

□ 원 저 □

내독소에 의한 말초혈액 단핵구의 IL-8 및 IL-1 β 유전자 발현에서 산소기 역할에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵 연구소

강민종 · 김재열 · 박재석 · 이승준 · 유철규 · 김영환 · 한성구 · 심영수

= Abstract =

Role of Oxygen Free Radical in the Expression of Interleukin-8 and Interleukin-1 β Gene in Mononuclear Phagocytic Cells

Min-Jong Kang, M.D., Jae Yeol Kim, M.D., Jae Seok Park, M.D., Seung Joon Lee, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D. and Young-Soo Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background: Oxygen free radicals have generally been considered as cytotoxic agents. On the other hand, recent results suggest that small nontoxic amounts of these radicals may act a role in intracellular signal transduction pathway and many efforts to reveal the role of these radicals as secondary messengers have been made. It is evident that the oxygen radicals are released by various cell types in response to extracellular stimuli including LPS, TNF, IL-1 and phorbol esters, all of which translocate the transcription factor NF κ B from cytoplasm to nucleus by releasing an inhibitory protein subunit, I κ B. Activation of NF κ B is mimicked by exposure to mild oxidant stress, and inhibited by agents that remove oxygen radicals. It means the cytoplasmic form of the inducible transcription factor NF κ B might provide a physiologically important target for oxygen radicals. At the same time, it is well known that LPS induces the release of oxygen radicals in neutrophil with the activation of NF κ B. From above facts, we can assume the expression of IL-8 and IL-1 β gene by LPS stimulation may occur through the activation of NF κ B, which is mediated through the release of I κ B by increasing amounts of oxygen radicals. But definitive evidence is lacking about the role of oxygen free radicals in the expression of IL-8 and IL-1 β gene in mononuclear phagocytic cells. We conducted a study to determine whether oxygen radicals act a role in the expression of IL-8 and IL-1 β gene in mononuclear phagocytic cells.

Method: Human peripheral blood monocytes were isolated from healthy volunteers. Time and dose relationship of H₂O₂-induced IL-8 and IL-1 β mRNA expression was observed by Northern

본 논문은 1995년도 서울대학교병원 지정 연구비의 보조로 이루어진 것임.

blot analysis. To evaluate the role of oxygen radicals in the expression of IL-8 and IL-1 β mRNA by LPS stimulation, pretreatment of various antioxidants including PDTC, TMTU, NAC, ME, Desferrioxamine were done and Northern blot analysis for IL-8 and IL-1 β mRNA was performed.

Results: In PBMC, dose and time dependent expression of IL-8 and IL-1 β mRNA by exogenous H₂O₂ was not observed. But various antioxidants suppressed the expression of LPS-induced IL-8 and IL-1 β mRNA expression of PBMC and the suppressive activity was most prominent when the pretreatment was done with TMTU.

Conclusion: Oxygen free radical may have some role in the expression of IL-8 and IL-1 β mRNA of PBMC but that radical might not be H₂O₂.

Key Words: Oxygen Free Radical, Secondary messenger, IL-8, IL-1 β , PBMC, LPS, Antioxidant

서 론

모든 생명체는 변화하는 외부환경에 적응하기 위하여 외부자극에 대하여 적절하게 반응할 수 있는 능력을 가지고 있으며, 이는 생명체의 생존 및 성장, 발달에 있어 가장 근본적인 것이다. 외부자극에 대한 생명체의 반응양식은 여러가지가 있을 수 있는데, 그중 가장 흔하고 중요한 반응양식이 특정 유전자의 발현을 억제하거나 혹은 증가시킴으로써 변화에 대처하는 것이라 할 수 있을 것이다¹⁾. 이러한 외부신호에 의한 유전자 발현의 조절양식중, 가장 흔한 방식은 바로 유전자 발현의 특정조절부위를 인지하는 전사인자(transcription factor)를 조절함으로써 이루어지게 되는데, 그 기본적인 작동원리는 개체에 가해진 외부신호가 세포내의 단백질 활성화효소(protein kinase)를 활성화 시키고 이 효소에 의해 전사인자의 활성이 이루어지는 과정을 거치는 것이라 할 수 있다. 이러한 전사인자는 DNA의 특정 염기 서열을 인지하여 결합하게 되는데(sequence-specific binding), 이 부위는 유전자의 promotor나 enhancer 역할을 하는 부위으로써 특정유전자의 mRNA 합성을 촉진하게 된다²⁾. 지금까지 여러 전사인자들이 알려져 있는바 이러한 전사인자중, 처음 발견당시에는 κ light chain immunoglobulin gene의 enhancer element에 결합하는 B림프구에 특이한 전사인자로서 알려진 NF κ B는³⁾, 그후 여러 연구를 통해 B림프구뿐만이 아니라 다른 여러 세포에서도 발견되었으며, 또한 이

