

□ 원 저 □

내독소에 의한 말초혈액 단핵구의 IL-1beta, IL-6, TNF-alpha와 TGF-beta 생성에 관한 연구†

순천향대학교 의과대학 내과학교실, 현암 신장 연구소, 한양대학교 이과대학 생화학 및 분자생물학과*

정성환, 박춘식, 김미호, 김은영, 장현수*, 기신영, 어수택, 문승혁, 김용훈, 이희발

= Abstract =

Lipopolysaccharide-induced Synthesis of IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and TGF-beta by Peripheral Blood Mononuclear Cells

Sung Hwan Jung M.D., Choon Sik Park M.D., Mi Ho Kim, Eun Young Kim,
Hun Soo Chang*, Shin Young Ki M.D., Soo-Taek Uh M.D., Seung Hyuk Moon M.D.,
Yong Hoon Kim M.D., Hi Bal Lee M.D.

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hyonam Kidney Laboratory
Soonchunhyang University, Seoul, Korea*

Department of Biochemistry & Molecular Biology, College of Science, Hanyang University Ansan, Korea*

Background : Endotoxin (LPS : lipopolysaccharide), a potent activator of immune system, can induce acute and chronic inflammation through the production of cytokines by a variety of cells, such as monocytes, endothelial cells, lymphocytes, eosinophils, neutrophils and fibroblasts. LPS stimulate the mononuclear cells by two different pathway, the CD14 dependent and independent way, of which the former has been well documented, but not the latter. LPS binds to the LPS-binding protein (LBP), in serum, to make the LPS-LBP complex which interacts with CD14 molecules on the mononuclear cell surface in peripheral blood or is transported to the tissues. In case of high concentration of LPS, LPS can stimulate directly the macrophages without LBP. We investigated to detect the generation of proinflammatory cytokines such as interleukin 1 (IL-1), IL-6 and TNF- α and fibrogenic cytokine, TGF- β by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after LPS stimulation under serum-free conditions, which lacks LBPs.

Methods : PBMC were obtained by centrifugation on Ficoll Hypaque solution of peripheral venous bloods from healthy normal subjects, then stimulated in the presence of LPS (0.1 μ g/mL to 100 μ g/mL). The activities of IL-1, IL-6, TNF, and TGF- β were measured by bioassays using cytokines - dependent proliferating or inhibiting cell lines. The cellular sources producing the cytokines was investigated by immunohistochemical stains and

† 이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구과제 (과제 번호 94-1400-07-01-3) 연구비에 의하여 연구되었음.

in situ hybridization.

Results : PBMC started to produce IL-6, TNF- α and TGF- β in 1 hr, 4 hrs and 8hrs, respectively, after LPS stimulation. The production of IL-6, TNF- α and TGF- β continuously increased 96 hrs after stimulation of LPS. The amount of production was 19.8 ng/ml of IL-6 by 10^5 PBMC, 4.1 ng/mL of TNF by 10^6 PBMC and 34.4 pg/mL of TGF- β by 2×10^6 PBMC. The immunoreactivity to IL-6, TNF- α and TGF- β were detected on monocytes in LPS-stimulated PBMC. Some of lymphocytes showed positive immunoreactivity to TGF- β . Double immunohistochemical stain showed that IL-1 β , IL-6, TNF- α expression was not associated with CD14 positivity on monocytes. IL-1 β , IL-6, TNF- α and TGF- β mRNA expression were same as observed in immunoreactivity for each cytokines.

Conclusion : When monocytes are stimulated with LPS under serum-free conditions, IL-6 and TNF- α are secreted in early stage of inflammation. In contrast, the secretion of TGF- β arise in the late stages and that is maintained after 96 hrs. The main cells releasing IL-1 β , IL-6, TNF- α and TGF- β are monocytes, but also lymphocytes can secrete TGF- β . (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 846-860)

Key words : LPS, IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , CD14-independent pathway, PBMC

서 론

내독소 (lipopolysaccharide ; LPS)는 그람음성균의 세포 외벽성분으로 단구세포와 대식세포 뿐만 아니라 내피세포, B 림프구, 섬유모세포에 강력한 자극효과를 가지고 있다. 내독소는 대식세포로부터 proinflammatory cytokine인 IL-1, IL-6, TNF- α 와 prostaglandin, leukotriene, platelet activating factor의 지질대사물을 조기에 다량 분비하게 한다¹⁾. 임상적으로 그람음성균에 의한 폐혈증시 proinflammatory cytokine을 포함한 상기 염증 물질이 증가하며 폐혈성 속의 발생과 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다²⁾. 이는 실험적으로 내독소를 생체 내로 정주한 후 관찰되는 폐혈성 속에서 보이는 소견과 동일 양상을 보임으로써 잘 증명되고 있다³⁾.

내독소는 생체 내에서 단구와 내피세포⁴⁾에 강한 자극을 주나 호중구, 림프구⁵⁾, 호염기구⁶⁾, 섬유모세포⁷⁾ 등 여러 세포에도 자극효과가 있어 염증반응이 시작된다. 그중 대식세포는 내독소의 자극을 받아 활성화되면 interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 분비하여 조직손상을 일으

킨다. 회복기에 과량의 TNF- α 와 TGF- β 의 분비는 섬유모세포를 증식시키고, 교원질생산을 증가시키는 동시에 분비된 단백질 분해 효소에 의하여 조직내의 세포외 기질 (extracellular matrix : ECM 으로 약함)을 확장시켜 섬유화를 유발한다. 상기 소견은 임상적으로 그람음성균 폐혈증 환자의 일부에서 관찰되며⁸⁾, 급성으로 성인성 호흡장애 증후군 (adult respiratory distress syndrom : ARDS)과 multi-organ failure가 동반되고, 후기에는 ARDS의 후유증으로 폐섬유화가 일부 환자에서 동반된다⁹⁾.

내독소의 작용기전은 CD14 의존성 경로와 비의존성 경로의 두 가지로 나뉘어 진다. 체내로 들어온 내독소는 혈청 내에서 내독소 운반에 관여하는 LPS-binding protein (LBP)과 결합하여 혈중내에서 세포와 결합되거나 조직으로 이동되어 조직내 세포와 결합하게 된다. 내독소는 세포표면의 73, 40, 28kD, CD11/18, 95kD scavenger receptor, CD14와 결합한다¹⁰⁾. CD14항원은 B, T림프구, 호중구 뿐만아니라 섬유모세포에서도 발현되며^{11), 12)}, 대식세포에서는 발달과정에 발현된다. CD14항원은 LBP와 LPS의 결합체가 내독소 수용체에 결합시 결합능을 증가시켜주

는 물질로 작용하여¹³⁾, 혈청이 존재하는 경우 ng이나 pg 농도의 미량의 LPS에 의하여 세포는 활성화된다¹⁴⁾. LBP는 acute phase protein으로 LPS의 lipid A region에 결합하며, 정상혈청내에 미량 존재하나 염증 반응이 있으면 상승한다¹⁵⁾. 이 과정에서 CD14 항원의 중요성은 잘 증명되어 있다. CD14 항원은 가용성으로도 존재하며, LPS에 의한 내피세포나 상피세포의 활성화에도 관여한다¹⁶⁾. 그러나 고농도의 LPS는 CD14 항원에 비의존적으로 대식세포를 자극할 수 있는 것으로 되어 있다. 이것은 CD14 항원에 대한 항체로 억제 실험을 할 때 LPS에 의한 대식세포의 반응이 전부 억제되지 못하는 것으로 잘 증명되어 있다. 또한 CD14 항원을 발현하지 않는 B-cell line인 70Z/3에서도 LPS에 반응하여 IgM의 형성이 증가하는 것으로 보아¹⁷⁾ LPS에 의한 세포자극은 CD14 항원에 비의존적으로 발생할 수 있다. 현재까지 LPS 자극에 의한 대식세포의 CD14 항원 의존성 IL-1, IL-6, TNF- α 의 형성과정은 많이 밝혀져 있으나, 내독소에 의한 TGF- β 의 형성 여부는 밝혀져 있지 않으며, CD14 항원 비의존성으로 IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β 가 형성되는 과정도 정확히 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 혈청이 없는 상태 (LBP가 없는 상태)에서, 즉 LPS 자극시 LBP-CD14 비의존성으로 말초혈액단핵구에서 형성된 proinflammatory cytokines인 IL-1, IL-6, TNF- α 와 섬유화 cytokine인 TGF- β 의 생성유무를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험시약내 내독소 존재 여부에 대한 검증¹⁸⁾

