

정상 인체 기관지 상피세포에서 콜히친의 Interleukin-1 수용체 길항제 생성 자극

¹울지외과대학교 을지병원 내과학교실, ²한양대학교 의과대학 내과학교실
이재형¹, 김상현², 김태형², 손장원², 윤호주², 신동호², 박성수²

IL-1Ra Elaboration by Colchicine Stimulation in Normal Human Bronchial Epithelial Cells

Jae Hyung Lee, M.D.¹, Sang Heon Kim, M.D.², Tae Hyung Kim, M.D.², Jang Won Sohn, M.D.², Ho Joo Yoon, M.D.², Dong Ho Shin, M.D.², Sung Soo Park, M.D.²

¹Department of Internal Medicine, Eulji General Hospital, Eulji University School of Medicine, Seoul, Korea, ²Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background: Asthma is a syndrome that is characterized by a variable degree of airflow obstruction, bronchial hyperresponsiveness, and airway inflammation. Colchicine is an inexpensive and safe medication with unique anti-inflammatory properties. IL-1Ra (Interleukin-1 receptor antagonist) mediates the anti-inflammatory effect in human inflammatory diseases, including asthma. This study examined whether IL-1Ra mediates the anti-inflammatory effect of colchicine in normal human bronchial epithelial cells (NHBE), RAW 264.7 cells (murine macrophage cell line), and a mouse lung.

Methods: NHBE, RAW 264.7 cells and BALB/c mice were stimulated with colchicine, and the increase in the IL-1Ra level was estimated by ELISA, Western analysis and RT-PCR analysis.

Results: Colchicine stimulated NHBE and RAW 264.7 cells to release IL-1Ra into the supernatant in a dose- and time-dependent manner. The major isoform of IL-1Ra in NHBE and RAW 264.7 cells is type I icIL-1Ra, and sIL-1Ra, respectively. IL-1Ra up-regulation was blocked by PD98059, a specific inhibitor in MAPK pathways. Colchicine also stimulated the secretion of IL-1Ra into the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of BALB/c mouse.

Conclusion: Colchicine stimulates an increase in the IL-1Ra level both in vivo and in vitro, and might have an anti-inflammatory effect. (*Tuberc Respir Dis* 2007; 63: 145-153)

Key Words: Colchicine, Asthma, IL-1Ra, MAPK.

서 론

천식은 다양한 정도의 기류장애, 기도과민성 및 기도염증을 특징으로 하는 질환이다. 기도염증이 천식의 주요기전이라는 근거는 천식으로 사망한 환자를 대상으로 한 부검연구에서 처음 확인 되었는데, 이들 환자의 기도내강은 점액으로 폐쇄되어 있었으며 기도는 호중구, 호산구 및 비만세포 등의 염증세포가 침윤되어 있었다¹. 최근 기관지 내시경을 이용한 기도 조

직검사와 기관지 폐포세척술이 용이해지면서 경증 및 중등증 천식환자에서 기도염증을 확인할 수 있었으며, 이러한 기도염증은 증상이 없는 경증 천식환자에서도 나타나므로 천식을 기도염증질환으로 분류하게 되었다²⁻⁴.

지금까지 천식의 치료제로 수많은 항염증제들이 연구개발 되어 왔지만 이들의 상당수가 치료효과의 부족, 약제의 독성, 경제성 등으로 인한 한계가 있었다. 이에 비해 콜히친은 안전하고 저렴한, 항염증 면역조절제로서 통풍, 건선, 가족성 지중해열, 베체트 병 및 특발성 폐섬유증 등에 널리 사용되어 왔다. 최근 콜히친이 경증 천식에 효과가 있다는 보고가 있었는데, Schwarz 등⁵은 아토피천식 환자에게 콜히친을 투여한 후 증상호전과 베타차단제 사용이 줄었다는 보고를 하였으며, Kelly 등⁶은 콜히친이 아토피천식 환자에서 후기기도반응을 억제하고, 조기 기도반응과

Address for correspondence: **Sung Soo Park, M.D.**
Division of Pulmonology, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University, 17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul, Korea
Phone: 82-2-2290-8347, Fax: 82-2-2290-8366
E-mail: parkss@hanyang.ac.kr
Received: Jan. 23. 2007
Accepted: Jul. 20. 2007

메타콜린 기도반응을 억제하는 경향을 보였다고 하였다. 그러나, 현재까지 콜히친이 기도내 항염증작용을 포함한 천식의 기전에 어떠한 역할을 하는지 명확히 알려져 있지 않다.

IL-1은 염증과 조직손상에 있어 중요한 매개체이며, IL-1Ra는 IL-1의 경쟁적 길항제로 조직의 염증과 손상을 억제하는 역할을 한다⁷. 천식에 있어서는 IL-1Ra가 기도과민성, 기도염증 및 후기천식반응에 억제 효과가 있다는 보고가 있다^{8,9}.

