

활성화된 내피세포에서 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 발현양상과 호중구 부착에 미치는 영향

부산대학교 의과대학 내과학교실, 흉부외과학교실¹, 병리학교실²

류기찬, 김윤성, 김용기, 김인주, 김영대¹, 이창훈²,
박도윤², 김지연², 하태정, 이민기, 박순규

= Abstract =

GRO- α , IL-8 and ENA-78 : Expressed by Stimulated Endothelial Cells and Increased PMN Adhesion

Ki Chan Ryu, M.D., Yun Seong Kim, M.D., Yong Ki Kim, M.D.,
In Ju Kim, M.D., Young Dae Kim, M.D.¹, Chang Hun Lee, M.D.²,
Do Youn Park, M.D., Ji Yeon Kim, M.D., Min Ki Lee, M.D.,
Soon Kew Park, M.D., Tae Jeong Ha, M.D.

*Department of Internal Medicine, Thoracic surgery¹, Pathology²
Pusan National University College of Medicine, Busan, Korea*

Background : Inflammation, where vascular endothelial cells are activated by cytokines, recruits circulating leukocytes such as neutrophils into the tissues. Mononuclear phagocytes as well as tissue cells activated by these stimuli produce these chemokines. In this study, the effects of IL-1 and LPS on the expression of CXC chemokines such as GRO- α , IL-8 and ENA-78 in vascular endothelial cells and the neutrophil adhesion effects of ENA-78 and GRO- α was investigated.

Methods : Human umbilical vein endothelial cells were cultured and stimulated with various concentrations of IL-1 and LPS. The concentrations of the GRO- α , IL-8 and ENA-78 secreted were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. The effects of ENA-78 and GRO- α on neutrophil adhesion to the endothelial cells were also investigated.

Address for correspondence :

Min Ki Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Pusan National University College of Medicine
1-10, Ami-Dong, Suh-Gu, Busan, 602-739, Korea

Phone : 051-240-7216 Fax : 051-254-3127 E-mail : leemk98@yahoo.com

Results : The addition of IL-1 and LPS to the vascular endothelial cells induced GRO- α , IL-8 and ENA-78 secretion in a time- and dose-dependent manner. The neutrophil adhesion was also increased by induction of ENA-78 and GRO- α to the vascular endothelial cells in a dose-dependent manner.

Conclusion : CXC chemokines such as GRO- α , IL-8 and ENA-78 secreted by the vascular endothelial cells play an important role in the acute inflammatory responses by stimulating neutrophil adhesion to the vascular endothelial cells, raising the possibility that the CXC chemokines are one of the targets in the clinical application of acute inflammation. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 52 : 145-155)

Key words : Inflammation, CXC chemokine, GRO- α , IL-8, ENA-78

서 론

백혈구의 동원(recruitment)은 급성호흡곤란증후군, 기관지 천식, 자가면역질환, 이식편거부, 허혈 재순환에 의한 손상 등 각종질환의 염증반응에서 중요한 과정이다. 백혈구의 동원은 백혈구와 기질 및 실질세포가 생성하는 각종 물질에 의해 조절되며 백혈구와 내피세포(endothelial cell)의 상호작용은 병태 생리학적으로 중요한 과정이다¹.

염증자극으로 활성화된 혈관의 내피세포는 호중구의 수용체에서 인지되는 부착인자뿐만 아니라 호중구의 동원을 촉진하는 여러 종류의 신호인자를 발현하게 된다. 즉 Interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 lipopolysaccharide(LPS) 등에 의해 자극된 내피세포는 결합분자를 발현하며 호중구의 수용체에 대한 신호 인자(signaling factor)를 발현하게 된다^{2,3}. 사람의 내피세포에서 발현되는 신호인자는 매우 다양하며 호중구 세포막의 다양한 수용체에 의해 인지된다⁴.

Platelet activating factor (PAF)가 자극된 내피세포에서 호중구에 대한 신호 인자로서 처음 보고된 후⁵, 이에 대한 연구가 진행됨에 따라 자극된 사람 내피세포에서 다양한 종류의 chemokine이 생성되는 것으로 보고되었다. Chemokine은 염증세포에 강력한 화학주성을 갖는 세포매개물질들의 총칭으로서, 비슷한 분자구조를 갖는 약 8 내지 10 kd의 단백질로서 cysteine 잔기의 위치에 따라 4가지 군으로 분류된다

(CXC, CC, C, CX₃C)^{6,7}. CXC chemokine에는 IL-8, GRO- α , β , γ , ENA-78과 neutrophil activating protein-2 (NAP-2) 및 granulocyte chemotactic protein (GCP-2) 등이 있고, 선택적으로 호중구를 활성화시키며 혈관형성의 성질을 가지고 있는 것으로 알려져 있다⁸.

