

소아기 단순 기침 환아에서의 케모카인 발현 양상 연구*

이영환 · 김희선*

영남대학교 의과대학 소아과학교실, 미생물학교실*

Chemokines Expression in Children with a Non-productive Cough

Young Hwan Lee, Hee Sun Kim*

*Department of Pediatrics and *Department of Microbiology,
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

— Abstract —

Purpose : To evaluate the chemokine expression in children with a non-productive cough.

Materials and Methods : Six children with a non-productive cough who visited Yeungnam University Hospital were evaluated for the mRNA expression of interferon- γ -inducible protein 10(IP-10), macrophage cationic protein 1 and 3 (MCP-1, 3), interleukin (IL)-8, regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted (RANTES), eotaxin and growth-related oncogene- α (Gro- α) using the reverse transcription polymerase chain reaction.

Results : The chemokines IP-10 and MCP-3 were expressed in all samples. The chemokine RANTES was expressed in five cases, and IL-8 was expressed in three among them. However, eotaxin, Gro- α and MCP-1 were not expressed at all. The expression of chemokine MCP-3, RANTES and IL-8 were suppressed after the resolution of coughing in just one available case.

Conclusion : The chemokines MCP-3, RANTES and IL-8 may contribute to airway inflammation in children with a non-productive cough, whereas IP-10 is of secondary importance in this condition.

Key Words: Chemokine expression, Non-productive cough, Childhood

* 이 논문은 2004년도 재단법인 천마의학연구재단 지원에 의하여 이루어 졌음
책임저자 : 이영환, 대구광역시 남구 대명5동 317-1, 영남대학교 의과대학 소아과학교실
Tel: (053) 620-3535, Fax: (053) 629-2252, E-mail: yhlee@med.yu.ac.kr

서 론

기관지 과민성을 가지고 있는 환아에서는 T 림프구의 불균형으로 인한 사이토카인의 활성화가 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 이미 잘 알려져 있다. 또한 최근에는 이들 환아들에게서 케모카인의 변화와 생성에 관한 연구와 영아기의 respiratory syncytial virus (RSV)에 의한 세기관지염 환아에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다.¹⁻⁷⁾

그러나, 이러한 급성 세기관지염이나 기관지 천식이 아닌 소아기의 단순 기침 환아에서의 케모카인의 발현 양상에 관한 연구는 없다. 이에 단순 기침 환아에서의 케모카인 발현 양상에 관한 연구를 통하여 향후 소아기의 천식이나 세기관지염 등의 질환별의 병태생리를 이해하고 비교·연구하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되어 이 연구를 시행하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

단순 기침을 호소하여 영남대학교병원 소아과를 내원한 환아 중 연구의 목적에 동의한 소아들을 대상으로 증상이 있을 때와 증상 호전 후의 케모카인 interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10), macrophage cationic protein 1 and 3 (MCP-1, 3), interleukin (IL)-8, regulated upon activation in normal T cells expressed and secreted (RANTES), eotaxin 및 growth-related oncogene- α (Gro- α)의 발현 양상을 알아보았다.

대상 환아의 선정기준은 임상적으로 진단하여 급·만성 기관지염을 동반한 비재발성 또는

약한 재발성 기침을 앓고 있거나, 낮 시간 동안 기침의 심한 정도가 정상적인 일상생활 또는 수면이 가능한 빈번한 기침 이상인 환아를 대상으로 하였다. 그러나, 2세 미만의 소아, 재발성 기침 환자, 상당한 병발성 질환자, 중증 신부전 환자, 본 시험개시 7일 전에 항생제 또는 점액용해제를 투여 받은 환자 및 본 시험개시 2일 전에 이미 다른 진해제, 코데인, 항히스타민 함유제제를 투여한 자는 제외하였다.

2. 재료

환자의 혈액으로부터 Ficoll-hypaque(Pharmacia Biotech, Sweden)를 사용하여 말초혈액 단핵구와 혈장의 분리하였으며, 분리된 단핵구로부터 전체 RNA 분리를 위하여 Trizol(Invitrogen, chrlsbad, CA, USA)을 사용하였다. 케모카인 유전자 발현은 역전사 중합효소 연쇄반응법(reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)을 이용하였으며, RNA 중합효소 연쇄반응 Kit (N808-0017, Perkin Elmer, USA)를 사용하였다. 중합효소 연쇄반응 과정에서 사용된 primer CXCL1 (Gro- α), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL11 (eotaxin) 및 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 바이오닉스 (Bionics, corp. Korea)에서 합성하였다.