이상의 보고들을 근거로 하여 본 연구에서는 기도내에서 콜히친에 의한 항염증작용이 IL-1Ra에 의해 매개될 수 있다는 가설을 세우고 이를 실험적으로 증명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험세포와 실험동물

정상 인체 기관지 상피세포(normal human bronchial epithelial cells, NHBE)와 쥐의 대식세포주인 RAW 2647 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) 에서 구입하였으며, 각 세포는 제조사의 방법에 따라 배양하였다. 각 세포는 20세대까지 사용하고 이후 세대는 폐기하였다.

생체 내에서 IL-1Ra의 생성자극을 확인하기 위해 8-10주 된 BALB/c 쥐를 사용하였다.

콜히친 자극

정상 인체 기관지 상피세포와 RAW 2647 세포 각각에 콜히친을 투여한 군과 투여하지 않은 군으로 나누어 실험을 시행하였다. 각 세포의 배양액에 다양한 농도(0.001~1 μ M)의 콜히친을 투여하고 지정된 시간에 배양된 세포의 상층액을 채취하고 -80°C에 냉동보관하였다. 남은 단일 세포층은 cell culture lysis reagent(Promega, Madison WI, USA)를 투여해서 세포 용해물을 얻었다.

BALB/c 쥐에게 콜히친을 복강 내 주사(체중 1 kg 당 1 mg, 3 mg)한 후, 48시간 후에 ketamine을 복강

내 주사하여 마취한 후 기관지 폐포 세척술을 시행하였다. 먼저 BALB/c 쥐의 목부분에 피부 절개를 하여 기관을 노출시키고 polyethylene tube를 삽입한 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 1 ml씩 2차례 기관지 폐포 세척술을 시행하였다. 세척액은 원심분리(4°C, 1000 rpm)하여, 상층액과 침전물을 분리한 후 -80°C에 냉동 보관하였다. 기관지 폐포 세척술을 시행한 후 폐를 절제하였으며 폐조직을 분쇄한 후 trizol (Invitrogen)을 사용해 제조사의 방법에 따라 세포용해물을 얻었다.

콜히친에 의한 IL-1Ra의 생성기전에 MAPK경로가 관여하는 지를 확인 하기 위해 정상 인체 기관지 상피세포와 RAW 2647 세포에 대표적인 MAPK 특이 억제제인 PD98059(Calbiochem, San Diego, CA, USA)와 콜히친을 투여한 후 IL-1Ra의 생성 변화를 확인하였다.

1. ELISA

ELISA kit(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 방법을 따라 IL-1Ra를 정량적으로 측정하였다. 검사의 민감도는 5-15 pg/ml 이하였다.

2. RNA의 분리와 분석

총 RNA는 Chomczynski 와 Sacchi¹⁰에 의한 acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction방법에 따라, 각각의 지정된 시간에 세포배양 단일세포층으로부터 추출하였다. 각 실험 단계에서 10 μ g의 동일 용량의 총RNA를 1% agarose, 17% formaldehyde gels로 전기영동하였으며, nylon membrane으로 옮겨져 ³²P-labeled cDNA probes로 hybridization하였다. 각 IL-1Ra아형과 hybridization하는 1.7-Kb IL-Ra cDNA insert를 포함한 clone HT AAA12은 American Type Culture Collection에서 구입하였으며, 겔 loading의 정확성은 ethidium bromide 염색과 cDNA encoding β -actin으로 측정하였다.

3. Western blot

Western blot은 Levine 등이 제시한 방법¹¹을 변형

하여 시행하였다. 각 단계에서 상층액을 채취한 후 protease inhibitor mixture(complete protease inhibitor mixture tablets; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 처리하였으며, 이후 cell culture lysis reagent(Promega)를 투여해서 세포 용해물을 만들었다. 각 검체의 총 단백질량은 bicinchoninic acid protein reagent(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용해 분석하였다.

실험군 검체와 대조군검체, 양성반응 기준물질을 15% SDS-PAGE gels를 이용하여 분리한 후 polyvinylidene difluoride membrane(Milipore, Bedford, MA, USA)으로 옮겼으며, 4°C의 blocking buffer(5% w/v non-fat dry milk in PBS/0.1% Tween)를 이용하여 3회 이상 세척한 후 primary goat anti-human IL-1Ra(R&D systems)를 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 membrane은 세척액(PBS/0.1 Tween)으로 3회 세척한 후 mouse anti-goat IgG(Pierce)에 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이를 세척액을 이용하여 다시 3회 세척하고 반응이 끝난 membrane은 chemiluminescent 과정(ECL Western blotting detection system; Amersham Life Science, Buckinghamshire, U.K.)을 통해 형광반응을 일으킨 후 암실에서

film(Bio-Max)에 옮겨 현상하였다. 이 실험에서는 2개의 양성반응 기준물질이 사용되었는데 그 중 하나는 recombinant human nonglycosylated mature sIL-1Ra(R&D system)이며 다른 하나는 recombinant human IL-4에 48시간 동안 보관된 PMA-differentiated U937 monocyte-like세포의 용해물로, 이는 쉽게 검출할 수 있는 glycosylated mature sIL-1Ra, icIL-1Ra I을 포함 하고 있다¹².

