

□ 원 저 □

말초 혈액 단핵구의 TNF- α 와 IL-8 발현에서 내독소에 대한 내성 기전에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 폐연구소

박계영, 김재열, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

Mechanisms of Lipopolysaccharide-induced Lipopolysaccharide Tolerance in the Expression of TNF- α and IL-8 in Peripheral Blood Monocytes

Gye Young Park, M.D., Jae Yeol Kim, 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 Lung Research Institute,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background : Monocytes/macrophages play a central role in determining the host response during Gram-negative infection through secretion of a variety of mediators after stimulation of LPS. Even though cytokine production has been shown to play an important role in host defense during sepsis, cytokine release may also lead to tissue injury. Thus, regulation of macrophage response to LPS is critical for host survival during Gram-negative sepsis. In animals exposed to nonlethal doses of endotoxin, a characteristic hyporesponsiveness to subsequent administration of endotoxin has been observed. This phenomenon was known as 'LPS tolerance'. However, little information is available regarding the underlying mechanism of LPS tolerance.

Method : Peripheral blood monocyte(PBMC) was isolated from peripheral blood of normal volunteers by adhesion purification method. To evaluate the conditions to obtain LPS tolerance, preculture was carried out with LPS at 10ng/ml for 24 hours. For stimulation, culture plates were washed two times and were stimulated with LPS at 1 μ g/ml for 4, 6 and 26 hours. To assess the underlying mechanisms of LPS tolerance, autologous serum, PMA, anti-CD14 Ab, Indomethacin or PGF₂ were added to preculture solution respectively. Cytokine concentrations in culture supernatants were measured using ELISA for TNF- α and IL-8 and mRNA of TNF- α and IL-8 were determined by Northern blot analysis.

Results : The exposure of PBMC to low dose of LPS suppressed the cytokine production and mRNA expression of TNF- α , but not IL-8.

*이 논문은 1995년도 서울대학교 병원 일반 연구비(수정 연구비)지원에 의해 이루어진것임

Anti-CD14 Ab partially recovered production of $\text{TNF-}\alpha$ which was suppressed by preculture with low dose LPS.

The preculture with PMA induces LPS tolerance, as preculture with low dose LPS.

Conclusion : LPS tolerance to $\text{TNF-}\alpha$ is regulated pretranslationally and is influenced by protein kinase C pathway and CD14.

Key words : LPS tolerance, $\text{TNF-}\alpha$, IL-8

서 론

임상적으로 흔히 관찰되는 sepsis syndrome은 고열, 저혈압, 저혈당 등의 소견을 보이다가 점차 진행하여 Multiorgan failure를 일으켜 사망에 이를 수 있는 매우 심각한 질환이다. 이는 주로 그람 음성 간균에 의해서 발생하며 그람 음성균의 세포벽 성분인 '내독소'가 결정적 역할을 하는 것으로 이해되고 있다¹⁾. 내독소는 세포에 작용하여 TNF 등 여러 cytokine을 분비함으로써 이러한 신체증상을 일으키게 된다. 대개 cytokine은 세포막의 수용체와 결합한 후 세포 내 신호전달 체계를 통해 세포를 활성화시키는데 내독소도 세포막의 수용체를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 내독소의 수용체로 가장 잘 알려져 있는 것은 CD14가 있으며 CD14 이외의 내독소 수용체들도 알려지고 있다²⁻⁵⁾. 내독소는 혈청 내 성분인 LBP(LPS binding protein)와 결합하면 세포막 수용체인 CD14와의 결합력이 증가된다고 알려져 있다^{3, 6, 7)}.

단핵 식세포는 내독소에 의한 sepsis syndrome을 일으키는 데 있어서 매우 중요한 세포로서 단핵 식세포가 내독소에 의해 활성화되면 IL-1, IL-6, IL-8, TNF 등 여러 종류의 cytokine을 분비하는데 이러한 염증 매개성 물질은 개체를 내독소로부터 개체를 방어하는 작용이 있는 반면에 TNF 등의 cytokine에 의한 심각한 조직 손상을 가져오는 부작용도 있다¹⁾.