전사인자에 의해 유도되는 단백질의 기능이 세포의 염증반응이나 면역반응에서 중요한 역할을 하는 cytokine이나 혹은 그 수용체임이 밝혀지면서, 아마도 NF κ B는 체내의 염증반응이나 면역반응에서 중요한 역할을 하지 않을까 생각하게 되었다. 한편 예전부터 과립구와 같은 염증세포에서 생긴 과량의 산소기가 세포독성작용을 나타낸다는 것이 알려지면서부터 산소기의 세포독성작용에 관한 많은 연구가 이루어 졌고, 이러한 과량의 산소기에 의한 세포독성이 염증반응에서의 중요한 개체손상의 기전으로서 이해되어져 왔다. 하지만 최근 들어서는 산소기가 정상적으로도 세포 대사 과정인 전자전달계의 부산물로서 항상 만들어지는 것으로 알려졌고, NF κ B를 활성화 시키는 외부자극으로 알려졌던 TNF- α , IL-1, dsDNA, LPS, Phorbol esters, UV light등에 의해 세포내의 산소기가 증가한다는 것이 알려지고^{4,5)}, 바로 이러한 세포내 산소기 농도의 증가가 NF κ B의 활성에 관여할 것이라는 실험결과들이 알려지면서 세포내 신호 전달과정에서의 산소기(oxygen free radical)의 2차전령(secondary messenger)으로서의 역할에 많은 관심이 모아지고 있다^{6~8)}. 또한 다른 실험결과로 IL-8 유전자는 5' flanking promotor region에 NF κ B-like motif가 있어서 핵내 NF κ B activity의 증가로 IL-8 유전자의 전사가 증가되는 것으로 알려져 있고, 또한 내독소는 핵내의 NF κ B activity의 증가와 함께 호중구에서의 산소기 분비를 증가시킴이 잘 알려져 있다^{9,10)}. 이러한 실험적 사실로부터 내독소에 의한 IL-8 유전자의 발현은 세포내에서 생성된 산소기에 의해 NF

α B가 활성화되고 이로 인해 IL-8 유전자의 전사가 증가될 것이라고 가정할 수 있을 것이다. 하지만 내독소 자극에 의한 말초혈액 단핵구에서의 IL-8 및 IL-1 β 유전자 발현의 증가에 산소기가 관여한다는 구체적인 증거는 아직 미비한 실정이다. 이에 저자들은 이러한 가설검정의 첫번째 단계로써 체내 염증반응에서 중요한 역할을 하는 말초혈액 단핵구의 IL-8 및 IL-1 β 유전자 발현에 세포내의 산소기가 관여하는지의 여부를 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 말초혈액 단핵구의 분리

말초혈액 단핵세포를 분리하기 위하여 heparin으로 처리한 주사기로 정상인 자원자에서 약 100ml의 정맥혈을 채취하였다. 혈액을 생리적 식염수와 1:1의 비율로 섞은 뒤 Ficoll-Hypaque 용액위에 살짝 얹은 후 1,500 \times g에서 30분간 원심분리하여 Density- gradient 방법으로 단핵세포층을 얻었다. 이를 배양액에 재부양시키고 2~3회 씻어준 다음 1×10^6 개/ml로 세포수를 조정하여 같은 양을 60mm배양접시에 분주한 후 1시간 동안 배양하여 단핵세포를 배양접시에 부착시키고 상층액을 제거하여 림프구로부터 단핵세포를 분리하였다.