4. RT-PCR

역전사와 PCR은 Access RT-PCR kit(Promega)를 사용하여 제조업체의 방법을 따라 시행되었다. RT-PCR primer와 방법은 Muzio 등¹³이 기술한 바에 따랐으며, 모든 primer는 Yale oligonucleotide synthesis laboratory에서 합성하였다. 이를 통해 IL-1Ra와 β-actin에 대한 mRNA transcript를 반정량적으로 분석하였다. PCR을 위한 primer, 반응산물의 크기는 다음과 같다. sIL-1Ra: 59-GAA TGG AAA TCT GCA GAG GCC TCC GC-39, 59-GTA CTA CTC GTC CTC CTG G-39, 539 bp; icIL-1Ra I: 59-CAG AAG ACC TCC TGT CCT ATG AGG C-39, 59-GTA CTA CTC GTC CTC CTG G-39, 515 bp;

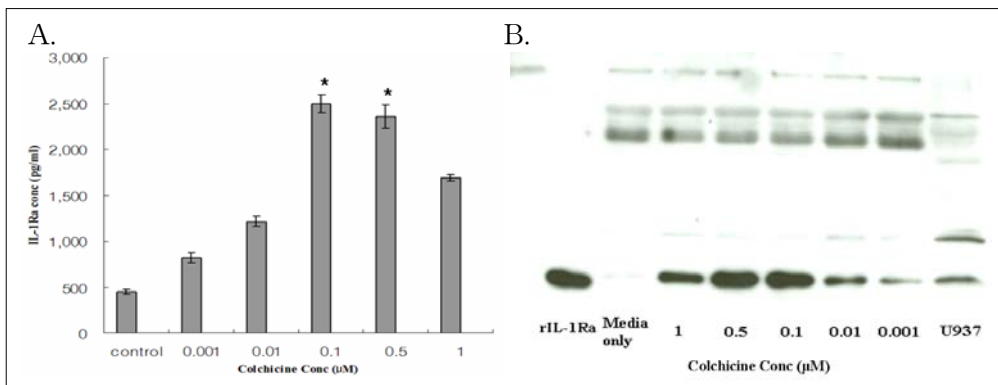


Figure 1. Dose kinetics of IL-1Ra elaboration in colchicine treated NHBE. (A) NHBE were incubated in various colchicine concentration media for 48 hours. The levels of immunoreactive IL-1Ra in supernatants were quantitated by ELISA. Colchicine stimulates NHBE to release IL-1Ra into supernatant with dose dependent manner. IL-1Ra elaborations in 0.1 and 0.5 µM colchicine concentrations show statistically significant differences compared to control (*p<0.05). However, in high colchicine concentrations, IL-1Ra elaborations are decreased. The noted values represent the mean ± SEM of a minimum of five assays. (B) Western blot results also show dose dependent IL-1Ra elaboration. SEM: standard error of the mean.

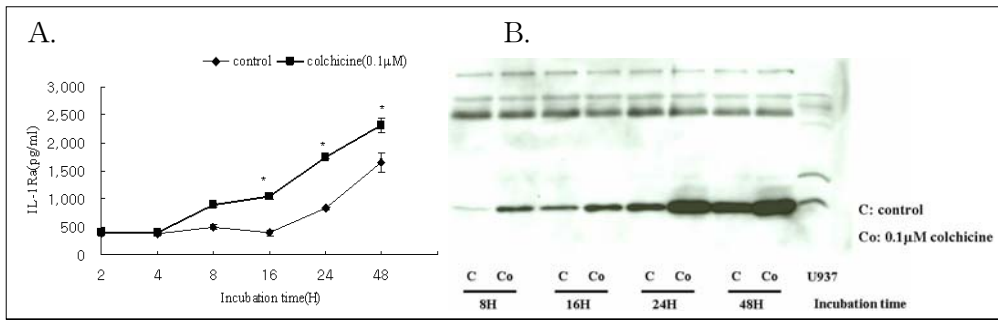


Figure 2. Time kinetics of IL-1Ra elaboration in colchicine treated NHBE. (A) NHBE were incubated in 0.1 μM colchicine concentration media for 2, 4, 8, 16, 24, 48 hours. The levels of immunoreactive IL-1Ra in supernatants were quantitated by ELISA. Colchicine stimulates NHBE to release IL-1Ra into supernatant with time dependent manner. IL-1Ra elaboration shows statistically significant differences compared to control after 16 hours (*p<0.05). The noted values represent the mean ± SEM of a minimum of five assays. (B) Western blot results show also time dependent IL-1Ra elaboration.

icIL-1Ra II: 59-CTG ACT TGT ATG AAG AAG GAG GTG G-39, 59-GTA CTA CTC GTC CTC CTG G-39, 536 bp; β-actin: 59-GCG CTC GTC GTC GAC AAC GG-39, 59-GAT AGA CAA CGT ACA TGG CTG-39, 390 bp.

RT-PCR반응산물은 1% agarose gels에서 전기영동한 후, ethidium bromide stained band들을 자외선 하에서 관찰하고 사진 촬영하였다.

5. 통계분석

모든 측정치는 평균과 표준오차로 표시하였고 각 실험군과 대조군의 측정치를 비교분석하기 위해 Student's t-test를 사용하였으며 그 통계학적 유의 수준은 5% 미만으로 하였다.

