

케모카인 KC 유전자 발현에 대한 Interleukin-10의 억제작용

영남대학교 의과대학 미생물학교실

김 희 선

서 론

대식세포는 이들이 분비하는 수종의 다양한 세포 독성, 염증성 또는 면역 통제 대사물질들을 통하여 면역반응에 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 이미 잘 알려져있다. 대식세포로부터 분비되는 흥미로운 수 많은 물질들 중 하나로 chemoattractant cytokine 즉, 케모카인(chemokine)을 들 수 있다. 이 케모카인 유전자 산물들은 여러 경로를 통하여 염증 반응의 특성과 크기의 조절에 관여한다(Thomson A, 1994). 케모카인은 대식세포 활성화 유도를 차단하거나 기존의 활성화 상태를 역전시킬 수 있다. 따라서 이러한 불활성화는 감염동안 염증 반응을 최소화 할 수 있을 것이다.

케모카인이란 최근 들어서야 분자적 성질들이 규명되어지기 시작한 면역 사이토카인계의 한 superfamily를 가리킨다. 특히 이들은 백혈구에 대한 특이한 화학 주성 효과를 통하여 인체내 면역 기전 중 면역 통제와 염증 과정의 조절인자로, 현재로서는 약 30여종의 케모카인이 알려져 있다(Thomson, 1994; Baggiolini 등 1997).

케모카인 유전자 표현의 다양성은 효과세포의 종류 뿐 아니라 자극상태의 조건, 및 자극인자의 종류에 따라 각각 다른 반응양상을 나타낸다(Introna 등, 1987; Ohmori 등, 1993; Sonouchi 등,

1994). 그러나 사이토카인 유전자 표현에 있어 활성화나 억제작용은 정확하게 짜여진 유전자 표현의 통제에 의함을 추측할 수 있다. 또한 유도되는 케모카인 유전자 발현의 정도는 interleukin-10(IL-10)과 같은 항 염증 반응성 물질에 의해 조절되어진다(Fiorentio 등, 1991).

마우스 대식세포의 활성화 억제제 가운데, 교차 통제 사이토카인에 대한 연구중 발견된 IL-10은 TH2, B 세포, 비만 세포, 대식세포, 단핵구에서 분비되는 것으로 proinflammatory cytokine 즉, IL-1, IL-6, IL-8, TNF α 의 생산 외에 Ia 표현 등을 강하게 억제시키는 것으로 알려져왔다(Malefytte 등, 1991; Oswald 등, 1992; Berkman 등, 1995). 대식세포의 유전자 발현에 대한 IL-10의 효과에 관한 연구는 일부 연구자를 통하여 진행중이며, IL-10은 전사 단계나 mRNA stability, 그리고 단백질 합성에 이르기까지 여러 단계에 작용할 수 있음을 증명하고 있다(Geng 등, 1994; Brown 등 1996). 비록 IL-10이 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도되는 대식세포의 여러 유전자 발현의 강력한 억제제로 잘 알려져 있다 하더라도 IL-10의 작용기전은 아직 명확하지 못한 실정이다.

본 연구자는 IL-10의 작용기전 연구의 일부로, LPS 자극에 의한 반응시간에 따른 마우스 복강내 대식세포의 KC(C-X-C chemokine) 유전자 발현 억

제 과정에 대한 실험을 실시하였다. 본 실험의 결과 KC 유전자 발현 과정에 있어 IL-10은 지연성 작용을 하며, KC 발현의 억제단계는 유전자 전사단계와는 무관함을 증명하였으며 지연성 작용은 IL-10의 자극시간과는 무관함을 알 수 있었다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

Brewer's thioglycollate와 NZY 배지는 Difco Laboratory, HBSS, RPMI1640 배지 및 fetal bovine serum은 Hyclone으로 부터, agarose, 페놀, guanidine isothiocyanate 및 cesium chloride는 Gibco BRL로 부터 구입 하였다. Magna nylon transfer membrane은 Micron Separation사 제품, deoxyribonucleoside triphosphates, high prime kit, proteinase K 및 DNase은 Boehringer Mannheim 제품을 사용하였으며, recombinant mouse IL-10은 Genzyme 제품, LPS(*Escherichia coli* 0111:B4)는 Sigma 제품을 사용하였다. KC, α -tubulin 및 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 plasmid DNA는 Cleveland Clinic Research Institute의 Hamilton 박사로부터 제공 받아 사용 하였다.

