

□ 원 저 □

결핵균을 탐식한 말초혈액단핵구 배양상층액에 의해 유도되는 폐상피세포주에서의 NF- κ B 의존성 IL-8 분비기전

단국대학교 의과대학 내과학교실 호흡기내과

박재석, 지영구, 최은경, 김건열, 이계영

= Abstract =

NF- κ B Dependent IL-8 Secretion from Lung Epithelial Cells Induced by Peripheral Blood Monocytes Phagocytosing *Mycobacterium Tuberculosis*

Jae Seuk Park, M.D., Young Koo Jee, M.D., Eun Kyong Choi, M.D.,
Keun Youl Kim, M.D., Kye Young Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Dankook University, College of Medicine, Chonan, Korea

Background : IL-8 is a potent chemotactic cytokine that plays an important role in the host defense mechanism against *M. tuberculosis* by recruiting inflammatory cells to the site of the infection. Lung epithelial cells, as well as alveolar macrophages are known to produce IL-8 in response to *M. tuberculosis*. IL-8 gene expression is mainly regulated on the level of transcription by NF- κ B. This study investigated whether or not A549 cells produce IL-8 in NF- κ B dependent mechanism in response to macrophages phagocytosing *M. tuberculosis*.

Methods : Peripheral blood monocytes that were obtained from healthy donors were cultured for 24 h with *M. tuberculosis* and a conditioned medium (CoMTB) was obtained. As a negative control, the conditioned medium without *M. tuberculosis* (CoMCont) was used. A549 cells were stimulated with *M. tuberculosis*, CoMCont and CoMTB and the IL-8 concentration in the culture media was measured by ELISA. The CoMTB induced IL-8 mRNA expression in the A549 cells was evaluated using RT-PCR, and CoMTB induced I κ B α degradation was

*이 연구는 2000학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

Address for correspondence :

Kye Young Lee, M.D., Ph.D.

Division of Pulmonary Medicine Dankook University Medical Center

16-5 Anseo-dong, Chonan, 330-715, Korea

Phone : 82-041-550-3916 Fax : 041-556-3256 E-mail : kylee@anseo.dankook.ac.kr

measured using western blot analysis. CoMTB induced nuclear translocation and DNA binding of NF- κ B was also examined using an electrophoretic mobility shift assay(EMSA), and the CoMTB induced NF- κ B dependent IL-8 transcriptional activity was measured using a luciferase reporter gene assay.

Results : CoMTB induced IL-8 production by A549 cells(46.8 ± 4.8 ng/ml) was higher than with direct stimulation with *M. tuberculosis* (6.8 ± 2.9 ng/ml). CoMTB induced IL-8 mRNA expression increased after 2 h of stimulation and was sustained for 24 h. I κ B α was degraded after 10 min of CoMTB stimulation and reappeared by 60 min. CoMTB stimulated the nuclear translocation and DNA binding of NF- κ B. The CoMTB induced NF- κ B dependent IL-8 transcriptional activity(13.6 ± 4.3 times control) was higher than either CoMCont(2.0 ± 0.6 times control) or *M. tuberculosis* (1.4 ± 0.6 times control).

Conclusion : A conditioned medium of peripheral blood monocytes phagocytosing *M. tuberculosis* stimulates NF- κ B dependent IL-8 production by the lung epithelial cells. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 315-324)

Key words : IL-8, *Mycobacterium tuberculosis*, NF- κ B, Conditioned medium.

서 론

결핵은 우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 가장 심각한 감염 질환 중의 하나이다¹. 결핵균에 대한 숙주의 방어기전은 주로 단핵식세포와 T-림프구를 주축으로 하는 세포매개성 면역반응에 의해 조절되며, 감염부위에서 이들 세포들로 구성된 육아종(granuloma)을 특징적으로 형성한다. 그러므로 감염 부위로 이들 염증세포들의 동원은 결핵균에 대한 숙주의 방어기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다².

Interleukin-8(IL-8)은 C-X-C 화학주성인자 가족군에 속하는 대표적인 화학주성 단백질로서 대식세포³, 섬유아세포⁴, 그리고 상피세포⁵ 등에서 분비된다. IL-8은 처음에는 대표적인 중성구의 화학주성인자로 알려졌으나⁶ 최근 T-림프구와 단핵구에 대해서도 화학주성을 보이는 것이 밝혀졌다^{7,8}. IL-8은 결핵균에 대한 숙주의 지연성 과민반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며⁹, 폐결핵 병변에서 시행한 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid)에서 IL-8의 농도가 증가되어 있고 이는 중성구와 림프구의 침윤의 정도와 비례하였다¹⁰. 그러므로 폐결핵 병변에서 높은 농도로 존재하는 IL-8의 분비기전을 밝히

는 것은 결핵균에 대한 숙주의 면역학적 방어기전을 이해하는데 중요하다.

