

비점막(鼻粘膜) 섬유모세포에서의 RANTES와 MCP의 발현 조절

경희대학교 의과대학 ¹성형외과학교실, ²미생물학교실

하용찬¹ · 조정제² · 유영천¹ · 양원용¹

Regulation of RANTES and MCP Expression in Human Nasal Mucosal Fibroblasts

Yong-Chan Ha¹, Jeong-Je Cho², Young-Chun Yoo¹ and Won-Yong Yang¹

Departments of ¹Plastic Surgery, and ²Microbiology, Medical College, Kyung Hee University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Fibroblast functions both as a structural element and as a vital immunoregulatory cell. Fibroblasts regulate inflammation through governing of chemokine expression. In order to elucidate the mechanisms by which the expressions of chemokines were regulated, the co-stimulatory effects of Th1 and proinflammatory cytokines were compared using nasal mucosal fibroblasts. **Methods:** Human nasal mucosa was obtained from surgery for septal deviation and the growth of fibroblasts was established. Fibroblasts from 4th to 6th passage were stimulated with various combinations of cytokines. To inhibit selected signaling pathways, fibroblasts were pretreated with cyclosporin A, wortmannin, staurosporine, and dexamethasone prior to the stimulation with cytokines. The supernatants were collected and chemokines were detected with a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** TNF- α /IFN- γ -induced production of RANTES was inhibited by all inhibitors used. MCP-1 was produced constitutively and TNF- α -induced or TNF- α /IFN- γ -induced production of MCP-1 was not inhibited by cyclosporin A or wortmannin, but by staurosporine or dexamethasone. All inhibitors used in this experiment inhibited TNF- α /IFN- γ -induced or IL-1 β /IFN- γ -induced production of MCP-2 in nasal mucosal fibroblasts. Although staurosporine or dexamethasone showed strong inhibitory effects, cyclosporin A or wortmannin did not inhibit the production of MCP-3 by IL-1 β /IFN- γ treatment. **Conclusion:** Chemokines were strongly induced by stimulation of cytokines in combination and showed different pattern of inhibition by the inhibitors. Therefore, it was assumed that cytokines acted on multiple pathways or on unknown pathways which converged to gene-specific transcription factors. (*Immune Network* 2003;3(1):61-68)

Key Words: Fibroblast, chemokine, cytokine, ELISA

서 론

섬유모세포는 체내에 널리 분포하고 있는 결합조직세포로서 같은 조직 내의 다른 세포형으로 항상 분화할 수 있는 능력을 가지고 있으며 오랜 시험관 내 배양을 거친 후에도 아주 안정된 표현형을 유지하고 있다(1,2). 면역반응이 조절되는 기전을 연구하기 위한 최근의 모델들은 좀 더 확장된 면역계에 관심을 두고 있으며 여기에서

는 기질세포들이 선천성 면역에서 후천성 면역으로의 전환에 중요한 역할을 수행하고 있다. 섬유모세포를 자극하면 즉시 싸이토카인, 케모카인, 그리고 prostaglandin E2 등을 생산해 내며, CD40-CD40L의 상호작용을 통하여 침윤된 혈액세포의 행동을 조절하는 능력을 가지고 있음이 알려져 있다(3). 정상적으로는, 위험신호가 조직 내에 상주하는 세포인 대식세포와 섬유모세포 등을 자극하면 이들 세포들로부터 케모카인이 생산되며, 그 결과로 염증세포가 모여들고 급성 염증반응이 개시되어 후천성 면역반응의 경과를 거친다(4).

극성을 띠지 않은 상태의 T 세포로부터 T helper (Th)

책임저자 : 조정제, 경희대학교 의과대학 미생물학교실
☎ 130-701, 서울시 동대문구 회기동
Tel: 02-961-0463, Fax: 02-962-6189
E-mail: jjcho@khu.ac.kr

1 또는 Th2 세포로의 전환은 T 세포반응의 중심축을 형성하며 감각 단계에서 존재하는 싸이토카인들의 조합은 최종적으로 효과 T 세포로부터 생산되는 싸이토카인의 양상을 결정하게 된다(5). 비강에 존재하는 섬유모세포는 비염형성 및 비강의 알레르기 질환에서 중요한 역할을 수행하며 아토피 질환을 가진 사람의 국소 점막으로부터 여러 백혈구에 대해 특이성을 가지는 케모카인들이 과발현된다는 사실이 알려져 있다(6). 비점막 유래의 또는 폐조직 유래의 섬유모세포를 이용한 일련의 실험들에서 Th1 싸이토카인과 Th2 싸이토카인의 혼합처치가 특정한 조합으로 작용할 경우, 각종 케모카인이 서로 다른 양상으로 발현되고 생산됨이 일부 보고되었다(7,8).

현재까지 여러 싸이토카인의 자극에 의한 케모카인의 발현이나 생산의 양상들에 대한 연구들이 여러 세포 종류들에 대하여 이루어져 왔으나 어떤 기전을 통하여 일어나는지에 대해서는 많이 연구되어 있지 않다. 최근 regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)와 eotaxin 유전자의 촉진자에 대한 연구에서 이들 싸이토카인들에 의해 촉진자 영역에 존재하는 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)나 signal transducer and activator of transcription (STAT)과 같은 전사인자들의 결합이 일어나고 그 결과로서 이들 케모카인 유전자의 전사가 증가하는 것이 알려진 바 있다(9-11). 싸이토카인에 의한 케모카인의 발현 양상은 반응하는 세포나 싸이토카인의 조합에 따라 반응하는 양상이나 반응 정도가 아주 다르다. 뿐만 아니라 특정 싸이토카인의 자극에 의해 특정 전사인자가 작용하여 케모카인의 발현에 개입하기까지의 여러 신호 전달과정을 명확하게 밝혀주는 연구가 별로 진행되어 있지 않다. 따라서 이들 신호 전달과정에 대한 정보는 장차 케모카인에 의해 일어나는 생리적 또는 병리적 현상들을 조절할 수 있는 가능성을 열어 준다는 의미에서 어떤 신호전달과정이 케모카인의 발현이나 생산에 개입하고 작용하는가를 확인하는 작업은 중요한 의미를 가지고 있다.

