

## 만성육아종질환 환자 단핵구에서 TNF- $\alpha$ 자극에 의한 IL-8과 IL-10의 발현 양상

제주대학교 의학전문대학원 소아과학교실, 제주대학교 의과연구소

신 경 수

= Abstract =

### TNF- $\alpha$ stimulated IL-8 and IL-10 expression in monocytes from patients with chronic granulomatous disease

Kyung-Sue Shin, M.D.

Department of Pediatrics, Cheju National University School of Medicine, and  
Institute of Medical Science Cheju National University, Jeju, Korea

**Purpose :** Patients with chronic granulomatous disease (CGD) have genetic mutations in a component of the NADPH oxidase enzyme that is necessary for the generation of the superoxide anion. The profound defect in innate immunity is reflected by the patients susceptibility to catalase-positive bacteria and fungi. In addition, CGD patients display signs of persistent inflammation, which is not associated only with deficient superoxide anion production. The aim of this study was to elucidate the cytokine responses in CGD patients after TNF- $\alpha$  stimulation.

**Methods :** Heparinized blood samples were collected from 8 CGD patients and 10 healthy volunteers. Monocytes ( $1 \times 10^6$  cell/well) isolated by the magnet cell isolation system were incubated with a constant amount of TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) at 37 °C for 6 h. Incubated cells were harvested at 60-min intervals for IL-8 and IL-10 mRNA analysis, and the supernatant was collected at the same intervals to determine IL-8 and IL-10 expression. Monocytes from healthy volunteers were also incubated with antioxidants followed by TNF- $\alpha$  stimulation for IL-8 and IL-10 expression.

**Results :** In CGD patients, a high expression of IL-8 together with a significantly higher IL-10 expression than in the healthy controls was seen after TNF- $\alpha$  stimulation. Moreover, normal monocytes treated with antioxidants exhibited increased IL-8 responses.

**Conclusion :** The absence of phagocyte-derived reactive oxidants in CGD might be associated with a dysregulated production of pro- and antiinflammatory cytokines. Additional research related to reactive oxidants is needed to clarify the role of cytokines in CGD patients. (*Korean J Pediatr* 2008 51 :1096-1101)

**Key Words :** Chronic granulomatous disease, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, Monocyte, Tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-8, Interleukin-10, Persistent inflammation, Reactive oxidants

### 서 론

만성육아종질환은 백혈구 내에서 superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 등과 같은 반응성 산소대사물들을

생성하는 효소인 NADPH oxidase의 유전적인 결함으로 인하여 발생하는 유전성 면역결핍질환이다<sup>1)</sup>. 반응성 산소대사물의 생성 장애로 인하여 catalase 양성 세균인 *Staphylococcus aureus* 등의 세균 감염과 *Aspergillus species*와 같은 진균에 의한 반복적이고 치명적인 감염이 만성육아종질환에서 자주 발생한다<sup>2)</sup>. 또한 급성 감염이 없는 상태에서도 만성적인 염증 소견을 보이며, 폐, 간, 피부, 림프절, 소화기계와 비뇨기계 등에서 염증성 육아종이 자주 관찰된다. 만성적인 염증 상태의 원인과 육아종 형성의 기전은 잘 알려져 있지 않으나 만성육아종질환의 염증 조절 부전과 관련이 있을 것으로 생각된다<sup>3)</sup>.

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 세포내 면역 반응과 염증 반응에 관여하는 중요한 매개체이며, 단핵구(monocyte)를

Received : 28 April 2008, Revised : 9 June 2008, Accepted : 11 July 2008

Address for correspondence : Kyung-Sue Shin, M.D.

Department of Pediatrics, Cheju National University School of Medicine,  
66 Jejudaeakno, Jeju, 690-756, Korea

Tel : +82.64-754-3927, Fax : +82.64-725-2593

Email : kyungsue@cheju.ac.kr

The content of this paper was presented in 56th Annual Autumn Meeting of the Korean Pediatrics Society in Seoul, Korea, October 20-21, 2006.