결핵균은 호흡기도를 통하여 침범하므로 감염초기 결핵균과 접촉하게 되는 세포는 주로 폐포대식세포와 폐상피세포(alveolar epithelial cell)다. 결핵균을 탐식한 폐포대식세포가 IL-8을 분비하므로 폐결핵 병변에서 증가되어 있는 IL-8의 중요한 근원 세포로 알려져 왔으나³, 최근 폐상피세포 또한 바이러스나 세균에 의한 호흡기 감염 시 IL-8을 포함한 cytokine들을 분비하며^{11,12}, 능동적으로 염증반응에 참여하는 것이 알려짐에 따라 폐결핵 병변의 IL-8 분비에 있어서 폐상피세포의 역할을 규명하는 것이 필요하게 되었다³. 결핵균을 탐식한 대식세포가 TNF- α 와 IL-1 β 같은 proinflammatory 사이토카인들을 분비하고, 또한 이들 사이토카인들이 폐상피세포의 IL-8 분비를 자극하는 것이 알려져 있다^{13,14}. 그러므로 결핵균을 탐식한 대식세포와 폐상피세포의 상호작용이 폐결핵 병변에서 폐상피세포의 IL-8 분비기전 중의 하나가 될 수 있을 것으로 추정할 수 있다.

NF- κ B는 원래 B-림프구에서 immunoglobulin κ chain 유전자의 발현 조절에 관여하는 역할이 확인되면서 명명된 전사인자로¹⁵, IL-8 유전자의 발현에 있

어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁶. 이에 본 연구에서는 폐상피세포주인 A549세포가 결핵균을 탐식한 단핵식세포와의 상호작용에 의해 IL-8을 분비하는지, 그리고 그 분비기전이 NF- κ B 의존성인지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 시약

폐상피세포주(A549)는 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin 그리고 100 U/ml streptomycin을 포함한 RPMI 1640 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. TRIzol, oligo dT 등은 GIBCO BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였고, Taq DNA polymerase는 TaKaRa(TaKaRa Shiga, Japan)에서 구입하였고, IL-8 ELISA kit는 R&D Systems(Minneapolis, MN)에서 구입하였다.

2. 결핵균

폐결핵 환자의 객담에서 분리 동정된 결핵균 중에서 약제 감수성 검사상 모든 결핵약제에 감수성을 보이는 임상균주를 결핵연구원에서 분양 받았다. 결핵균을 ADC enrichment를 포함하는 Middlebrook 7H9 액체배지(Difco, Detroit, MI)에서 배양한 후 10000×g에서 10분간 원심분리하여 결핵균 덩어리를 얻은 후 RPMI 1640으로 3번 세척하여 새로운 결핵균 부유액을 얻었다. 결핵균 부유액을 22게이지 주사바늘을 20회 통과시키고, 2분간 vortex로 진탕시켜 결핵균 덩어리를 분산시킨 후 10분간 방치하여 부유액 속의 결핵균 덩어리를 침전시키고 상층액 1/2을 얻어서 분주한 후 -70°C에 보관한 후 실험에 이용하였다. 부유액 속의 살아있는 결핵균의 농도는 부유액을 10 배씩 희석한 후 OADC enrichment가 첨가된 Middlebrook 7H10(Difco, Detroit, MI) 배양접시에서 4주간 배양한 후 집락군의 숫자를 세어서 계산하였다.

3. 말초혈액단핵구의 분리 및 결핵균 감염

Heparin으로 처리된 주사기로 정상인의 정맥혈을 채취하여 1:1의 비율로 생리식염수와 섞어서 Histo-paque-1077(Sigma, St. Louis, MO) 용액 위에 중첩시킨 후 400×g로 30분간 원심분리하여 단핵세포층(mononuclear cell layer)을 얻은 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 2차례 세척한 후 2 mM L-glutamine, penicillin G(100 U/ml), streptomycin(100 U/ml), 2% human AB serum이 첨가되어 있는 RPMI 1640으로 세포농도가 2×10^6 cells/ml 되도록 희석하여 플라스틱 배양접시에 분주하고 36°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양하여 단핵구를 배양접시에 부착시킨 후 RPMI 1640으로 세 번 세척하여 상층액과 비흡착세포들을 제거하여 말초혈액단핵구만을 분리하였다. 말초혈액단핵구에 대한 결핵균의 비율이 1:10이 되도록 말초혈액단핵구 배양액에 결핵균 부유액을 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 그 상층액(CoMTB)을 얻어서 실험에 이용하였다. 결핵균을 첨가하지 않은 말초혈액단핵구 배양 상층액(CoMCont)은 음성 대조군으로 이용하였다.