2. 실험 동물

실험 동물은 9-12 주령의 specific pathogen free, inbred C57BL/6 마우스를 사용하였으며 주위환경의 병원체 감염으로 인한 조직 대식세포의 활성화 유발을 방지 하기 위하여 마우스의 사육에 조심을 기울였다(Meltzer 등, 1978).

3. 마우스 복강내 대식 세포의 분리

Thioglycollate 용액을 이용한 Hamilton 등의 방

법(1989)으로 마우스 복강내 대식 세포를 얻었다. 분리된 대식세포는 RPMI1640 (L-glutamine, penicillin, streptomycin, 및 5% FBS 첨가)와 함께 직경 100mm(1×10^7 세포) 또는 150mm(2×10^7 세포) 크기의 세포평판접시에 분주하여 37°C, CO₂ 배양기에 2시간 정치시켜 비부착 세포는 HBSS로 제거 후 부착 세포만을 취한 뒤 이를 하룻밤 동안 배양시켜 사용하였다.

4. RNA의 분리 및 Northern analysis

1×10^7 농도의 대식세포에 자극인자 LPS(10ng/ml)를 IL-10(25ng/ml)과 함께 또는 단독으로 정해진 시간 동안 자극시킨 뒤 guanidine thiocyanate-cesium chloride법(Chirgwin 등, 1979)으로 RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA(10 μ g)를 1% agarose/2.2M formaldehyde 겔에 전기영동후 Sambrook 등(1989)의 방법으로 겔의 RNA를 nylon membrane에 전이시킨 뒤 ultraviolet crosslinker (Stratagene)로 crosslink를 2회 실시하였다. 그뒤 50% formamide, 1% SDS, 1x Denhardt's 용액, 0.25mg/ml denatured salmon sperm DNA, 및 50mM sodium phosphate(pH 6.5)의 전보합 용액에 8-12 시간 42°C에서 전보합 결합을 실시 하였다. 그후 high prime kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 제작한 α [³²P]dCTP 표지의 cDNA plasmid probe를 보합결합 용액에 1×10^6 cpm/ml 첨가하여 42°C, 16-24 시간 동안 보합결합을 실시하였다. 보합 결합 뒤 blots을 0.1% SDS, 2xSSC 용액에 42°C, 30분 동안 세척후 65°C, 15분동안 다시 세척하였다. 그후 blots를 XAR-5 X-ray에 -70°C에서 4-18시간 노출시킨 뒤 결과를 판독하였다.

5. Transcriptional analysis

KC 또는 tubulin cDNA가 삽입된 plasmid DNA(7.5 μ g/slot)을 bio-dot(Bio-rad)을 사용

(Hamilton 등, 1989)하여 membrane에 흡착시킨 뒤 24-48 시간 동안 전보합을 실시하였다. 그동안 150mm 배양 접시의 2×10^7 농도의 대식세포를 자극인자로 일정시간 자극시킨 뒤 Hamilton 등의 방법(1989)으로 핵 분리 및 nuclear run on assay를 실시하였다. 요약하면 일정시간 동안 반응시킨 대식세포를 차가운 인산 완충용액으로 세 번 세척한 뒤 lysis용액으로 핵을 분리하였다. 분리된 핵은 ATP, CTP, GTP 및 1M Tris, 1M MgCl₂, 3M KCl 이 첨가된 run-off buffer와 $\alpha^{32}P$ UTP를 첨가 하여 전사 단계를 마무리시킨 뒤 분리된 RNA를 전보합 처리된 slot-blotted plasmid와 65°C, 48-72 시간 보합 반응을 실시하였다. 보합된 blots를 0.1% SSC, 0.1% SDS용액에 65°C, 30분간 두 번 세척한 뒤 X-ray 필름에 -70°C, 24-48 시간 노출시켜 결과를 관찰하였다.

성 적

1. 케모카인 KC 유전자에 대한 IL-10의 억제 효과

LPS (10ng/ml)를 IL-10 (25ng/ml)과 함께 또는 단독으로 대식세포에 2시간 동안 자극시킨 뒤 RNA를 분리, 노던 블롯을 실시하여 KC mRNA 발현을 관찰하였다.