This study was partially supported by a grant from Cheju National University Hospital Research Fund (2006).

자극하여 식작용에 적합한 형태로 변화시키고, 중성구의 활성화와 화학적 유인에 관여하는 IL (interleukin)-8 등과 같은 염증성 시토크인 들을 분비하게 한다<sup>4)</sup>. IL-10은 면역 반응과 염증 반응을 억제하는 대표적인 항염증성 시토크인이며, T helper 세포, 단핵구, 대식세포 등에서 분비되어 항염증 작용과 중성구의 작용을 조절한다<sup>5)</sup>. 그리고 IL-10은 단핵구에서 TNF- $\alpha$  자극에 의하여 생성된 염증성 반응을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

본 연구는 만성육아종질환 환자의 단핵구에서 TNF- $\alpha$ 의 자극으로 생성되는 IL-8과 IL-10을 측정하여 염증성과 항염증성 시토크인의 생성 양상과 만성육아종질환 환자의 만성적인 염증 상태와의 관련성을 알아보고자 하였다.

**대상 및 방법**

**1. 대상**

2006년 3월 현재 제주 지역에 거주하는 만성육아종질환 환자 10명 중에서 본인이나 보호자가 본 연구에 대한 내용의 설명을 듣고 동의한 8명의 환자와 건강 대조군 10명을 대상으로 하였다. 본 연구는 제주대학교병원 기관윤리위원회(제주대학교병원 IRB 2006-14)의 승인을 받고 시행하였다.

**2. 방법**

**1) 단핵구의 분리와 TNF- $\alpha$  자극**

만성육아종질환 환자의 채혈은 최소한 3개월 이전까지 발열 등의 감염 증상과 주요 기관의 감염이 없는 경우에 시행하였다. 환자군과 건강 대조군의 말초혈액으로부터 Ficoll-Hypaque 용액 (Lymphoprep Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway)을 이용한 밀도구배 원심분리법으로 단핵세포(mononuclear cells)를 분리하였다. 분리된 단핵세포를 PBS buffer로 2번 세척한 후 MagCollect\* Human CD14+ Cell Isolation Kit (R&D Sys-

tems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 단핵구를 분리하였고, 유세포분석적으로 조사한 결과 단핵구의 순도는 89.6%였다. 환자군과 건강 대조군에서 분리한 단핵구( $1 \times 10^6$  cells/mL/well)를 24-well plate에 10% FBS와 gentamicin이 첨가된 RPMI 배양액으로 2시간 전처리한 후, TNF- $\alpha$  (10 ng/mL)로 각각 1시간 간격으로 6시간 동안 자극하였다.

**2) TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-8, IL-10의 mRNA의 발현 측정**

TNF- $\alpha$ 로 자극한 단핵구를 수거한 후 Trizol (Invitrogen, NY, USA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였고, ImProm<sup>TM</sup>-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

실시간 정량적 중합효소 연쇄반응을 위한 IL-8, IL-10, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 등의 시발체(primers)와 탐촉자(probers)의 서열은 TIB MOLBIOL사 (Berlin, Germany)에 의뢰하여 제작하였다. 탐촉자는 중합효소 연쇄반응 산물에 직접 반응하는 Hybridization 탐촉자를 사용하였고, donor fluorescein 탐촉자와 IL-8과 IL-10 acceptor LightCycler RED 640 탐촉자와 GAPDH acceptor LightCycler RED 705 탐촉자를 각각 합성하여 사용하였다(Table 1). 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응은 LightCycler 2.0 System Instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 이용하여 dual color detection 방법으로 수행하였고, fluorescein 탐촉자와 LightCycler RED 640 탐촉자, LightCycler RED 705 탐촉자를 이용하여 protocol에 따라 dual color compensation을 시행하였다. 반응 혼합액은 각각의 cDNA 3  $\mu$ L, 10x LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 2  $\mu$ L, 시발체 혼합액 2  $\mu$ L, HybProbe 혼합액 2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 4 mM를 혼합한 후 증류수로 최종 부피를 20  $\mu$ L로 만들었다. 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 먼저 10분간 반응시킨 후 95 $^{\circ}$ C에서 10초간 변형 반응, 61 $^{\circ}$ C에서 5초간 결합 반응, 72 $^{\circ}$ C에서 10초간 신장 반응을 총 50회 반응시켰다. Cycle threshold (Ct)값

