에 의한 싸이토카인의 생성으로 염증반응이 시작되므로써 치아이동이 발생하는데 기계적 자극에 의하여 유리된 IL-1 β 가 치조콜개조에 관여하는 기전에 대한 지속적인 연구가 차후의 과제로 고려된다.

참 고 문 헌

- Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N and Yokota T: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Rev. Biochem.* 59:783-836, 1990.
- di Giovine FS and Duff GW: Interleukin 1: The first interleukin, *Immunol. Today* 11:13-20, 1990.
- Richards D and Rutherford RB: The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E by human periodontal ligament and gingival fibroblast, *Archs Oral Biol.* 33:237-243, 1988.
- Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL and Ago JM: Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption, *J Immunol* 138:1464-1468, 1987.
- Dinarello CA: Multiple biological activities of human interleukin-1, Molecular basis of lymphokine action, based on the 5th. int'l lymphokine workshop, pp. 83-95, The Humana Press Inc., Clifton, NJ., 1987.
- Kaplan E, Dinarello CA and Gelfand JA: Interleukin -1 and the response to injury, *Immunol. Res.* 8:118 -124, 1989.
- Gowen M, Wood DD and Russel GG: Stimulation of the proliferation of human bone cells in vitro by human monocyte products with interleukin-1 activity, *J. Clin. Invest.* 75:1223-1227, 1985.
- Boyce BF, Yates AJP and Mundy GR: Bolus injections of recombinant human interleukin-1 cause transient hypocalcemia in normal mice, *Endocrinol.* 125:2780-2785, 1989.
- Rafter GW: Interleukin-1 and rheumatoid arthritis, *Med. Hypoth.* 27:221-225, 1988.
- Johnson WJ, Breton J, Newman-Tarr T, Connor JR, Meunier PC and Dalton BJ: Interleukin-1 release by rat synovial cells is dependent on sequential treatment with τ -interferon and lipopolysaccharide, *Arthr. Rheum.* 33:261-272, 1990.
- Dewhirst FE, Ago JM, Peros JM and Stashenko P: Synergism between parathyroid hormone and interleukin-1 in stimulating bone resorption in organ culture, *J. Bone Min. Res.* 2:127-134, 1987.
- Gowen M and Mundy GR: Actions of recombinant interleukin-1, interleukin-2 and interferon-gamma on bone resorption in vitro, *J. Immunol.* 136:2478- 2482, 1986.
- Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ and Vadas MA: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 8667-8671, 1985.
- Diarell CA: Interleukin-1 and its biologically related cytokines, *Adv. Immunol.* 44:153-205, 1989.
- Manogue KR and van Deventer SJH: The cytokine handbook, 241-256, 1991.
- Nawabata K, Suzuki M, Sugitani M: A novel inhibitor of human neutrophil elastase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 177:814-822, 1991.
- Kim DH, Johnson KW and Holsapple MP: Suppression of in vitro antibody production by dimethylnitrosamine in mixed cultures of mouse primary hepatocytes and mouse splenocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87:32-42, 1987.
- Jacobson H, Mestan J, Mittnacht S and Dieffenbach CW: β -interferon subtype 1 by tumor necrosis factor, *Mol. Cell. Biol.* 9:3037-3042, 1989.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, McDonald RJ and Rytter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, *Biochem.* 18:5294-5299, 1979.
- Dubois M, Gillis KA, Hamilton JK, Robers PA and Smith P: *Anal. Chem.* 28:350, 1956.
- Lorry HO, Rosenberough A, Farr L and Randall JR: *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- Lee YH, Park SH, Kwon DW, Yoon DY, Bae YS, Choe IS and Chung TW: *Kor. J. Brm.* 3:47-54, 1993.
- Akarasereenont P and Thiemermann C: The induction of