이전의 연구들에서 보면, 동물실험 등에서 내독소를 치사량 이하의 농도로 노출시킨 후 다시 내독소를 주입하면 내독소에 의한 여러 임상증상 들이 억제되는

것이 관찰되었다. 또한, 여러 세포주와 단핵 식세포를 가지고 시행한 실험에서도 내독소에 이미 노출된 세포는 내독소로 재자극 시 cytokine 생성능이 현저히 저하되는 현상이 관찰되어 이러한 현상을 '내독소 내성 (LPS tolerance)'이라고 한다^{8, 9)}. 이러한 내독소 내성 획득의 생체 내에서의 의의가 현재 정확하게 알려져 있지 않은 실정이지만 두 가지 측면을 고려해야 할 것으로 생각된다. 즉, 내독소에 대한 내성획득은 단핵 식세포에서의 지나친 cytokine생성을 억제하여 이로 인한 조직 손상을 예방하는 유익한 효과가 있는 반면에 외부물질에 대한 방어기능이 저하되는 불리한 측면도 있다. 내성획득의 의의를 이해하면 sepsis syndrome의 새로운 치료법 개발에 큰 도움이 될 것으로 생각되며 이를 위해서는 내성획득 기전의 규명이 선행되어야 할 것으로 생각된다. 이에 연구자들은 말초 혈액 단핵구를 이용하여 내독소로 미리 전처리한 후 다시 내독소 재자극 시에 $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 분비 능력에 있어 내성획득이 이루어지는가를 알아보고, 만약 내독소 내성이 이루어지면 이 내성획득이 어떻게 조절되며, 내성획득 기전은 무엇인가를 알아보고자 본 연구를 시행했다.

대상 및 방법

1. 시약

실험에 사용한 시약은 다음과 같다.

Media ; RPMI-1640(Sigma®)

LPS ; E.coli 0111 : B4(Sigma®)

Protein kinase C activator ; PMA(16nM)
(Sigma®)

Indomethacin(100uM) (Sigma®)

PGE2(30uM) (Sigma®)

antiCD14 Ab ; anti-Leu-M3(10ug/ml) (Becton
Dickinson®)

2. 말초혈액 단핵구의 분리

정상인의 말초혈액을 heparin을 항응고제로 이용하여 채혈하여 Ficoll-Hypaque density gradient 방법으로 단핵 세포층을 분리한 후, 혈청성분이 포함되지 않은 RPMI-1640 배양액을 이용하여 plastic 접시에 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 부착시킨 후 상층액을 제거하고 RPMI로 세척하여 부착되지 않는 세포를 제거하는 방법(Adhesion purification)으로 말초혈액 단핵구를 분리하였다. 세포수는 2×10^6 /ml로 조절하여 모든 실험조건에 동량의 세포수가 되도록 조절하였다.

3. 실험 조건

내독소는 전처치는 10ng/ml로 24시간 배양하였으며 2회 세척 후 내독소 재자극을 1 µg/ml의 농도로 시행하였다. 내독소 재자극 시간은 각 cytokine이 최고 농도에 도달하는 시간으로 알려져 있는 TNF-α에 대해서는 6시간 IL-8은 24시간으로 하였고, RNA분리는 모두 4시간에 시행하여 Northern analysis를 시행하였다.

4. Cytokine 측정

TNF-α, IL-8 단백질의 양은 배양액 상층액에서 시료를 채취하여 미국 R & D System의 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 실험은 3회 반복하여 평균을 구하였다.

5. Northern blot analysis

1) RNA 분리

각 실험조건에 따라 누어진 plastic접시에서 말초혈액 단핵구의 RNA를 guanidine thiocyanate phenol chloroform extraction 방법으로 추출한 후 spectrophotometer로 전체 RNA의 양을 측정하였다. 1% agarose/2.2M formaldehyde gel을 이용하여 각 실험조건당 동량의 RNA가 loading 되도록 하여 gel electrophoresis를 시행한 후 Hybond nylon membrane(Amersham®)에 transfer하였다.