**Table 1.** Primers and Probes for Real-time PCR

Primer		
IL-8	Forward	5'-ACCATCTCACTGTGTGTAACATGA
	Reverse	5'-TTTTTTTATGAATTCTCAGCCCTC
IL-10	Forward	5'-AGCTGAGAACCAAGACCCAGA
	Reverse	5'-GGGCTGGGTGAGTATCC
GAPDH	Forward	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	Reverse	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC
Probe		
IL-8	IL-8 EL	5'-GACATCTAAGTTCTTTAGCACTCCTTGGA-FL
	IL-8 LC	5'-LC Red640-AACTGCACCTTCACACAGAGCTGC-PH
IL-10	IL-10 FL	5'-CGGCGCTGTCATCGATTTCTTCCCT-FL
	IL-10 LC	5'-LC Red640-TGAAAACAAGAGCAAGGCCGTGGAGC-PH
GAPDH	GAPDH EL	5'-CATGGCCTCCAAGGAGTAAGACCCCT-FL
	GAPDH LC	5'-LC Red705-ACCACCAGCCCCAGCAAGAGCA-PH

Abbreviations : IL-8, interleukin-8; IL-10, interleukin-10; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

을 분석하여 IL-8과 IL-10의 mRNA 발현량을 GAPDH mRNA 발현량과의 상대정량으로 나타내었다.

**3) TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-8, IL-10의 발현 측정**

TNF- $\alpha$  로 자극하고 배양 상층액을 각각 모은 후 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 IL-8, IL-10의 생성을 측정하였다. 100  $\mu$ L의 희석액을 microplate에 넣고 100  $\mu$ L의 표준용액이나 배양 상층액을 넣고 2시간 동안 반응을 시킨 후에 4번의 세척을 하였다. 200  $\mu$ L의 conjugate를 첨가하고 다시 2시간 동안 반응시킨 후에 4번 세척을 하였다. 200  $\mu$ L의 substrate 용액을 첨가한 후 20분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**4) 건강 대조군의 단핵구에서 항산화제 처리에 의한 IL-8, IL-10의 발현 측정**

건강 대조군에서 분리한 단핵구 ( $1 \times 10^6$  cells/mL/well)를 24-well plate에 10% FBS와 gentamicin이 첨가된 RPMI 배양액으로 2시간 처리한 후, 항산화제인 diphenyleneiodonium chloride (DPI, Sigma) 2  $\mu$ M, catalase (Sigma) 1,000 U/mL와 NADPH oxidase 저해제인 apocynin (Calbiochem) 100  $\mu$ M을 30분간 전처리한 후 TNF- $\alpha$  (10 ng/mL)로 6시간 동안 자극하였다. IL-10의 경우에는 항산화제를 각각 30분과 2시간 전처리한 후 TNF- $\alpha$ 로 자극하였다.

**5) 통계**

대조군과 환자군의 차이의 통계적 유의성은 SPSS (9.0.1 for Windows)의 Student's t-test로 검정하였고, P값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미 있는 것으로 간주하였다.