- cyclo-oxygenase-2 in human pulmonary epithelial cell culture(A549) activated by IL-1 β is inhibited by tyrosinekinase inhibitor, Biochem. Biophys. Res. Comm. 220:181-185, 1996.
24. Salmon JA: Further studies on the enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxidase into prostacyclin by porcine aorta microsomes, Biochem. Biophys. Acta. 15:383-397, 1978.
25. Ikekawa T, Nakanishi M, Urehara N, Chihara G and Fukuoka F: Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phillus inteus*, Gann. 59:155 -157, 1968.
26. Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B: Prostaglandin endoperoxides, A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 71:3400-3404, 1974.
27. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL and Simmons DL: Expression of a mitogen- responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88:2962-2969, 1991.
28. O'Banion MK, Winn VD and Young DA: cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4888-4892, 1992.
29. Maier JAM, Hla T and Maciag T: Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin -1 in human endothelial cells, J. Biol. Chem. 265: 10805-10808, 1990.
30. Akarasereenont P and Mitchell JA: Comparison of the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages, Eur. J. Pharmacol. 273:121-128, 1995.
31. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop -baily D, Croxtall J and Willoughby D: Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric- oxide synthase in inflammation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2045-2050, 1994.
32. Hempel S, Monick MM and Hunninghake GW: Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase -2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes, J. Clin. Invest. 93: 391-396, 1994.
33. Balkwill FR and Burke F: The cytokine network (see comments), Immunol. Today 10:299-304, 1989.
34. 冷木博史: 免疫, Annual Review, 77-84, 1993.
35. Kunkel SL and Remick DG: Cytokines in health and disease, 1992.
36. Dinarello CA: Lymphokines, New Engl. J. Med. 14:1 -31, 1987.
37. Cunningham Jr. ET and DeSouza EB: Interleukin-1 receptors in the brain and endocrine tissues, Immunol. Today, 14:171-176, 1993.
38. Arend WP and Dayer JM: Cytokines and cutokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis, Arthritis Rheum. 33:305-315, 1990.

- ABSTRACT -

A BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF THE ROLE OF IL-1 β UPON INFLAMMATION IN MOUSE

Duk-Sang Yoon, Ki-Soo Lee

Department of Orthodontics, Graduate School, Kyung Hee University

Cytokines are intercellular peptide mediators that regulate homeostasis and host defense reactions in living body. Of the diversity of cytokines in terms of biological accomplishment, interleukin 1- β (IL-1 β) and tumor necrosis factor(TNF) are the most conspicuous cytokines with a wide variety of effects on cells involved in inflammatory and immune responses, and likely to be involved in the inflammatory pathogenesis of oral tissue as well.

The present study was designed to explicate the role of IL-1 β on inflammatory revelation of oral tissues in mice biochemically. In the Induced arthritis by injection of 10 μ g LPS shown the relaeese of 0.93 μ g IL-1 β /joint with a peak

at 4-5 h. and diminished at 24h, and the release of TNF α of 1.25 μ g/joint with a peak at 2-3h and diminished at 6h. After injection of th IL- β into the joint, the number of leucocytes proliferated with a peak at 4-5h and diminished at 36h and the loss of proteoglycan showed with maximum at 15-30h. After injection of IL-1 β into the oral tissue, cyclooxygenase metabolites (PGE₂) accumulated in the oral tissue with dose dependant.

These elucidated IL-1 β to be inflammatory mediator in the early phase of its pathogenesis. Intraoral injection of recombinant IL-1 β induced the proliferation of leukocytes in situ. IL-1 β took an pertinent part in the development of inflammation and the succession of cellular infiltration.

The results exemplify that IL-1 β plays a significant role in mediating inflammatory response induced by LPS in oral tissue, the inflammatory response is regulated by IL-1 β at an acute phase of pathogenesis.

KOREA. J. ORTHOD. 1998 ; 28 : 611-626

* Key words : IL-1 β , inflammation, lose of proteoglycan, cyclooxygenase metabolites