ENA-78은 최근에 발견된 CXC chemokine의 일종으로 주로 상피세포에서 발현된다고 알려져 있지만 혈관내피세포에서도 발현된다고 보고된 바 있다⁹. 또한 IL-8은 CXC chemokine의 한 종류로서 IL-1, TNF- α 및 LPS 등에 의해 내피세포에서 생성되어 호중구의 수용체에 결합하여 활성화시키고 부착능을 변화시키는 것으로 알려져 있다^{10,11}. 내피세포에 의해 생성되는 다양한 신호인자와 부착분자의 발현은 호중구의 국소적 활성화를 유발하는 분자적 기전으로 생각되며, 자극의 종류 및 시간경과에 따라 특이한 반응을 보인다고 알려져 있다¹². 때로는 내피세포에서 특정시간에 유사한 생물학적 성질을 지닌 2개 이상의 신호분자가 생성되기도하며 이 결과는 호중구의 활성화에 특정한 역할을 할 것으로 추정된다. 즉 내피세포에서 신호인자의 특이적인 발현 양상은 호중구 및 다른 형태의 백혈구의 활성화와 내피세포-백혈구의 상호작용을 통하여 염증 반응을 지속시키는데 매우 중요한 초기 인자로 생각된다. 저자들은 IL-1 또는 LPS의 염증성 자극에 대한 내피세포에서의 GRO- α , IL-8 and ENA-78의 발현양상을 조사하고, 이들 인자의 호중구와 내피세포간의 부착에 대

한 영향을 추구하고서 염증성 반응의 초기 단계에 내피세포에서 유래되는 이들 chemokine의 역할을 확인하여 염증성 반응의 진행원인을 규명하고 나아가 치료방법의 개발을 위한 연구의 기초적 자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

인간 제대정맥 내피세포(human umbilical venous endothelial cell)를 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며 F12K medium에 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 150 μ g/mL endothelial cell growth supplement, 90 μ g/mL heparin, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 첨가하여 0.5% gelatin으로 처리된 25 cm² flask에 넣어 37°C, 95% air-5% CO₂가 공급되는 배양기(incubator)에서 배양하였다. 2일 간격으로 배양액을 갈아주었고 합류(confluence)가 일어난 뒤에 배양액을 완전히 흡입하여 내고 Hanks' balanced salt solution(HBSS)으로 1회 세척을 한 후 0.25% trypsin-0.02% EDTA로 처리하여 계대배양(subculture)을 2회 시행하였다. ELISA를 위해 96 well plate에 1×10⁵ 개의 세포를, 호중구 부착 검사에는 48 well plate에 2×10⁵의 세포를 배양하였다.

2. 호중구의 분리

약물을 복용하지 않은 건강한 성인에서 EDTA (0.5%)가 함유된 채혈주사기를 이용하여 전혈을 얻었다. 채혈된 혈액을 polyvinylpyrrolidone (PVP, 3%)과 혼합시켜 실온에서 50분간 처리하여 적혈구를 침전시킨 후 백혈구를 함유하고 있는 상층액을 조심스럽게 분리하였다. 분리된 상층액을 저장성 용혈을 시켜서 적혈구를 제거한 다음 Histopaque 1077을 이용하여

백혈구로부터 호중구를 분리하였다.

3. 자극물질에 대한 내피세포의 GRO- α , IL-8 및 ENA-78 분비에 대한 조건

자극물질에 대한 내피세포의 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 유리농도를 측정하기 위하여 배양된 내피세포에 0.01, 0.1, 1, 10, 100 및 1,000 ng/ml의 농도로 IL-1 α 와 LPS를 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 또한 시간경과에 따른 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 분비정도를 알아보기 위해서 IL-1를 1,000 ng/ml의 농도로 한 배양조건에서 3, 6, 12, 24시간 동안 내피세포를 배양하여 각각의 실험조건에서 배양액으로 유리된 chemokine의 농도를 측정하였다.