LPS의 자극은 KC 유전자 발현을 유도하였으며 IL-10의 첨가시 LPS에 의한 KC 유전자 발현은 현저히 억제되어 IL-10이 KC의 유전자 발현을 억제시킴을 알 수 있었다(그림 1).

2. 시간 경과에 따른 LPS 유도에 의한 KC 유전자 발현 양상의 IL-10에 의한 억제효과 및 KC 유전자 발현 억제의 지연성 반응

LPS 자극시 시간의 경과에 따른 KC 유전자 발

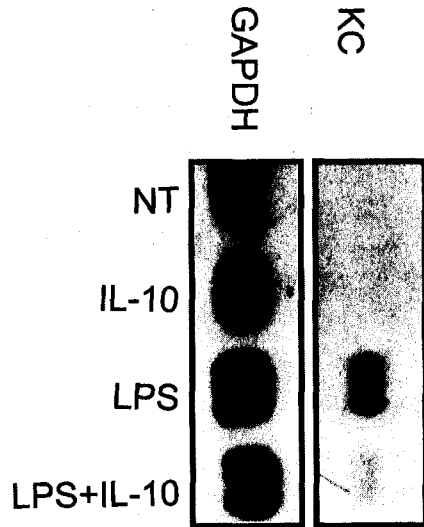


Fig. 1. Inhibitory effects of IL-10 on KC gene expression induced by LPS and LPS with IL-10. TG-elicited peritoneal macrophages(10^7 cells) were treated with LPS(10ng/ml) in the absence or presence of IL-10(25ng/ml) for 2 hrs prior to analysis of KC mRNA levels by northern blot hybridization analysis as described in materials and methods. Blots were hybridized with [^{32}P]dCTP-radiolabeled cDNA encoding KC or GAPDH as indicated. Similar results were obtained in several separate experiments.

현 양상을 관찰하기 위하여 마우스 대식세포를 LPS 단독 또는 IL-10과 함께 위와 같은 농도로 1, 2, 4 및 8시간 동안 반응시킨 뒤 RNA를 분리하여 노던블롯을 실시하였다. LPS 자극시 반응 1시간째 강한 KC 유전자 발현이 관찰되었고 시간이 경과할수록 KC 유전자의 축적이 떨어지는 것을 관찰하였다. LPS와 IL-10 자극 경우, 반응 1시간째 IL-10의 억제효과는 관찰할 수 없었다. 그러나 반응 2시간부터 현저히 KC 유전자 발현이 억제됨을 관찰할 수 있었으며 반응 8시간째는 거의 나타나지 않았다. 따라서 IL-10의 억제 작용은 다소 지연되어 나타남을 확인하였다(그림 2).

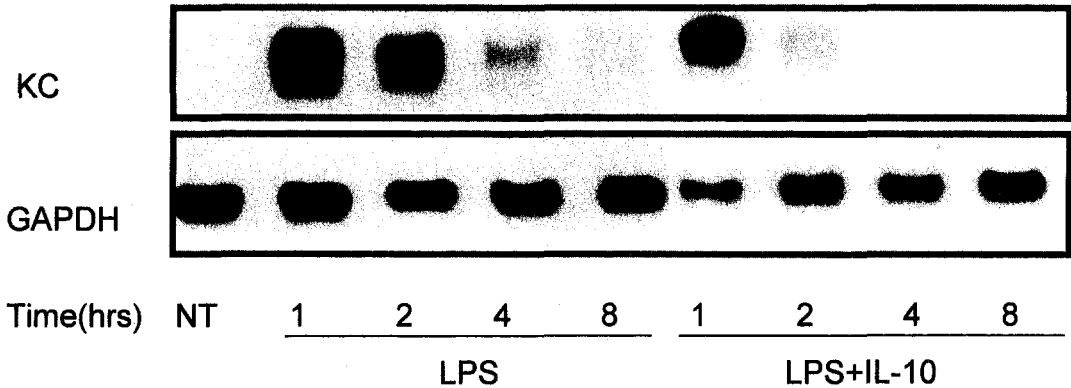


Fig. 2. The effect of IL-10 on LPS induced KC mRNA expression is delayed. TG-elicited macrophages(10^7 cells) were treated with LPS (10ng/ml) for various times in the absence or presence of IL-10(25ng/ml) prior to preparation of total RNA and analysis of KC mRNA and GAPDH levels by northern analysis as described in the legend to figure 1. Similar results were obtained in several separate experiments.