2. 실험 조건

외부에서 투여한 산소기의 농도에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현의 관계여부를 평가하기 위해 세포배양액에 각각 H₂O₂를 0, 10, 100, 300, 1,000 μ M/L의 농도로 첨가하고, 6시간이 경과한 후 IL-8과 IL-1 β 에 대한 Northern blot analysis를 시행하였다. 한편 외부에서 산소기를 투여하였을 때 시간에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현 여부를 평가하고자 H₂O₂를 100 μ M/L의 농도로 투여하고 0, 2, 4, 6, 8, 24시간이 경과한 후 Northern blot analysis를 시행하였다. 항산화제가 내독소에 의한 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Tetramethylthiourea(TMTU, 10 mM/L) 1시간, Pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC, 100 μ M/L) 1시간, N-acetyl-L-cystein(NAC, 10mM/L) 2.5시간, 2-mercaptoethanol(ME, 10mM/L) 2.5시간,

Desferrioxamine(100mM/L) 15시간 동안 전처리 한 다음 내독소를 투여하여 4시간이 경과한 후 IL-8 및 IL-1 β 에 대한 Northern blot analysis를 시행하였다. 이때 각각의 항산화제로 전처리한 후 RNA를 추출하기 직전에도 다시 한 번 inverted microscope로 배양접시를 살펴보고 말초혈액 단핵구가 상층부로 부유되지 않고 바닥에 잘 붙어 있으며, 그 수가 처음과 변하지 않았음을 확인함으로써 항산화제에 의한 직접 독성의 가능성을 배제하였다.

3. Northern Blot Analysis

Chomezynski와 Sacchi의 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출법¹¹⁾을 이용하여 총 RNA를 추출한 뒤 이를 정량화하고 동량의 RNA를 formaldehyde를 함유하는 1.2% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 분리시켰다. 전기영동후 28S와 18S rRNA band의 정도로 동량의 RNA loading 여부를 관찰하였다. 전기영동한 gel의 RNA를 nylon membrane으로 transfer시키고 RNA가 transfer된 membrane을 ultraviolet 광선을 이용한 cross-linking을 시행하여 RNA를 membrane에 고정시켰다. Prehybridization후 65 $^{\circ}$ C에서 32P로 labling한 사람의 IL-8 cDNA 및 쥐의 IL-1 β cDNA를 포지자로 이용하여 hybridization을 시행하였다. IL-8 cDNA는 미국 NIH의 Dr. Crystal에게서 기증받았다. cDNA의 labeling은 Random primed DNA labling Kit(영국 Amersham Life science 회사 제품)를 이용하였다. Hybridization을 시행한 후 nylon membrane을 intensifying screen이 들어있는 X-ray film cassette에 넣고 영하 70 $^{\circ}$ C에서 1~2일간 autoradiography를 시행하고 laser densitometry로 정량하였다.

결 과

1. 산소기 농도에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현양상

외부에서 투여한 산소기의 농도에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA의 발현양상을 평가하기 위해 세포배양액에 H₂O₂를 0, 10, 100, 300, 1000 μ M/L의 농도로 첨가하고, 6시간이 경과한 후 Northern blot analysis를 시행

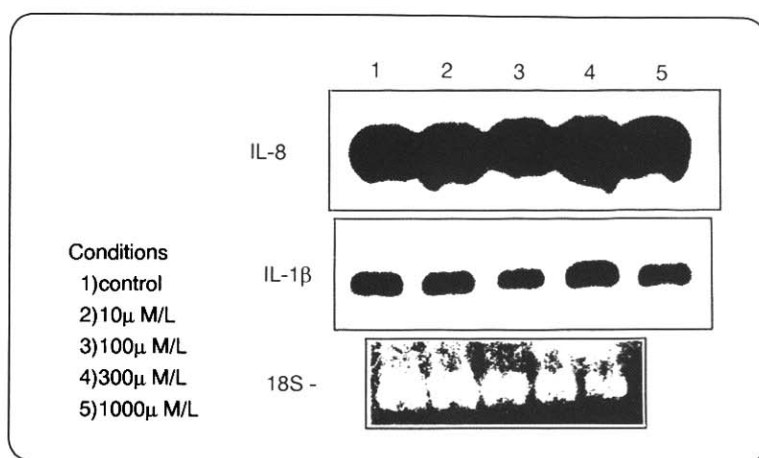


Fig. 1. Dose response of IL-8 & IL-1 β mRNA expression by H₂O₂ stimulation.