4. GRO- α , IL-8 및 ENA-78 분비의 측정

IL-1과 LPS에 의해 분비된 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 측정은 ELISA kit (R&D system, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 방법을 요약하면 microplate에 전처리된 각각의 단일클론성 항체에 표준용액, 배양배지를 첨가하여 일차 결합시킨 뒤 효소가 부착된 이차항체를 첨가하여 이차결합을 유발시킨 후 발색반응을 일으켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 호중구 부착의 측정

순수 분리된 호중구를 HBSS를 이용하여 2×10⁷/ml로 희석시킨 후 30 μ Ci Na⁵¹CrO₄/ml (Amersham Pharmacia Biotech, Upssala, Sweden)을 첨가하여 37°C에서 60분간 배양한 뒤 HBSS로 호중구를 두 번 세척하여 결합되지 않은 방사성 물질을 제거시켰다. 방사성 표지된 호중구를 혈관내피세포층에 첨가하여 내피세포와 호중구의 부착정도를 측정하였고, 내피세포-호중구의 부착에 미치는 ENA-78, GRO- α 의 영향을 관찰하기 위하여 각각 0.01, 0.1, 1, 10 및

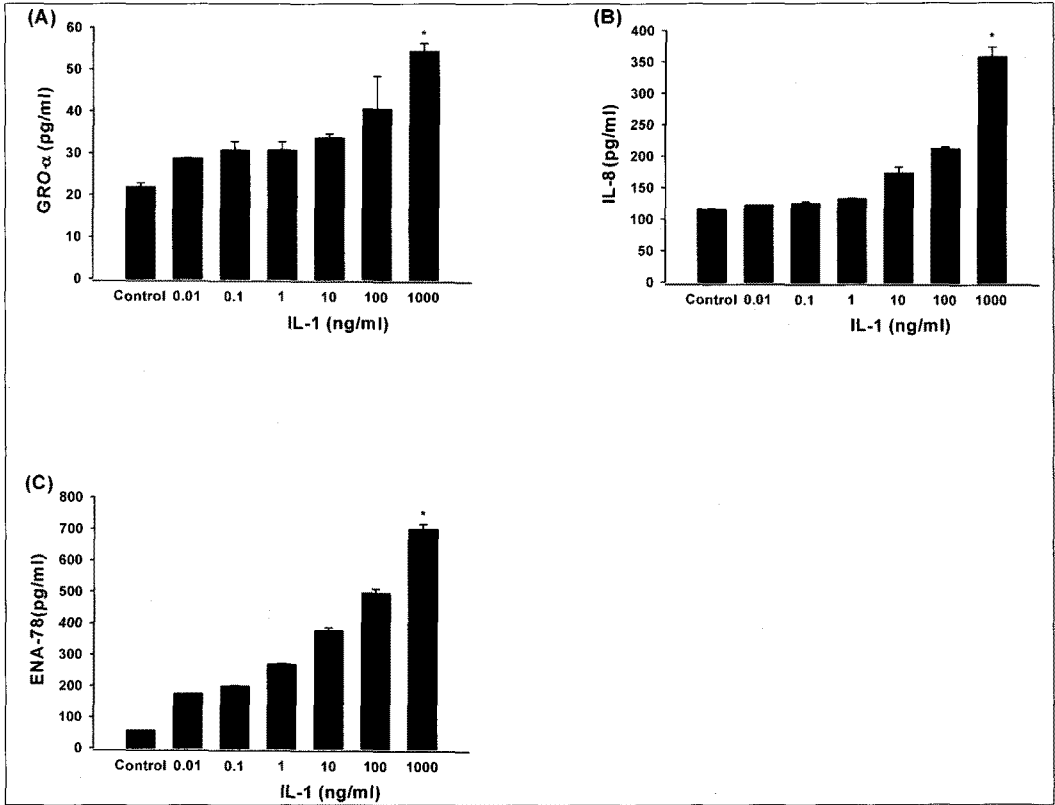


Fig. 1. IL-1 induces the secretion of GRO- α (A), IL-8(B) and ENA-78(C) in a concentration-dependent manners. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were stimulated with various concentration of IL-1 for 24 hrs at 37°C. * $p < 0.05$ vs. control condition.

100 ng/ml씩의 ENA-78 또는 GRO- α 를 함유하고 있는 배양액으로 37°C에서 30분 동안 자극하였다. $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ 이 결합된 호중구는 혈관 내피세포에 10 : 1의 비율로 첨가하였다. 30분 배양한 후 배양액을 제거하고 혈관 내피세포를 HBSS로 두 번 세척하여 부착되지 않은 호중구를 제거하였다. 그 후 2 N NaOH를 이용하여 혈관 내피세포와 내피세포에 부착된 호중구를 용해시켰다. 세포 배양액, 세포 세척액 및 세포 용해액으로부터 측정되는 방사성 활성을 다음의 공식을 이용하여 호중구의 부착을 계산하였다.