본 연구에서 저자는 섬유모세포에 작용하여 각종 케모카인을 유도하는 것으로 알려져 있는 대표적인 싸이토카인인 interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α 및 IL-1 β 등을 이용하여 이들에 의해 케모카인이 조절되는 기전을 확인하고자 하였다. 이들 싸이토카인에 의해 비점막 섬유모세포로부터 유도된 케모카인이 세포 내의 여러 신호전달 과정에 작용하여 억제효과를 나타내는 것으로 알려져 있는 약제들을 처리하였을 때 어떠한 양상으로 억제되는가를 확인함으로써 케모카인이 조절되는 기전을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

비점막유래 섬유모세포의 배양. 인체 비점막 조직은 비중격 만곡의 교정을 위해 수술하는 환자에게서 동의를 얻은 다음 하비갑개로부터 수술중에 채취하였다. 비점막조직을 2~4 mm 정도로 잘게 자른 다음 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO, NY, USA) 완전배양액을 가하여 직경 10 cm 배양접시상에서 배양하였다. DMEM 완전배양액은 DMEM에 2%의 우태아혈청 (GIBCO, NY, USA), 1%의 페니실린-스트렙토마이신, L-glutamine이 함유된 것으로 하였으며 5% CO₂ 존재하에 37°C에서 배양하였다. 약 3~4주 후 섬유모세포의 성장이 확립되었을 때 점막조직 덩어리를 제거하고 제 1차 계대배양을 실시하였다. 배양용기 바닥에 부착된 세포는 0.05% trypsin 및 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid로 떼어내고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 다음 DMEM 완전배양액으로 배양하였다. 배양접시의 바닥에 섬유모세포가 100% 차지하게 되면 다음 계대배양을 실시하였으며 4~6대째로 계대배양한 섬유모세포를 실험에 사용하였다(8).

비점막 섬유모세포의 싸이토카인 자극. 75 cm² 플라스크(Falcon)에서 배양한 인체 비점막 유래의 섬유모세포를 최종적으로 직경 35 mm 배양접시(Greiner, Germany)상에서 5대째 계대배양하여 바닥에 100% 차게 되면 cyclosporin A (최종농도: 0.1 μ g/ml), wortmannin (100 nM), staurosporine (100 nM), dexamethasone (2×10^{-7} M)을 각각 18시간씩 전처리하였으며 그 후 이들 섬유모세포를 여러 종류의 싸이토카인으로 처리하였다. 본 실험에 사용된 싸이토카인들은 모두 R&D사(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. MCP 계열의 케모카인을 확인하기 위하여 TNF- α , IFN- γ 그리고 IL-1 β 등을 단독으로 혹은 여러 가지 조합으로 처리하였다. RANTES의 발현을 확인하기 위하여 Th2 싸이토카인인 IL-4와 IL-13을 병행하여 처리하였다. 사용한 싸이토카인의 최종 농도는 TNF- α 와 IL-1 β 는 10 ng/ml이었으며 나머지 싸이토카인들의 경우에는 20 ng/ml이었다. 싸이토카인으로 자극한 다음 24시간이 경과한 후 배양상청액을 수거하여 -70°C에 보관하였다가 면역효소측정법으로 측정하였다.

역전사-중합 연쇄반응. 비점막 유래 섬유모세포로부터의 역전사 중합 연쇄 반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)은 역전사 kit (Takara, Japan) 및 중합 연쇄 반응 kit (Takara, Japan)/(Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 실시하였다. Total RNA의 추출을 위해 TRIZOL (mono-phasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate: Life Technologies, Grand Island, NY, USA)을 이용하였으며, TRIZOL 1 ml당 5×10^6 세포를 가

하였다. RNA를 추출한 다음, 3 μ g의 total RNA를 역전사 반응액(MgCl₂ 5 mM, 1 x RNA PCR buffer, dNTP 1 mM, RNase inhibitor 1 unit/ μ l, oligo dT 0.125 μ M, AMV RTase 0.25 unit/ μ l)과 혼합하여 42°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 10배 희석한 다음 2~5 μ l를 중합 연쇄 반응액과 혼합하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)-특이 시발체를 이용하여 반정량적인 PCR을 시행하였으며 RT-PCR 증폭 산물은 1.2% agarose gel상에서 분석하였다. 실험에 사용한 시발체의 염기 서열 및 증폭 산물의 크기는 다음과 같다.