결 과

1. 정상 인체 기관지 상피세포에 콜히친 투여 후 IL-1Ra의 생성

정상 인체 기관지 상피세포에서 콜히친의 투여농도가 증가함에 따라 IL-1Ra의 생성이 증가하였다. 그러나 고농도의 콜히친에서는 IL-1Ra의 생성이 일부 감소되는 경향을 보였다(Figure 1). 콜히친을 투여한 후 시간에 따라 IL-1Ra의 생성은 증가되었으며, 16시간 이후에는 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보였다

(Figure 2).

2. 정상 인체 기관지 상피세포에 콜히친 투여 후 생성되는 IL-1Ra의 아형

정상 인체 기관지 상피세포에 콜히친을 투여 후 생성되는 IL-1Ra의 아형은 icIL-1Ra I mRNA가 우세하게 관찰되었다. 그러나 콜히친 농도에 따른 mRNA 발현의 차이는 없었다(Figure 3).

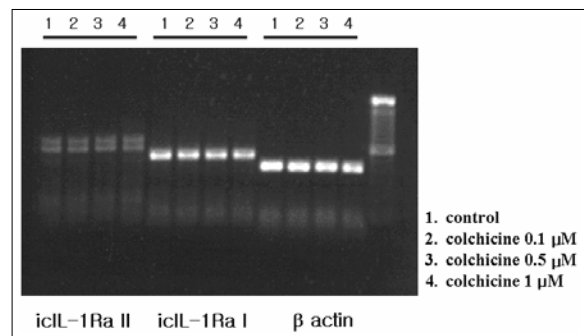


Figure 3. IL-1Ra isoform mRNA expression in colchicine treated NHBE. NHBE were incubated in various colchicine concentration media for 48 hours. The supernatant was removed, total cellular RNA was isolated, and RT-PCR was performed with primers specific for icIL-1Ra type I, icIL-1Ra type II, and β actin. icIL-1Ra I mRNA expressions are dominantly observed. However, there are no differences in IL-1Ra mRNA expression in various colchicine concentrations.

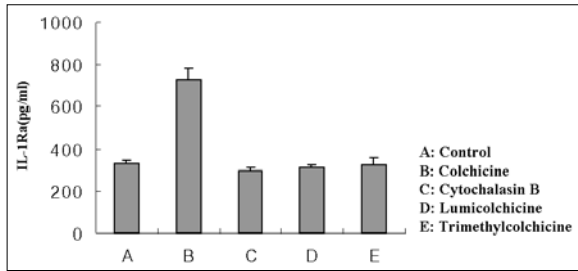


Figure 4. IL-1Ra elaboration in NHBE treated with colchicine variants. NHBE were incubated in media containing colchicine variants for 16 hours. The levels of immunoreactive IL-1Ra in supernatants were quantitated by ELISA. Colchicine variants do not stimulate IL-1Ra elaboration whereas colchicine does. The noted values represent the mean + SEM of a minimum of five assays.

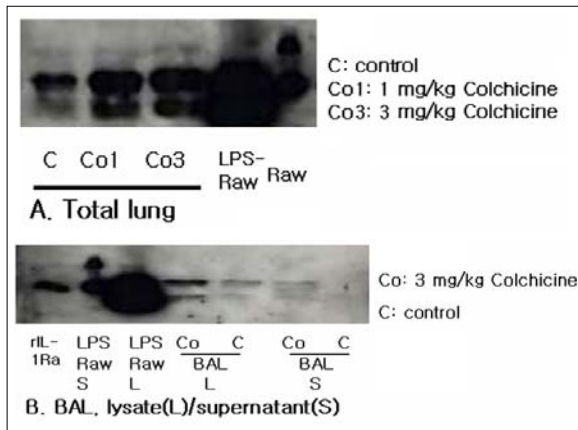


Figure 5. IL-1Ra elaboration in colchicine treated mouse lung. Colchicine was administered intraperitoneally to BALB/c mouse. The mouse was sacrificed 48 hours later, the elaborations of IL-1Ra in the total lung and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were quantitated by Western blot. (A) Colchicine stimulates to release IL-1Ra with dose dependent manner in mouse lung. (B) Colchicine stimulates to release IL-1Ra in BAL fluid. The lysate shows more dominant band than supernatant. rIL-1Ra (recombinant human nonglycosylated mature sIL-1Ra) and LPS treated RAW 264.7 cells (LPS Raw; 100 ng/ml for 48 hours) are used as positive controls for IL-1Ra elaboration.