호중구 부착율 (%) =

$$\frac{\text{세포용해액 (cpm)} \times 100}{\text{세포배양액 (cpm)} + \text{세포세척액 (cpm)} + \text{세포용해액 (cpm)}}$$

7. 결과분석

본 실험에서 얻어진 모든 실험결과는 세 번 측정된 값의 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 결과는 SPSS for Windows Release 9.0.0 (SPSS Inc, USA)을 이용하여 ANOVA로 분석하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. IL-1과 LPS로 자극시 내피세포에서 유리되는 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 분비

자극물질인 IL-1과 LPS가 없는 배양액으로 배양한

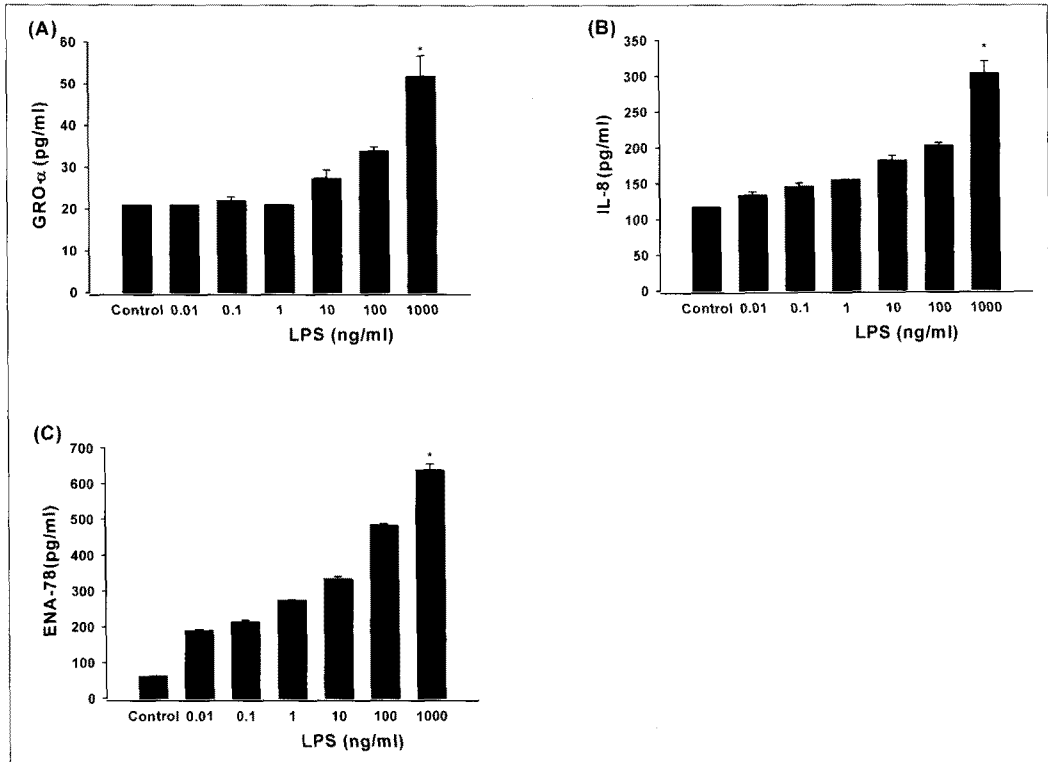


Fig. 2. Lipopolysaccharide (LPS) induces the secretion of GRO- α (A), IL-8(B) and ENA-78(C) in a concentration-dependent manner. HUVEC were stimulated with LPS as described in Fig. 1. * $p < 0.05$ vs. control condition

내피세포에서 측정된 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 농도는 측정역치이거나 이하의 농도였다. 반대로 IL-1과 LPS로 자극된 내피세포에서는 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 분비가 증가되었고, IL-1, LPS 농도의 증가에 따라 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 분비정도도 유의하게 증가하는 양상을 보였으며 통계적으로 의미 있는 차이를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 1, 2).

2. 자극된 내피세포에서 시간 경과에 따른 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 분비

IL-1의 농도를 1,000 ng/ml로 하여 배양한 내피세포에서 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 분비양상은 중

류에 따라 다소의 차이를 보였으나 시간의 경과에 따라 증가되는 소견을 공통적으로 나타내었다. IL-8의 분비는 첫 3시간에 급속히 증가된 후 12시간까지는 약간 증가되었다가, 24시간에 다시 현저히 증가되었다. ENA-78은 첫 3시간에 IL-8보다 2배 이상 (370 pg/ml)의 높은 농도로 증가되었고, 6시간에는 비슷한 농도를 유지하였으며, 그 후 24시간까지 계속 증가되었다. GRO- α 의 분비도 시간의 경과에 따라 증가되는 양상을 보였으나 최고 발현농도는 24시간째 56 pg/ml로 ENA-78의 농도보다 낮았다. 결과적으로 농도의 증가정도는 ENA-78 > IL-8 > GRO- α 의 순으로 나타났고 3시간부터 12시간까지는 큰 차이를 보이지 않다가 24시간에 최고 농도로 증가되었으며