3. 방법

말초혈액으로부터 혈장 및 말초혈액 단핵구의 분리

말초혈액은 정맥에서 헤파린으로 항응고처리(Heparin: 10 U/ml 첨가)된 일회용 주사기를 이용하여 5 ml 채취하였다. 말초혈액 단핵구와

혈장은 채혈 즉시 Ficoll-Hypaque에 중첩시킨 후 2,000 r.p.m.에서 30분간 원심 분리하였다. 분리된 말초혈액 단핵구는 Hank Balanced Salt Solution (HBSS)로 세척 후 Trizol 1 ml에 처리하여 전체 RNA 분리에 사용하였다.

말초혈액 단핵구로부터 전체 RNA의 분리

말초혈액 단핵구에 Trizol 1 ml와 클로로포름 200 μ l를 섞어서 15분간 얼음에 정치시킨 뒤, 원심 분리하여 윗층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 넣고 -20°C에서 45분간 정치시켰다. 원심 분리하여 얻어진 침전물은 70% 에탄올로 세척하여 말린 뒤, 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)가 첨가된 증류수에 녹여 RNA의 농도를 측정하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응

중합효소 연쇄반응 시험관에 농도가 100 ng/ μ l의 RNA 3 μ l, MgCl₂ 4 μ g/ml, 10 × PCR buffer 2 μ l, dNTP 각각 2 μ l씩 8 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, reverse transcriptase(M-MLVRT : RAV-2) 1 μ l, oligo(dT) 1 μ l가 혼합된 RT 시료 17 μ l를 넣고 그 위에 mineral oil을 중첩시킨 후 42°C에서 15 분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 그후 99°C에서 5 분간, 5°C에서 5 분간 반응시켜 reverse transcriptase를 불활성화 시킨 다음 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응 master mixture는 MgCl₂ 4 μ g/ml, 10×PCR buffer 8 μ l 그리고 *Taq* polymerase 0.5 μ l와 멸균 증류수를 혼합하여 전체 78 μ l가 되도록 하였다. 여기에 각각 20 μ M 의 sense primer 와 antisense primer를 1 μ l 첨가하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

사용된 각각의 primer sequence는 CXCL1

(Gro- α , 468bp): sense, 5'-actcaagaatggcggaag-3'; antisense, 5'-tgcatgttcagcggctcct-3'; CXCL8 (IL-8, 300 bp): sense, 5'-atgactccaagctggccgtg-3'; antisense, 5'-ttatgaattctcagccctctcaaaaacttctc-3'; CXCL10 (IP-10, 107 bp): sense, 5'-ggaacctccagtctcagcacc-3'; antisense, 5'-gcgtacggttctagagagaggtac-3'; CCL2 (MCP-1, 372 bp): sense, 5'-ccaattctcaactgaagctgcac-3'; antisense, 5'-gttagctgccagattcttgggtgtg-3'; CCL5 (RANTES, 275 bp): sense, 5'-atgaaggctctccgpgcagcc-3'; antisense, 5'-ctagctcatctcaagagttg-3'; CCL7 (MCP-3, 239 bp): sense, 5'-gcctctgcagcacttctgtg-3', antisense, 5'-cactctgtgtggggtcagc-3'; CCL11 (eotaxin, 207 bp): sense, 5'-ccaaccactgtctgcttaacctg-3'; antisense, 5'-tggctttggagttggagattttgg-3'; GAPDH (178 bp): sense, 5'-accactctccaccttg-3'; antisense, 5'-ctcttgctcttctgtggg-3'이다.

중합효소 연쇄반응은 thermal cycler(Perkin Elmer)를 이용하여 실시하였으며, 처음 thermal cycling 단계는 CXCL8 (IL-8), CCL5 (RANTES) 및 CCL2 (MCP-1)은 95°C에서 15초 동안의 불활성화 단계, 60°C에서 30초 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 1분 동안의 핵산 중합 단계로 구성하여 35회의 thermal cycling을 실시하였다. CXCL10 (IP-10)은 94°C에서 45초 동안의 불활성화 단계, 59°C에서 1분 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 1분 동안의 핵산 중합 단계로 구성하여 31회의 thermal cycling을 실시하였고 CXCL1 (Gro- α)의 경우 94°C에서 40초 동안의 불활성화 단계, 55°C에서 1분 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 1분 동안의 핵산 중합 단계로 구성하여 27회의 thermal cycling을 실시하였다. CCL7 (MCP-3)는 94°C에서 1분 동