G3PDH forward : 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'/
reverse : 5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3' (324 bp)
RANTES forward: 5'-CCTCCGACAGCCTCTCCACA-3'/
reverse : 5'-GTGTAAGTTCAGGTTCAAGGA (350 bp)
Chemokine 단백질의 측정. RANTES와 MCP의 생산량을 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 법으로 측정하였다. RANTES와 MCP-1의 측정은 ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하였다. MCP-2 및 MCP-3는 capture 항체와 detection 항체(R&D Systems)를 별도로 구입하여 ELISA plate를 준비하였다. ELISA용 plate (Nalge-Nunc, Rochester, NY, USA)를 각각의 싸이토카인 capture 항체로 coating하여 4°C에서 16시간 처리하였다. 이때 항체의 농도는 coating buffer (PBS) 1 ml당 1 μ l이었다. Plate 바닥에 고정되지 않은 여분의 capture 항체를 씻어낸 다음 각 plate를 37°C에서 2% BSA-PBS로 blocking하였다. Blocking 후 plate를 PBS-Tween 20 (0.05%; v/v)으로 씻어내고 검체를 50 μ l씩 duplicate로 가하였다. 재조합 MCP들의 표준곡선은 케모카인의 농도를 측정하기 위하여 사용되었다. 각 plate들을 세척한 다음 biotin을 결합시킨 rabbit 항-싸이토카인 항체를 가하였다. 30분 후 세척하고 streptavidin-peroxidase를 가한 다음 30분간 더 처리하였다. 세척 후 발색 기질을 가하고 ELISA reader로 측정하였다. MCP-1에 대한 실험의 민감도는 5 pg/ml였다. 모든 기준치는 duplicate로 측정하였고 결과는 3회에 걸친 독립적인 실험치 중 대표적인 수치를 나타내었다. 이들 실험치는 ANOVA로 비교하였고 P value < 0.01를 유의성이 있다고 간주하였다.

결 과

비점막 섬유모세포에서의 RANTES 발현 및 억제. RANTES는 정상 섬유모세포 배양에서는 거의 생산되지 않으나 Th1 싸이토카인들인 TNF- α /IFN- γ 의 혼합처리에 의해 현저하게 mRNA의 발현과 단백질의 생산이 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이를 확인하기 위해 먼저 RANTES의 발현이 유도되는 것을 RT-PCR을 통해 확인하였다(Fig. 1A). RT-PCR을 시행한 결과에

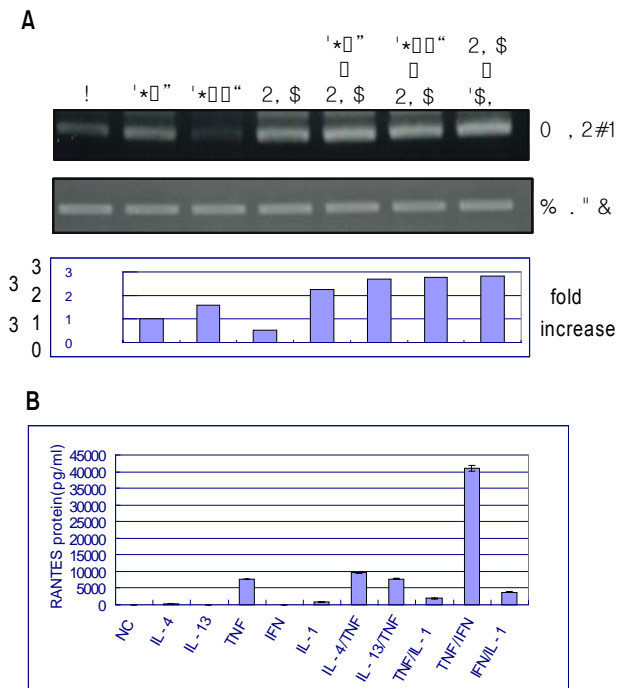


Figure 1. Effects of cytokines on the mRNA expression and production for RANTES in nasal mucosal fibroblasts (NMF). Confluent monolayers of NMFs were stimulated with IL-4 (20 ng/ml), IL-13 (20 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), and IFN- γ (20 ng/ml). These cytokines were used alone or in combination for 24 hours. (A) mRNA expression of RANTES. (B) RANTES levels in the supernatants of cells. Co-stimulation with TNF- α /IFN- γ showed most potent effect in the production of RANTES.

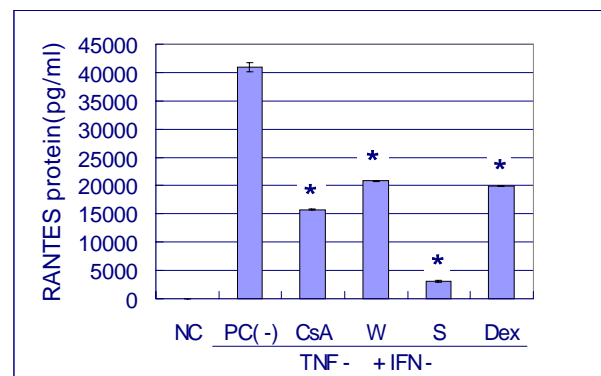


Figure 2. Effects of cyclosporin A, wortmannin, staurosporin, and dexamethasone on TNF- α /IFN- γ -induced RANTES production in nasal mucosal fibroblasts. Cells were pretreated with any one of cyclosporin A (CsA, 0.1 μ g/ml), wortmannin (W, 100 nM), staurosporin (S, 100 nM), or dexamethasone (Dex, 2 \times 10⁻⁷ M) for 18 hours and then incubated with TNF- α (10 ng/ml)/IFN- γ (20 ng/ml) for 24 hours. The RANTES amount secreted was determined by ELISA. TNF- α /IFN- γ -induced production of RANTES was inhibited by all inhibitors used. NC: negative control (no stimulation), PC: positive control (stimulation with TNF- α /IFN- γ). *: P < 0.01 compared with PC.