**결 과**

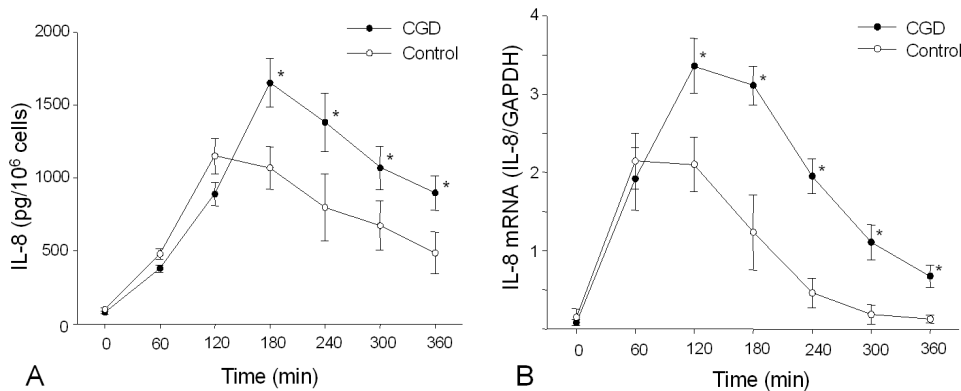
**1. 만성육아종질환 환자의 단핵구에서 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-8과 IL-10의 발현**

IL-8은 환자군에서 TNF- $\alpha$ 로 자극한 후 180분 이후부터 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 농도를 지속적으로 보였다 ( $P < 0.05$ ). 대조군에서는 120분까지 IL-8이 높은 농도를 유지하다가 이후 감소하였다. 환자군에서는 IL-8의 생성 최고치가 60분 정도 늦게 관찰되었으나 이후 대조군에 비해 지속적으로 높은 농도를 유지하였다(Fig. 1A). IL-8 mRNA 발현 양상도 IL-8과 비슷하였으나, 대조군의 경우에는 4시간 이후에는 mRNA 발현이 거의 없었으나 환자군에서는 mRNA 발현이 지속되었다(Fig. 1B).

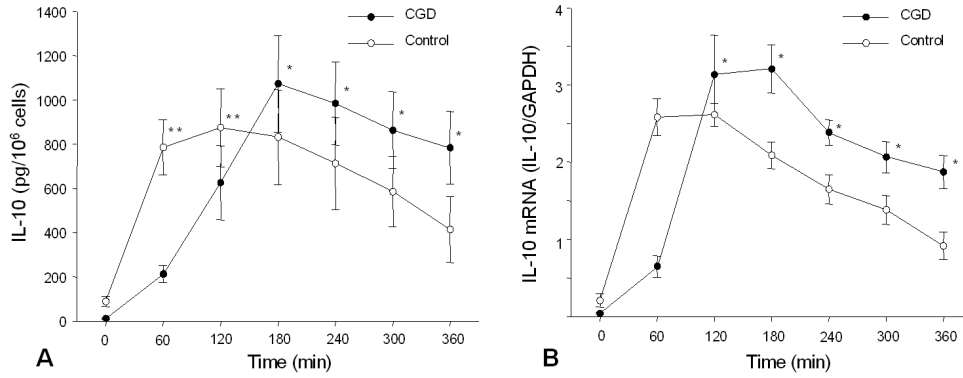
대조군에서 IL-10은 TNF- $\alpha$ 로 자극한 후 60분부터 일정 농도를 유지하였으나, 환자군에서는 180분 이후부터 높은 농도를 보였다 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 2A). IL-10 mRNA 발현 양상도 IL-10과 비슷하였으나, 120분 이후부터 환자군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). IL-10 mRNA 발현은 IL-8 mRNA 발현과는 다르게 환자군과 대조군 모두에서 시간이 경과하여도 일정 이상으로 발현되었다(Fig. 2B).