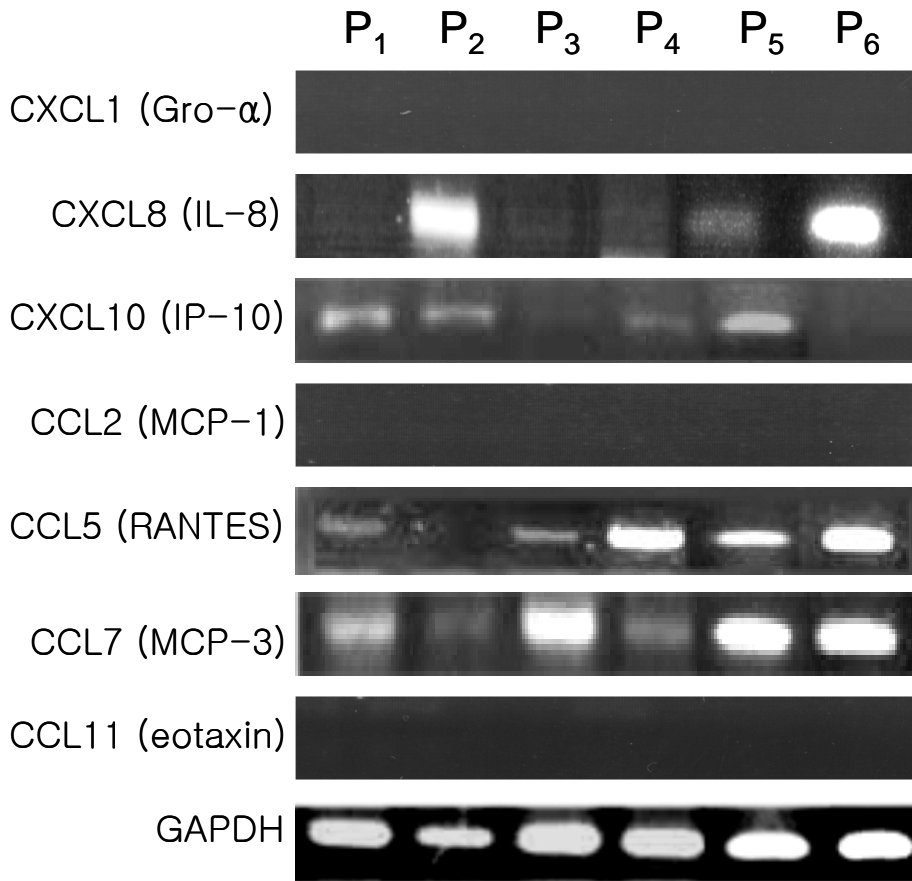


Fig. 1. The reverse transcription polymerase chain reaction for mRNA expression of chemokines in peripheral blood mononuclear cells from the children with non-productive cough. (P : patient)

안의 불활성화 단계, 60°C에서 80초 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 70초 동안의 핵산 증합 단계로 구성하여 33회의 thermal cycling을 실시하였고. CCL11 (eotaxin)의 경우 94°C에서 45초 동안의 불활성화 단계, 60°C에서 20초 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 30초 동안의 핵산 증합 단계로 구성하여 30회의 thermal cycling을 실시하였다. GAPDH의 경우 95°C에서 30초 동안의 불활성화 단계, 60°C에서 30초 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 30초 동안의 핵산 증합 단계로 구성하여 30회의 thermal

cycling을 실시하였다. 이들은 별도로 72°C에서 10분 동안 핵산 증합 반응을 한 번 더 실시하여 부분적으로 신장된 산물을 완전한 가닥으로 완성시켜 주었다.

증폭된 상보 DNA는 1.5% agarose gel상에서 1배 농도의 TBE buffer로 100 volt에서 35분간 전기영동 시켰다. EtBr(0.5 µg/ml)에 20분 염색 후 나타나는 띠를 관찰하였다. DNA marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다.