2) c-DNA probe

TNF-α, IL-8 c-DNA는 multiprime DNA kit (Amersham®)와 α³²P-dCTP를 이용하여 random priming를 시행하였으며 scintillation counter에 의해 specific activity를 측정하였다.

3) Hybridization

TNF-α와 IL-8의 hybridization은 같은 조건으로 이루어졌는데 hybridization조건은 6x SSC, 0.5% SDS, 5x Denhardt's solution, 100ug/ml salmon sperm DNA으로 65°C에서 overnight하는 조건으로 시행되었다. 세척은 1x SSC, 0.1% SDS로 50°C에서 약 30분간 시행한 후 membrane을 intensifying screen이 달린 Kodak XAR 필름과 함께 -70°C에 둔 후 현상 시켰다.

결 과

1. 말초혈액 단핵구에서 내독소 전처치에 의한 내성 획득 유무

분리된 말초혈액 단핵구를 4가지 실험조건으로 나누

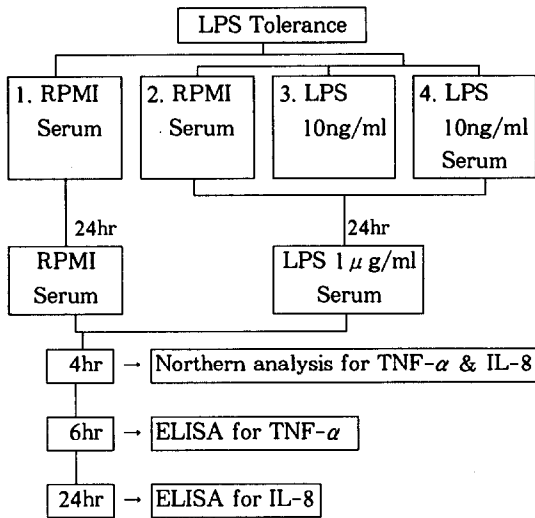


Fig. 1. Experimental design : LPS tolerance to cytokine expression(ELISA & Northern analysis).

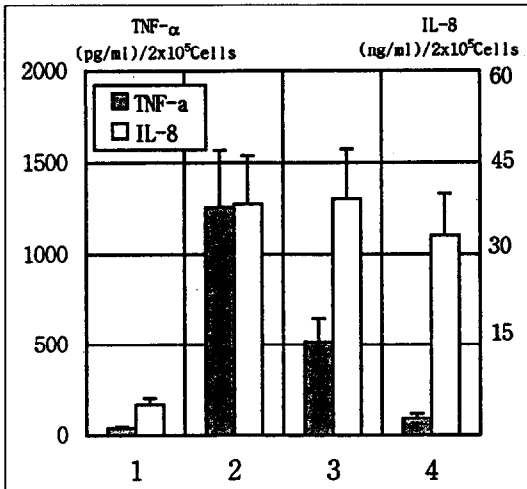


Fig. 2. Expression of cytokines on PBMC after preculture with low dose LPS(ELISA)

어 내독소 내성획득 유무를 알아보았다. 1번 실험조건은 control로서 내독소 없이 5% 자가혈청이 포함된 RPMI만으로 24시간 동안 전처치한 후 2회 세척하고 다시 같은 조건으로 배양한 것이고, 2번 실험조건은

전처치로 5% 자가혈청이 포함된 RPMI만 준 후 2회 세척한 다음 내독소를 고농도 내독소인 1μg/ml로 자극한 경우이고, 3번 실험조건은 2번 조건과 같으나 다만 전처치로 자가혈청 없이 내독소를 저농도인 10 ng/ml로 자극한 경우, 마지막 4번 실험조건은 3번 조건과 같으나 내독소 10ng/ml로 전처치할 때 5% 자가혈청을 같이 준 경우로서 내독소를 전처치한 경우에서 내독소 재자극 시에 cytokine 분비능의 감소가 일어나 내성획득이 이루어졌는가 알아보았다. 내독소 재자극 후 6시간에 상층액의 TNF-α 단백을 측정하였고 24시간 후 IL-8의 단백을 측정하였다(Fig. 1).