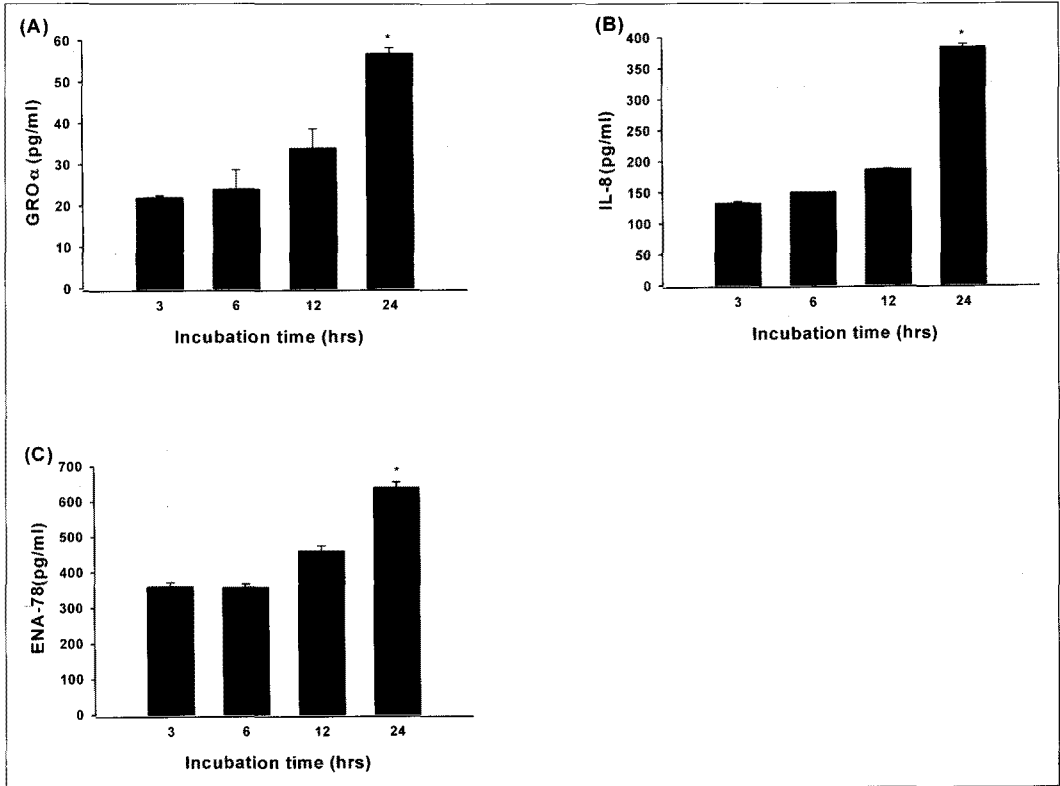


Fig. 3. GRO- α , IL-8 and ENA-78 are secreted from stimulated HUVEC with different time courses. HUVEC were stimulated with 1,000 ng/ml IL-1 for various times. After medium was removed the cell were washed, the cells were incubated for 1-h, and the concentration of GRO- α , IL-8 and ENA-78 were determined. * $p < 0.05$ vs. 3 hrs incubation

그 농도는 GRO- α 는 58 pg/ml, IL-8는 392 pg/ml 그리고 ENA-78은 631 pg/ml이었고 통계적으로 의미 있는 차이를 보였다($p < 0.05$) (Fig. 3).

3. 내피세포에 대한 호중구 부착에 미치는 ENA-78 과 GRO- α 의 영향

Recombinant human ENA-78, GRO- α 를 함유한 배양배지로 내피세포와 호중구를 처리하였을 때 호중구의 부착율이 증가되었으며, ENA-78과 GRO- α 의 농도가 증가할수록 호중구의 부착율은 증가되어 각각 100 ng/ml의 농도에서 ENA-78의 경우 12%, GRO- α 는 9%가 증가되어 통계적으로 유의한 차이를

보였다($p < 0.05$) (Fig. 4).

고 찰

급성 염증 반응에서 호중구와 내피세포간의 상호작용이 가장 중요한 초기과정이며, 이러한 상호작용에는 여러 인자들이 관여한다. 염증성 자극으로 활성화된 내피세포에서는 백혈구 유착분자 및 신호인자가 발현되어 동원된 백혈구의 수용체를 인지하여 상호결합과 내피세포를 통한 백혈구의 이동이 증가되어 병소 부위에 백혈구가 집적된다¹³⁻¹⁶.