4. ELISA

결핵균, CoMTB가 폐상피세포의 IL-8 분비를 자극하는지 평가하기 위해 A549 세포주 배양액에 결핵균(세포 대 결핵균 비율; 1:10), 100배 희석한 CoMCont, CoMTB, 그리고 양성 대조군으로 Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA) 20 ng/ml을 첨가하고 24시간 배양 후 배양 상층액을 얻어서 -70°C 냉동고에 보관하였다가 IL-8 ELISA kit를 이용하여 IL-8 농도를 측정하였다.

5. 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

CoMTB가 폐상피세포의 IL-8 mRNA의 발현을 유도하는지 역전사-중합효소연쇄반응을 이용하여 평가하였다. A549 세포주 배양액에 100배 희석한

CoMTB를 첨가하여 24시간 동안 배양하면서 정해진 시점에 배양접시에서 배양액을 제거한 후 TRIzol을 이용하여 폐상피세포의 총 RNA를 얻었다. 2 μ g의 RNA를 oligo(dT)에 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 결합반응 시킨 후 0.1 M DTT, 2.5 mM dNTP, RNase inhibitor, reverse transcriptase를 다시 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. PCR은 얻어진 cDNA를 비활성화 시킨 후에 IL-8 시발체 (primers) 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATT-3', 5'-AACTTCTCCACAACCCTCTG-3'와 섞은 후에 DNA thermal cycler (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer)를 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 변성, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 결합(annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 연장의 주기로 20회 반복 시행하였다. PCR 생산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색 후 UV하에서 관찰하였다. Gel 사진은 Gel Doc 위에서 Photoshop software (Adobe System, Inc)을 이용한 HEWLETT PACKARD Scanject로 스캔을 시행하였다.

6. Western blot 분석

CoMTB 자극에 의한 폐상피세포에서의 I κ B α 의 분해 여부를 Western blotting을 시행하여 평가하였다. CoMTB로 A549 세포주를 0, 10분, 30분, 60분, 120분 자극한 후 용해용액(1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10 mM Tris-HCl pH 7.4)으로 lysis 시킨 후 14000 rpm에서 5분간 원심분리하여 단백추출물을 얻었다. Bradford assay로 단백질 농도를 측정하고 3분간 가열하여 변성시킨 후 SDS-PAGE(12% gel)로 전기영동하여 nitrocellulose에 이전하였다. Blot을 차단 완충액 (blocking buffer, 4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 반응시킨 후 rabbit polyclonal I κ B α 항체와 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG로 2차 항체반응을 1시간 시킨 후 ECL (Amersham, Arlington Heights, IL)로 검출하였다.

7. Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)

A549 세포주를 100 mm 배양접시에서 배양한 후 100:1의 비율로 희석된 CoMTB로 1, 2시간동안 자극한 후 trypsin/EDTA로 세포들을 수확하여 핵단백 (nuclear protein)을 얻었다. 추출된 핵단백 7.5 μ g을 1 μ g의 poly(dI-dC)와 2.5 pg의 (α - 32 P)-labeled oligonucleotide 표식자(probe)(1×10^5 cpm)가 포함된 20 μ L의 결합완충액(25 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 50 mM KCl, 0.05 mM DTT)에 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. oligonucleotide 표식자는 IgG κ chain 유전자의 5 flanking 부위의 NF- κ B binding site(5'-tcga-GTCGGGGACTTTCCTCTGA-3')를 포함하는 것을 이용하였다. 4% nondenaturing polyacrylamide gel에서 전기영동하여 단백질-DNA 복합체를 분리한 후 autoradiography로 결과를 얻었다. NF- κ B와 표식자의 결합 특이도는 경쟁시험(competition assay)로 확인하였는데, 동위원소가 표지 되지 않은 표식자(specific for the NF- κ B binding site) 250 pg(100X)을 방사선 동위원소가 표지된 표식자와 반응시키기 5분전에 먼저 반응시켰다.