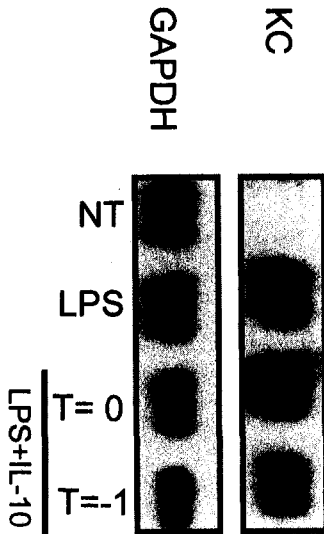


Fig. 3. Pretreatment with IL-10 does not eliminate the delayed inhibitory response. Elicited peritoneal macrophages(10^7 cells) were treated with LPS(10ng/ml) for one hour. IL-10(25ng/ml) was either added simultaneously(T=0) or one hour prior(T=-1) to addition of LPS. Total RNA was prepared from each samples and analyzed for KC and GAPDH mRNA levels as described in the legend to figure 1. Similar results were obtained in several separate experiments.

3. LPS 자극시 IL-10의 전 처리 및 동시 처리에 따른 KC 유전자 발현의 차이

IL-10의 억제작용이 다소 지연되어 나타남에 따라 이를 확인하기 위하여 LPS와 IL-10을 자극시 IL-10의 자극시간을 LPS 처리 한 시간 전에 전 처리한 것과 LPS 반응과 동시에 한 것으로 나누어 실시한 후 LPS의 반응시간을 1시간으로 하여 KC 유전자 발현을 관찰하였다.

반응의 결과 IL-10을 한 시간 전처리한 것과 LPS와 동시에 처리한 것 둘다 KC 유전자 발현에는 별차이를 관찰할 수 없었으며 IL-10의 억제 효과는 나타나지 않아 IL-10에 의한 KC 유전자의 지연성 억제효과는 IL-10의 반응시간과는 무관함을 알 수 있었다(그림 3).

4. KC mRNA 발현에 대한 IL-10 억제 작용과 KC 유전자의 전사단계와의 관계

IL-10의 KC 유전자에 대한 억제작용이 어느 단계에서 이루어 지는가를 확인하기 위하여 우선 전사단계에서의 확인을 위해 nuclear run-on assay를

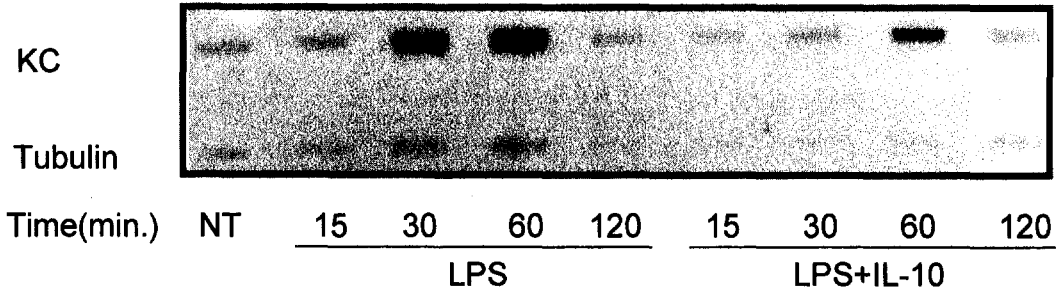


Fig. 4. KC mRNA expression is not controlled at the level of transcription. Elicited macrophage(4×10^7 cells) were treated with LPS(10ng/ml) for various times in the absence or presence of IL-10(25ng/ml) prior to isolation of nuclei and analysis of transcription by nuclear run on as described in the materials and methods. Radiolabeled nuclear RNA was hybridized with nylon membranes containing equivalent amounts of denatured plasmid DNA encoding KC and tubulin. Similar results were obtained in several separate experiments.

실시 하였다.

고농도(2×10^7 cells)의 대식세포를 LPS 단독 또는 IL-10과 함께 위와 동일 농도로 각각 15분, 30분, 한 시간, 및 두 시간 동안 반응시킨 뒤 핵을 분리하여 전사의 단계를 관찰하였다. LPS에 의한 KC 유전자의 전사유도는 반응 30분에 강하게 나타나며 한 시간째 최고치에 이르다가 2시간째부터 약해지는 것을 관찰할 수 있었다. IL-10의 첨가시 LPS 단독 처리시의 양상과 유사한 양상이 관찰됨으로써 IL-10의 KC 유전자 억제작용은 전사의 단계에서는 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다(그림 4).