결 과

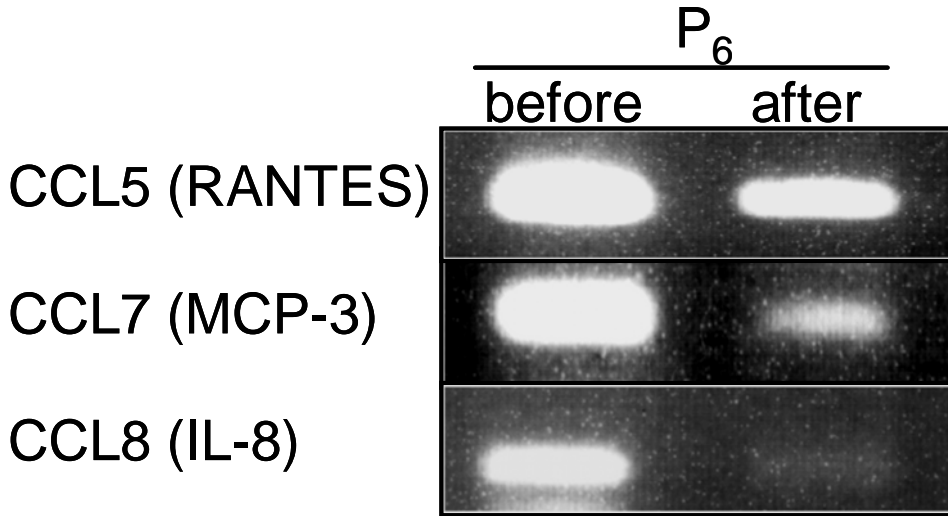


Fig. 2. The changes of chemokine mRNA expression after coughing resolution in the reverse transcription polymerase chain reaction. (P : patient)

대상 소아

대상 소아는 모두 6명으로 남녀 각각 3명이었으며, 평균 월령은 73.2개월 (34개월~122개월)이었다. 기침 증상의 정도는 모두 동일하였고, 다른 기초질환 조사에서 특이 사항은 없었다. 증상 호전 후 추적 검사에 응한 환아는 1명이었다.

단순 기침 증상시의 케모카인 발현 양상

단순 기침 증상이 있는 시기에 케모카인 IP-10, MCP-3는 모든 환아에서, RANTES는 5명에서, IL-8은 3명에서 각각 발현되었다. 하지만, eotaxin, Gro- α 및 MCP-1은 모든 환아에서 전혀 발현되지 않았다(Fig. 1).

증상 회복 후 케모카인 발현 변화 양상

추적 관찰이 가능했던 1례에서 증상 회복 후에 MCP-3, RANTES 및 IL-8 발현의 감소가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2).

고 찰

케모카인은 면역 사이토카인계의 한 super-family로, 1993년에 이르러서야 비로소 국제 위원회를 통하여 '케모카인'이란 공식적 이름이 명명되어진 새로운 proinflammatory 사이토카인군을 말한다. 특히 이들은 백혈구에 대한 특이한 화학주성을 통하여 인체내 면역기전 중 면역 통제와 염증 과정의 조절자로 작용한다는 증거가 많은 자료들을 통해 제시되고 있다.⁸⁾ 케모카인은 구조적으로 4개의 cysteine motif의 위치에 따라 네 종류로 분류된다. 처음 위치되는 두 개의 cysteine이 서로 붙어있는 구조를 가진 C-C 케모카인으로 가장 많으며, MCP-1, macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), RANTES 등이 있다. 처음 위치되는 두 개의 cysteine 사이에 아미노산이 삽입된 구조를 가진 C-X-C 케모카인으로는 platelet factor-4(PF-4), platelet basic protein (PBP), IL-8, IP-10, MGSA/Gro- α (Gro- α), KC(murine

gro homologues) 등이 있다. 이 외에도 C 케모카인과 C-X₃-C 케모카인이 있다. 근래에 들어서 각종 염증질환 연구에 매우 중요한 부분을 차지하고 있다.

본 연구는 단순기침 소아에서의 케모카인 MCP-1, MCP-3, RANTES, IP-10, IL-8, Gro- α 및 eotaxin의 발현 양상을 관찰하였다. 호흡기의 염증성 질환에서 사이토카인의 활성화에 관한 연구는 기관지 천식이나 RSV 혹은 adenovirus 감염에 의한 급성기 호흡기 질환을 위주로 국내외적으로 활발하다.