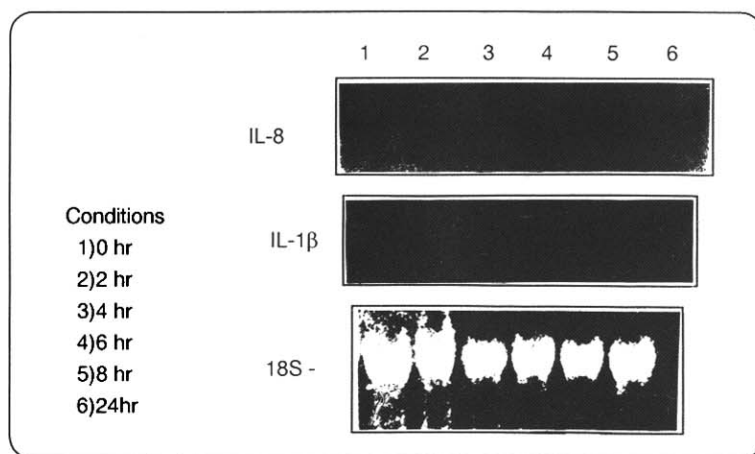


Fig. 2. Time response of IL-8 & IL-1 β mRNA expression by H₂O₂ stimulation.

하였는데 산소기의 농도증가에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현의 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 1)

2. 산소기 투여후 시간에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현 양상

산소기 투여후의 시간에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA의 발현여부를 평가하고자 H₂O₂를 100 μ M/L의 농도로 투여하고 0, 2, 4, 6, 8, 24시간이 경과한 후 Northern blot analysis를 시행하였는데, 시간 경과에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

3. 여러 항산화제가 내독소에 의한 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현에 미치는 영향

TMTU(10mM/L) 1시간, PDTC(100 μ M/L) 1시간, NAC(10mM/L) 2.5시간, ME(10mM/L) 2.5시간, Desferrioxamine(100mM/L) 15시간의 조건으로 여러 항산화제를 전처리 한 다음 내독소를 투여하여 4시간이 경과한 후 IL-8 및 IL-1 β 에 대한 Northern blot analysis를 시행하였는데, 항산화제의 전처리에 의해 IL-8 및 IL-1 β mRNA의 발현이 부분적으로 억제됨을 관찰할

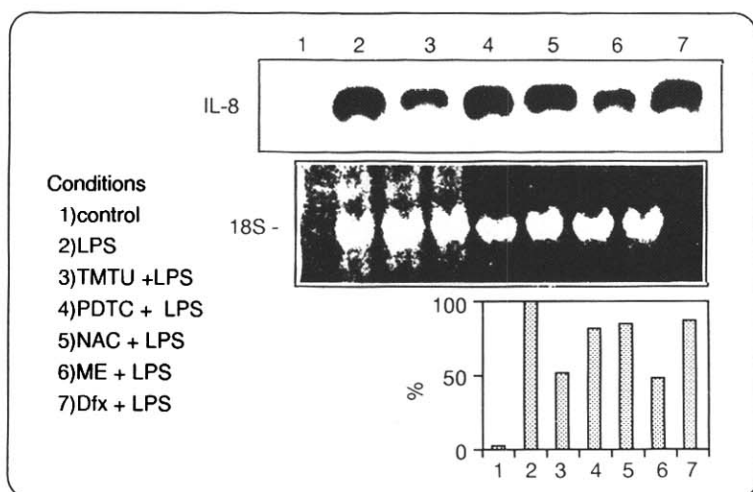


Fig. 3. Suppression of IL-8 mRNA expression by various antioxidants.

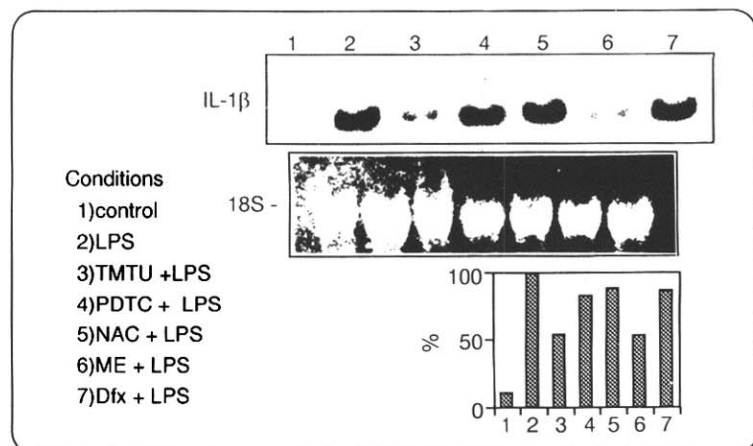


Fig. 4. Suppression of IL-1 β mRNA expression by various antioxidants.

수 있었고 특히 TMTU에서 그 억제효과가 가장 현저하였다(Fig. 3, 4).