8. Luciferase Reporter Gene Assay

NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성(transactivation)을 평가하기 위하여 IL-8-NF- κ B luciferase reporter gene construct를 이용하였다¹⁷. 안정적으로 IL-8-NF- κ B luciferase 유전자를 발현하는 A549 세포주(IL-8-NF- κ B luc)를 획득하기 위하여 IL-8-NF- κ B luciferase reporter gene construct를 Lipofectamine-plus를 이용하여 A549 세포주에 유전자 주입을 시행한 후 G418 400 μ g/ml 농도 하에서 선택배양하였다. Luciferase assay는 IL-8-NF- κ B luc 세포주를 24 well 배양접시에서 배양한 후 CoMCont, CoMTB(100배 희석)와 PMA(20 ng/ml)를 첨가하여 6시간 자극한 후 0.1 ml의 lysis buffer (0.1 M HEPES, pH 7.6, 1% Triton-X, 1 mM

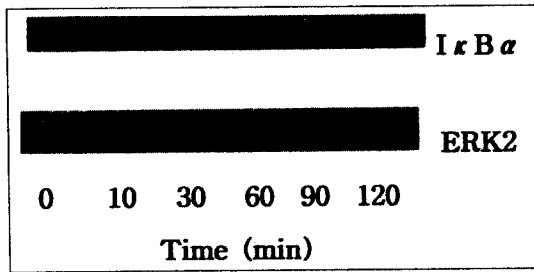


Fig. 3. $I\kappa B\alpha$ degradation by CoMTB. CoMTB (1 : 100 dilution) was used to stimulate A549 cells over 120-min period and western blot analysis were performed using rabbit polyclonal $I\kappa B$ antibody. Equal loading of protein was ensured by ERK2.

는 영향을 평가하기 위해 EMSA를 시행하였다. 그 결과 100 : 1로 희석한 CoMTB로 A549 세포주를 자극하였을 때 자극 1시간만에 뚜렷한 NF- κ B-DNA 복합체의 띠(band)가 관찰되었고, 자극 2시간 후에 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4). EMSA에서 관찰되는 띠가 NF- κ B와 NF- κ B binding site를 포함하는 표식자와의 특이적인 결합인 것을 확인하기 위해 동위원소를 표지하지 않은 표식자를 100배(250 pg) 넣고 반응시킨 후 동위원소를 표지하는 표식자(2.5 pg)를 첨가하여 경쟁시험을 하였을 때 NF- κ B-DNA 복합체의 유도가 차단되는 것이 관찰되어 NF- κ B와 NF- κ B binding site를 포함하는 표식자와의 결합이 특이적으로 일어나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4, lane 4).

5. CoMTB의 자극에 의한 A549 세포주에서 NF- κ B 의존성 IL-8 전사활성

CoMTB의 자극에 의한 폐상피세포에서의 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성의 정도를 luciferase assay를 통해 확인하였다. CoMCont(100배 희석)으로 자극하였을 때 luciferase 활성이 자극 없이 배양한 대조군(cont)의 2.0 ± 0.6 배 증가하였고, 결핵균으로 직접 자극하였을 경우 대조군의 1.4 ± 0.6 배

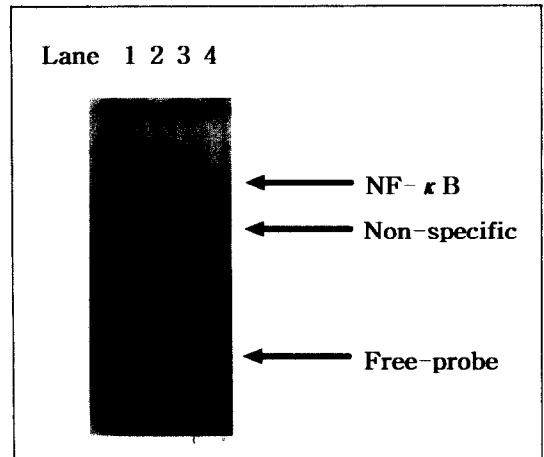


Fig. 4. NF- κ B binding to IL-8 DNA in CoMTB-stimulated A549 cells (EMSA). Nuclear extracts from A549 cells stimulated by CoMTB(1 : 100 dilution) for 1 h(lane 2), and 2 h(lane 3) were mixed with radiolabelled DNA probe specific for the IL-8 NF- κ B binding site and analyzed on a 4% polyacrylamide gel. Lane 1 is control without stimulation, and lane 4 was competition assay using prior treatment with non-radiolabelled probe.

증가하였으며, CoMTB(100배 희석)로 자극하였을 경우 대조군의 13.6 ± 4.3 배 증가하였고, 양성 대조군인 PMA(20 ng/ml)로 자극하였을 경우 대조군의 24.1 ± 9.1 배 활성이 증가하였다(Fig. 5).