LPS 자극에 따른 cytokine 생성의 변화를 보는 실험이 되기 때문에 일차적으로 세포배양에 이용되는 RPMI배지와 우태아혈청 (fetal calf serum : FCS) 내에 내독소의 양을 측정하여 실험에 영향이 없는지를 결정하였다. 내독소의 측정은 Limulus amoebocyte lysate 방법을 이용하였으며 E-Toxate Kit (Sigma,

USA)를 이용하였다. 내독소가 없는 plastic tube를 용기로 이용하였으며 내독소가 없는 중류수 (Sigma catalog No. 210-7)로 희석하였다. 내독소 표준용액은 E. coli OSJ : B5를 이용하였으며 2 ng/mL의 농도부터 2배수 희석으로 0.03 ng/mL까지 만들었다. 내독소 표준용액과 검체 100 μ l 에 limulus amoebocyte lysate를 100 μ l 첨가한 후 잘 혼합하여 37°C에서 1시간 보온 반응시켰다. 1시간후 시험관을 180° 돌려서 반응액이 gel로 변화된 것을 관찰하고 gel로 변한 시험관의 희석배율을 이용하여 내독소의 양을 구하였다.

2. 말초혈액단핵구의 분리와 LPS 자극실험

정상인의 헤파린 처리된 말초혈액정맥혈을 비중 1.077의 Ficoll-Hypaque 용액 위에 중첩시킨 후 500g에서 30분간 원심분리하여 말초혈액단핵구를 얻었다. 분리된 말초혈액단핵구를 우태아혈청이 없는 RPMI에 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 보온기에서 0.1, 1, 10, 100 μ g/mL의 LPS와 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48시간 혼합 배양 후 상층액을 분리하여 각 cytokines의 양을 bioassay로 측정하였다. 세포층은 slide에 고정시킨 후 이중 면역조직화학염색법과 in situ hybridization에 이용하였다.

3. IL-6, TNF- α , TGF- β 의 측정

1) Tumor Necrosis factor- α 의 측정¹⁹⁾

L929 섬유모세포 (ATCC, USA)를 이용하였다. L929 섬유모 세포를 5% 우태아혈청이 함유된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 5×10^4 cell/씩 분주한 후, 5% CO₂ 가습보온기에서 24시간 보온한 뒤 검체와 표준시약인 rhTNF- α (Genzyme, USA)를 2000pg/mL부터 0.64pg/mL의 농도까지 100 μ l 씩 분주하였다. 희석이 끝나면 8 μ g/mL actinomycin D 용액을 100 μ l 첨가한 후 5% CO₂, 37°C에서 16시간 배양하였다. 인산완충용액 200 μ l 로 1회 세척

한 뒤 0.5% Naphthol blue black, 9% acetic acid 0.1M sodium acetate 100 μ l 를 분주하여 세포를 염색한 후 흐르는 물로 세척하고 흡수지 위에 거꾸로 세워 놓은 후 4시간 정도 말렸다. 150 μ l 50mM NaOH을 첨가하여 세포내에 흡수된 염색시약이 유리되어 나오게 되면 562nm에서 분광 흡수량을 측정하였다. 분광 흡수 최대치의 50%를 1U로 계산하고 회석 배수를 구하여 검체의 TNF- α 의 양을 구하고 농도는 pg/mL로 표시하였다.

2) Interleukin-6의 측정²⁰⁾

IL-6 의존성 B9 hybridoma 세포주를 96 well culture plate에 well당 1×10^5 cell/mL를 100 μ l 씩 분주하고 rhIL-6 표준시약을 4,000pg에서 1.28pg까지의 농도로 5배수 희석하여 만든 후, 검체도 5배수씩 희석하여 37°C, 5% CO₂ 가습배양기에서 B9 hybridoma 세포와 같이 72시간 배양하였다. 5mg/mL의 3-(4,5-dimethyl thiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 28 μ l 를 첨가하고 4시간 반응시킨 후 50 μ l 의 elution buffer를 첨가하여 24시간 반응시켰다. 색소가 녹아 나오면 562nm와 650nm에서 흡광도를 측정하여 B9 세포의 증식능을 측정하여 검체내의 IL-6의 양을 구하였다.

3) Transforming growth factor-beta의 측정²¹⁾

TGF- β 에 의해 증식이 억제되는 mink lung fibroblast 세포주인 MV-309 (ATCC, CCL 64) 증식 억제를 이용하여 TGF- β 의 양을 측정하였다. 3일 간격으로 trypsin을 처리한 후 부유세포를 적정수 조절하여 재배양하여 증식시켰다. 5×10^4 /mL 100 μ l 의 세포부유층을 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 보온배양기에서 16시간 배양한 후 회석된 표준용액과 RPMI 100 μ l 을 flat-bottom microtiter plate에 넣은 뒤, TGF- β 를 10 ng에서 0.0064 pg/mL까지 5배씩 희석하여 표준용액을 만들어 100 μ l 를 각 well에 넣고 검체를 2배씩 희석하여 따로 첨가하였다. 검체를 넣고 96시간동안 37°C, 5% CO₂ 보온기에서 배양한

후 MTT를 첨가하여 IL-6 측정에서 기술된 방법으로 시행한 후 562nm에서 분석하였다.

4. IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 의 면역화학조직염색법²²⁾

말초혈액단핵구 3×10^5 /mL개를 cytocentrifuge (cytospin, shandon, UK)로 500g에서 5분간 원심 침착시킨 후 공기 중에서 16시간 말리고, 4°C의 acetone에 5분간 고정하였다. 사용된 slide는 세포의 탈락을 막기 위하여 poly-L-lysine으로 전처리된 slide를 이용하였다. 생성된 cytokines을 분비하는 세포의 종류를 감별하기 위하여 cytokines에 대한 항체만을 이용한 단일염색과 단구세포와 T림프구에 대한 항체를 추가로 이차염색하는 이중면역조직 염색법을 시행하였다.