고 찰

예전부터 과량의 산소기가 세포독성을 보이는 것은 잘 알려져 있는데 급성염증이나 만성염증시에 과립구를 비롯한 염증세포에서 산소기의 생성이 증가되어 이

에 의해 조직파괴가 일어나는 것이 그 대표적인 예라 할 수 있을 것이며^{12~14)}, 과량의 산소기는 단백질 파괴, 단백질 분해, DNA분절화, 지방질 산화 등의 다양한 세포파괴 기전을 통해 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 하지만 산소기는 병적 조건하에서 과량이 생성됨으로써 세포독성에 관여하는 것 뿐만이 아니라 정상적인 세포대사과정에서 전자전달계(electron transfer system)의 부산물로써 항상 만들어지는 것으로 알려져

으며¹⁵⁾, 최근에는 산소기가 세포내의 신호전달과정에 2차 전령으로써 중요하게 역할을 할 것이라는 실험 결과들이 제시되면서 2차 전령으로써의 산소기의 역할에 대해 많은 관심이 모아지고 있다. 과립구나 대식세포에 존재하는 세포막 효소인 NADPH oxidase는 protein kinase C(PKC)의 조절하에서 NADPH와 O₂를 기질로 이용하여 O₂⁻(superoxide radical)를 생성한다는 것이 알려졌는데, 즉 phorbol ester PMA와 같이 PKC를 활성화시키는 외부자극을 가했을때 과립구나 대식세포에서 산소기의 생성이 증가하는 것이 그 예이다¹⁶⁾. 또한 체내의 염증반응이나 면역반응에서 중요한 역할을 하는 TNF나 IL-1 등의 자극에 의해서도 세포내의 O₂⁻ 및 H₂O₂ 생성이 증가함이 확인되었다¹⁷⁾. 이처럼 외부자극에 의해 그 농도가 증가한다는 사실은 적어도 2차 전령의 조건중의 중요한 한가지를 충족시킨다고 할 수 있을 것이다. 더불어 세포내의 중요한 전사인자인 NFκB가 산소기에 의해 활성화된다는 것이 알려지면서 2차 전령으로써의 산소기의 역할에 대한 보다 직접적인 증거들이 제시되었다. 즉 다른 여러 전사인자들과는 달리 NFκB는 핵내에 존재하지 않고 세포질내에 존재하면서^{8,9)}, 기저상태에서는 DNA와의 결합이 억제되어 있고^{4,18)}, 세포내의 산소기의 생성을 증가시키는 TNF, IL-1, PMA 등은 또한 NFκB를 활성화시키는 것이 확인되었다. 그동안 알려졌던 바에 의하면 PMA는 PKC를 활성화 시킴으로써 세포에 영향을 미치고 TNF는 G단백질을, IL-1은 cAMP나 phosphatidylcholine 계를 통해 작동하는 것으로 생각되어져 왔다. 이들 3가지 물질이 공통의 2차전령 전달체계를 갖지 않는다는 점을 고려해볼 때 이런 실험결과와는 뜻밖이었고, 따라서 새로운 공통의 2차 전령 전달체계를 가정하는 계기가 되었다고 할 수 있다. 이후 Staal 등은 PMA와 TNF에 의한 NFκB의 활성이 항산화제인 NAC에 의해 억제됨을 밝힘으로써 산소기가 NFκB의 활성화에 관여할 것이라는 것을 시사하였다¹⁹⁾. 또한 좀더 직접적으로 T림프구 세포주에 H₂O₂를 처리하였을 때 NFκB가 활성화된다는 실험결과가 발표되기도 하였다²⁰⁾. 이상의 일련의 실험결과들이 점차 축적되면서 세포내의 산소기가 2차전령으로써 작용하여 세포내의 중요한 전사인자인 NFκB를 활성화 시킬 것이라는 가설

은 그 구체적인 실득력을 갖게 되었다고 할 수 있을 것인데, 1992년 Shreck 등은 그 증거들을 아래와 같이;

1) 저농도의 hydrogen peroxide에 의해 NFκB가 활성화 되는데 이는 post-translational activation에 의한다.

2) TNF, IL-1, Phorbol ester, LPS, UV light 등의 많은 물질이 NFκB를 활성화시키는데, 이들 물질들에 의해 또한 세포내의 oxidative stress가 유도된다.

3) NFκB의 활성화에 관여하는 여러 자극이 다양한 종류의 항산화제에 의해 차단된다.