3. 정상 인체 기관지 상피세포에서 콜히친 유사약제에 의한 IL-1Ra의 생성

콜히친 유사약제에 의한 IL-1Ra의 생성증가 유무를 관찰하였을 때 콜히친과는 다르게 유사약제에 의

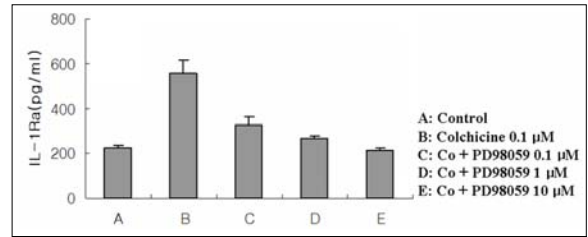


Figure 6. Effect of PD98059 on IL-1Ra elaboration in colchicine treated NHBE. A. NHBE were incubated in various colchicine concentration media for 16 hours. The levels of immunoreactive IL-1Ra in supernatant were quantitated by ELISA. IL-1Ra elaboration by colchicine stimulation is inhibited by MAPK inhibitor (PD98059) with dose dependent manner. The noted values represent the mean + SEM of a minimum of five assays.

한 IL-1Ra의 생성 증가는 없었다(Figure 4).

4. BALB/c 쥐에게 콜히친 투여 시 기도 내 IL-1Ra의 생성

BALB/c 쥐에게 콜히친을 복강 내 주사한 후 기도 내 IL-1Ra의 생성을 폐조직과 기관지 폐포 세척액에서 관찰하였을 때 폐 분쇄물과 기관지 폐포 세척액의 상청액, 세포 용해물에서 대조군에 비해 IL-1Ra의 생성이 증가되었다(Figure 5).

5. 정상 인체 기관지 상피세포와 RAW 264.7세포에서 콜히친에 의한 IL-1Ra의 생성에 있어 PD98059의 효과

콜히친을 투여한 정상 인체 기관지 상피세포에 대표적인 MAPK경로 억제제인 PD98059를 투여한 후 IL-1Ra생성을 관찰하였다. 콜히친 투여로 증가되었던 IL-1Ra의 생성은 PD98059에 의해 감소되었으며, 이는 PD98059의 농도가 증가할수록 더욱 감소하였다(Figure 6).

RAW 264.7세포에서 콜히친을 투여한 후 IL-1Ra의 mRNA 발현을 보았을 때 icIL-1Ra I mRNA보다 sIL-1Ra mRNA의 발현이 우세하게 관찰되었으며 이러한 mRNA의 발현은 PD98059의 농도가 증가할수록 감소하였다(Figure 7).

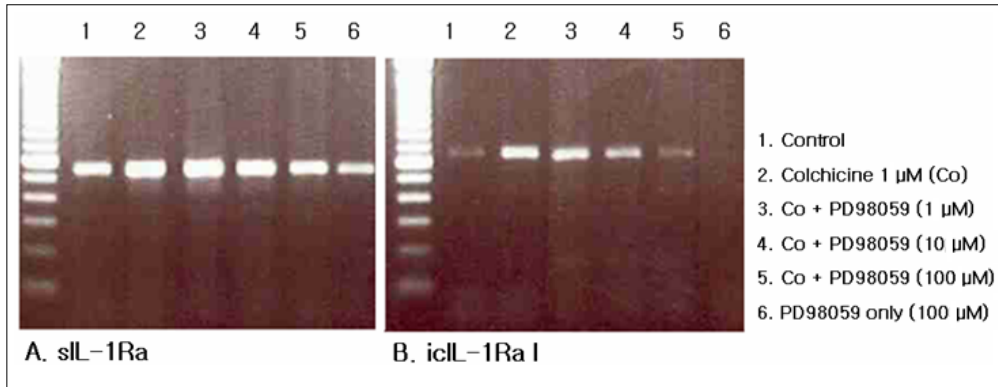


Figure 7. IL1-Ra isoform mRNA expression in colchicine/PD98059 treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated in various colchicine/PD98059 concentration media for 48 hours. The supernatant was removed, total cellular RNA was isolated, and RT-PCR was performed with primers specific for sIL-1Ra, icIL-1Ra type I. sIL-1Ra mRNA expression is dominantly observed in RAW 264.7 cell than icIL-1Ra type I, and mRNA expression by colchicine is decreased by PD98059 in dose-dependent manner.

고찰

콜히친의 항염증 작용기전은 세포내 fibrillar microtubule의 소실 또는 depolymerization을 일으키고, 염증세포의 주화성과 리소좀의 가수분해효소의 분비를 억제하는 것 이외에도¹⁴, 염증세포의 5-lipoxygenase생성물의 생성억제¹⁵⁻¹⁷, 호염구와 폐조직에서 히스타민의 분비억제^{18,19}, 백혈구와 대식세포에서 베타 아드레날린성 자극 후의 c-AMP의 반응을 강화하는 것 등이 알려져 있다^{20,21}.

Schwarz 등⁵은 10명의 아토피천식환자에게 4주간 콜히친을 투여하여 증상호전과 베타 차단제 흡입제의 사용이 감소하였다는 보고를 하였으며, Kelly 등⁶은 콜히친이 아토피 천식환자에서 후기 기도반응을 억제하며, 조기 기도반응과 메타콜린 기도반응을 억제하는 경향을 보였음을 보고하면서 이러한 억제효과는 폐 조직 내 비만세포 외에 다른 세포에 의한 작용이 있을 것이며, 이에 대해 잘 설계된 연구가 더욱 필요하다고 제안하였다. 또한, Dannon 등²²은 지속적인 콜히친 치료를 하는 가족성 지중해열 환자에서 천식 유발률이 일반인의 천식 유발률보다 유의하게 감소되어 있는데(1.1 vs 6.4%), 이러한 차이는 콜히친의 예방 효과일 것이라는 보고를 하였다.