고 찰

IL-10은 대식세포 세포주와 마우스 복강내 대식세포로부터 분비되는 여러 종류의 사이토카인들의 생산을 억제하는 사이토카인으로 잘 알려져

있다(Fioentio 등, 1991). 이러한 사이토카인에 대한 억제작용은 IL-10이 감염 동안 유발되는 염증 작용에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

KC는 C-X-C 케모카인에 속하는 사람의 Gro 유전자와 상동성을 갖는 마우스 케모카인으로 이는 호중구의 활성화인자나 유도인자로서 인식되며, 현재로서는 아직 충분히 증명이 되지 않은 상태이나 IL-8의 기능도 수행한다고 알려져 있다(Thomson 등, 1994).

여러 종류의 세포와 시간점을 이용하여 많은 연구자들이 IL-10의 사이토카인 억제작용을 증명하였다. 특히 사람의 단핵구 경우 IL-10은 사이토카인의 유전자 전사를 차단함으로써 사이토카인 생성을 억제하며 이러한 유전자 전사단계에서의 IL-10 억제효과는 NF κ B 활성화 억제가 하나의 기전으로 작용할 것이라 추측하지만 IL-10에 의한 사이토카인 유전자의 발현 억제기전은 아직도 정확하지 못한 실정이다(Malefyte 등, 1991; Berkman 등, 1995; Brown 등, 1996). IL-10에 의한

TNF α 의 발현억제를 연구한 Bogdan 등(1992)에 의하면 TNF α mRNA의 발현은 반응 초기(반응 시간 45분)에 현저한(15-40배) 억제력을 보였으며 LPS와 동시에 처리시 유전자 발현이 억제됨을 보고하였다.

본 연구는 LPS 유도에 의해 발현되는 KC 유전자 발현에 대한 IL-10의 억제작용이 추측과는 달리 즉각적인 억제 효과를 보이지 않고 늦은 반응 시간대(반응 2시간대)에서 이루어지며 이러한 작용은 IL-10의 반응시간과는 무관함을 관찰하였고 IL-10의 작용 또한 KC의 전사단계에는 작용하지 않음을 관찰하였다. 본 논문의 결과에는 언급되지 않았으나 본 연구자의 진행중인 실험에서 IL-10의 KC 유전자에 대한 억제작용은 mRNA stability 단계에서도 뚜렷한 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰되는 바, 이는 번역의 단계에서 IL-10이 작용하지 않을까 추측된다. IL-10의 지연성 작용은 IL-10의 분자적 작용기전 연구중 한 부분이 될것으로 추측할 수 있다. IL-10의 지연성 작용은 Gasperini 등(1995)의 보고에서도 언급된 바 이들은 IL-10이 LPS에 자극 받은 사람 다형핵 백혈구들의 protein tyrosine phosphorylation을 억제하는 과정에서 IL-10의 작용 효과는 반응 60분이 지나야 나타남을 보고하였다. 본 실험의 KC mRNA의 지연성 억제반응 경우 두가지 가능성을 추측할 수 있다. 첫째, LPS가 다소 늦은 반응 시간대에서(반응 1-2시간대) IL-10과의 작용에 관계있는 어떤 물질을 분비하지 않는가 하는 것이며 둘째, IL-10은 세포질내에 성숙된 케모카인 mRNA가 나타난 단계에서만 작용하지 않는가 하는 추측이다. 본 실험의 IL-10의 지연성 KC 유전자 억제는 후자에 속하는 것으로 생각되며 이를 뒷받침하기 위하여 앞으로 mRNA decay 속도와 mRNA 번역의 변화에 대한 실험을 진행해야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 실험은 Brewer thioglycollate 배양액으로 자극시킨 뒤 분리된 마우스 복강내 대식세포를 LPS로 자극하여 이들로 부터 발현되는 케모카인 KC에 대한 IL-10의 KC 유전자 발현 억제효과에 대한 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS에 의해 유도되는 KC 유전자 발현은 IL-10에 의하여 현저히 억제되며 IL-10의 억제작용은 반응 2시간대에 나타나는 지연성 반응을 보였다.
2. Nuclear run-on 실험의 결과 IL-10의 KC 유전자 발현 억제작용은 KC 유전자의 전사단계와는 무관함을 확인하였다.