Waller는 개구리의 허에서 백혈구가 혈관 외 조직으로 유출되는 것을 관찰하여 염증반응에서 백혈구의

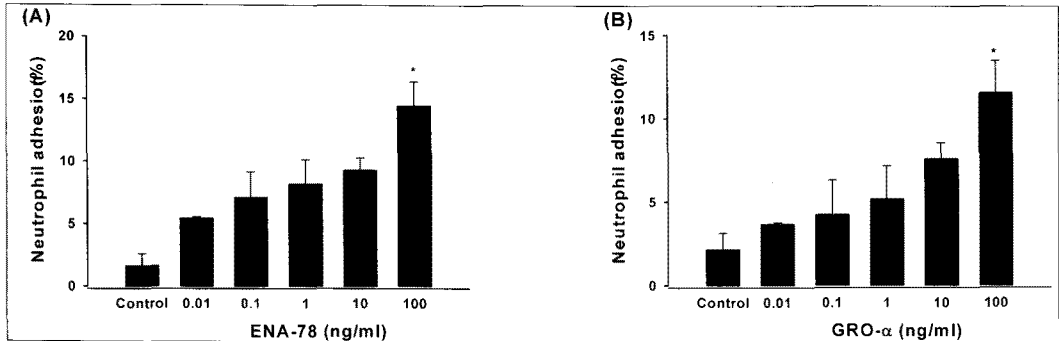


Fig. 4. Neutrophil adhesion to cultured endothelial monolayers stimulated by r(h) ENA-78 and r(h)GRO- α for 30 minutes. * $p < 0.05$ vs. control condition

부착과 내피세포를 통한 이동을 처음으로 보고하였다¹⁷. 이후 백혈구의 이동은 화학적 주성신호인자에 대한 반응이라는 것이 알려지기 시작했으며¹⁸, 1960년경에 박테리아 세포벽으로부터 얻은 N-formilmethionyl peptides와 anaphylatoxin, C5a 등이 백혈구의 동원을 유발할 수 있음을 알게되어 화학주성물질에 대한 정체가 밝혀지기 시작하였다¹⁹.

CXC chemokine의 유전자는 4번 염색체의 장완에 위치하며, ENA-78은 IL-8 및 GRO- α 와 각각 52% 및 22% 정도의 아미노산 배열을 공유하고 있으므로, 서로 공동적인 생물학적 특성과 작용을 가질 것으로 여겨진다²⁰. 이중 IL-8은 호중구와 내피세포를 활성화시켜 호중구의 부착과 이동을 증가시키는 작용을 나타낸다는 것이 이미 잘 알려져 있으며²¹⁻²³, ENA-78과 GRO- α 는 여러 염증질환상태에서 그 역할의 중요성에 대한 관심이 최근에 증가되고 있다.

ENA-78은 사람의 type II 폐상피세포암 계열 세포인 A549의 배양에서 처음으로 발견되었으며 일반적으로 상피세포의 생산물로 생각되었다²⁴. 그러나 ENA-78은 A549 계열 외에도 다른 세포나 암세포에서도 생성됨을 알게 되었다. 즉 관절염 환자의 활막 내피세포에도 존재한다는 보고가 있었을 뿐만 아니라²⁵, 최근에는 사람의 혈관 내피세포에서도 발견된다고 보고된 바 있다²⁶. ENA-78은 호중구 혈장막의 β

-integrin을 양적으로 상향 조절시켜 백혈구의 동원뿐 아니라 호중구의 부착과 내피세포를 통한 이동도 증가시키는 작용을 나타낸다고 보고되었다²⁷. 따라서 ENA-78과 GRO- α 는 IL-8과 마찬가지로 호중구와 내피세포의 부착과 이동을 유도하는 능력을 가지며, 이런 작용은 백혈구에 대한 화학적 주성을 일으키고, 호중구내의 칼슘농도를 일시적으로 증가시키는 능력을 통해서 이루어진다고 생각된다²⁸. 이전의 연구에서 염증성 자극에 대한 ENA-78의 발현은 염증성 자극의 농도와 자극시간에 비례하여 더욱 증가된다고 보고되고 있다⁹. 본 연구에서도 IL-1과 LPS로 내피세포를 자극하였을 경우에, IL-1과 LPS의 농도가 증가함에 따라 ENA-78, IL-8 및 GRO- α 의 분비가 의미 있게 증가되어 같은 조건을 얻을 수 있었다. 또한 IL-1으로 24시간동안 자극한 결과, 정도의 차이는 있었으나 자극시간의 경과에 따라 이들 chemokine의 분비가 증가되는 소견을 보였으며 이는 사람의 혈관내피세포에서 염증성 자극에 의해 ENA-78과 GRO- α 가 분비되며, 분비정도는 자극의 정도와 지속시간에 비례하여 증가되는 것을 알 수 있었다.