의 3가지로 요약할 수 있을 것이라고 고찰한바 있다^{7,8)}.

한편 유 등은 내독소에 의한 말초혈액 단핵구에서의 IL-8 유전자의 발현 및 IL-8 단백질비의 증가가 일부 전사이전수준에서 조절되며, 말초혈액 단핵구내의 de novo 단백질합성이 중요할 것이라는 점을 제시한 바 있으며 향후의 연구과제로써 IL-8유전자 발현에 관여하는 이들 단백질의 성상에 관한 연구의 중요성을 지적하였다²¹⁾. 따라서 저자들은 기존의 연구결과들을 토대로 내독소에 의한 IL-8 유전자의 발현증가에 관여하는 세포내 단백질으로써 NFκB가 관여하고, 이러한 NFκB의 활성화에 미치는 2차 전령으로써의 산소기의 역할을 규명하고자 본 실험을 진행하였다.

그 첫번째 단계로서 먼저 본 연구에서는 외부에서 투여한 산소기에 의해 말초혈액단핵구에서의 IL-8 및 IL-1β 유전자의 발현양상을 관찰하였는데, 농도 및 시간변화에 따른 발현의 증가가 관찰되지 않았다. 이는 T림프종 세포주에 30~150μM/L 농도의 H₂O₂를 처리했을때 NFκB가 활성화되고 이를 catalase로 전처리하였을때 억제됨을 보인 Schreck 등의 실험 결과와는 상치된다²²⁾. 하지만 공판의 mesangial cell을 이용하여 TNF-α와 IgG에 의한 JE/MCP-1 및 CSF-1의 증가에 산소기가 2차 전령으로써 작용한다는 점을 보여준 또 다른 실험에서는, xanthin oxidase/hypoxanthin을 이용하여 superoxide를 생성시킴으로써 JE/MCP-1과 CSF-1 유전자 발현의 증가를 관찰하였지만 exogenous H₂O₂ 자극에 의해서는 그 발현의 증가를 관찰하지 못하였다²³⁾. 이런 서로 상반되는 실험결과들로 미루어 볼 때 각 세포마다 특정 산소기가 2차 전령으로써 작용할 가능성이 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 외부에서 가한 H₂O₂에 의해 유전자 발현의 증가가 관

찰되지 않은 점으로 미루어 보건데 말초혈액 단핵구에서 hydrogen peroxide는 2차 전령으로서 작동하지는 않을 것이라고 추정해볼 수 있을 것이다. 하지만 hydrogen peroxide 이외의 superoxide나 혹은 다른 어떤 산소기가 2차 전령으로써 작용하는지에 대해서는 본 연구에서는 확인하지 못하였다. 물론 본 실험에서는 특정 산소기를 가하여 IL-8 및 IL-1 β 유전자의 발현 증가를 관찰한 직접적인 실험 결과가 없으므로 구체적으로 어떤 산소기가 관여할 것인지에 대한 논의는 무리라고 생각되지만 본 실험에서 항산화작용이 가장 현저했던 TMTU의 항산화기전이 hydroxyl radical의 scavenger로 작용한다는 점을 고려한다면 hydroxyl radical이 말초혈액 단핵구에서의 상기 유전자의 발현에 관여할 가능성이 있으리라고 추정된다. 이에 대해서는 향후 추가 연구가 필요하리라고 생각된다.

한편, 여러 항산화제가 내독소에 의한 IL-8 및 IL-1 β 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴 보았을 때 내독소에 의한 이들 유전자 발현의 증가는 여러 항산화제에 의해 부분적으로 억제되었고, 특히 TMTU에서 그 억제정도가 가장 현저하였다. 각각의 항산화제의 억제정도가 서로 다른 이유는 여러가지로 생각해볼 수 있을 것인데 먼저 생각해볼 수 있는 이유로는 서로 항산화작용의 기전이 다르다는 점을 생각해 볼 수 있을 것이다. NAC나 ME는 sulfhydryl group을 갖고 있어 scavenger로서 작용하여 항산화작용을 미치고 PDTc는 NCS₂기가 scavenger로서 작용하며, Desferrioxamine은 Fe ion을 흡수하는 metal chelator로서 역할하여 항산화작용을 미치고 TMTU는 hydroxyl radical의 scavenger로 역할하여 항산화작용을 미치는 등 실제로 항산화작용을 나타내는 기전이 각각의 항산화제마다 서로 다름을 고려할 때, 항산화제에 의한 억제정도가 차이가 난 점을 이와 연관지을 수 있을지 모르겠다. 실제로 Schreck 등은 T림프종 세포주를 이용한 실험에서 NF κ B를 억제하는 정도는 NAC나 ME, PDTc에서 가장 현저하였고 Desferrioxamine은 중간정도로 억제함을 보인 반면, TMTU는 억제효과가 관찰되지 않았다고 하였었다²⁴⁾. 하지만 항산화제가 각각의 세포에서 동등한 정도로 기능을 하는지, 실제로 세포내로 잘 투과해 들어가는지, 특정세포에서는 항산화작용을 중화시킬 수 있는 독특