고 찰

폐상피세포는 폐포대식세포와 함께 결핵균 감염시 제일 먼저 접촉하게 되는 세포지만, 최근까지의 폐결핵의 병태생리에 관한 연구들은 대부분 폐포대식세포에 집중되었고, 폐상피세포는 주목을 받지 못하였다. 그러나 최근 폐상피세포가 여러 가지 proinflammatory 사이토카인들의 자극을 받아 단구화학주성단백-1(monocyte chemotactic protein-1), IL-8과 같은 화학주성인자들과 사이토카인들을 분비하여 결핵병변으로 염증세포들을 동원하고 활성화시켜 결핵

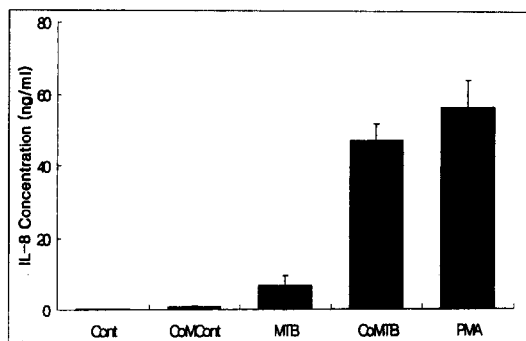


Fig. 1. IL-8 production in A549 cells. A549 cells were cultured with media alone (Cont), with CoMCont(1 : 100 dilution), *M. tuberculosis* (MOI=10), CoMTB (1 : 100 dilution), and PMA (20 ng/ml). After 24 h, IL-8 concentration in culture supernatant were measured by ELISA. Results are the mean \pm SD of three independent experiments.

DTT and 2 mM EDTA)를 직접 첨가하여 수확 한 후 4℃에서 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세포단백을 얻었다. Bradford assay를 이용하여 단백질 농도를 측정 한 후 20 μ g의 단백질을 luciferase assay mix(25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO₄, 1 mg/ml BSA, 5 mM ATP and 1 mM D-luciferin (Pharmingen International))에 첨가한 후 TD-20/10 Luminometer(Turner Design, Sunnyvale, CA)로 luminescence를 측정하였다. 전사활성의 정도는 자극 없이 배양한 A549 세포주의 전사활성의 정도(cont)에 대한 상대적인 비로 비교하였다.

결 과

1. 폐상피세포의 IL-8 생산

A549 세포주를 자극 없이 24시간 배양한 후 얻은 배양액의 IL-8 농도는 0.2 \pm 0.1 ng/ml, CoMCont (100배 희석)로 자극한 경우 0.9 \pm 0.3 ng/ml, 결핵균(세포 대 결핵균 비율; 1 : 10)으로 자극한 경우 6.8 \pm 2.9 ng/ml, CoMTB(100배 희석)로 자극한 경우 46.8 \pm 4.8 ng/ml, 그리고 양성 대조군인 PMA

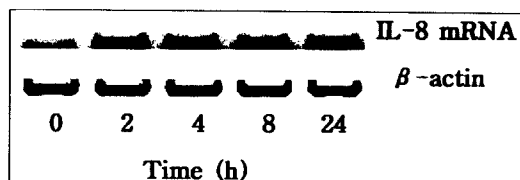


Fig. 2. Time course of IL-8 mRNA expression by A549 cells in response to CoMTB(1:100 dilution). Total cellular RNA was extracted at each time point and IL-8 mRNA expression was determined by RT-PCR. Equal loading of cDNA was ensured by β -actin.

(20 ng/ml)로 자극한 경우 55.9 \pm 7.5 ng/ml로 결핵균으로 직접 자극한 경우에도 A549 세포주의 IL-8 생산이 증가하였지만 CoMTB로 자극한 경우 결핵균으로 직접 자극한 경우보다 6배 가량 더 많은 양의 IL-8이 생산되었다(Fig. 1).

2. CoMTB의 자극에 의한 A549 세포주에서의 IL-8 mRNA 발현

100배 희석한 CoMTB로 A549 세포주를 24시간에 걸쳐 자극하였을 때, IL-8 mRNA의 발현은 자극 2시간에 최고치를 이루었고 24시간까지 지속되었다(Fig. 2).

3. CoMTB의 자극에 의한 A549 세포주에서 I κ B α 의 분해

CoMTB가 폐상피세포의 NF- κ B 전사를 활성화시키는지를 알아보기 위해 CoMTB의 자극으로 A549 세포주에서 I κ B α 가 분해되는지를 Western blotting을 시행하여 확인하였다. I κ B α 는 CoMTB 자극 10분 후에 신속히 분해되었다가 시간이 지남에 따라 다시 나타나는 양상을 보였다(Fig. 3).