TNF-α의 경우 2×10^6 개 세포당 농도로 볼때 control인 1번 실험조건인 경우 37.8pg/ml이었으며 내독소 전처치를 시행하지 않은 2번 실험조건인 경우 1253.0pg/ml이었으며 저농도 내독소로 전처치한 3번 실험조건인 경우 단백질농도가 2번 조건에 비해 감소하여 515.8pg/ml이었고 내독소 전처치 시에 자가혈청을 같이 주었던 4번 실험조건인 경우 94.9pg/ml로 더욱 더 감소하였다. 그러나 IL-8의 경우 control인 1번 실험조건인 경우 5.4ng/ml이었고 2번 실험조건인 경우 41.4ng/ml이었으며 내독소로 전처치한 3번 실험조건인 경우 2번 조건과 별 변화가 없는 42.4ng/ml이었고 4번 실험조건인 경우도 34.0ng/ml으로 큰 변화가 없었다(Fig. 2).

2. 내독소 내성획득의 조절 수준

앞 실험과 같은 조건 즉, 4가지 실험조건으로 나누어서 실험을 시행한 후 내독소 재자극 후 4시간에 Northern blot analysis를 시행하여 TNF-α와 IL-8 mRNA 발현 정도를 관찰하였다(Fig. 3).

Control인 1번 실험조건인 경우 TNF-α와 IL-8 mRNA발현이 거의 관찰되지 않았으며 내독소 전처치를 시행하지 않고 내독소 자극만 시행한 2번 실험조건인 경우 TNF-α 및 IL-8 mRNA가 모두 증가하였다. 그러나 24시간 동안 저농도 내독소로 전처치를

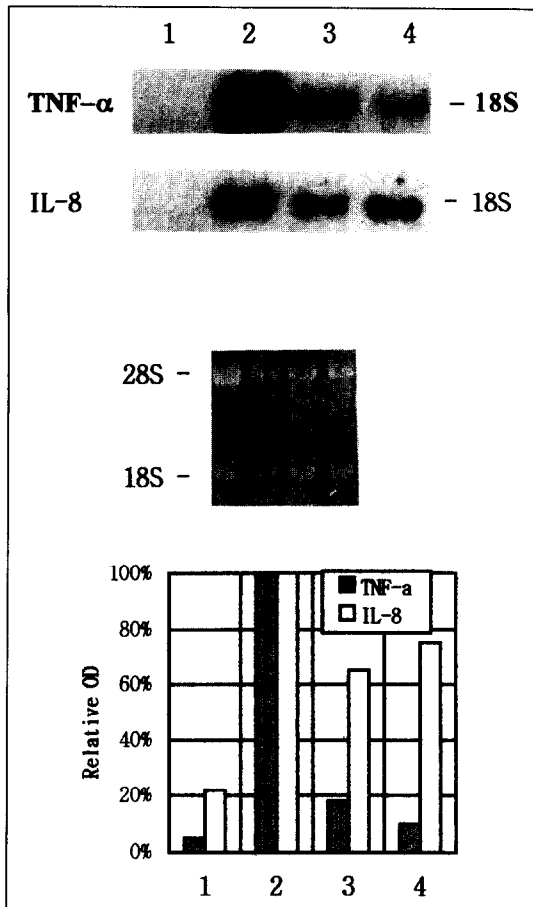


Fig. 3. Expression of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-8 mRNA on PBMC after preculture with low dose LPS. The lower part is laser densitometry and expressed as the percentage of control level

시행한 3번 실험조건의 경우 $\text{TNF-}\alpha$ mRNA 발현은 매우 현저히 감소하였으나 IL-8 mRNA 발현은 큰 변화가 없었다. 내독소 전처리 시에 자가혈청을 같이 준 4번 실험조건의 경우 $\text{TNF-}\alpha$ mRNA 발현은 좀 더 감소하였으나 IL-8 mRNA 발현은 변화가 없었다 (Fig. 4).