한 기전등이 존재하지는 않는지 등등의 다양한 의문점이 아직 잘 알려져 있지 않은 점을 고려해 볼 때, 각각의 항산화제에 의한 억제정도가 다른 것은 전혀 놀라운 일은 아니며 향후 이에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 실험결과를 요약하면, 내독소에 의한 말초혈액 단핵구에서의 IL-8 및 IL-1 β 유전자 발현의 증가는 여러 항산화제에 의해 부분적으로 억제되었고, 이는 세포내의 산소기가 이들 유전자 발현의 증가에 관여함을 시사한다고 할 수 있다. 한편 외부에서 H₂O₂를 가했을 때에 유전자 발현의 증가가 관찰되지 않아 말초혈액 단핵구에서 IL-8 및 IL-1 β 유전자 발현에 관여하는 산소기가 hydrogen peroxide는 아닐 것으로 생각된다. 더불어 말초혈액 단핵구에서 IL-8 및 IL-1 β 유전자 발현에 다른종류의 산소기가 관여하는지, 산소기가 유전자 발현에 관여하는 기전이 저자들이 처음에 가정했었던 것처럼 NF κ B의 활성화를 통한 것인지 등에 대해서는 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 산소기의 작용은 과거에는 세포독성이 주로 알려져 있었던 반면, 최근 들어 산소기의 세포내 신호전달체계에서의 역할에 많은 사람의 관심이 모이고 있다. 여러 cytokine의 전사인자(transcription factor)로 작용하는 NF κ B는 기저상태에서는 세포질에 존재하는데 I κ B와 결합되어 핵내로의 이동이 억제되고 있다. 여러 연구에 의해 NF κ B의 I κ B로부터의 분리는 외부자극에 의해 생성된 산소기에 의한 것으로 알려졌는데, 이렇게 하여 분리된 NF κ B가 핵내로 이동하면 핵내에서 전사인자로 작용하여 여러 유전자의 전사를 증가시키는 것이 보고되었다. IL-8 유전자는 5'flanking promotor region에 NF κ B-like motif가 있어 핵내 NF κ B activity의 증가로 IL-8 유전자의 전사가 증가되는 것으로 알려졌고, 또한 내독소는 핵내의 NF κ B activity의 증가와 함께 호중구에서의 산소기의 분비를 가져온다. 이러한 사실로부터 내독소에 의한 IL-8 유전자의 발현은 세포내에서 생성된 산소기에 의해 NF κ B가 I κ B로부터 분리되어 핵내로 이동하고 이로 인해 IL-8 유전자의

전사가 증가되는 가설을 생각할 수 있다. 저자들은 이러한 가설 검증의 첫번째 단계로써 체내 염증반응에서 중요한 역할을 하는 말초혈액 단핵구의 IL-8 및 IL-1 β 유전자 발현에 세포내의 산소기가 관여하는지의 여부를 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

방법: Ficoll-Hypaque density gradient 법과 plastic 부착법을 이용하여 말초혈액 단핵구를 분리하였다. 외부에서 투여한 산소기의 농도에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현의 유무를 관찰하기 위하여 H₂O₂를 0, 10, 100, 300 μ M/L, 1mM/L의 농도로 투여하고 6시간이 경과한 후 IL-8 및 IL-1 β 에 대한 Northern blot analysis를 시행하였다. 시간에 따른 IL-8 및 IL-1 β mRNA 변화를 관찰하고자 H₂O₂를 100 μ M/L의 농도로 투여하고 0, 2, 4, 6, 8, 24시간이 경과한 후 Northern blot analysis를 시행하였다. 항산화제가 내독소에 의한 IL-8과 IL-1 β mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 TMTU(10mM/L) 1시간, PDT(100 μ M/L) 1시간, NAC(10 mM/L) 2.5시간, ME(10mM/L) 2.5시간, Desferrioxamine(100mM/L) 15시간 동안 전처리 한 다음 내독소를 투여하여 4시간이 경과한 후 IL-8 및 IL-1 β mRNA에 대한 Northern blot analysis를 시행하였다.