Cytokine의 양은 일반적으로 세포표면 항체인 CD3나 CD14보다 발현율이 낮으므로 cytokine에 대한 염색을 먼저 하였다. 또한 세포질내의 cytokine염색은 0.1% saponin이 함유된 Tris-완충용액에 일차항체, 이차항체를 희석하여 사용하였다. 연속하여 CD3, CD14 세포표면 항체를 이용하여 이차염색을 하였다. Table 1은 면역염색에 사용된 시약의 종류와 양이다. 4°C acetone으로 고정된 slide를 0.1% avidine-biotin blocking 용액 (Dakopatts, Denmark)으로 실온에서 15분간 중화시킨 후 비특이 결합을 방지하기 위하여 3% 토끼혈청을 각각 첨가하고 실온에서 15분간 처리하였다. 일차항체로 cytokine에 대한 단클론 항체를 적정 희석하여 4°C에서 16시간 반응후 Tris-완충용액으로 세척하였다. 이차항체는 일차항체를 만든 동물의 면역글로블린에 대한 polyclonal 항체로 biotin이 결합되어 있으며, 이차항체로 실온에서 30분간 반응 후 Tris-완충용액으로 세척하고 avidin이 부착된 alkaline phosphatase (Dakopatts, Denmark)를 30분간 반응시킨 후 chromogen으로 naphthol phosphate/fast red TR salt를 이용, 직사광선을 차단하고 어두운 곳에서 반

용시켰다. CD3와 CD14의 추가 염색은 0.3% H₂O₂-methanol로 내재성 peroxidase를 block시킨 후 일차염색에서 이용된 avidine-biotin을 block하고 혈청 block을 각각 15분간 시행하였다. 둘째 염색의 일차 항체로 세포표면 항원에 대한 단클론 항체를 이용하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 이차항체로 biotin이 결합된 polyclonal 항체를 반응시킨 후 삼차항체인 streptavidin-peroxidase와 30분간 반응시키고 DAB-brown or black (Dakopatts, Denmark)으로 발색시켰다. 염색이 끝나면 세척 후 건조시키고 crystal mount (Biomed corp., CA, USA)로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

5. In situ hybridization을 이용한 말초혈액단핵구의 IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 의 발현 규명²³⁾

실험에 사용되는 증류수는 0.1% diethyl-pyrocabonate (DEPC로 약함, Sigma)로 처리한 후 autoclave 하였다 (DEPC-water). 유리용기는 180℃에서 8시간 처리하며, 그 외의 용기는 0.1% DEPC 용액에서 37℃, 4시간 동안 처리한 후 DEPC-water로 씻은 후 사용하였다.

RNA Probe의 제조를 위한 C-DNA는 ATCC사에서 구입하였으며 IL-1 β 는 YEPSECL-hl 1 β (ATCC), IL-6는 OMRF 2189 (ATCC), TNF- α 는 pMu TNF (ATCC), TGF- β 는 ST 64betaas (ATCC)을 사용하였다. cDNA를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 시행하였다. Primer는 BamHI와 Hind III가 작용할 수 있는 site를 포함시키며 Hind III가 5 prime쪽에 BamHI site가 3 prime쪽에 위치하도록 한국생공 (대덕)에서 만들었다. 각 cytokine의 primer sequence는 Table 2와 같았으며 PCR product의 크기는 IL-1은 298 bp, IL-6는 380 bp, TNF- α 는 405 bp, TGF- β 는 312bp가 되도록 계획하였다. PCR은 0.1g/L의 cDNA template를 1 μ l, up stream primer와 down stream primer를 각각 1 μ l (100 pmol), 2.5 U의 Taq polymerase를 가하여

94℃에서 1분, 54℃에서 1분, 72℃에서 3분씩 1 cycle로 35 cycle을 돌린 후 37℃에서 10분간 반응을 시켰다. PCR product를 phenol-chloroform-isoamylalcohol로 분리 후 3M sodium acetate와 100% ethanol로 침전시켰다. PCR product를 Vector DNA인 PGEM-3zf와 결합시킨 후, E-coli (DH-5 α)에 접종시켰다가 이를 다시 mini-preparation하여 plasmid DNA를 얻어내 이 DNA에서 RNA probe에 필요한 DNA template를 만들었다. 앞에서 만들어진 template DNA를 이용하여 In vitro transcription을 시켜서 RNA probe를 만들고 표식자로 digoxigenin-labelled UTP를 사용하였다. In vitro transcription으로 만들어진 RNA probe는 dot blot을 시행하여 각각의 RNA probe의 역가를 구하였다. 도말세포를 실온에서 잠시 건조시키고, 4℃에서 4% paraformaldehyde로 5분간 고정시킨 다음, 위에서 만든 RNA probe, hybridization mixture, t-RNA (25 μ g/ μ l)로 혼합된 용액 25 μ l를 조직 위에 얹고, 37℃에서 16시간 반응시킨 다음 고농도의 SSC 용액으로부터 점차 SSC 농도를 낮추어가며 순차적으로 세척하고, blocking solution으로 30분간 처리 후, 500배 희석된 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate로 2시간 반응시키고 NBT 4.5 μ l, BCIP 3.5 μ l 씩 분주하여 염색 후 관찰하였다. 대조염색은 methyl green으로 16시간 하였다.

5. 통 계

각 군간의 통계는 Wilcoxon matched pairs signed Ranks test로 검정했으며, 통계적 유의성은 P 값 0.05이하로 하였다.

결 과

1. 실험시약내 내독소 존재 여부에 대한 검증결과

세포배양과 분리에 사용된 Ficoll-Hypaque 용액, 인산완충용액, 그리고 RPMI배지내의 내독소의 양은 각

각 1.25 ng/mL과 0.25 ng/mL로 측정이 되었으며, 시약회사로부터 구입한 IL-6, IL-1 β , TNF- α , anti-human IL-6, anti-human IL-1 β , anti-human TNF- α antibody내의 내독소 함유량은 10 ng/mL 이하로 되어 있어 본 실험에서는 10 ng/mL 이상의 농도로 실험을 하였기 때문에 오염된 내독소는 실험에 영향이 없었을 것으로 사료되었다.

2. 말초혈액단핵구의 IL-6 생성능

1×10^5 /mL의 말초혈액단핵구에서 시간에 따른 IL-6의 형성은 LPS 용량에 따라 차이가 있었다(Fig. 1). 100 μ g/mL과 10 μ g/mL의 LPS에서는 자극 1시간째부터 1209 pg/mL, 249 pg/mL의 IL-6를 형성하였으나 1 μ g/mL과 0.1 μ g/mL의 LPS에서는 자극 1시간째 19 pg/mL과 2 pg/mL의 IL-6의 조기형성은 LPS용량의존성을 보였다(Fig. 1, a). 자극 4시간 이후로는 100 μ g/mL의 LPS보다 10 μ g/mL LPS에 의하여 더 많은 양의 IL-6가 형성되며 (3754 pg/mL vs 5053 pg/mL, $p < 0.05$) 12시간째부터는 1 μ g/mL LPS가 100 μ g/mL LPS자극 때보다 더 많은 양의 IL-6를 형성하였다. (11237 pg/mL vs 7218 pg/mL, $p < 0.05$). LPS농도에 따라 100 μ g/mL의 고농도에서는 자극 후 4시간 이전의 IL-6가 많이 형성되며, 48시간까지 완만한 상승을 보이나 그 이후로는 변화가 없었던 반면 10 μ g/mL과 1 ng/mL의 LPS자극에의하여는 96시간까지 지속적으로 상승하였다. 0.1 μ g/mL의 LPS 자극에 의하여 48시간까지 IL-6의 분비가 증가되나 24시간째 10 μ g/mL의 LPS에 의해서 19.8 ng을 생성하였고, LPS 자극이 없는 상태의 자연생성능도 3.2 ng이었으며 그 후 96시간까지 변화 없이 일정하였다. LPS 농도 10 μ g/mL이 될 때까지 용량의존성으로 지속적인 증가를 보였다. 자연생성능에 대한 10 μ g/mL의 LPS 자극으로 형성된 IL-6형성의 비율은 24시간째 6.1배로 증가 된 후 96시간에까지 10배 증가하는 변화를 보였다(Fig. 1, b).