Eotaxin, MCP-1 및 MCP-3는 호산구에 활성화에 주로 작용하여, 알레르기 비염이나 천식의 병태생리에 많이 관여하는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹¹⁾ 이번 연구에서는 MCP-3는 모든 대상 소아에서 증상이 있는 시기에 발현이 증가되어 있었으며, 증상 소실과 함께 발현의 감소를 확인하였다. 하지만, eotaxin과 MCP-1은 모든 대상 소아에서 전혀 발현되지 않았다. 이것은 대상 소아들이 수가 너무 적어서 분석하기가 어렵지만, 증상이 동일하더라도 염증 정도나 부위가 다를 수 있으며, 해당 케모카인의 염증 매개과정이 다를 수 있음에 기인하는 것으로 추정된다.

RANTES는 호산구나 호염기구 및 T 세포 등에 작용하여 염증 반응시 단핵구를 염증 부위로 끌어들이는데 관여하는 대표적 케모카인 중의 하나로 호흡기질환, 특히 기관지 천식이나 RSV 감염과의 연관성 연구에 많이 활용되었다.¹²⁻¹⁵⁾ 이번 연구에서는 한 사람을 제외하고 대부분의 소아에서 증상이 있는 시기에 발현이 증가되었으며, 증상 소실 후 발현이 감소함을 확인할 수 있어서 RANTES는 일반적인 기관지 염증 반응에 광범위하게 관여하는 것으로

생각된다.

IL-8은 염증반응에서 호중구와 호산구의 활성화에 중요한 역할을 하여, 주로 급성 세균성 질환의 병태생리에 관여한다고 알려져 있지만,^{16, 17)} 기관지 상피세포에서 천식이나 감염시 IL-8의 발현이 증가되었음을 보고하였다.^{18, 19)} 본 연구에서도 IL-8의 발현이 급성기에 증가되었다가 회복기에 감소됨을 확인할 수 있어서, IL-8도 다양한 기관지 염증에 매우 중요한 매개 물질임을 확인할 수 있었다.

그 외에도 IP-10이 다양한 호흡기 염증 반응에서 호중구와 단핵구의 화학 주성에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있는데,²⁰⁾ 본 연구에서 대상 소아 전원에서 발현이 증가되어 있어 이를 확인할 수 있었다.

Gro- α 는 대표적인 호중구 화학 주성 및 활성 인자로서 RANTES에 비해 아직까지 그 작용 기전이나 발현 특성 등이 완전하게 밝혀져 있지 않은 케모카인이다. 인체내에서 염증반응이 생길 때 가장 첫 번째 방어 효과세포가 호중구이며 면역 방어를 위한 각종 사이토카인의 생성을 담당하는 단핵구의 역할을 생각할 때 호흡기질환의 염증반응 과정에 Gro- α 의 역할과 병의 임상 경과에 따른 생성·변화의 추적은 호흡기 질환의 병리기전을 밝히는데 매우 의미있는 작업으로 생각되었다. 실제로 Gro- α 에 대한 연구 정보는 아직 다른 케모카인에 비해 매우 부족한 상태일 뿐만 아니라, Gro- α 는 체내에서 세 가지 종류의 isoform으로 존재하는데, 특히 mouse에서는 IL-8과 유사한 작용을 하는 것으로 알려져 있는데,²¹⁾ 이번 연구에서는 IL-8과 달리 전혀 발현되지 않았다.

하지만, 이번 연구에는 몇 가지 제한점이 있었다. 우선 대상이 너무 적었을 뿐만 아니라,

모든 대상군의 추적이 완전히 이루어지지 않았으며, 추가적으로 다양한 대조군을 이용한 비교 연구가 이루어지지 않았다는 것이다.

결론적으로 단순 기침 환아에서 MCP-3, RANTES 및 IL-8 등이 강하게 발현되는 것으로 보아 이들은 일반적인 기관지 염증 반응에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, 향후 더 많은 증례 확보를 통한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

2002년 1월 1일부터 6월 30일까지 비재발성 또는 약한 재발성 마른기침을 주증상으로 영남대학교 의료원 소아과를 내원한 환아들 중 연구의 목적에 동의한 소아를 대상으로 이들에서의 케모카인 IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10), Macrophage cationic protein 1 and 3 (MCP-1, 3), Interleukin (IL)-8, RANTES, eotaxin 및 Gro- α 의 발현 양상을 알아보았다.