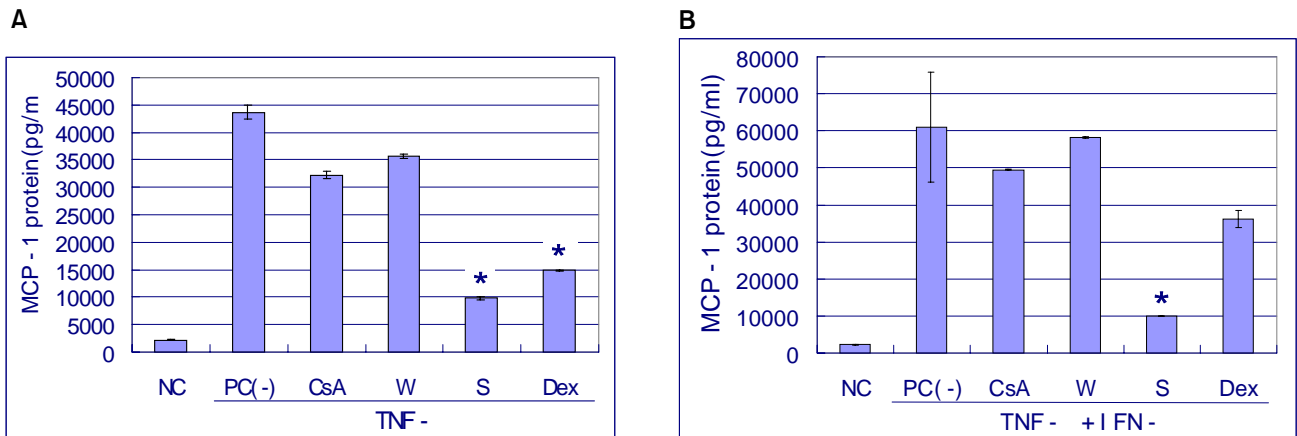


Figure 3. Inhibition of cytokine-induced MCP-1 production by various inhibitors in nasal mucosal fibroblasts. Cells were pretreated with any one of cyclosporin A (CsA, 0.1μg/ml), wortmannin (W, 100 nM), staurosporine (S, 100 nM), or dexamethasone (Dex, 2×10^{-7} M) for 18 hours and then incubated with TNF-α (10 ng/ml) alone (A) or TNF-α (10 ng/ml)/IFN-γ (20 ng/ml) combination (B) for 24 hours. The MCP-1 amount secreted was determined by ELISA. Staurosporine and dexamethasone inhibited TNF-α-induced MCP-1 production. Among the inhibitors used, only staurosporine inhibited TNF-α/IFN-γ-induced MCP-1 production. *: $P < 0.01$ compared with PC.

서는 TNF-α의 단독처리 및 IL-4/TNF-α, IL-13/TNF-α, TNF-α/IFN-γ의 혼합처리 시 모두 RANTES mRNA의 발현을 볼 수 있었으나 양적인 차이를 확인할 수는 없었다. ELISA를 시행한 결과, mRNA의 발현을 보였던 경우 모두 단백질이 생산되었으나 이미 알려진 바와 같이 섬유모세포에서의 RANTES 생산에 필요한 자극으로는 TNF-α/IFN-γ의 혼합처리가 현저하게 작용함을 확인할 수 있었으므로 본 연구에서 RANTES의 유도를 위해 TNF-α/IFN-γ를 혼합처리하였다(Fig. 1B). RT-PCR의 결과로는 발현유무만 확인할 수 있었으며 생산량을 추정할 수 있는 근거가 되지 못하였으므로 이후 양성대조군의 설정에는 ELISA 결과만을 참고하였다. 아무 자극도 가하지 않은 실험군을 음성대조군(NC, negative control)으로, 억제제로 전처리하지 않고 싸이토카인만 처리한 실험군을 양성대조군(PC, positive control)으로 각각 설정하였다. 억제제를 처리한 4가지 각각의 실험군들 모두에서 TNF-α/IFN-γ에 의한 RANTES의 생산이 억제되었고 staurosporine의 억제효과가 가장 현저하였다(Fig. 2).

비점막 섬유모세포에서의 MCP-1 생산의 억제. MCP-1은 정상 섬유모세포의 배양상청액에서도 상당량 검출되었다(2208 ± 81 pg/ml). 본 연구에서는 MCP-1의 유도를 위하여 TNF-α를 단독으로 처리하거나 TNF-α와 IFN-γ를 동시에 함께 처리함으로써 MCP-1의 생산을 유도하였다. 먼저 TNF-α의 단독 처리 시(45244 ± 5490 pg/ml) cyclosporin A 처리는 20% 정도 생산을 억제시켰으며(36467 ± 188 pg/ml) wortmannin의 처리는 오히려 10% 정도의 생산을 증가시키는(50828 ± 1317 pg/ml) 반대 결과를 보여 주었다. 한편 staurosporine (9813 ± 291 pg/ml) 및

Table I. Effects of inhibitors on the production of MCP-2, MCP-3 by single cytokine treatment

Chemokine	Cytokine (stimuli)	Inhibitors				No inhibitor
		CsA	W	S	Dex	
MCP-2	TNF-α	ND	ND	ND	ND	ND
	IFN-γ	259	471	692	57	380
	IL-1β	44	99	48	10	108
MCP-3	TNF-α	150	190	30	13	133
	IFN-γ	693	709	27	155	394
	IL-1β	947	1481	170	155	1235

ND: not detectable, detection level: pg/ml

dexamethasone (14898 ± 100 pg/ml)의 억제 효과는 현저하게 강하였으며 staurosporine의 억제 효과가 가장 강하였다(Fig. 3A).