반면 콜히친이 천식에 효과가 없다는 보고들도 있는데, Adalioglu 등²³은 30명의 중증천식 환아들을 대

상으로 콜히친을 4주간 투여한 후 임상증상의 호전과 베타차단제의 사용량이 감소하지 않았다고 하였으며, Newman 등²⁴은 천식환자에게 콜히친을 투여해도 흡입스테로이드제의 사용량을 줄이지 못한다고 하였다.

본 연구는 염증반응의 주요 매개체인 IL-1의 길항제가 기도 내에서 콜히친에 의해 생성이 증가된다는 것을 확인하였고 이는 세포 실험뿐 아니라, 쥐의 생체 내 실험을 통해서도 확인할 수 있었다. 이러한 사실을 통해 콜히친이 IL-1Ra를 통해 기도 내 염증을 감소시킬 수 있을 것이라는 결과를 얻을 수 있었다. 또한, 콜히친에 의한 IL-1Ra의 생성자극은 다른 콜히친 유사 약제에서는 관찰할 수 없었다.

본 연구의 결과에서 콜히친의 농도가 증가할수록 IL-1Ra의 생성이 증가하지만 0.5 μM이상의 고농도 콜히친에서는 IL-1Ra의 생성이 감소하는 경향을 보였다. 이는 고농도의 콜히친 투여시 IL-1Ra의 생성이 다른 기전에 의해 실제로 감소할 수도 있지만, 대조군과 비교하였을 때 콜히친의 농도가 증가함에 따라 IL-1Ra의 생성이 증가하는 경향을 보이고, 고농도의 콜히친을 투여할 때 IL-1Ra의 생성이 대조군이나 저농도의 IL-1Ra의 생성보다 여전히 높은 점 등을 고려하여 볼 때, 이러한 감소는 고농도의 콜히친 투여할 때 실험세포의 사멸 등의 실험상의 조건에 의해 발생한 것으로 생각된다.

본 연구의 결과에서 콜히친 투여 후 시간이 지남에

따라 IL-1Ra의 생성이 증가하지만 대조군에서도 증가하는 소견을 보인다(Figure 2). 세포배양시 배양액 안의 성장인자 등이 세포에 영향을 주어, 많은 수의 사이토카인들이 특별한 자극없이 증가되는 것을 흔히 관찰할 수 있다. 본 연구의 결과에서 4시간 이후에는 실험군과 대조군간에 차이가 보이며, 16시간 이후에는 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있어 콜히친 투여가 시간에 따라 IL-1Ra의 생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있다.

콜히친이 천식에 치료에 있어 도움을 줄 수 있다는 연구결과들은 아직 부족한 상태이지만, 향후 이 연구가 콜히친의 천식에 치료 효용성에 대한 잘 계획되고, 많은 환자들을 대상으로 한 연구의 실험적 근거가 될 수 있을 것으로 사료된다.

IL-1은 염증과 조직손상에 있어 중요한 매개물질로, IL-1 α 와 IL-1 β 의 아형이 있으며, 수용체로는 생리적으로 활성인 IL-1R I과 비활성인 IL-1R II가 있다. 특이적 수용체 길항제로는 IL-1Ra가 있다. IL-1Ra는 IL-1과 유사구조를 가지고 있으며, IL-1과 IL-1 수용체에 동등한 결합능력을 가지고 있어, IL-1이 IL-1R과 결합해 세포가 활성화되는 것을 억제한다⁷.

IL-1Ra와 IL-1 α , IL-1 β 의 유전자는 염색체2번(2q14)에 동일하게 위치하여 구조적인 유사성을 갖게 된다²⁵. IL-1Ra의 아형은 분비형인 sIL-1Ra와 세포내형인 icIL-1Ra I, icIL-1Ra II 및 icIL-1Ra III가 있다. sIL-1Ra는 단핵세포, 대식세포, 중성구의 여러 세포에서 분비되며, IL-1Ra I는 상피세포, 단핵세포, 대식세포 및 섬유아세포 등에서 발견되었으나, IL-1Ra II는 인체세포에서는 발견된 바 없다. IL-1Ra III는 단핵세포, 대식세포, 중성구 및 간세포 등에서 발견되며, IL-1Ra의 아형들은 동일 유전자의 선택적 접합(alternative splicing)을 통해 발현되는 것으로 알려져 있다^{26,27}.