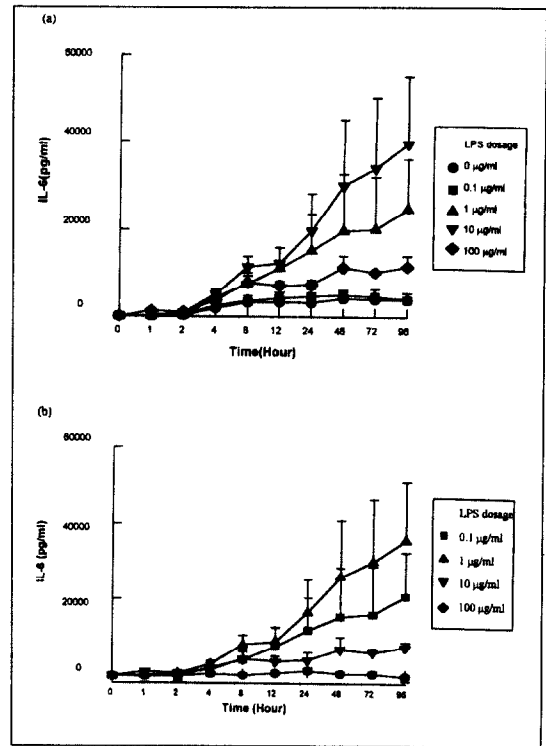


Fig. 1. The effect of LPS on IL-6 secretion by human PBMC(1×10^5 /ml) (a) Total amount of IL-6 secreted by PBMC (b) The level of LPS-induced IL-6 secretion.

3. 말초혈액단핵구의 tumor necrosis factor-alpha 생성

TNF- α 는 1×10^6 /mL의 말초혈액단핵구에 의해서 LPS 자극 4시간째부터 상승하기 시작하여 시간이 갈수록 생성량은 증가하여 24시간째에 0.38 ng/mL을 생성하였다 (Fig. 2, a). LPS 자극시 농도에 대한 10 μ g/mL까지 용량이 증가할수록 형성량이 증가하는 의존성을 보였으며 100 μ g/mL에서는 오히려 감소하였다. 10 μ g/mL의 농도에서 24시간째 4.1 ng/mL의 TNF- α 의 생성능을 보였다. 자연생성능에 의한 TNF- α 의 양을 뺀 LPS 자극에 의한 절대생성량은 LPS 10 μ g/mL에 의하여 3.7 ng/mL이었다. 자연생성능에 대한 10 μ g/mL의 LPS 자극으로 형

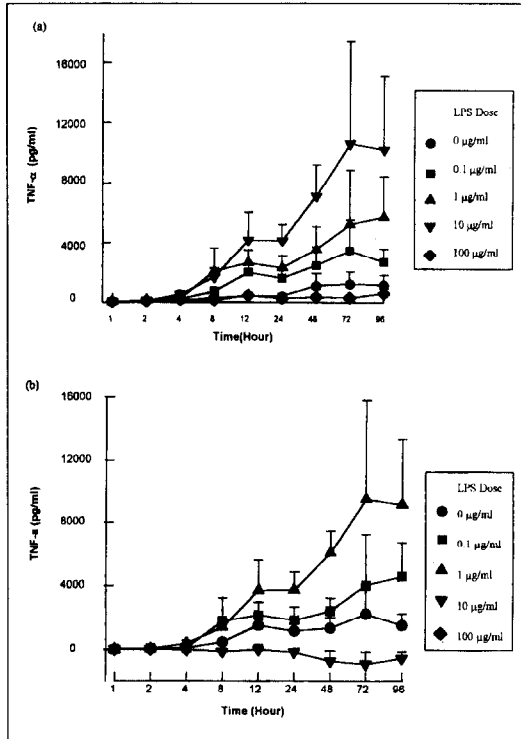


Fig. 2. The effect of LPS on TNF- α secretion by human PBMC(1×10^5 /ml) (a) Total amount of TNF- α secreted by PBMC (b) The level of LPS-induced TNF- α secretion.

성된 TNF- α 형성의 비율은 24시간째 67배로 증가된 후 72시간째 2334배로 증가하였다가 96시간에 다시 69배로 감소하는 변화를 보였다 (Fig. 2, b).

4. 말초혈액단핵구의 transforming growth factor-beta생성

2×10^6 /mL의 말초정맥단핵구의 LPS 자극에 따른 TGF- β 형성도 LPS 용량에 의존성을 보여 100 μ g/mL에서 최대로 형성되었다. 8시간째 일차로 TGF- β 의 형성이 증가 한후 12시간째는 오히려 감소하였다가 시간이 지남에 따라 다시 증가하여 2차로 96시간에 최대 형성을 보였다. 시간에 따른 자연생성능은 큰

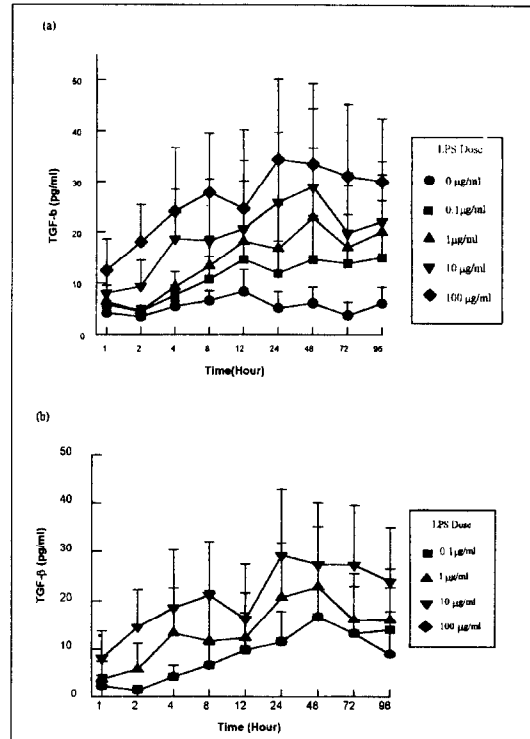


Fig. 3. The effect of LPS on TGF- α secretion by human PBMC(1×10^5 /ml) (a) Total amount of TGF- β secreted by PBMC (b) The level of LPS-induced TGF- β secretion.

변화가 없었으며 자연생성능에 대한 100 μ g/mL의 LPS 자극으로 형성된 TGF- β 형성의 비율은 24시간째 7.8배로 증가 된 후 다시 감소하였다가 72시간과 96시간에 각각 10.6배, 10.2배로 증가하여 LPS자극 시 이중반응을 보였다. 2×10^6 /mL의 말초혈액단핵구를 LPS 100 μ g 으로 24시간 자극시 34.4 pg/mL의 TGF- β 가 생성되었고 자연생성능은 5.2 pg/mL의 생성능을 보였다(Fig. 3).

5. 말초혈액단핵구의 IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 단백질 발현 결과

IL-1 β 의 경우 LPS 자극 후 단구세포에서 강한 염색



Fig. 4. Light microscopic findings of double immunohistochemical stain of peripheral blood mononuclear cells with interleukin-1 and CD 14
IL-1 β : Alkaline phosphatase-Naphtol phosphate/Fast red TR salt
CD14: Horse radish peroxidase-DAB brown, X400

을 보였으며 모든 단구세포에서 염색되는 것보다는 일부 단구세포에서 염색이 되었다. CD14를 중복염색 소견상 CD14에만 염색이 되는 단구세포와 CD14와 IL-1에 염색이 이중으로 관찰되어 단구세포의 성숙단계에 관계없이 염색됨을 알 수 있었다(Fig. 4). CD3 염색에 양성인 세포는 IL-1 염색은 음성소견을 보여 IL-1은 T림프구에서 형성되지 않음을 알 수 있었다. TNF- α 의 경우도 IL-1의 경우와 마찬가지로 단구세포에서 염색이 되었으며 (Fig. 5, A) 주로 세포질이 풍부하고 용적이 커진 단구세포에서 강하게 염색되는 양상을 보였고, LPS 자극에 의하여 유의하게 양성세포의 수가 증가됨을 알 수가 있었다 (Fig. 5, B). IL-6의 경우도 TNF- α 와 마찬가지로 단구세포에서 염색이 되었으며 주로 세포질이 풍부하고 용적이 커진 단구세포에서 강하게 염색이 되었고, LPS 자극에 의하여 유의하게 양성세포가 증가함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5, C). TGF- β 의 경우 세포질이 풍부한 단구세포보다 세포질이 작은 단구세포, 림프구에서 양성을 보였으며 LPS 자극에 따라 단구세포와 림프구의 양성반응의 증가가 관찰되었다 (Fig. 5, D).