1) 대상 환아는 모두 6명(남 3명, 여 3명)으로, 평균 연령은 73.2개월(34개월~122개월)이었다. 2) 케모카인 IP-10, MCP-3는 모든 환아에서, RANTES는 5명에서, IL-8은 3명에서 발현되었다. 3) Eotaxin, Gro- α 및 MCP-1은 모든 환아에서 전혀 발현되지 않았다. 4) 추적 관찰에 응한 1례에서 회복기에 MCP-3, RANTES 및 IL-8 발현의 감소가 관찰되었다.

단순 기침 환아에서 케모카인 MCP-3, RANTES 및 IL-8 등이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 향후 이에 관한 더 많은 비교 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Oh JW, Lee HB, Park IK, Kang JO. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-11, and interferon-gamma levels in nasopharyngeal aspirates from wheezing children with respiratory syncytial virus or influenza A virus infection. *Pediatr Allergy Immunol* 2002 Oct;13(5):350-6.
2. Joshi P, Kakakios A, Jayasekera J, Isaacs D. A comparison of IL-2 levels in nasopharyngeal and endotracheal aspirates of babies with respiratory syncytial viral bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998 Oct;102(4 Pt1):618-20.
3. Pala P, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Metcalfe C, Sigurs N, Openshaw PJ. Enhanced IL-4 responses in children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Eur Respir J* 2002 Aug;20(2):376-82.
4. Gern JE, Martin MS, Anklam KA, Shen K, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, et al. Relationships among specific viral pathogens, virus-induced interleukin-8, and respiratory symptoms in infancy. *Pediatr Allergy Immunol* 2002 Dec;13(6):386-93.
5. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, et al. Monocyte IL-10 production during respiratory syncytial virus bronchiolitis is associated with recurrent wheezing in a one-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 May;161(5):1518-23.
6. van Schaik SM, Trisram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver RC 2nd, Welliver RC. Increased production of IFN-gamma and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 1999 Apr;103(4):630-6.
7. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JM, et al. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J Infect Dis* 2001 Aug 1;184(3):355-8.

8. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675-705.
9. Lilly CM, Woodruff PG, Camargo CA Jr, Nakamura H, Drazen JM, Nadel ES, et al. Elevated plasma eotaxin levels in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999 Oct;104(4 Pt 1):786-90.
10. Hartl D, Griese M, Nicolai T, Zissel G, Prell C, Reinhardt D, et al. A role for MCP-1/CCR2 in interstitial lung disease in children. *Respir Res* 2005 Aug 11;6:93.
11. Gorski P, Wittczak T, Walusiak J, Palczynski C, Ruta U, Kuna P, et al. Eotaxin but not MCP-3 induces eosinophil influx into nasal fluid in allergic patients. *Allergy* 2002 Jun;57(6):519-28.
12. Becker S, Reed W, Henderson FW, Noah TL. RSV infection of human airway epithelial cells causes production of the beta-chemokine RANTES. *Am J Physiol* 1997 Mar;272(3 Pt 1):L512-20.
13. Tsutsumi H, Takeuchi R, Chiba S. Activation of cellular genes in the mucosal epithelium by respiratory syncytial virus: implications in disease and immunity. *Pediatr Infect Dis J* 2001 Oct;20(10):997-1001.
14. Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, et al. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 1988 Aug 141(3):1018-25.
15. Cho KS, Lee JY, Yoon JS, Lee Y, Kim HH, Lee JS. Comparison of cytokine production and activation of NF- κ B in RSV and adenovirus infected bronchial epithelial cells. *Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)* 2006;16(4):306-16.
16. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992;307:97-101.
17. Alcorn MJ, Booth JL, Coggeshall KM, Metcalf JP. Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *J Virol* 2001 Jul;75(14):6450-9.
18. 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* 1992 May;89(5):1001-9.
19. Sohn MH, Lee KE, Choi SY, Kwon BC, Kim WK, Jang GC, et al. Effect of Mycoplasma pneumoniae on IL-8 gene expression in human respiratory epithelial cells. *Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)* 2004 Mar;14(1):38-45.
20. Zeng X, Moore TA, Newstead MW, Deng JC, Lukacs NW, Standiford TJ. IP-10 mediates selective mononuclear cell accumulation and activation in response to intrapulmonary transgenic expression and during adenovirus-induced pulmonary inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 2005 Feb;25(2):103-12.
21. Rudack C, Maune S, Eble J, Schroeder JM. The primary role in biologic activity of the neutrophil chemokines IL-8 and GRO- α in cultured nasal epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res* 2003 Feb;23(2):113-23.