**2. 건강 대조군의 단핵구에서 항산화제 처리에 의한 IL-8, IL-10의 발현**

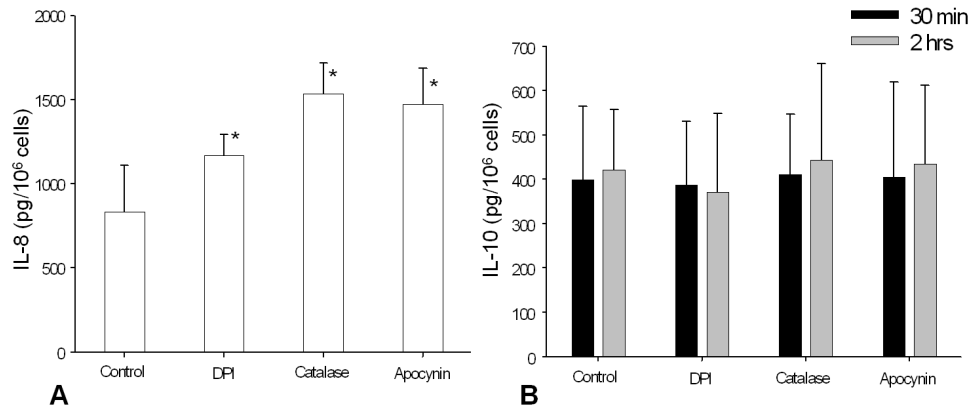
건강 대조군의 단핵구에 항산화제를 처리하여 만성육아종질환과 유사한 조건으로 IL-8과 IL-10을 측정하였다. IL-8은 항산화제를 처리한 군에서 처리하지 않은 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). 특히 catalase와 apocynin을 처리



**Fig. 1.** Prolonged expression of IL-8 and IL-8 mRNA after TNF- $\alpha$  stimulation in monocytes from CGD patients. A) The average level of IL-8 expression in CGD patients and healthy controls did not differ through 120 min after TNF- $\alpha$  stimulation. However, IL-8 expression in healthy controls dropped after 180 min whereas IL-8 expression in CGD patients remained significantly elevated. B) Early after stimulation, expression of IL-8 mRNA was similar in CGD patients and healthy controls. However, 240 min after TNF- $\alpha$  stimulation, healthy controls showed little expression of IL-8 mRNA, whereas CGD patients continued to show sustained IL-8 mRNA expression. \*,  $P < 0.05$ .



**Fig. 2.** Prolonged expression of IL-10 and IL-10 mRNA after TNF- $\alpha$  stimulation in monocytes from CGD patients. A) The average pattern of IL-10 production in CGD patients and healthy controls was similar. However, the average level of IL-10 production in healthy controls dropped after 180 min whereas IL-10 production in CGD patients remained significantly elevated. B. In healthy controls, production of IL-10 mRNA was detected within 30 min and reached the peak level after 60 min. However, The expression of IL-10 mRNA in CGD patients reached the peak level after 120 min but slowly dropped through 360 min. \*,  $P < 0.05$



**Fig. 3.** The effect of antioxidants on the expression of IL-8 and IL-10. (A) Monocytes from healthy volunteers were incubated with anti-oxidants followed by TNF- $\alpha$  stimulation for IL-8 and IL-10 expression. Normal monocytes treated with anti-oxidants exhibited increased IL-8 responses. Pre-incubation with catalase and apocynin result in markedly increased IL-8 expression. (B) There was no effect of anti-oxidants on the expression of IL-10. \* $P < 0.05$ ; DPI, dipheyleneiodonium chloride

한 군에서 DPI를 처리한 군보다 IL-8의 생성이 증가하였다(Fig. 3A).

항산화제를 30분간과 2시간 처리한 군 모두에서 IL-10은 처리하지 않은 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3B).

### 고 찰

만성육아중질환에서 염증성 육아종 형성과 만성적인 염증 상태의 원인이 지속적인 감염에 의한 것보다는 반응성 산소대사물의 생성 부진과 관련된 염증 반응의 이상이라는 보고들<sup>3, 7-11)</sup>은 있으나 그 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 본 연구는 만성육

아중질환 환자의 단핵구에서 TNF- $\alpha$ 의 자극으로 생성되는 IL-8과 IL-10을 측정하여 염증성과 항염증성 시토카인의 발현 양상과 반응성 산소대사물들과의 관련성을 알아보았다.