4. CoMTB의 자극에 의한 A549 세포주에서 NF- κ B의 핵 이동과 DNA 결합

CoMTB가 NF- κ B의 핵 이동과 DNA 결합에 미치

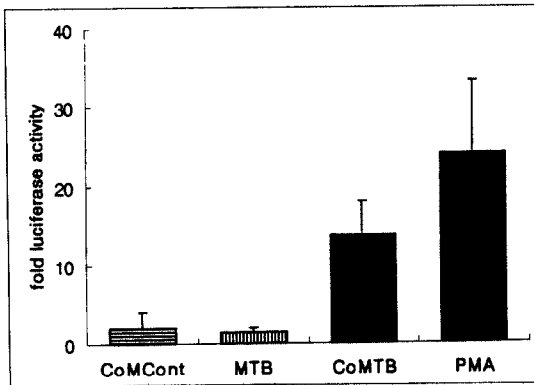


Fig. 5. NF- κ B-dependent IL-8 promoter activity in A549 cells. A549-IL-8-NF- κ B-luc cells were stimulated with CoMCont(1 : 100 dilution), CoMTB(1:100 dilution), PMA (20 ng/ml) for 6 h, and cell extracts were harvested and assayed for luciferase activity using luminometer. luminescence of each condition was expressed as fold of luminescence without stimulation. Results are the mean \pm SD of three independent experiments.

균을 억제하는 것이 밝혀짐에 따라^{18,19}, 폐상피세포 또한 결핵균에 대한 숙주의 방어기전에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

폐상피세포주인 A549 세포는 결핵균을 탐식하기도 하며, 결핵균을 탐식한 A549 세포가 IL-8을 분비하는 것은 잘 알려져 있다¹⁹. 그러나 A549 세포의 결핵균 탐식율은 전문적인 탐식세포(professional phagocyte)인 대식세포보다 떨어지므로²⁰, 폐상피세포의 IL-8 분비기전에 있어서 결핵균의 직접자극에 의한 기전 이외에 또 다른 기전, 즉 결핵균을 탐식한 대식세포와의 상호작용에 의한 기전이 있지 않을까 생각된다. 왜냐하면, 결핵균을 탐식한 대식세포가 TNF- α 와 IL-1 β 같은 proinflammatory 사이토카인들을 분비하고, 또한 이들 사이토카인들이 폐상피세포의 IL-8 분비를 자극하는 것이 알려져 있기 때문이다^{13,14}. 실제로 본 연구의 결과 결핵균으로 폐상피세포를 직접 자극하였을 경우 IL-8의 생산이 증가되었지만 CoMTB로 자극하였을 때 더 많은 양의 IL-8이 생산

되었다(Fig. 1). 그러므로 폐상피세포의 IL-8 생산에 있어서 결핵균에 의한 직접적인 자극보다는 결핵균을 탐식한 폐포대식세포가 생산하는 물질들에 의한 2차적인 자극이 더 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 여기에는 TNF- α 와 IL-1 β 가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 CoMTB로 A549 세포를 자극하였을 때 IL-8 mRNA의 발현이 빠르게 나타나며 24시간 동안 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. Actinomycin D로 새로운 유전자 전사를 차단했을 경우에도 IL-8 mRNA의 발현이 자극 24시간 후에도 70% 정도 유지되는 것으로 보아¹⁹, 전사 후 조절기전에 의한 IL-8 mRNA의 안정화(stabilization)가 CoMTB의 자극에 의한 A549 세포에서의 IL-8 mRNA의 발현이 지속적으로 높게 유지하는데 기여할 것으로 생각된다²¹.

IL-8 유전자의 발현은 전사적 조절에 의해 이루어지며 전사인자(transcription factor) 중에서 NF- κ B가 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁶. 이에 본 연구에서는 CoMTB에 의한 폐상피세포에서의 IL-8 mRNA의 발현이 증가하는 기전이 NF- κ B 의존성으로 일어나는지 알아보았다. NF- κ B는 원래 B-림프구에서 immunoglobulin κ chain 유전자의 발현 조절에 관여하는 역할이 확인되면서 명명된 전사인자로서 면역 및 염증 유발에 관여하는 가장 중요한 전사인자인데 이러한 합목적성에 부합하기 위해 독특한 활성화기전을 갖고 있다¹⁵. 미리 합성되어 있는 NF- κ B가 세포질 내에 I κ B α 라는 억제 단백질에 의해 억류되어 있다가 활성화 자극이 발생하면 I κ B α 가 인산화되면서 ubiquitin-proteasome 경로에 의해 분해되는데 이와 동시에 NF- κ B가 유리되어 핵으로 이동하여 κ B 특이적 염기서열 부위의 DNA에 결합함으로써 IL-8을 포함한 κ B-의존성 유전자들의 전사를 유도하는 것으로 밝혀져 있다¹⁵. 본 연구에서 western blot 방법을 이용하여 CoMTB의 자극으로 A549 세포주에서 I κ B α 의 분해가 일어나는 것을 관찰한 결과, I κ B α 는 CoMTB 자극 후 10분만에 신속히 분해되었다가 시간이 지남에 따라 다시 나타나는 양상을 보였는데 이는 I κ B α 가 NF- κ B 활성화에 의해 다시 전사유도되