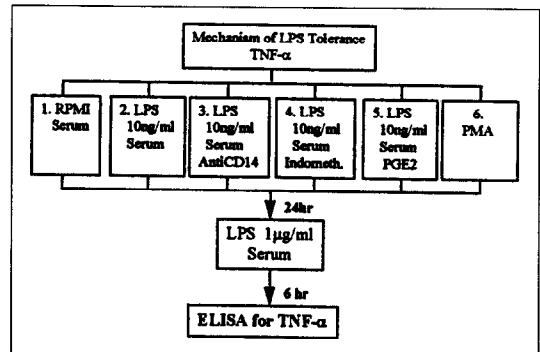


Fig. 4. Experimental design (II). Mechanism of LPS tolerance to $\text{TNF-}\alpha$ expression

3. 내독소 내성획득의 기전

1, 2번 실험 결과에서 내독소 전처리 시에 말초혈액 단핵구가 내독소 재자극 시 $\text{TNF-}\alpha$ 에 대한 분비능이 감소하여 내독소에 대한 내성이 획득되었음을 보여주었다. 그래서 이러한 내독소 내성획득이 어떻게 이루어지는지 그 기전을 알아보하고자 다음 실험을 실시했다. 내독소로 자극하기 전에 전처치의 조건을 6가지로 나누어 실험을 진행하였다. 1번 실험조건의 경우 control로서 RPMI로만 전처치를 한 경우이고, 2번 실험조건의 경우 10ng/ml의 저농도 내독소와 자가혈청으로 전처치를 하여 내성획득을 유도한 경우이며, 3번 실험조건은 내독소 수용체인 CD14가 관여하는지 알아보하고자 저농도 내독소 전처리 시에 antiCD14 monoclonal Ab를 같이 준 경우이고, 4번 실험조건이 경우 저농도 내독소 전처리 시에 여러 prostaglandin의 관여 여부를 알아보하고자 indomethacin으로 cyclooxygenase를 억제한 경우, 5번 실험조건의 경우 전처리 시에 PGE_2 를 같이 주어 관여하는지 알아 보았다. 마지막으로 6번 내독소에 대한 내성획득이 이루어지는지 알아보았다. 모든 실험조건에서 전처치는 24시간 동안 시행했으며 내독소 재자극은 $1\mu\text{g}/$

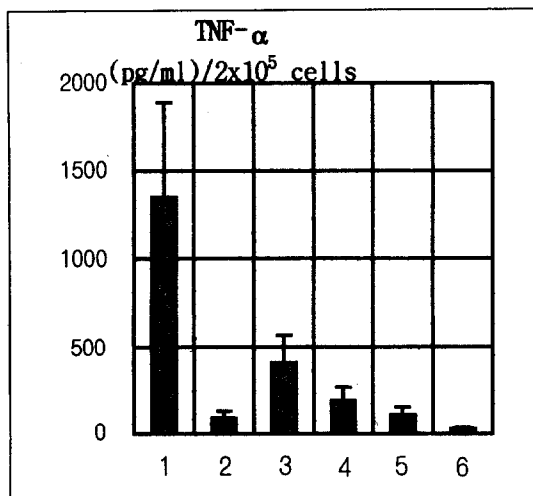


Fig. 5. Expression of TNF- α in various conditions(ELISA)

ml로 시행하여 6시간 후에 TNF- α 단백 농도를 ELISA를 이용하여 측정하였다(Fig. 5).