본 연구의 결과에서 건강 대조군의 경우에는 TNF- $\alpha$  자극으로 발현되는 IL-8 mRNA는 자극 후 1시간까지 현저하게 증가되었다가 이후 감소하여 자극 후 4시간 이후에는 거의 IL-8 mRNA의 발현이 관찰되지 않다. 그러나 IL-10 mRNA 발현은 자극 후 1시간까지 현저하게 관찰되었고 시간이 경과하여도 발현이 유지되었다. 이는 정상적으로 TNF- $\alpha$  자극으로 발현된 IL-8의 염증 반응이 IL-10에 의하여 지속적으로 억제된다는 것을 알 수 있으며, Armstrong 등<sup>6)</sup>과 Abrams 등<sup>12)</sup>의 보고들에서도 IL-10은 단핵구에서 TNF- $\alpha$  자극에 의하여 생성된 염증 반응을 억제한다

고 보고하였다.

그러나 만성육아종질환 환자에서는 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-8의 발현 양상이 건강 대조군과 달리 최고 발현치가 60분 정도 늦게 관찰되었고, IL-8의 발현도 자극 시간이 경과하여도 지속되었다. 그리고 건강 대조군의 단핵구에 항산화제를 처리하여 만성육아종질환과 유사한 조건하에서 IL-8을 측정하였을 때 항산화제를 처리한 군에서 처리하지 않은 대조군에 비하여 IL-8의 발현이 증가하였고, catalase와 apocynin을 처리한 군에서 DPI를 처리한 군보다 IL-8의 발현이 증가하였다. 항산화제인 DPI는 선택적 NADPH oxidase 저해제인 apocynin과는 달리 미토콘드리아 전자전달계를 저해하기 때문에 항산화제에 의한 IL-8 발현 증가는 NADPH oxidase 경로를 통하여 생산된 반응성 산소대사물들에 의해 매개됨을 알 수 있다. 그리고 만성육아종질환에서 관찰되는 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-8의 지연 반응과 과발현도 NADPH oxidase의 결함에 의한 반응성 산소대사물의 생성 부전과 연관되어 있음을 알 수 있다.

Brown 등<sup>9)</sup>은 만성육아종질환 환자의 중성구가 정상 중성구보다 세포자멸사(apoptosis)에 강하고, 세포자멸사 과정에서 항염증 반응의 매개체인 prostaglandin D2와 transforming growth factor- $\beta$ 를 만성육아종질환 환자의 중성구가 정상 중성구보다 더 적게 발현한다고 보고하였다. 그러나 Warris 등<sup>10)</sup>은 *Aspergillus fumigatus*의 분생포자(conidia)와 균사(hypha)로 만성육아종질환 환자의 백혈구를 자극했을 때 정상 대조군에 비해 IL-10의 발현이 증가한다는 상반된 보고를 하였다. 본 연구에서는 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-10의 발현도 IL-8의 발현 양상과 유사하게 지연 반응과 과발현이 관찰되었다. 그러나 건강 대조군의 단핵구에 항산화제를 처리하였을 때의 IL-10 발현은 처리하지 않은 군과 큰 차이를 보이지 않았다. Dang 등<sup>13)</sup>은 IL-10이 NADPH oxidase complex의 p47phox subunit 인산화를 저해하여 세포내 반응성 산소대사물의 생성을 억제한다고 보고하였으나, Perianayagam 등<sup>14)</sup>은 IL-10 생성은 미토콘드리아 전자전달계 경로를 통하여 생성된 반응성 산소대사물과 연관이 있다는 상반된 보고를 하였다. 본 연구의 결과에서는 항산화제 처리에 의한 IL-10 발현의 변화를 관찰할 수 없었기 때문에 반응성 산소대사물들이 어떤 경로를 통하여 생성되어 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-10의 발현에 어떻게 영향을 미쳤는지에 대한 명확한 설명을 할 수가 없다. 단지 만성육아종질환에서 관찰되는 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-10의 지연 반응과 과발현이 반응성 산소대사물의 생성 부전과 연관되어 있음을 추정할 수는 있다. 그러나 TNF- $\alpha$  신호 전달 경로에 p47phox의 인산화가 필수적인 조건이며, 반응성 산소대사물들이 이차적인 매개체 역할을 한다는 여러 보고들<sup>15-17)</sup>을 미루어 볼 때 NADPH oxidase와 반응성 산소대사물 생성 경로가 TNF- $\alpha$ 에 의하여 유발된 염증성 반응을 억제하고 항염증성 시토카인을 생성하게 함을 알 수 있다.