는 유전자이기 때문이다¹⁵. 여러 가지 자극에 의한 NF- κ B 활성은 매우 신속하게 유도되지만 엄격하게 조절되고 있는데, NF- κ B 활성이 소실되는 기전으로는 NF- κ B 활성화에 의해 전사유도되어 새롭게 생성된 I κ B α 가 핵 내에서 NF- κ B와 결합한 후 세포질로 배출되어 핵 내에서 NF- κ B의 농도가 감소하는 것이 주 기전으로 알려져 있다^{22, 23}. CoMTB의 자극으로 I κ B α 의 분해로 유리된 NF- κ B가 핵으로 이동하여 κ B 특이적 염기서열 부위의 DNA에 결합하는 것을 증명하기 위해 EMSA를 이용하였다. CoMTB로 A549 세포주를 자극하였을 때 핵에서의 NF- κ B-DNA 복합체의 양이 자극 1시간 후에 증가하였다가 2시간째에는 감소하는 양상을 보였는데 이와 같은 현상은 NF- κ B 활성이 매우 신속하게 유도되지만 엄격하게 조절되고 있다는 또 다른 증거이다. A549 세포주에서 CoMTB의 자극으로 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성(transactivation)이 일어나는지를 luciferase reporter gene assay를 통하여 관찰하였는데, CoMTB의 자극에 의한 IL-8 유전자의 전사활성이 정상대조군에 비해 12.5배 증가하였다.

이상의 결과로 CoMTB의 자극에 의한 A549 세포에서의 IL-8 유전자 발현에 있어서 NF- κ B가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있지만 NF- κ B 이외의 다른 전사인자에 의한 기전의 가능성을 배제할 수 없다. 실제로 IL-8 유전자의 전사활성에 있어서 NF- κ B가 중요한 역할을 하지만 NF-IL-6도 같이 관여하는 것으로 알려져 있다²⁴. Wickremasinghe 등¹⁹의 보고에 의하면 결핵균을 탐식한 단핵구의 배양상층액으로 A549 세포를 자극하고 luciferase reporter gene assay를 시행했을 때 NF- κ B 결합부위에 돌연변이가 있을 경우 luciferase 활성이 돌연변이가 없는 경우(wild type)의 15% 밖에 되지 않았으나, NF-IL-6 결합부위에 돌연변이가 있을 경우 luciferase 활성이 돌연변이가 없는 경우의 50% 정도로 높게 유지되었다. 그러므로 CoMTB에 의한 A549 세포에서의 IL-8 유전자의 전사활성에 있어서 NF- κ B가 NF-IL-6보다 더 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 폐결핵에서 결핵균에 대한 숙주의 방어기전에 있어 중요한 역할을 하는 IL-8의 분비기전에 있어서 폐상피세포가 중요한 역할을 하며 그 분비기전에 있어서 결핵균의 직접작용에 의한 기전보다는 결핵균을 탐식한 단핵식세포와의 상호작용에 의한 기전이 더 중요한 역할을 하며, CoMTB에 의한 폐상피세포에서의 IL-8 유전자의 발현에 있어서 NF- κ B가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

요 약

연구배경 :

IL-8은 강력한 화학주성인자로서 결핵감염 부위로 염증세포들을 동원함으로써 결핵균에 대한 숙주의 방어기전에 있어서 중요한 역할을 한다. IL-8의 유전자의 발현에 있어서 NF- κ B가 중요한 역할을 한다. 저자들은 결핵 감염시 폐상피세포가 NF- κ B 의존성으로 IL-8을 분비하는지 알아보하고자 하였다.