TNF-α와 IFN-γ를 혼합처리한 경우에도 TNF-α의 단독처리 시와 거의 유사한 양상을 보여주었다. 다만 dexamethasone을 전처리한 경우에서 TNF-α의 단독처리에 비해 억제되는 정도가 다소 약하였다(Fig. 3B).

비점막 섬유모세포에서의 MCP-2 생산의 억제. MCP-2는 정상 섬유모세포에서는 전혀 생산되지 않았으며 실험에 사용한 싸이토카인의 단독처리 시에는 생산되지 않거나 미미한 수준이었다(Table I). TNF-α의 처리에는 전혀 반응하지 않았으나 IFN-γ으로 처리한 경우 cyclosporin A는 어느 정도의 억제 효과를 보였으나 wortmannin과 staurosporine은 오히려 생산을 증가시켰으며 dexamethasone의 억제효과가 현저하였다. IL-1β의 경우

wortmannin의 전처치는 별 영향을 미치지 못하였으나 cyclosporin A 및 staurosporine의 경우 50% 이상 억제하였고 dexamethasone의 억제효과가 가장 현저하여 약 90% 정도까지 억제하였다. 한편 TNF- α 와 IFN- γ 의 동시 자극 또는 IL-1 β 와 IFN- γ 의 동시 자극 시 MCP-2의 증가가 가장 현저하여 이들의 자극 시 MCP-2의 생산을 억제하는 약제의 효과를 확인하였다. 동시 자극 시 모든 억제 약제들에 의해 억제효과가 나타남을 확인할 수 있었으며 dexamethasone의 경우가 억제효과가 가장 좋았다 (Fig. 4A, B).

비점막 섬유모세포에서의 MCP-3 생산의 억제. MCP-3의 생산도 MCP-2에서와 마찬가지로 자극하지 않은 경

우에는 거의 생산되지 않았으며 사이토카인의 단독처치에 의한 경우에는 약간 생산되었다. TNF- α 처치군에서 cyclosporin A는 영향을 미치지 못하였으나 wortmannin은 오히려 MCP-3의 생산을 증가시켰다. 그러나 staurosporine 또는 dexamethasone의 전처치는 완전한 억제효과를 보여주었다. IFN- γ 처치군에서 cyclosporin A 및 wortmannin은 억제효과가 없이 오히려 현저하게 증가시키는 양상을 보였으나 staurosporine은 완전한 억제효과를 보였고, dexamethasone은 50% 이상 MCP-3의 생산을 감소시키는 역할을 하였다. IL-1 β 처치군에서도 cyclosporin A는 약간의 감소를, wortmannin은 약간의 증가를 보였으나 staurosporine과 dexamethasone은 완전한 억제

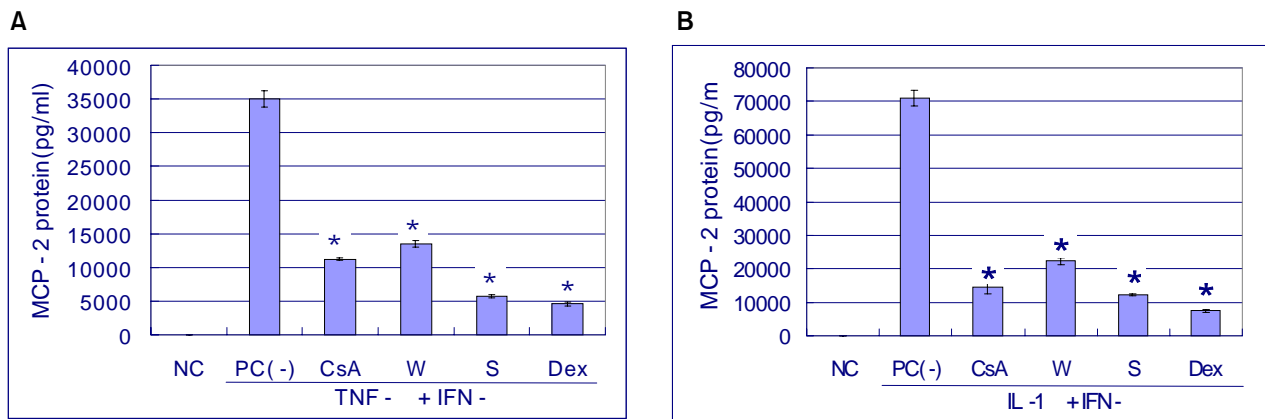


Figure 4. Inhibition of cytokine-induced MCP-2 production by various inhibitors in nasal mucosal fibroblasts. Cells were pretreated with any one of cyclosporin A (CsA, 0.1 μ g/ml), wortmannin (W, 100 nM), staurosporine (S, 100 nM), or dexamethasone (Dex, 2×10^{-7} M) for 18 hours and then incubated with TNF- α (10 ng/ml)/IFN- γ (20 ng/ml) (A) or IL-1 β (10 ng/ml)/IFN- γ (20 ng/ml) combination (B) for 24 hours. All inhibitors used in this experiment inhibited TNF- α /IFN- γ -induced or IL-1 β /IFN- γ -induced production of MCP-2 in fibroblasts. *: $P < 0.01$ compared with PC.