ENA-78과 GRO- α 가 호중구-내피세포의 부착에 미치는 영향을 알아보기 위해 recombinant human ENA-78과 GRO- α 를 각각 농도별로 배양액에 첨가하여 호중구와 내피세포의 부착정도를 측정된 결과 농

도의 증가에 따라 호중구의 부착율이 증가되는 현상을 확인할 수 있었다. 따라서 ENA-78과 GRO- α 도 잘 알려진 IL-8과 마찬가지로 백혈구의 주성을 유발할 뿐만 아니라 호중구-내피세포의 상호작용에도 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

최근 보고에 의하면 급성호흡곤란증후군 환자의 기관지폐포 세척액에서 ENA-78과 IL-8이 존재하고 검체에서 발현된 호중구의 농도와 양의 상관관계가 있다고 알려졌다²⁹. 또한 급성 폐손상 모델에서 ENA-78에 대한 항체는 호중구의 부착을 감소시킨다는 결과가 보고되었으며³⁰, 심부 정맥혈전증이 있는 동물 모델 실험에서 항 ENA-78항체는 혈관벽에 호중구의 축적을 감소시켰음이 보고³¹되는 등, 여러 염증관련 질환의 유발과 진행, 나아가서 치료적 측면에서의 ENA-78등의 CXC chemokine의 역할에 대한 관심이 증가되고 있다. 또한 특발성 폐섬유화증에서 ENA-78이 혈관생성과 혈관 개형과 관련이 있다는 보고³²가 있을 뿐만 아니라 폐암에서도 혈관생성과 관련이 있다는 보고³³를 볼 때 다양한 질환에서 이들 chemokine의 역할에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서는 염증성 자극에 의해 사람의 혈관내피세포에서 ENA-78, GRO- α 및 IL-8이 자극의 농도와 지속시간에 비례하여 분비가 증가될 뿐 아니라, ENA-78과 GRO- α 의 자극에 의하여 호중구-내피세포의 부착이 증가함을 확인 할 수 있었다. 이런 결과는 앞으로 여러 염증성 질환의 유발과 진행에 있어서 ENA-78과 GRO- α 의 역할을 규명하는 연구뿐 아니라 폐나 다른 기관의 병적인 염증상태의 이해와 향후 임상적으로 치료에 응용가능성을 살피는데 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

혈관내피세포와 호중구의 상호작용은 급성염증반응의 생리 및 병리학적 핵심적인 과정으로서 특별한 분자들

에 의해서 매개되고 있다. 적절한 자극이 주어질 때 혈관 내피세포에서는 부착 및 신호인자가 표현되며 이들은 호중구의 수용체에 의해 인지된다. 본 연구에서는 IL-1과 LPS로 혈관내피세포를 자극하였을 때 CXC chemokine family에 속하는 GRO- α , IL-8 및 ENA-78이 내피세포에서 분비되는 양상을 관찰하였고, ENA-78과 GRO- α 가 호중구-내피세포의 부착에 미치는 영향을 평가하였다.

방 법 :

인체대혈관 내피세포를 배양하여 다양한 농도로 IL-1과 LPS로 자극하였다. 자극된 내피세포로부터 분비되어진 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 농도는 ELISA로 측정하였다. recombinant human ENA-78 및 GRO- α 로 자극된 내피세포에 동위원소가 부착된 정상백혈구를 이용하여 부착능을 측정하였다.

결 과 :

IL-1 α 과 LPS로 자극된 내피세포에서 GRO- α , IL-8 및 ENA-78의 분비는 자극의 농도와 지속시간에 비례하여 증가되었고, recombinant human ENA-78과 GRO- α 의 농도가 증가함에 따라 호중구의 부착율이 더욱 증가하였다.