방 법 :

말초혈액단핵구에 결핵균을 감염시키고 24시간 배양 후 배양상층액(CoMTB)을 얻었다. 결핵균, CoMTB로 자극한 A549 세포주의 IL-8 분비 정도를 ELISA 방법으로 측정하였다. CoMTB로 자극한 A549 세포주의 IL-8 mRNA의 발현 정도를 RT-PCR로, I κ B α 의 분해를 western blot 분석으로, NF- κ B의 핵이동과 DNA 결합은 electrophoretic mobility shift assay(EMSA)를 이용하여, 그리고 NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성은 luciferase reporter gene assay를 이용하여 측정하였다.

결 과 :

A549 세포주를 CoMTB로 24시간 자극하여 얻은 배양액의 IL-8 농도는 46.8 ± 4.8 ng/ml로 분비하여 결핵균으로 직접 자극하였을 때의 6.8 ± 2.9 ng/ml보다 높았다. CoMTB로 A549 세포주를 자극하였을 때 IL-8 mRNA의 발현이 증가하였고, I κ B α 의 분해가 일어났으며, NF- κ B의 핵이동과 DNA 결합이 일어났으며, NF- κ B 의존성 IL-8 유전자의 전사활성이

증가하였다.

결 론 :

결핵병변에서 폐상피세포는 결핵균을 탐식한 단핵식세포와의 상호작용에 의해 NF- κ B 의존성으로 IL-8을 분비한다.

참 고 문 헌

1. Bloom BR, Murray CM. Tuberculosis : commentary on re-emergent killer. Science 1992;257:1055-64.
2. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines : an update. Annu Rev Immunol 1997;15:675-705.
3. Zhang Y, Broser M, Cohen H, Bodkin K, Law K, Reibman J, Rom WN. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. J Clin Invest 1995;95:586-92.
4. Schroder J, Sticherling M, Henneicke HH, Preissner WC, Christophers E. IL-1 α or tumor necrosis factor- α stimulate release of three NAP-1/IL-8-related neutrophil chemotactic proteins in human dental fibroblasts. J Immunol 1990;144:2223-32.
5. Standiford TJ, Kunkel SL, Busha MA, Chensue SW, Lynch JPIII, Toews GB, Westwick J, Strieter RM. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line : a model for cytokine network in the lung. J Clin Invest 1990;86:1945-53.
6. Walz AP, Peveri HA, Baggiolini M. Purification of amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. Biochem Biophys Res Commun 1987;149:755-61.
7. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein(NAP-1) is also chemotactic for T-lymphocytes. Science 1989;243:1464-6.
8. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim Y, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. Nature 1999;398:718-23.
9. Larsen CG, Thomsen MK, Gesser B, Thomsen PD, Deleuran BW, Nowak J, et al. The delayed type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8 inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody. J Immunol 1995;155:2151-7.
10. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1474-7.
11. Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM. Respiratory syncytial virus increases IL-8 gene expression and protein release in A549 cell. Am J Physiol 1995;269:L865-72.
12. DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. J Clin Invest 1995;96:2204-10.
13. Valone SE, Rich EA, Wallis RS, Ellner JJ. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium bovis* BCG and mycobacterial antigens. Infect Immun 1988;56:3313-5.
14. Wallis RS, Fujiwara H, Ellner JJ. Direct stimulation of monocyte release of interleukin-1 by mycobacterial protein antigens. J Immunol 1986;136:193-6.

15. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: Discoveries and insight. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
16. Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K. Tumor necrosis factor- α and interferon- γ synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cell line through acting concurrently on AP-1 and NF- κ B line binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* 1992;267:22506-11.
17. 지영구, 김윤섭, 윤세영, 김용호, 최은경, 이계영 등. 폐상피세포에서 Triptolide에 의한 NF- κ B의 존성 IL-8 유전자 전사활성 억제기전. *결핵 및 호흡기질환* 2001;50:52-66.
18. Lin Y, Zhang M, Barnes PF. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998;1121-6.
19. Wickremasinghe M, Thomas LH, Friedland JS. Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: Essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF- κ B-dependent network. *J Immunol* 1999; 163:3936-47.
20. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterim tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* 1996;64:1400-6.
21. Lindstein T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989;244:339-43.
22. Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 1997;110:369-78.
23. Turpin P, Hay RT, Dargemont C. Characterization of IkappaBalpha nuclear import pathway. *J Biol Chem* 1999;274:6804-12.
24. Mastronarde JG, He B, Monick MM, Mukaida N, Matsushima K, Hunninghake GW. Induction of interleukin(IL)-8 gene expression by respiratory syncytial virus involves activation of nuclear factor(NF)- κ B and NF-IL-6. *J Infect Dis* 1996; 174:262-7.