6. 말초혈액단핵구의 IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β mRNA 발현

양성대조군으로 LPS로 자극된 U937 세포주를 이용하였다. LPS 자극 4시간후 IL-1 β 에 대한 anti-sense RNA-probe로 반응시킨 결과 세포질 내에 강한 양성반응을 보였고 sense probe를 이용한 경우 세포질 내 양성반응을 보이는 세포를 거의 관찰할 수 없어 양성대조세포로 LPS로 자극된 U937을 이용하였다 (Fig. 6, A, B). 말초혈액단핵구를 LPS 자극 6시간후에 단구세포의 세포질 내의 IL-1 β 의 anti-sense RNA probe에 대하여 강한 양성반응을 보이는 반면 LPS 자극이 없는 대조군에서는 약 양성반응만을 관찰할 수 있었다(Fig. 6, C). IL-6의 경우도 IL-1 β 와 마찬가지로 anti-sense RNA probe로 염색한 경우 세포질이 풍부한 단구세포의 세포질에서 주로 염색이 되었으며 sense-probe로 염색한 경우에는 단구세포의 세포질에서 약한 염색소견만을 관찰할 수 있었다. TNF- α 도 IL-6와 비슷한 소견을 보였으나 IL-1 β 나 IL-6보다 염색이 오히려 약하였으며, 양성세포는 주로 세포질이 풍부한 것으로 보아 단구세포로 사료되었다. TGF- β 의 경우 단구세포 외에도 세포질이 적은 림프구에서도 약하게 양성반응을 보여 림프구에서도 분비됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6, D).

고 찰

본 논문에서는 혈청이 없는 상태, 즉 LBP가 없어 CD14 비의존적 경로가 작용되는 조건에서, 말초혈액단핵구를 고농도의 내독소로 자극하였을 때 proinflammatory cytokine인 IL-6, IL-1, TNF- α 와 TGF- β 가 형성됨을 관찰하였다. 그리고 proinflammatory cytokine의 주된 형성세포가 단구세포이며, TGF- β 는 림프구에서도 일부 형성됨을 밝혔다. 종래의 많은 실험은 혈청의 존재 하에서 시행되었다. 즉 1 ng/mL 이하의 농도의 내독소로 대식세포를 자극시 IL-6, IL-1, TNF- α 가 형성되며 이는

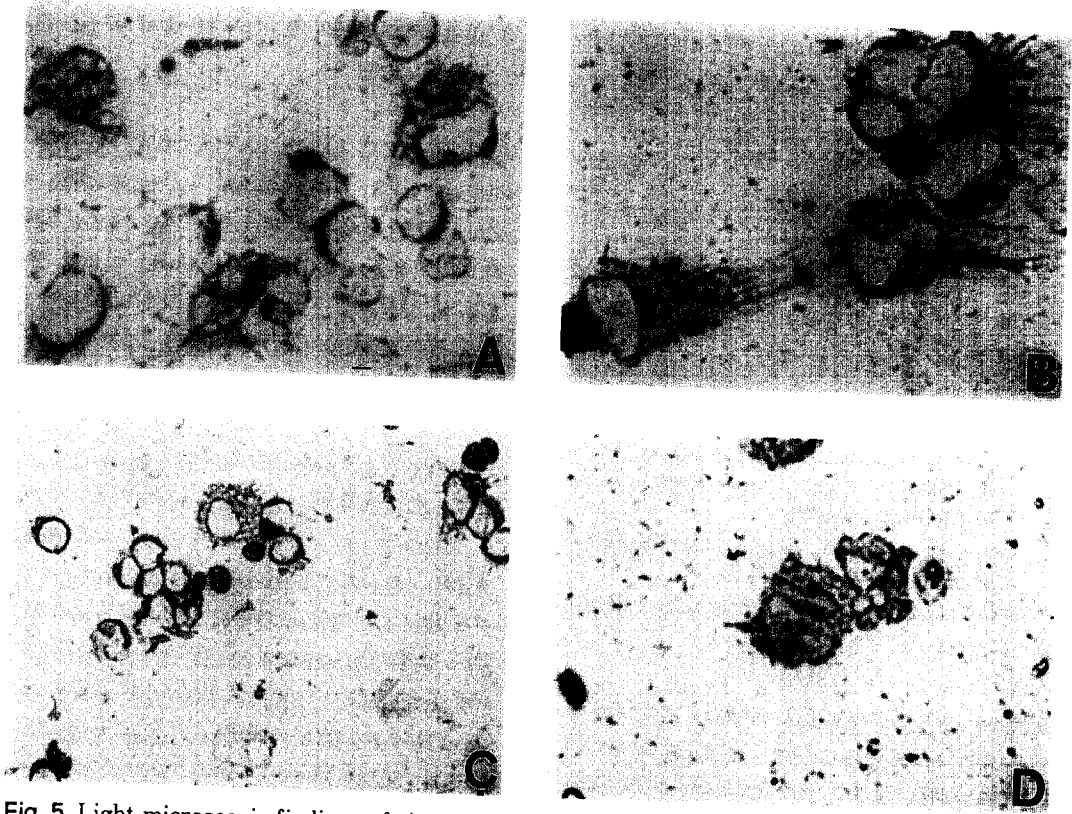


Fig. 5. Light microscopic findings of single immunohistochemical stains of peripheral blood mononuclear cells (Alkaline phosphatase-Naphtol phosphate/Fast TR salt)
 (a) TNF- α , stimulated with 0 μ g/ml of LPS, $\times 400$
 (b) TNF- α , stimulated with 100 μ g/ml of LPS, $\times 400$
 (c) IL-6, stimulated with 100 μ g/ml of LPS, $\times 200$
 (d) TGF- β , stimulated with 0 μ g/ml of LPS, $\times 400$

LBP와 CD14에 의하여 매개됨은 잘 알려진 현상이다^{10-16).}

LPS의 병태생리적 효과가 나타나는 기전의 하나는 대식세포에서 조기에 분비되는 TNF- α , IL-1 β 에 의한 것이다^{24).} LPS 정주 후 TNF- α 의 형성은 일시적이며, 조기에 나타난다. 1시간 안에 상승하며 4시간에 정상으로 환원되는 것으로 알려져 있다. IL-1 β 는 1시간 안에 상승하여 16시간 지속되는 것으로 알려져 있다. TNF mRNA는 15분 안에 상승하며 30분에 정점에 도달하며 60분이 되면 없어진다. IL-6단백의 경우 기도세척액내에서 3시간째 최대 상승되며, TNF- α

의 경우 6시간에 상승되어 조기에 분비되는 cytokine임을 의미한다^{25), 26)} 혈청의 존재 하에서 또는 생체로 투여한 후 IL-6, IL-1, TNF- α 의 형성이 주로 2시간에서 6시간 사이에 상승하였다가 12시간이 지나면 감소하는 소견과는 달리 우리 실험에서는 시간이 지난 후에도 지속적으로 상승하여 혈청이 있을 때와 없을 때의 차이가 있었다. 이 차이가 어디서 기원되는지는 알 수 없으나 혈청이 존재할 때 생기는 탈감작현상 즉 일차 자극된 대식세포는 같은 자극에 이차노출시 반응이 감소되는 현상²⁷⁾이 혈청이 없는 경우에는 관찰되지 않는 것으로 설명되어 진다.