다양한 실험 동물모델과 인체 호흡기 질환에서 IL-1과 IL-1Ra의 역할에 대한 검증이 이루어져 왔는데, IL-1은 쥐의 면역복합체유발 폐손상(immune complex-induced lung injury)을 매개하고 IL-1Ra를 투여하였을 때 이러한 효과는 감소한다²⁸. 또한 내인성 IL-1Ra도 면역성 폐손상 모델에서 중요한 항염증

작용을 하는 것으로 밝혀져 있다²⁹. 동물실험의 결과이지만 IL-1Ra는 항원 유발성 기도과민성과 기도염증을 억제하는 효과를 보이며⁸, 후기 천식반응에 억제 효과가 있다는 보고가 있다⁹. 천식지속 상태(status asthmaticus) 환자에서는 기관지 폐포 세척액 내에 IL-1과 IL-1Ra 모두가 증가되어 있으나, IL-1Ra의 양이 IL-1을 억제할 만큼 충분하지 못했다는 보고도 있다³⁰. 이상의 소견들을 종합하여 볼 때 IL-1과 IL-1Ra의 균형은 염증성, 면역성 폐질환의 경과와 결과에 있어 중요한 역할을 한다.

본 연구에서 콜히친에 의한 IL-1Ra의 생성이 정상 인체 기관지 상피세포와 RAW 264.7 세포에서 모두 증가되었지만, 발현된 IL-1Ra의 아형을 보면 인체 기관지 상피세포의 경우 icIL-1Ra I이 우세하게 관찰된 반면, RAW 264.7 세포에서는 sIL-1Ra의 발현이 우세하였다. 아마도 이 차이는 각 세포간의 특성 차이 또는 인간과 쥐, 두종간에 서로 다른 조절 기전에 의한 것으로 생각된다.

MAPK(mitogen activated protein kinase)는 진핵 세포에서 세포외부의 자극을 세포내부로 전달하는 신호전달 단백질로 세포간의 정보전달과 유전자 발현을 매개한다. MAPK는 Jun N-terminal kinases(JNKs)와 extracellular signal-regulated kinases(ERKs) 및 p38 proteins의 3가지의 그룹으로 분류할 수 있으며, MAPK 신호전달 경로는 특히 세포의 발달과 사멸, 면역반응 및 염증과정 등에 기여하는 것으로 알려져 있다³¹. 또한, 천식에 있어서 MAPK는 Th2세포의 분화, 염증세포의 침윤, 상피세포와 내피세포의 기능, 근 섬유모세포의 과대증식, 기도평활근 활성화 등에 영향을 준다³².

본 연구에서는 콜히친에 의한 IL-1Ra의 발현 증가의 기전을 밝히기 위해 대표적인 MAPK경로의 특이 억제제인 PD98059를 사용하였으며, 그 결과로 IL-1Ra의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다. 이는 적어도 콜히친에 의한 IL-1Ra생성에 MAPK경로가 관여한다는 것을 의미한다. 하지만 이 결과 만으로는 복잡하고 다양한 구조의 MAPK경로 중 어떠한 단계가 관여하는지는 알 수 없으며 이후 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

이상의 소견을 종합하였을 때 기도에서 콜히친은 IL-1Ra의 생성을 유도하고 IL-1Ra를 통한 항염증 작용을 할 것으로 보인다. 본 연구에서는 콜히친의 투여가 기도 폐포세척액의 염증세포의 변화나, 기도 조직에서의 염증정도의 변화를 유도하는 지를 직접적으로 보여준 실험결과를 보여주지 못하였으므로, 이러한 항염증 작용이 얼마나 효과적인가에 대해서는 추후의 실험 등을 통해 검증하는 것이 필요할 것으로 보인다. 또한, 적어도 콜히친에 의한 IL-1Ra의 생성에는 MAPK경로가 관여할 것으로 사료되며 구체적으로 어떠한 단계가 이러한 결과를 보였는지는 추가적인 실험이 필요할 것이다.

요 약

연구배경: 천식은 기류장애, 기도과민성 및 기도염증을 특징으로 하는 질환이다. 콜히친은 안전하고 저렴한 항염증 면역조절제로서 천식치료에 효과가 있다는 보고가 있으며, IL-1Ra는 천식을 포함한 인체 내 염증질환에 있어 항염증효과를 매개하는 대표적인 물질이다. 본 연구에서는 기도 내에서 콜히친에 의한 항염증작용이 IL-1Ra에 의해 매개될 수 있다는 가설을 세우고 이를 실험적으로 증명하고자 하였다.

방 법: 정상 인체 기관지 상피세포와 RAW 264.7 세포, BALB/c 쥐에게 콜히친을 투여한 후 IL-1Ra의 생성을 ELISA, Western분석, RT-PCR 을 통해 측정하였다.

결 과: 정상 인체 기관지 상피세포에서 콜히친의 투여농도가 증가함에 따라, 또한 투여 후 시간이 지남에 따라 IL-1Ra의 생성이 증가하였다. 이러한 IL-1Ra의 증가는 대표적인 MAPK경로 억제제인 PD98059에 의해 억제되었다. 콜히친의 IL-1Ra 자극효과는 BALB/c 쥐의 기관지 폐포세척액과 폐조직에서도 관찰되었다.