Lekstrom-Himes 등<sup>18)</sup>은 만성육아종질환과 건강 대조군의 중성구를 formyl peptide로 자극하였을 때 IL-1 $\beta$ 의 발현은 별다른

차이를 보이지 않았으나 IL-8의 발현은 만성육아종질환에서 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 IL-8 이외의 다른 염증성 시토카인의 발현을 조사하지는 않았지만 위의 보고 결과로 미루어 볼 때 IL-8의 과발현과 지연 반응이 만성육아종질환의 만성 염증 상태의 원인일 가능성을 생각할 수 있다. 그러나 어떻게 염증성 시토카인 중에서 IL-8의 과발현이 만성육아종질환에서만 관찰되고, NADPH oxidase와 반응성 산소대사물이 어떻게 IL-10의 지연 반응과 과발현에 영향을 미쳤는지에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 만성육아종질환 환자의 단핵구에서 TNF- $\alpha$  자극에 의하여 염증성 시토카인인 IL-8과 항염증성 시토카인인 IL-10의 지연 반응과 과발현이 동시에 관찰되었으며, 건강 대조군의 단핵구에 항산화제를 처리하였을 때 IL-8의 발현 증가가 관찰되었다. 이는 만성육아종질환의 만성 염증 상태가 시토카인의 생성 조절의 부전과 연관이 있고, NADPH oxidase의 결함에 의한 반응성 산소대사물의 생성 부전과도 연관되어 있음을 알 수 있다.

## 요 약

**목적 :** 만성 육아종 질환은 백혈구 내에서 반응성 산소 대사물을 생성하는 효소인 NADPH oxidase의 유전적인 결함으로 인하여 반복적이고 치명적인 세균 감염과 진균 감염이 발생하는 유전성 면역 결핍 질환이다. 만성적인 염증 상태의 원인과 염증성 육아종 형성의 기전은 잘 알려져 있지 않으나 만성육아종질환의 염증 조절 부전과 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 연구는 만성육아종질환 환자의 단핵구에서 TNF- $\alpha$ 의 자극으로 발현되는 IL-8과 IL-10을 측정하여 염증성 시토카인과 항염증성 시토카인의 발현 양상과 만성육아종질환 환자의 만성적인 염증 상태와의 관련성을 알아보고자 하였다.

**방법 :** 만성 육아종 질환 환자 8명과 건강 대조군 10명의 말초 혈액에서 magnet cell isolation kit를 이용하여 단핵구를 분리하고, TNF- $\alpha$  (10 ng/mL)로 6시간 동안 자극한 후 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응과 ELISA법으로 IL-8과 IL-10의 발현 정도를 측정하였고, 건강 대조군의 단핵구에 항산화제를 전처리한 후 TNF- $\alpha$ 로 자극하여 IL-8과 IL-10의 발현 정도를 측정하였다.

**결과 :** 만성육아종질환 환자에서 TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-8의 발현 양상은 건강 대조군과 달리 최고 발현치가 60분 정도 늦게 관찰되었고, IL-8의 발현도 자극 시간이 경과하여도 지속되었다. 그리고 건강 대조군의 단핵구에 항산화제를 처리하여 만성육아종질환과 유사한 조건하에서 IL-8을 측정하였을 때 항산화제를 처리한 군에서 처리하지 않은 대조군에 비하여 IL-8의 발현이 증가하였고, catalase와 apocynin을 처리한 군에서 DPI를 처리한 군보다 IL-8의 발현이 증가하였다. TNF- $\alpha$  자극에 의한 IL-10의 발현도 IL-8의 발현 양상과 유사하게 지연 반응과 과발현이 관찰되었다. 그러나 건강 대조군의 단핵구에 항산화제를 처리하였을 때의 IL-10 발현은 처리하지 않은 군과 큰 차이를 보이지 않

았다.