결과를 보면 2×10^5 개 세포당 농도로 보았을 때 1번 실험조건의 경우 control로서 TNF- α 단백질농도가 1351.0pg/ml로 매우 높으나 내독소로 전처치한 2번 실험조건의 경우 TNF- α 단백질농도가 92.9pg/ml로 현저히 감소하여 내성획득이 이루어졌음을 알 수 있다. 그러나 AntiCD14를 주어 내독소가 그 수용체인 CD14와 결합하는 것을 방해한 3번 실험조건의 경우 405.0pg/ml로 TNF- α 의 단백질농도가 회복함을 보여 주었다. 4번과 5번 실험조건의 경우 각각 192.4pg/ml, 111.7pg/ml로 내성획득에는 변화가 없었다. 마지막 6번 실험조건의 경우 29.4pg/ml로 내독소없이 PMA만으로 전처치하여도 TNF- α 분비가 현저히 억제되어 내독소 내성이 획득됨을 보여주었다.

고 찰

그람음성균 감염시 세균의 세포벽 성분인 내독소는 단백질 및 대식세포 등을 활성화시켜 TNF- α , IL-6, IL-8등의 cytokines을 생산한다. 감염증이 점차 진행함에 따라 cytokine 생산이 크게 증가하고 이에 따라

고열, DIC, 속 등 여러 폐혈증의 증상을 유발시켜 속주에 해가되는 효과를 나타나게 된다^{1,10)}. 그러므로 속주는 이러한 cytokine의 생산을 억제할 수 있는 조절기전이 필요하게 되며 현재까지의 실험결과들로 판단하면 '내독소 내성'은 이러한 조절기전의 하나로 이해되고 있다^{8,9)}. 이미 오래 전에 토끼를 가지고 한 실험에서 내독소를 반복 주사하면 처음에 고열 등 강한 임상반응을 보이다가, 재차 반복 주사시에 임상반응이 감소하는 현상이 관찰되어 이러한 현상을 '내독소 내성(LPS tolerance)'라고 하였다⁹⁾. 또한 이후에 Hass등에 의하면 이러한 현상은 세포 수준에서 보았을 때 대식세포 등에서 TNF- α 생성이 감소하여 임상반응이 감소하는 사실이라는 것이 밝혀졌으나 이후의 분자적 수준에서 어떤 기전으로 이러한 현상이 일어나는 지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 못한다^{8,11)}.

내독소로 전처치하여 내성이 획득되는 조건은 실험에 사용한 세포에 따라 조금씩 다르게 나타나는데 Mathison 등에 따르면 내독소를 3pg/ml의 극소량으로 전처치 해도 내독소 재자극시 반응성이 현저히 감소되는 것이 관찰되었다. 특히, 내독소 전처치 시에 투여하는 내독소의 농도가 높을 수록 재자극에 대한 cytokine 분비의 억제 정도가 더 강하게 내성이 유도되었다³⁾.

Martin 등에 따르면 LBP(LPS binding protein)는 혈청 내 성분으로 내독소의 lipid A 성분과 강한 친화력으로 결합하여 LPS-LBP complex를 형성한 후 대식세포 표면에 수용체인 CD14와 결합하여 TNF- α 의 mRNA발현과 단백질 분비를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 특히 내독소 자극 시에 혈청이 없는 즉, LBP가 없는 배양액으로 자극한 것에 비하여 LBP를 같이 준 경우 TNF- α 단백질분비가 좀 더 조기에 증가하고 더욱 더 많은 양이 분비되며 mRNA도 같은 양상을 보였다^{6,7)}. 또 Mathison 등에 따르면 내독소 전처치 시에 혈청성분인 LBP를 같이 준 경우 내독소 내성획득이 더 낮은 농도의 내독소 전처치로 가능하였으며 좀 더 강하게 내성을 유도하였다³⁾. 이러한 관찰은 LBP가 내성획득에서도 영향을 주고있음을 알 수

있었으며 말초혈액 단핵구를 가지고 시행한 본 실험에서도 내독소 전처리 시 자가형성을 준 경우가 안 준 경우에 비해 내독소 재 자극 시 TNF- α 의 단백 및 mRNA 발현 모두를 좀 더 현저히 억제시켰음을 알 수 있다.