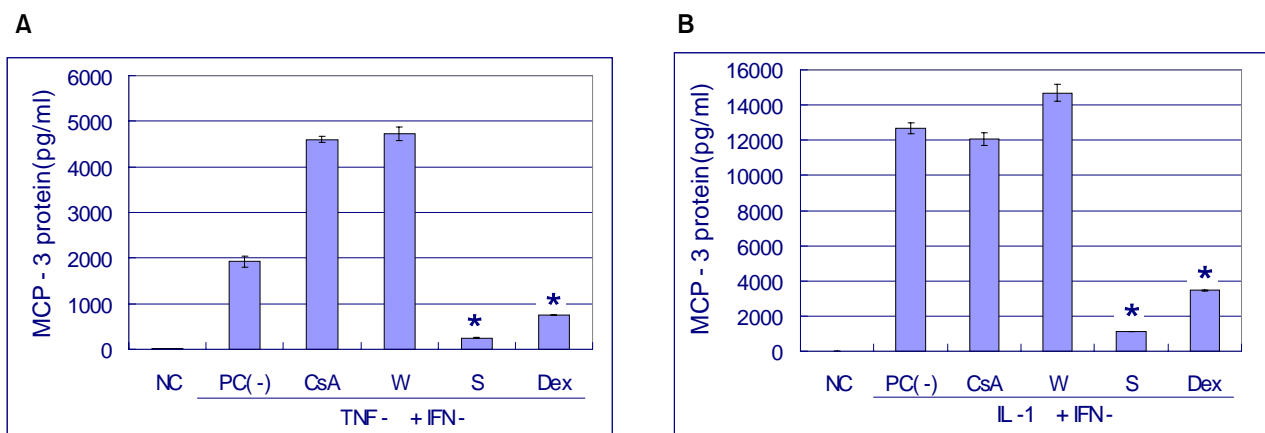


Figure 5. Inhibition of cytokine-induced MCP-3 production by various inhibitors in nasal mucosal fibroblasts. Cells were pretreated with any one of cyclosporin A (CsA, 0.1 μ g/ml), wortmannin (W, 100 nM), staurosporine (S, 100 nM), or dexamethasone (Dex, 2×10^{-7} M) for 18 hours and then incubated with TNF- α (10 ng/ml)/IFN- γ (20 ng/ml) (A) or IL-1 β (10 ng/ml)/IFN- γ (20 ng/ml) combination (B) for 24 hours. Staurosporine or dexamethasone showed strong inhibitory effects on TNF- α /IFN- γ -induced or IL-1 β /IFN- γ -induced production of MCP-3. *: $P < 0.01$ compared with PC.

효과를 나타내었다(Table I).

TNF- α 와 IFN- γ 의 혼합처리 시 MCP-3의 생산량은 1922 ± 131 pg/ml이었으며 cyclosporin A 처리군에서는 4,601 pg/ml, wortmannin 처리군에서는 4,718 pg/ml로 MCP-3가 오히려 크게 상승하였으나 staurosporine 처리군에서는 253 pg/ml, dexamethasone 처리군에서는 754 pg/ml로 현저하게 억제되었다(Fig. 5A). IL-1 β 와 IFN- γ 의 혼합처리 시에는 cyclosporin A 및 wortmannin은 별 영향을 주지 못하였고 staurosporine과 dexamethasone은 현저한 억제효과를 보여주었다(Fig. 5B).

고찰

케모카인이란 특정한 세포에 대해 화학적 주성을 일으킴으로써 백혈구의 기능이나 이동을 조절하는 사이토카인을 말하며 염증 반응에서 중요한 역할을 하고 있다(12,13). 면역학적 반응이나 염증성 반응에서 서로 다른 종류의 세포들에서 생산되므로 케모카인을 지령하는 유전자들은 특정한 조건들에서 활성화되는 전사인자에 의해 조절된다고 예상할 수 있다. NF- κ B는 면역반응과 염증반응에 있어서 중요한 전사인자들 가운데서도 핵심적인 요소이다. 전염증성 사이토카인이나 LPS 등에 의해 NF- κ B가 활성화되면 케모카인 유전자의 전사가 여러 종류의 세포에서 확인된다.

전염증성 사이토카인들인 TNF- α 와 IL-1 β 가 혈관내막 세포나 섬유모세포에 작용하여 MCP-1의 생산을 유도한다고 보고되었다(14). TNF- α 는 phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)의 활성화를 포함한 일련의 세포 내 반응을 일으키는데 PI3K의 하부 표적은 phospholipase C, protein kinase C (PKC), protein kinase B 등이 있다. 비록 TNF- α 는 일부 세포나 종양에 대해서 apoptosis를 유도하지만 대부분의 경우 유전자의 발현을 자극하는 작용을 한다. 많은 종류의 유전자가 TNF- α 에 응답성이 있으며 여기에는 사이토카인, 전사인자, 부착 단백질 및 구조단백질 등이 포함되며 TNF- α 에 의한 유전자의 발현은 NF- κ B에 집중된다. NF- κ B는 억제물질인 I κ B에 의해 결합되어 있다가 TNF의 신호에 의해 I κ B가 인산화되어 제거됨으로써 활성화된다(15). Murao 등(16)은 혈관내막세포에서 TNF- α 에 의한 MCP-1의 생산이 wortmannin에 의해 억제됨을 보고하였다. wortmannin은 강력한 PI3K 억제제로서 PI4-kinase나 PKC는 억제하지 않는다. 본 연구의 결과에서는 wortmannin의 전처치가 TNF- α 에 의한 섬유모세포에서의 MCP-1의 생산을 전혀 억제하지 못하였으나 staurosporine나 dexamethasone이 현저하게 억제시켰으므로 섬유모세포에서의 MCP-1의 생산은 TNF- α 로 자극할 때 PI3K의 경로는 거치지 않음을 예상할 수 있었다. 한편 TNF- α 는 IKK β 및 p38 MAP kinase 등의 경로를 통한 신호 전달을 독립적으로 수행하여 최종적으로 전사복합

체의 형성으로 귀착되므로 섬유모세포에서의 TNF- α 의 작용은 이들 경로를 통하여 일어날 수도 있을 것으로 추정된다.