결과: H₂O₂농도 및 시간에 따른 말초혈액 단핵구에서의 IL-8 및 IL-1 β mRNA의 발현에는 유의한 차이가 관찰되지 않았지만 항산화제로 전처리하였을 때 내독소에 의한 말초혈액 단핵구에서의 IL-8 및 IL-1 β mRNA의 발현이 억제되었고 그 억제정도는 TMTU에서 가장 현저하였다.

결론: 이상의 결과에서 말초혈액 단핵구에서의 IL-8 및 IL-1 β mRNA 발현에 H₂O₂가 아닌 다른 산소기가 일부 관여할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Karin M: Signal transduction and gene control. *Curr Opin Cell Biol* 3:467, 1991
- 2) Roeder RG: The complexities of eukaryotic transcription initiation: Regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Genet* 16:402, 1991
- 3) Lenardo M, Baltimore D, NF κ B: A pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 58:227, 1989
- 4) Baeuerle P: The inducible transcription factor NF κ B: Regulation by distinct protein subunits. *Biochemica et Biophysica Acta* 1072:63, 1991
- 5) Baeuerle P, Baltimore D: The physiology of the NF κ B transcription factor. In Cohen P, Foulkes JG(Ed.) *Molecular aspects of cellular regulation-Hormonal control regulation of gene transcription*. p 409, Elsevier, North Holland, Biomedical Press, 1991
- 6) Hayashi T, Ueno Y, Okamoto T: Oxidoreductive regulation of NF κ B. *J Biol Chem* 268:11380, 1993
- 7) Schreck R, Baeuerle P: A role for oxygen radicals as secondary messengers. *Trends Cell Biol* 1:39, 1991
- 8) Schreck R, Albermann K, Baeuerle P: NF κ B: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic Res Comms* 17:221, 1992
- 9) Mukaida N, Hishinuma A, Zachariae C, Oppenheim TT, Matsushima K: Regulation of human IL-8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for IL-8. *Adv Exp Med Biol* 305:31, 1991
- 10) Raetz C, Ulevitch R, Wright S, Sibley C, Ding A, Nathan C: Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J* 5:2652, 1991
- 11) Chomezynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156, 1987
- 12) Jamieson D: Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Radic Biol Med* 7:87, 1989
- 13) Tate BM, Repine JE: Neutrophil and the adult

- respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **128**:552, 1983
- 14) Rot A: Some aspects of NAP-1 pathophysiology: Lung damage caused by a blood-borne cytokine. *Adv Exp Med Biol* **305**:127, 1991
 - 15) Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine(2nd ed.). Clarendon Press, 1990
 - 16) Cerruti PA: Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**:375, 1985
 - 17) Meier B, Radeke HH, Solle S, Younes M, Sies H, Resch K, Habermehl GG: Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to IL-1 or TNF- α . *Biochem J* **263**:539, 1989
 - 18) Baeuerle P, Baltimore D: I κ B: A specific inhibitor of the NF κ B transcription factor. *Science* **242**:540, 1989
 - 19) Staal FJT, Roederer M, Herzenberg LA: Intracellular thiols regulate activation of NF κ B and transcription of HIV. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:9943, 1990
 - 20) Roederer M, Staal FJT, Raju PA, Ela SW, Herzenberg LA: Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cystein. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4884, 1990
 - 21) 유철규, 서지영, 김영환, 한성구, 심영수, 한용철: 단핵식세포에서 내독소에 의한 인터루킨-8 유전자 발현 조절기전에 관한 연구. *결핵 및 호흡기 질환* **41**:462, 1994
 - 22) Schreck R, Rieher P, Baeuerle P: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF κ B transcription factor and HIV-1. *Embo J* **10**:2247, 1991
 - 23) Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schiondorff D: Oxygen radicals as secondary messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony stimulating factor, CSF-1, in response to TNF- α and Ig G. *J Clin Invest* **92**:1564, 1993
 - 24) Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle P: Dithiocarbamates as potent inhibitors of NF κ B activation in intact cells. *J Exp Med* **175**:1181, 1992