내독소 자극에 대하여 대식세포는 여러 가지 cytokine들을 분비한다. 내성 획득에 있어서는 이들 cytokine들이 같은 양상을 보이지는 않는 것으로 알려져 있다¹²⁾. Takasuka 등의 보고에 의하면 백서의 복막 대식세포를 가지고 한 실험에서 TNF- α 에 대해서는 내성 획득이 이루어지나 IL-1 생성에 대해서는 내성 획득이 이루어지지 않았다고 보고하였다¹³⁾. 말초혈액 단핵구를 가지고 시행한 본 실험에서도 TNF- α 에 대한 실험에서 내독소 전처리한 조건에서 TNF- α 의 단백 및 mRNA가 모두 현저하게 감소하여 내성 획득을 명확하게 관찰할 수 있었으나, IL-8에 대해서는 단백 및 mRNA 수준 모두에서 내성 획득이 관찰되지 않았다. 그러나 실제로 TNF- α 와 달리 IL-8에 대해서는 내성 획득이 이루어지지 않는 것인지 혹은 TNF- α 와 IL-8의 내성 획득이 다르게 조절되고 있어서 본 실험 조건에 의해서는 IL-8에 대한 내성 획득은 관찰할 수가 없었는지에 대해서는 추가적 연구가 요망된다. 또한, 본 실험에서 mRNA 발현 양상이 단백 농도와 같은 양상으로 보이고 있어 내성 획득의 조절 수준이 pretranslational 수준에서 이루어지고 있음을 알 수 있다¹⁴⁾.

앞에서 관찰한 내독소 내성이 어떤 기전에 의해 얻어지는가에 대하여는 여러 연구가 있었으나 아직 잘 알려지지 못한 상태이다. 내성 획득의 기전으로 먼저 제기된 가설은 내독소 전처리에 의해 대식세포 표면에 있는 내독소 수용체의 down regulation이 가설이다^{8, 12, 15)}. 그러나 Mathison 등에 따르면 토끼의 복막 대식세포를 가지고 한 실험에서 flow cytometry로 관찰하였을 때 내독소 전처리로 내독소 내성이 획득된 대식세포와 정상 반응을 보이는 세포 사이에 내독소 수용체인 CD14 발현이 거의 차이가 없었다. 또한 내독소 수용체는 정상으로 존재하나 그 결합력이 변하여

내독소 반응성이 감소하였나 알아보기 위해 형광물질이 포함된 내독소 유사체를 이용하여 내독소와 CD14와의 결합을 알아보았을 때도 두 세포 사이에 차이가 없었다. 이러한 결과는 내독소 내성 획득의 기전에서 CD14의 down regulation은 중요한 기전이 아님을 알 수 있다^{3, 15)}. 그러나 본 연구에서는 내독소 전처리 시에 antiCD14 Monoclonal Ab를 같이 주어 LPS가 그 수용체에 결합하는 것을 방해한 경우 그 반응성이 어느 정도 회복되어 CD14가 down regulation이 아닌 다른 방법으로 내독소 내성 획득의 매개 과정에서 어느 정도 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 반응성의 회복 정도는 정상 세포 수준까지는 미치지 못하고 부분적인 회복을 보여주고 있어 CD14 이외의 과정도 역시 관여하고 있음을 보여주고 있다.