따라서, IL-10의 KC 유전자 발현 억제기전을 명확히 이해하기 위하여 KC mRNA decay 실험과 반응시간에 따른 KC 단백질 생성 수준에 대한 실험이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

- Baggiolini M, Dewald B, Moser B: human chemokine: An update *Annu Rev Immunol* 15: 675-705, 1997.
- Berkman N, Jhon M, Roeseman G, Jose PJ, Chung KF: Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 α expression by IL-10 *J Immunol* 155: 4412-4418, 1995.
- Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C: Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor beta and interleukin-10. *J Biol Chem* 267: 23301-23308, 1992.
- Brown CY, Lagnado CA, Vadas MA, Goodall GJ: Differential regulation of the stability of cytokine

- mRNAs in lipopolysaccharide activated blood monocytes in response to interleukin-10: *J Biol Chem* 271: 20108-20112, 1996.
- Chirgwin JM, Przybyla RJ, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active RNA from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5295-5299, 1979.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147: 3815-3822, 1991.
- Geng Y, Gulbins E, Altmann A, Lotz M: Monocyte deactivation by interleukin-10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci* 91: 8602-8606, 1994.
- Gesperini S, Dnini M, Drasi S, Cassatella MA: Interleukin-10 decreases tyrosine phosphorylation of discrete lipopolysaccharide induced phosphoproteins in human granulocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 209: 87-94, 1995.
- Hamilton TA, Bredon N, Ohmori Y, Tannenbaum CS: IFN gamma and IFN beta independently stimulate the expression of lipopolysaccharide-inducible genes in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 142: 2325-2331, 1989.
- Introna M, Bast RC Jr, Tannenbaum CS, Hamilton TA, Adams DO: The effect of LPS on expression of the early competence gene JE and KC in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 138: 3891-3896, 1987.
- Malefytte RW, Abrams J, Bennet B: Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220, 1991.
- Meltzer MS: Tumoricidal responses in vitro of peritoneal macrophage from conventionally housed and germ free nude mouse. *Cell Immunol* 75: 176-187, 1978.
- Ohmori Y, Hamilton TA: IFN- γ selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 153: 2204-2212, 1994.
- Ohmori Y, Wyner L, Namuri S, Armstrong D, Hamilton TA: Tumor necrosis factor- α induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am J Pathol* 142: 861-870, 1993.
- Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL: Interleukin-10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon- γ -induced activation. *Proc Natl Acad Sci* 89: 8676-8680, 1992.
- Sambrook JE, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning, A Laboratory manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989, pp 7.3-7.23.
- Sonouchi K, S, Hamilton TA, Tannenbaum CS, Tubbs RR: Chemokine gene expression in the murine renal cell carcinoma, RENCA, following treatment in vivo with interferon α and interleukin-2. *Am J Pathol* 144: 747-755, 1994.
- Tannenbaum CS, Koerner TJ, Jansen MM, Hamilton TA: Characterization of lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression *J Immunol* 140: 3640-3645, 1988.
- Thomson A: The cytokine handbook: The chemokines. 2nd ed, Academic press INC, San Diego, 1994, pp 419-460.

— Abstract —

The Effect of Interleukin-10 on KC Gene Expression in Mouse Peritoneal Macrophages

Hee Sun Kim

*Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University,
Taegu, Korea*

Interleukin-10(IL-10) inhibits production of a wide range of cytokines in various cell types and transcriptionally inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced expression of proinflammatory mediators. Cytokine expression by macrophages is an important aspect to orchestrate inflammatory responses.

As an approach to identify mechanistic targets of IL-10, it was examined the time course for expression of KC(murine homologue of *Gro*) gene in murine peritoneal macrophages stimulated with LPS with or without IL-10.

The effect of IL-10 on LPS induced KC mRNA expression was delayed and only seen after 1 hour treatment. Pretreatment with IL-10 did not eliminate the delayed inhibitory response nor increase the magnitude of suppression. These effects did not depend upon time of IL-10 treatment but the time of LPS treatment. LPS-induced KC mRNA expression by inhibitory action of IL-10 was not controlled at the level of transcription.

The result indicates that IL-10 acts late in the process of KC gene expression and that the prominent site of action may be mRNA stability or translation.

Key Words: KC, interleukin-10(IL-10)