Dexamethasone은 가장 강력하고 안정된 glucocorticoid로서 항염증성 유전자의 전사를 증가시키고 염증성 유전자의 전사는 감소시킴으로서 염증과정을 억제한다(17). Dexamethasone에 의해 전사가 억제되는 cytokine들로는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α 등이 있으며 IL-8, RANTES, MIP-1 α , eotaxin 등과 같은 케모카인도 억제함이 알려져 있다. 그 외에도 유도성 nitric oxide synthase, 유도성 cyclooxygenase, 유도성 phospholipase A2 및 adhesion molecule 등이 dexamethasone에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다. Dexamethasone에 의한 주된 면역억제의 기전은 I κ B α 의 생산을 촉진함으로써 NF- κ B를 불활성화시키는 것이다. 뿐만 아니라 전사인자인 activating protein (AP)-1이 표적유전자의 촉진자에 결합하는 것을 차단하여 유전자의 전사가 일어나지 못하도록 한다. Martin 등(18)은 사람의 내막세포에서의 MCP-1의 발현에는 NF- κ B와 AP-1의 협동이 필요함을 보고하였으며 Ping 등(14)은 또 다른 전사인자인 Sp1의 결합이 TNF- α 에 의한 MCP-1 유전자의 촉진자의 조립과 활성화에 필수적이라고 보고한 바 있다. 본 연구에서 dexamethasone에 의해 현저하게 억제되었을 뿐 아니라 PKC 억제제인 staurosporine에도 억제되었으므로 TNF- α 가 PKC를 경유하는 신호전달과정을 통해 MCP-1의 유도를 일으킬 것으로 추정되었다.

RANTES의 유도에 있어서 TNF- α 가 약간의 유도능을 보여주나 같은 전염증성 사이토카인에 속하는 IL-1 β 의 경우에는 거의 영향이 없었다. Lebovic 등(9)은 endometriotic stromal cell에서 IL-1 β 에 의해 RANTES가 유도되고 이는 NF- κ B에 의존적임을 보고하였으며 Yamada 등(19)은 IL-1 β 의 자극에 의한 RANTES의 생산에 Syk와 TNF receptor associated factor (TRAF) 6가 관여하고 TNF- α 의 신호전달에는 TRAF2가 관여한다고 보고하였다. 본 실험에서 IFN- γ 단독처리로는 유도되지 않으나 TNF- α 와 IFN- γ 를 혼합처리하였을 경우에만 강력한 유도 및 상승작용을 나타내었고, 사용한 4가지 억제제 모두에 반응하여 억제되었다. 아직까지 TNF- α 와 IFN- γ 의 동시자극이 어떤 기전으로 RANTES의 발현을 유도하는지 보고되어 있지 않으며 본 연구의 결과만으로 활성화되는 경로를 명확하게 확인하기는 어려웠다. 다만 IL-1 β 에 대한 반응성이 전혀 없기 때문에 일반적으로 염증반응을 유도할 경우에 TNF- α 와 IL-1 β 가 공통적으로 거치는 경로들과는 무관하면서 TNF- α /IFN- γ 를 동시에 자극할 경우에만 작용하는 미지의 기전이 존재할 가능성이 있을 것으로 추정된다. 한편 이들 사이토카인의 조합에 의한 다른 유전자의 유도 시에는 억제제에 대한 효과가 다르게 나타

났으므로 사이토카인의 혼합에 의한 작용부위는 유전자의 조절특성을 보여줄 수 있는 촉진자영역에서의 전사인자들일 것으로 생각한다.

MCP-2는 IFN- γ 에 의한 자극 시 dexamethasone에 의해서만 억제되었다. MCP-2의 촉진자 영역에는 공통적인 NF- κ B 결합염기서열이 존재하지 않으므로 NF- κ B가 직접적인 표적이 될 가능성보다는 다른 전사인자들의 조절이 일어날 것으로 생각한다(20). JAK1 및 JAK2 두 가지 tyrosine kinase을 활성화시키는 인자인 IFN- γ 는 PI3K 및 Akt의 활성화를 거쳐 궁극적으로는 STAT1 전사인자를 인산화시킴으로써 gamma-activated sequence (GAS) 영역에 작용하여 유전자의 발현을 유도한다. 아직 이들 기전에 의한 케모카인의 발현이 보고되어 있지는 않다. 그러나 IL-13에 의한 MCP-1의 유도에 Stat6의 인산화가 필요하다는 연구와(21)와 IL-4 또는 TNF- α 에 의한 eotaxin-1의 유도에 STAT6가 개입한다는 연구(11) 등으로 미루어볼 때 IFN- γ 에 의한 MCP-2 또는 MCP-3의 유도에 STAT1의 개입이 가능할 것이다. 실제로 MCP-2의 촉진자 영역에 두 개의 GAS와 유사한 영역이 존재하며 이들이 개입되어 작용할 것으로 예상된다. 최근에는 또 다른 DNA 염기서열인 gamma-activated transcription element (GATE)와 여기에 작용하는 전사인자인 EBP- β 가 IFN- γ 에 의해 조절됨이 발표되었으며(22), Stat1 null mutation 마우스에서 Stat1이 인산화되지 않아도 c-myc이나 c-jun이 IFN- γ 에 의해 유도되어 유전자들을 조절할 수 있음이 보고되었다(23). MCP-2와 MCP-3 모두 전염증성 사이토카인과 IFN- γ 의 혼합처리 시에 크게 상승작용을 일으키며 생산되며 이들은 예외없이 staurosporine 및 dexamethasone에 의해 크게 억제되었으므로 섬유모세포에서 이들 케모카인의 유도에 개입하는 사이토카인들은 PKA, PKC 등의 경로, JAK 경로 혹은 아직 밝혀지지 않은 다른 경로를 통해 작용하여 최종적으로는 전사인자들을 조절할 것으로 보인다. 억제되는 양상은 케모카인에 따라 특이적으로 일어나므로 유전자의 특성을 나타내는 촉진자 영역과 직접적으로 관련되어 억제제들이 작용할 것으로 추정되나 명확한 억제경로를 확인하기 위해서는 더욱 특이적인 여러 가지 억제제를 사용하여 추적하여야 할 것으로 생각되었다.