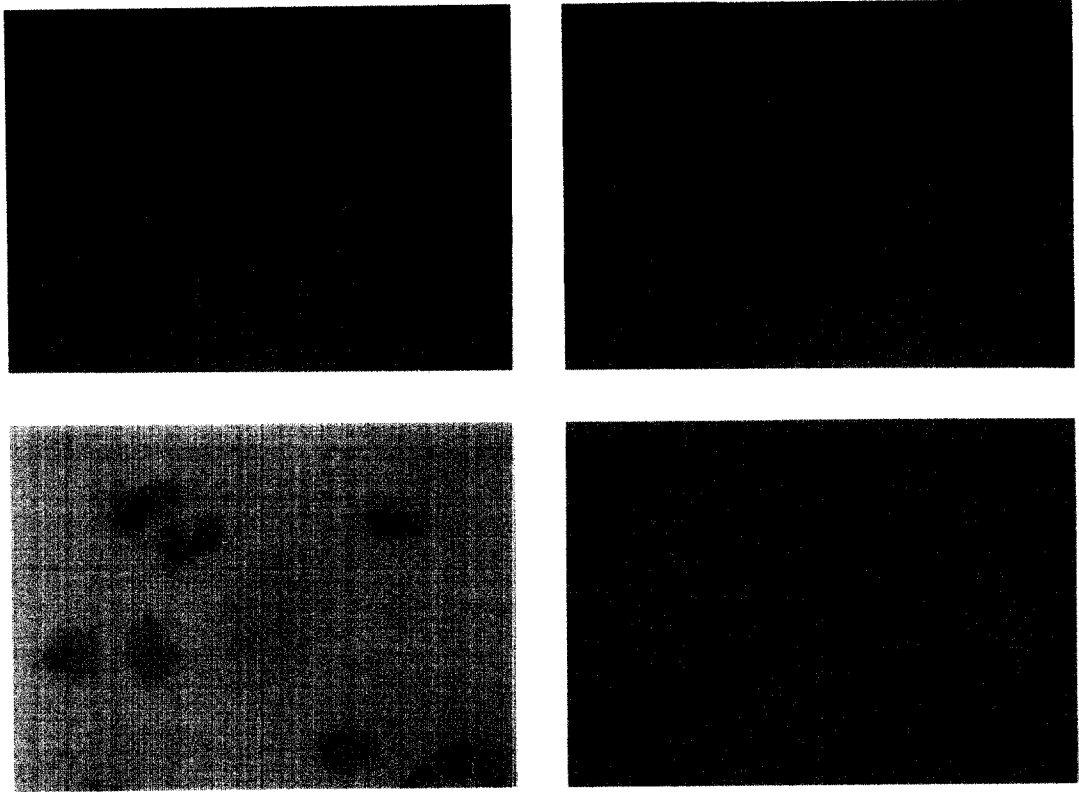


Fig. 6. Light microscopic findings of in situ hybridization. (Anti-Dig-Alkaline phosphatase-BCIP /NBT stain, X200)

- (a) u937 stimulated with 10 µg/ml of LPS, sense probe for IL-1β
- (b) U937 stimulated with 10 µg/ml of LPS, anti-sense probe for IL-1β
- (c) PBMC stimulated with 100 µg/ml of LPS, anti-sense probe for IL-1β
- (d) PBMC stimulated with 10 µg/ml of LPS, anti-sense probe for TGF-β

임상적으로 ARDS환자의 혈중내에서 IL-1β, TNF-α, IL-6의 농도가 상승됨은 잘 증명되어 있다²⁸⁾. 혈중 TNF-α의 양이 140 pg/mL 이상인 경우 사망하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾ 이런 TNF-α의 효과는 IL-1과 LPS에 의하여 증가되는 것으로 알려져 있으며, TNF-α 단독 보다는 다른 요인들이 같이 작용하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 폐혈증의 초기에 IL-6 (189 ng/mL)의 증가도 사망률과 밀접한 상관관계가 있어 TNF-α와 같이 작용하여 폐혈성 속에 관여되는 것으로 생각된다. TNF-α와 IL-6 분비는 TNF-α가 IL-6보다 선행되며 IL-6의 분비량은 TNF-α에 비하

여 1000배 이상 높은 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 IL-6의 형성 (1×10^5 말초혈액단핵구에 의하여 24시간째 19.8 ng)이 TNF-α (1×10^6 말초혈액단핵구에 의하여 24시간째 4.1 ng/mL의 TNF-α)의 형성비보다 50배 높았다.

본 실험에서는 LPS가 없는 무자극 상태에서 IL-6, TNF-α, TGF-β가 형성되는데 이는 우리가 사용한 배지에 오염된 LPS가 1.25 ng/mL이 됨으로 LPS를 외부에서 첨가하지않은 상태에서도 배지내에 내재된 LPS에 의하여 형성이 가능했으리라고 사료된다. 혈청이 없는 상태에서는 1 µg/mL이상의 농도에서

Table 1. Antibodies and dilutional amount in immunohistochemical stain

	company	dilutional amount
Monoclonal anti-II-1 β	R & D	5 μ g /mL
Monoclonal mouse anti-IL-6	Genzyme	25 μ g /mL
Monoclonal mouse anti-TNF- α	R & D	25 μ g /mL
Monoclonal rat anti-human CD3(leu4)	Becton-Dickison	원액의 1 : 10으로 희석
Monoclonal mouse anti-human CD14	DAKO	1.8 μ g /mL(1 : 20)

B. Secondary antibody

	Company	Dilutional amount
biotinylated polyclonal rabbit Ab anti-mouse Ig	Dakopatts Denmark	2.7 μ g /mL(1 : 200)

C. Tertiary antibody

	Company	Dilutional amount
Avidin conjugated alkaline phosphatase	Dakopatts	1 μ g /mL(1 : 200)
Streptavidin peroxidase	Zymed	2 μ g /mL(1 : 200)

Table 2. The nuclear sequence of primer using polymerase chain reaction

IL-1 β	up primer	5' -AAAAGC TTG GTG ATG TCTGG-3'	20mer
	down primer	5' -GGG GAT CCG GGC AGA CTC AAA TT-3'	23mer
IL-6	up primer	5' -GGA GCT TCC AAA CAT GGC TGA-3'	21mer
	down primer	5' -AGGATC CCA TGC TAC AAT TGC-3'	21mer
TNF- α	up primer	5' -TCA AGCTTA GGG GCA GCT CCA GRGG-3'	25mer
	down primer	5' -AAG GAT CCC AAA GTA GAC CTG-3'	21mer
TGF- β	up primer	5' -CAA AGC TTG AGC CGT GGA GGG GAA-3'	24mer
	down prime	5' -GTG GAT CCA CTT CCA GCC GA-3'	20mer