결 론 :

ENA-78과 GRO- α 는 CXC chemokine family에 속하며 주로 상피세포에서 발현되어 백혈구의 화학적 주성을 유발하며 염증성 반응을 매개하는 중요한 물질로 알려져 있다. 본 연구에서는 다양한 농도의 IL-1과 LPS로 자극된 내피세포에서 농도에 비례하여 GRO- α , IL-8 및 ENA-78이 분비됨을 확인할 수 있었으며, 또한 ENA-78과 GRO- α 를 각각 다른 농도로 배양한 후 호중구 부착능이 농도에 따라 증가함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과는 염증성 자극으로 혈관내피세포에서 분비되는 ENA-78과 GRO- α 등의 CXC chemokine이 염증반응의 진행 기전에서 중요한 역할을 담당할 것임을 시사하며, 향후 염증성 질환의 발병기전 규명이나 치료법개발을 위한 기초적 자료를 제공하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Zigmond SH, Levitsky HK, Kreel BJ. Cell polarity : an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* 1981;89:585-92.
2. Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem* 1995;270:11703-6.
3. Baggiolini M, Dewald B, Walz A. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. In : Gallin JJ, Coldstein M and Snyderman R, editors. *Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed. New York : Raven press;1992. p. 247-64.
4. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemotactic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 1980;286:264-5.
5. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine when stimulated with thrombin. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:3534-8.
6. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines : an update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675-705
7. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Engl J Med* 1998;338:436-45.
8. Wuyts A, Proost P, Van Damme J. Interleukin-8 and other CXC chemokines. In : Thomson A, editors. *The Cytokine Handbook*, 3rd ed. London : Academic Press.;1998. p. 271-311.
9. Imaizumi TA, Albertine KJ, Jicha DL, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Human endothelial cells synthesize ENA-78 : relationship to IL-8 and to signaling of PMN adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:181-9.
10. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991;254:99-102.
11. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hart MHL, Roos D. Neutrophil migration across monolayers of cytokine-rpestimulated endothelial cells : a role for platelet-activating factor and IL-8. *J Cell Biol* 1992;117:564-72.
12. Stier RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, et al. Endothelial gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- α LPS and IL-1b. *Science* 1989;243:1467-70.
13. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocyte : tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992;93:93-8.
14. Bevilacqua MP, Stenglin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 : an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989;243:1160-5.
15. McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*. 1995;270:11025-8.
16. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101.

17. Waller A. Microscopical observations on the perforation of the capillaries by the corpuscles of the blood, and on the origin of mucus and pus-globules. *Philos Magazine* 1846;29:397-9.
18. Massart J, Bordet C. Recherches sur l'irritabilité des leukocytes et sur l'intervention de cette irritabilité dans la nutrition des cellules et dans l'inflammation. *J Med Chir Pharm Brux* 1890;90:169-73.
19. McCarron RM, Wang L, Rache MK, McFarlin DE, Spatz M. Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 1993;43:23-30.
20. Walz A, Burgener R, Car B, Baggiolini M, Kunkel SL, Strieter RM. Structure and neutrophil-activating properties of a novel inflammatory peptide (ENA-78) with homology to interleukin-8. *J Exp Med* 1991;174:1355-62.
21. Westlin WF, Kiely JM, Gimbrone MA. Interleukin-8 induces changes in human neutrophil actin conformation and distribution: relationship to inhibition of adhesion to cytokine-activated endothelium. *J Leukoc Biol* 1992;52:43-51.
22. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991;254:99-102.
23. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hart MHL, Roos D. Neutrophil migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: a role for platelet-activating factor and IL-8. *J Cell Biol* 1992;117:564-72.
24. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994;12:593-633.
25. Koch A E, Kunkel S L, Harlow L A, Mazarakis D D, Haines G K, Burdick MD, et al. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J Clin Invest* 1994;94:1012-8.
26. Strieter R M, Kunkel S L, Burdick M D, Lincoln P M, Waltz A. The detection of a novel neutrophil-activating peptide (ENA-78) using a sensitive ELISA. *Immunol Invest* 1992;21:589-96.
27. Bozic C R, Gerard N P. Receptor binding specificity and pulmonary gene expression of the neutrophil-activating peptide ENA-78. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:302-8.
28. Raju U, Aggarwal BB. Other novel cytokines and cytokine-related ligands. In: Aggarwal BB, Gutterman JV, editors. *Human Cytokines: Handbook for basis and Clinical Research*. 2nd ed. Cambridge MA: Blackwell Science.; 1996. p. 489-515.
29. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest* 1995;95:134-41.
30. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, et al. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:602-11.
31. Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, Kadell AM, Wroblewski SK, Burdick MD, et al. Venous thrombosis-associated inflammation and attenu-

- ation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler Thromob Vasc Biol* 1995;15:258-68.
32. Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Lynch JP, Fishbein MC, Strieter RM. ENA-78 is an important angiogenic factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: 2239-42.
33. Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Morris SB, Xue YY, et al. Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. *J Clin Invest* 1988;102:465-72