본 연구에서는 비점막유래의 섬유모세포가 여러 사이토카인의 자극에 의해 케모카인을 생산함에 있어 조절되는 양상을 신호전달의 억제를 통하여 알아보았다. 본 연구결과는 섬유모세포가 케모카인의 조절을 통해 염증반응에 관여하는 기전을 이해하는 데 도움이 될 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1. Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Doucet C, Jasmin C,

- Azzarone B: Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *Eur J Immunol* 30;914-919, 2000
2. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP: Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol* 151;317-322, 1997
3. Zhang Y: CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts. *J Immunol* 160;1053-1057, 1998
4. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M: Fibroblasts regulate resolving to chronic persistent inflammation. *Trends in Immunol* 22;199-204, 2001
5. Romagnani S: Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12;227-257, 1994
6. Christodouloulopoulos P, Wright E, Frenkel S, Luster A, Hamid Q: Monocyte chemotactic proteins in allergen-induced inflammation in the nasal mucosa: effect of topical corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 103;1036-1044, 1999
7. Terada L, Hamano N, Nomura T: Interleukin 13 and TNF- α synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 30;348-355, 2000
8. Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, Valencia EL, Nakajima T, Hirai K, Schroder JM: Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20;777, 1999
9. Levoic DI, Chao VA, Martini JF, Taylor RN: IL-1 beta induction of RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted) chemokine gene expression in endometriotic stromal cells depends on a nuclear factor-kappaB site in the proximal promoter. *J Clin Endocrinol Metab* 86;4759-4764, 2001
10. Jedrzkiewicz S, Nakamura H, Silverman ES, Luster AD, Mansharamani N, In KH, Tamura G, Lilly CM: IL-1 β induces eotaxin gene transcription in A549 airway epithelial cells through NF- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279;1058-1065, 2000
11. Hoeck J, Woisetschlager M: STAT6 mediates eotaxin-1 expression in IL-4 or TNF-alpha-induced fibroblasts. *J Immunol* 166;4507-4515, 2001
12. Luster AD: Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England Journal of Medicine* 338; 436-445, 1998
13. Rollins BJ: Chemokines. *Blood* 90;909-928, 1997
14. Ping D, Boekhoudt G, Zhang F, Morris A, Philipsen S, Warren ST, Boss JM: Sp1 binding is critical for promoter assembly and activation of the MCP-1 gene by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 275;1708-1714, 2000
15. Israel A: The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B? *Trends in Cell Biol* 10;129-133, 2000
16. Murao K, Ohya T, Imachi H, Ishida T, Cao WM, Namiyama H, Sato M, Wong NCW, Takahara J: TNF- α stimulation of MCP-1 expression is mediated by the Akt/PKB signal transduction pathway in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 276;791-796, 2000
17. Barnes PJ: Glucocorticosteroids. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thompson NC eds.: *Asthma, Basic mechanisms and clinical management*, p725-766, Academic Press, 1998
18. Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR: Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF- κ B and AP-1. *Eur J Immunol* 27;1091-1097, 1997
19. Yamada T, Fujieda S, Yanagi S, Yamamura H, Inatome R, Yamamoto H, Igawa H, Saito H: IL-1 induced chemokine production through the association of Syk with TNF

- receptor-associated factor-6 in nasal fibroblast lines. *J Immunol* 167;283-288, 2001
20. Van Coillie E, Van Aelst I, Fiten P, Billiau A, Van Damme J, Opdenakker G: Transcriptional control of the human MCP-2 gene promoter by IFN-gamma and IL-1 beta in connective tissue cells. *J Leukoc Biol* 66;502-511, 1999
21. Goebeler M, Schnarr B, Toksoy A, Kunz M, Brocker EB, Dusch A, Gillitzer R: Interleukin-13 selectively induces monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and secretion by human endothelial cells. Involvement of IL-4R alpha and Stat6 phosphorylation. *Immunology* 91;450-457, 1997
22. Zhou ZHL, Han Y, Wei T, Aras S, Chaturvedi P, Tyler S, Rani MRS, Ransohoff RM: Regulation of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 transcription by interferon-gamma (IFN- γ) in human astrocytoma cells: postinduction refractory state of the gene, governed by its upstream elements. *FASEB J* 15;383-392, 2001
23. Ramana CV, Gil MP, Han Y, Ransohoff RM, Schreiber RD, Stark GR: Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 98;6674-6679, 2001
-