만 대식세포가 자극되나, 혈청이 있는 상태에서는 1 ng/mL의 농도만으로 자극된다¹⁴⁾. 이 농도는 폐혈중 환자의 혈중에서 발견되는 양이다³¹⁾. 즉 말초혈액단핵구의 분리과정중 아주 미량의 LBP가 함유되어 있으면서 배지내에 LPS가 오염되어 있다면 이는 충분한 단구세포에 자극 효과가 있게된다. 본 실험에서 관찰된 LPS 자극 없이도 IL-6, TNF- α , TGF- β 가 자연적으로 형성된 결과의 일부도 상기 서술한 미량의 LPS와 LBP의 존재에 의하여 CD14 의존적 경로를

통해 생겼을 가능성을 배제할 수는 없다. 간에서 생성되는 LBP는 LPS가 CD14와의 결합을 항진시킨다. 혈청이 LPS의 효과를 증폭시키는 혈청내에 LBP가 있기 때문인 것은 이미 잘 알려져 있다. 2% 우태아 혈청이 있을 때 무혈청 상태에 비하여 S-chemotype LPS에는 200-500배의 proinflammatory cytokine 형성의 증가가, R-chemotype LPS에는 5내지 10배의 증가가 관찰된다³²⁾. 이는 다시 말하면 LBP가 없는 조건에서도 LPS는 CD14와 결합하여 효과를

나타낼 수도 있다. 그러나 10 μ g/mL의 LPS로 자극시 TNF- α 형성이 CD14 항체로 억제되지 않는 것은 고농도 LPS자극의 세포내 신호전달과정은 LBP-CD14경로 외의 다른 경로를 이용하기 때문에 생기는 결과로 추정된다. 본 실험에서도 특히 IL-1 β 와 CD14의 이중 염색소전상 CD14 음성인 단구 세포에서 IL-1 β 가 발현되며 반대로 CD14 양성세포중 일부에서만 IL-1 β 가 염색되어 CD14의 존재는 고농도의 LPS 자극시 proinflammatory cytokine 형성에 필수적인 것은 아님을 알 수 있었다.

LPS 자극에 의한 세포내 신호전달과정은 여러 경로가 복잡하게 작동되는 것으로 알려져 있으나 비교적 공통적으로 작용하는 기전은 다음과 같다. Tyrosine kinase phosphorylation을 통하여 NF- κ B가 인산화되어 IL-6, TNF, IL-1 형성에 필요하다³⁹⁾. LPS는 TNF- α 가 분비되기 전에 핵주위에 일시적으로 축적되며 그 다음 단계로 세포표면에 발현되는 것으로 알려져 있다. 핵주위의 발현은 20분에서 발현되며 40분에 최대치가 되고 120분에 소실되는 것으로 되어있다. 그러나 세포표면의 TNF- α 발현은 90분에서 나타나기 시작하여 24시간까지 서서히 증가하는 것으로 보아 TNF- α 는 활성화된 단구에서는 transmembrane의 형태로 존재하는 것으로 추정된다³⁴⁾.

면역형광염색을 이용한 시간에 따른 cytokine 단백질 발현 실험에서 TNF- α 는 LPS 자극 후 15분에서 60분 안에 거의 모든 단구세포가 양성을 보인다^{35), 36)}. IL-6는 1.6시간에 나타나기 시작하여 3시간에 최대가 된다. Polyclonal T cell 자극제인 staphylococcal enterotoxin이나 CD3로 자극시 6시간에 일차로 상승되었다가, 48시간에 다시 상승하게 된다. 상기 현상은 TNF- α 에서도 동일하게 관찰된다. m-RNA 발현은 LPS자극 후 말초혈액단핵구에서 4시간에 최대가 되나 PMA나 PHA자극시는 8시간에 최대치가 된다.

이처럼 IL-1, IL-6, TNF- α 의 proinflammatory cytokine은 LPS 자극 후의 경로가 비교적 자세히 규명되어 있으나 TGF- β 형성에 관한 것은 별로 밝혀져

있지 않다. 즉 LPS에 의한 TGF- β 형성은 LPS-CD14-TGF- β 형성의 경로인지 또는 LPS-CD14-TNF- β 형성의 경로인지는 아직 규명이 되어 있지 않은 현상으로 향후 규명되어야 할 과제이다.

요 약

연구배경 :

내독소는 생체 내에서 단구와 내피세포⁴⁰⁾에 강한 자극을 주나 호중구, 림프구⁴¹⁾, 호염기구⁴²⁾, 섬유모세포⁴³⁾ 등 여러 세포에도 자극효과가 있어 염증반응이 시작된다. 그중 대식세포는 내독소의 자극을 받아 활성화되면 interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 분비하여 조직손상을 일으킨다. 내독소의 작용기전은 CD14의존성 경로와 비의존성 경로의 두 개로 나뉘어진다. 체내로 들어온 내독소는 혈청 내에서 내독소 운반에 관여하는 LPS-binding protein (LBP)과 결합하여 혈중내에서 세포와 결합되거나 조직으로 이동되어 조직내 세포와 결합하게 된다. 그러나 고농도의 LPS는 CD14항원에 비의존적으로 대식세포를 자극할 수 있는 것으로 알려져 있다. 현재까지 LPS자극에 의한 대식세포의 CD14 항원 의존성 IL-1, IL-6, TNF- α 의 형성과정은 많이 밝혀져 있으나, 내독소에 의한 TGF- β 의 형성 여부는 밝혀져 있지 않으며, CD14 항원 비의존성으로 IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β 가 형성되는 과정도 별로 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 혈청이 없는 상태(LBP가 없는 상태)에서, 즉 LPS 자극시 LBP-CD14비의존성으로 말초혈액단핵구에서 형성된 proinflammatory cytokines인 IL-1, IL-6, TNF- α 와 섬유화 cytokine인 TGF- β 의 생성유무를 규명하고자 하였다.

방 법 :

정상인의 헤파린 처리된 말초혈액정맥혈을 비중 1.077의 Ficoll-Hypaque 용액 위에 중침시킨 후 500g에서 30분간 원심분리하여 말초혈액단핵구를 얻었다. 분리된 말초혈액단핵구를 우태아혈청이 없는

RPMI에 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 보온기에서 0.1 µg, 1 µg, 10 µg, 100 µg/mL의 LPS와 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48시간 혼합 배양 후 상층액을 분리하여 IL-6, TNF-α, TGF-β의 측정 cytokines의 양을 bioassay로 측정하였다. 세포층은 slide에 고정시킨 후 단 클론 항체를 이용한 이중 면역조직화염색법과 RNA probe를 이용한 in situ hybridization에 이용하였다.

결 과 :

실험시약내 내독소 존재 여부에 대한 검증결과 내독소 함유량은 10 ng/mL 이하로 되어 있어 본 실험에서는 10 ng/mL 이상의 농도로 실험을 하였기 때문에 오염된 내독소는 실험에 영향이 없었을 것으로 사료되었다.

말초혈액단핵구에서 LPS 자극에 의하여 IL-6는 1시간째부터 형성되기 시작하였으며 96시간까지 지속적으로 상승하였고 LPS용량의존성으로 형성됨을 알 수 있었다. TNF-α는 LPS 자극 4시간째부터 상승하기 시작하여 시간이 갈수록 생성량은 증가하며 72시간째까지 지속적으로 형성되었다. TGF-β형성도 LPS 용량에 의존성을 보이며 8시간째 일차로 TGF-β의 형성이 증가 한 후 12시간째는 오히려 감소하였다가 시간이 지남에 따라 다시 증가하여 2차로 96시간에 최대 형성을 보였다. 각각 cytokine의 24시간째 생성량은 IL-6의 경우 1×10^5 /mL의 말초혈액단핵구에서 10 µg/mL의 LPS에 의해서 19.8 ng이 생성되었고 LPS 자극이 없는 상태의 자연생성능도 3.2 ng이었으며, 1×10^6 /mL의 말초혈액단핵구에 의해서 자연 생성량은 증가하여 24시간째에 0.38 ng/mL, 10 µg/mL의 농도에서 24시간째 4.1 ng/mL의 TNF-α의 생성능을 보였다. TGF-β의 경우 2×10^6 /mL의 말초혈액단핵구에 의하여 34.4 pg/mL가 생성되었고 자연생성능은 5.2 pg/mL의 생성능을 보였다.