**결론** : 만성육아종질환 환자의 단핵구에서 TNF- $\alpha$  자극에 의하여 염증성 시토카인인 IL-8과 항염증성 시토카인인 IL-10의 지연 반응과 과발현이 동시에 관찰되었으며, 건강 대조군의 단핵구에 항산화제를 처리하였을 때 IL-8의 발현 증가가 관찰되었다. 이는 만성육아종질환의 만성 염증 상태가 시토카인의 생성 조절의 부전과 연관이 있고, NADPH oxidase의 결함에 의한 반응성 산소대사물의 생성 부전과도 연관되어 있음을 알 수 있다.

## References

- 1) Roos D: The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev* 1994;138:121-57.
- 2) Lekstrom-Himes JA, Gallin JL. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 2000;343:1703-14.
- 3) Morgenstern DE, Gifford MAC, Li LL, Doerschuk CM, Dinanauer MC. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med* 1997;185:207-18.
- 4) Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med* 1995;43:227-35.
- 5) Cassatella MA. The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *Int J Clin Lab Res* 1998;28:148-61.
- 6) Armstrong L, Jordan N, Milar A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax* 1996;51:143-9.
- 7) Ricevuti G. Host tissue damage by phagocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1997;832:426-48.
- 8) Selmezy Z, Szelenyi J, Nemet K, Vizi ES. The inducibility of TNF- $\alpha$  production is different in the granulocytic and monocytic differentiated forms of wild type and CGD-mutant PLB-985 cells. *Immunol Cell Biol* 2003;81:472-9.
- 9) Brown JR, Goldblatt D, Buddle J, Morton L, Thrasher AJ. Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease (CGD). *J Leukoc Biol* 2003;73:591-9.
- 10) Warris A, Netea MG, Wang JE, Gaustad P, Kullberg BJ, Verweij PE, et al. Cytokine release in healthy donors and patients with chronic granulomatous disease upon stimulation with *Aspergillus fumigatus*. *Scand J Infect Dis* 2003;35:482-7.
- 11) Hatanaka E, Costa Carvalho BT, Condino-Neto A, Campa A. Hyperresponsiveness of neutrophils from gp 91<sup>phox</sup> deficient patients to lipopolysaccharide and serum amyloid A. *Immunol Lett* 2004;94:43-6.
- 12) de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-17.
- 13) Dang PMC, Elbim C, Marie JC, Chiandotto M, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity. *FASEB J* 2006;20:E698-E709.
- 14) Perianagam MC, Morena M, Jaber BL, Balakrishnan VS. Anti-oxidants reverse uraemia-induced down-regulation of mitochondrial membrane potential and interleukin-10 production. *Eur J Clin Invest* 2005;35:148-53.
- 15) Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR. Nuclear factor- $\kappa$ B-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor  $\alpha$ : evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 1999;94:1878-89.
- 16) Li JM, Fan LM, Christie MR, Shah AM. Acute tumor necrosis factor alpha signaling via NADPH oxidase in microvascular endothelial cells: Role of p47phox phosphorylation and binding to TRAF4. *Mol Cell Biol* 2005;25:2320-30.
- 17) Dewas C, Dang PMC, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. TNF-induces phosphorylation of p47phox in human neutrophils: Partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 2003;171:4392-8.
- 18) Lekstrom-Himes JA, Kuhns DB, Alvord WG, Gallin JL. Inhibition of human neutrophil IL-8 production by hydrogen peroxide and dysregulation in chronic granulomatous disease. *J Immunol* 2005;174:411-7.