결 론: 기도에서 콜히친은 생체 내와 생체 외에서 IL-1Ra의 생성을 유도하고 IL-1Ra를 통한 항염증 작용을 할 것으로 보이며, 적어도 콜히친에 의한 IL-1Ra의 생성에는 MAPK경로가 관여할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344:350-62.
2. Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR, Kozakewich HP, Reilly JJ, Mentzer SJ, et al. Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:565-72.
3. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1505-10.
4. Vignola AM, Chané P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:403-9.
5. Schwarz YA, Kivity S, Ilfeld DN, Schlesinger M, Greif J, Topilsky M, et al. A clinical and immunologic study of colchicines in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:578-82.
6. Kelly SJ, Uri AJ, Freeland HS, Woods EJ, Schulman ES, Peters SP, et al. Effects of colchicines on IgE-mediated early and late airway reactions. *Chest* 1995;107:985-91.
7. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998;16:27-55.
8. Selig W, Tocker J. Effect of interleukin-1 receptor antagonist on antigen-induced pulmonary responses in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 1992;213:331-6.
9. Okada S, Inoue H, Yamauchi K, Iijima H, Ohkawara Y, Takishima T, et al. Potential role of interleukin-1 in allergen-induced late asthmatic reactions in guinea pigs: suppressive effect of interleukin-1 receptor antagonist on late asthmatic reaction. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:1236-45.
10. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
11. Levine SJ, Wu T, Shelhamer JH. Extracellular release of the type I intracellular IL-1 receptor antagonist from human airway epithelial cells: differential effects of IL-4, IL-13, IFN-gamma, and corticosteroids. *J Immunol* 1997;158:5949-57.
12. Berger AE, Carter DB, Hankey SO, McEwan RN. Cytokine regulation of the interleukin-1 receptor antagonist protein in U937 cells. *Eur J Immunol* 1993;23:39-45.
13. Muzio M, Polentarutti N, Sironi M, Poli G, De Gioia L, Inrona M, et al. Cloning and characterization of a new isoform of the interleukin receptor antagonist. *J Exp Med* 1995;182:623-8.

14. Wallace SL, Omokoku B, Ertel NH. Colchicine plasma levels: implications as to pharmacology and mechanism of action. *Am J Med* 1970;48:443-8.
15. Ouyang Y, Wang W, Bhuta S, Chang YH. Mechanism of action of colchicine. VI: Effect of colchicine on generation of leukotriene B4 by human polymorphonuclear leukocytes. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:397-402.
16. Reibman J, Haines KA, Rich AM, Cristello P, Giedd KN, Weissmann G. Colchicine inhibits ionophore-induced formation of leukotriene B4 by human neutrophils: the role of microtubules. *J Immunol* 1986;136:1027-32.
17. Griffiths RJ, Li SW, Wood BE, Blackham A. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in a model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. *Agents Actions* 1991;32:312-20.
18. Gillespie E, Lichtenstein LM. Histamine release from human leukocytes: studies with deuterium oxide, colchicine, and cytochalasin B. *J Clin Invest* 1972;51:2941-7.
19. Kaliner M. Human lung tissue and anaphylaxis. Evidence that cyclic nucleotides modulate the immunologic release of mediators through effects on microtubular assembly. *J Clin Invest* 1977;60:951-9.
20. Rudolph SA, Greengard P, Malawista SE. Effects of colchicines on cyclic AMP levels in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3404-8.
21. Hagmann J, Fishman PH. Modulation of adenylate cyclase in intact macrophages by microtubules. Opposing actions of colchicine and chemotactic factor. *J Biol Chem* 1980;255:2659-62.
22. Danon YL, Zemer D. Low asthma prevalence found in FMF. *Immunol Allergy Pract* 1992;14:357-62.
23. Adalioglu G, Turktas I, Saraclar Y, Tuncer A. A clinical study of colchicines in childhood asthma. *J Asthma* 1994;31:361-6.
24. Newman KB, Mason UG, Buchmeier A, Schmaling KB, Corsello P, Nelson HS. Failure of colchicines to reduce inhaled triamcinolone dose in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:176-8.
25. Patterson D, Jones C, Hart I, Bleskan J, Berger R, Geyer D, et al. The human interleukin-1 receptor antagonist(IL1RN) gene is located in the chromosome 2q14region. *Genomics* 1993;15:173-6.
26. Malyak M, Smith Jr MF, Abel AA, Hance KR, Arend WP. The differential production of three forms of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils and monocytes. *J Immunol* 1998;161:2004-10.
27. Weissbach L, Tran K, Colquhoun SA, Champlaud MF, Towle CA. Detection of an interleukin-1 intracellular receptor antagonist mRNA variant. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:91-5.
28. Mulligan MS, Ward PA. Immune complex-induced lung and dermal vascular injury. Differing requirements for tumor necrosis factor- α and IL-1. *J Immunol* 1992;149:331-9.
29. Shanley TP, Peters JL, Jones ML, Chensue SW, Kunkel SL, Ward PA. Regulatory effects of endogenous interleukin-1 receptor antagonist protein in immunoglobulin G immune complex-induced lung injury. *J Clin Invest* 1996;97:963-70.
30. Tillie-Leblond I, Pugin J, Marquette CH, Lamblin C, Saulnier F, Brichet A, et al. Balance between proinflammatory cytokines and their inhibitors in bronchial lavage from patients with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:487-94.
31. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.
32. Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, Gallelli L, Caraglia M, Marra M, et al. Mitogen-activated protein kinases and asthma. *J Cell Physiol* 2005;202:642-53.