말초혈액단핵구의 IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β 단백질과 m-RNA 발현 IL-1β, IL-6, TNF-α단백은 주로 단구세포에서, TGF-β 단백질은 단구세포와 림프

구에서 발현되었으며, CD14항원 발현과는 상관이 없었다. TNF-α, IL-1β, IL-6, TGF-β m-RNA 양성 세포는 주로 세포질이 풍부한 것으로 보아 단구세포로 사료되었다. TGF-β의 경우 단구세포외에도 세포질이 적은 림프구에서도 약하게 양성반응을 보여 림프구에서도 분비될 가능성을 보여 주었다.

결 론 :

내독소로 말초혈액 단핵구를 자극시 IL-6, TNF-α는 초기에 분비되기 시작하며 TGF-β는 후기에 분비되기 시작하여 96시간까지 지속적으로 분비된다. 주 분비세포는 IL-1β, IL-6, TNF-α의 경우 단구세포가 되며 TGF-β도 단구세포가 주세포가 되나 림프구도 분비에 관여한다.

참 고 문 헌

1. Morrison DC, Ryan JL : Endotoxins and disease mechanisms. In. Annual Review of Medicine. Palo Alto, CA : W.P. Creger Annual Reviews : 417-432, 1987
2. Strieter RM, Lynch JP, Basha MA, Standiford TJ, Kasahara K, Kunkel SL : Host responses in mediating sepsis and adult respiratory distress syndrom. Semin Respir Infect 5 : 233-247, 1990
3. Reitschel ETh, Brade H. : Bacterial endotoxins. Sci Am 267 : 54-61, 1992
4. Schlag G, Redl H, Halsrom S. : The cell in shock; the origin of multiple organ failure, Resuscitation 21 : 137-180, 1991
5. Morrison DC, ulevich R.J. : The effects of bacterial endotoxin on host mediation systems. Am J Pathol 93 : 527-617, 1976
6. Smith T, Alveolet M, Morrison DC. : The effect of bacterial lipopolysaccharide on histamine release from human basophils. I. Enhancement of immunologic release by S. minnesota R 595 LPS. Clin Immunol Immunopathol 34 : 355-365, 1985

7. Watanabe A, Takeshita A, Kitano S, Hanazawa S : CD14-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infect Immun* : 4488-4494, 1996
8. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, Murray JF. : Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock; mortality rate, incidence of adult respiratory syndrome, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis* 141 : 94-97, 293-164-166, 167, 166, 169, 1990
9. Anna-Luise AK : Chapter 2, Acute Lung Injury Patterns : Diffuse alveolar damage and bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia, Virginia AL, Katzenstein and Askin's Surgical Pathology of Non-Neoplastic Lung Disease, 3rd ed., p14, Philadelphia, W.B. Saunders company, 1997
10. Morrison DC, Lei MG, Kirikae T, Chen TY. : Endotoxin receptors on mammalian cells. *Immunobiology* 1993 in press.
11. Lei MG, Morrison DC. : Specific lipopoly-saccharide binding protein on murine splenocytes. I. Detection of LPS binding sites on splenocytes and splenocyte subpopulation. *J Immunol* 141 : 996-1005, 1988
12. Lei MG, Stimpson SA, Morrison DC. : Specific lipopolysaccharide binding protein on murine splenocytes. III. Binding specificity and characterization. *J Immunol* 147 : 1925-1932, 1991
13. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, ulevich RJ, Mathison JC. : CD14, A receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249 : 1431-33, 1990
14. Desch CE, Kovach NL, Present W, Broyles C, Harlan JM. : Production of human tumor necrosis factor from whole blood ex vivo. *Lymphokine Res* 8 : 141-146, 1989
15. Kirikae T, Kirikae F, Morrison DC. : Serum - dependent enhancement of S-form lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production by macrophage-like J774.1 cell. in preparation
16. Pugin J, Schuler-Maly CC, Leturco D, Moriaty A, ulevitch RJ, Tobias PS. : Soluble CD14 and LPS binding protein mediate epithelial cell responses to LPS. *FACEP J* 7 : A142, 1993
17. Lee JD, Kato K, Tobias PS, Kirkland TN, ulevich RJ. : Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J Exp Med* 175 : 1697-1705, 1992
18. RA Bowman, AS Medley, KT Karthigasu : Limulus amoebocyte lysate assay in the diagnosis of peritonitis in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis, *J Clin Pathol* 45 : 72-74, 1992
19. Wang AM, Creasey AA, Landner MB, Lin LS, Striker J, Van Arsdell JN, Yamamoto R, Mark DF : Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 228 : 149-154, 1985
20. Aarden LA, De Groot ER, Schaap OL, Landop PM. : Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* 117 : 1411-1416, 1987
21. Like B, Massague J : The antiproliferative effect of type beta transforming growth factor occurs at a level distal from receptor for growth-activating factors. *J Biol Chem* 261 : 13426-13429, 1986
22. Polak JM, Van Noorden S : Immunocytochemistry : Practical applications in pathology and biology, John Wright PSG, Littleton, Mass

23. Kessler C, Holtke HJ, Scible R, Burg J, Muhlegger K. : Non-radioactive labelling and detection of nucleic acids : I. A novel DNA labelling and detection system based on digoxigenin:anti-digoxin ELISA principle. *Mo Gen Hoppe-Seyer* 371 : 917-27, 1990
26. 문승혁, 오제호, 박성우, 남궁은경, 기신영, 임건일, 정성환, 김현태, 어수택, 김용훈, 박춘식, 진병원 : 시간별 내독소 정맥주입으로 유발된 급성폐손상의 변화양상에 대한 고찰. *결핵 및 호흡기 질환* 44 : 360-378, 1997
28. Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Metz CA, Murray JF. : Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock ; mortality rate, incidence of adult respiratory syndrom, and effects of methylprednisolone administration. *Am Rev Respir Dis* 141 : 94-97, 293-164-166, 167, 166, 169, 1990
29. Waage A, Halstensen A, Espevik T. : Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*, I : 355, 1987
30. Waage A, Espevik T. : Interleukin-1 potentiates the lethal effect of TNF- α /cachectin in mice. *J Exp Med* 167. 1987
31. Parsons PE, Worthen GS, Moore EE, Tate RM, Henson PM. : The association of circulating endotoxin with the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 140 : 294-301, 1989
32. Kieikae T, Lei MG, Chen TY, Morrison DC. : Interactions of endotoxin with membranes and membrane receptors. in *Endotoxin and the lungs* ed by Brigham KL, New York, marcel Dekker, 1994
33. Hu JYQ, McCall CE : Protein-tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of interleukin 1 β and NF κ B activation, but not NF κ B nuclear translocation. *J Biol Chem* 271 : 18306-18309, 1996
34. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A : Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis : Mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232 : 977-980, 1986
35. Hofsl E, Bakke O, Nonstad U, Espevik T. : A flow cytometric and immunofluorescence microscopic study of tumor necrosis factor production and localization in human monocytes. *Cell Immunol* 122 : 405-415, 1989
36. Andersson U, Matsuda T. : Human interleukin-6 and tumor necrosis factor α production studied at a single-cell level. *Eu J Immunol* 19 : 1157-60, 1989