내성 획득의 또 하나의 가설로 세포 반응의 탈진(cell exhaustion)을 생각해 볼 수 있다. 이 가설에 의하면 내독소 전처리로 인하여 세포가 탈진되어 재 자극에 반응을 나타낼 수 없다는 가설이다. 그러나 내독소 내성의 획득되어 세포 반응이 억제된 대식세포를 heat-killed *S. aureus*나 Zymogen 등을 재 자극하면 정상적인 반응을 보여 cytokine 생성이 정상 수준임을 보여주었다⁹⁾. 이러한 소견은 세포 반응의 탈진 가설이 근거 없음을 보여주는 동시에 내독소 내성을 치료 목적으로 적절히 이용하여 cytokine 생성을 억제하며 숙주에 해가 되는 반응을 줄이면서 동시에 여러 세균에 대한 방어 반응을 유지시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 또 한가지 가설이 TNF- α 의 생성을 억제하는 feedback 조절 기전의 활성화이다. Kunkel 등의 보고에 의하면 백서의 복막 대식세포를 내독소로 자극 시에 exogenous PGF₂를 같이 주면 TNF- α 생성이 억제되며, 반대로 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin 주어 endogenous PGF₂ 생성을 억제하면 오히려 TNF- α 생성이 증가한다는 사실을 밝혀, 내독소에 의한 TNF- α 생성이 PGF₂를 통해 feedback 조절되고 있음을 밝혔다¹⁶⁾. 그러나 본 연구에서 Indomethacin이나 혹은 PGF₂를 내독소와 함께 전처리하여도 내성 획득에는 별 변화가 없어 endogenous

PGF₂는 내성획득에 관여하지 않으리라 생각된다. 마지막 가설로 내독소에 의해 자극되는 세포내 신호 전달체계가 내성획득에 관여하리라는 가설이다.

Wightman등에 따르면 내독소의 lipid A 성분으로 대식세포를 자극하면 Protein kinase C이 활성화가 증가된다는 사실을 보고하였으며^{17,18)} Shapira등에 따르면 Protein kinase C 억제제인 H7등으로 Protein kinase C를 억제하면 TNF- α 와 IL-1 β 의 분비가 완전히 억제됨을 보고하여 Protein kinase C 경로가 내독소에 의한 TNF- α 분비조절에 관여함을 알 수 있다^{19,20)}. 본 연구에서 전처치 시에 내독소 대신에 PMA로 전처치하여도 내독소로 재자극 시에 TNF- α 생성이 억제되어 내성획득이 이루어짐을 알 수 있어 이 가설을 뒷받침하는 결과를 보여주었다. 그러나 PMA가 어떤 기전으로 내성획득을 유도하는 지에 대해서는 본 연구로서는 잘 알 수 없으며 앞으로 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

향후 연구과제로서는 먼저 본 연구 결과에서도 알 수 있듯이 세포내의 protein kinase C 경로가 내성획득에 관여하기 때문에 내독소가 수용체인 CD14와 결합한 뒤 세포내에서 일어나는 post receptor signal transduction system에 대한 연구와 함께 그 단계의 어느 과정이 내독소 내성획득과 관련이 있는지 추가적 연구가 필요하다. 또한 내성획득이 조절수준이 pretranslational 수준에서 일어나므로 mRNA 분해 속도를 측정하여 mRNA 반감기의 변화가 있는지, 혹은 enhancer와 silencer등의 transcriptional factor가 관여하는 지에 대한 연구도 필요하리라 생각된다²¹⁾.

요 약

연구배경 :

그람음성 간균의 내독소에 의한 sepsis syndrome에서 단백 식세포는 내독소에 의해 자극받아 여러 종류의 cytokine을 분비함으로써 개체를 방어하는데 있어

매우 중요한 역할을 한다. 그러나 불행히도 cytokine들은 개체를 방어하는 작용 뿐 아니라 TNF등의 경우처럼 심각한 조직손상을 가져오는 효과도 있다. 그러므로 생체 내에서 내독소에 반응하여 cytokine의 분비를 조절하는 기능은 매우 중요하다. 이전의 연구에서 미리 내독소에 노출된 단백 식세포는 내독소로 재자극 시 cytokine 생성능의 저하가 관찰되었는데 이러한 현상을 '내독소 내성'이라고 하며 cytokine 분비조절에 중요한 역할을 하리라 생각되나 그 기전 등에 대해서는 연구가 부족한 상태이다.

방 법 :

생체 외에서 내독소에 대한 내성획득의 조건을 확립하고자 정상인의 말초혈액 단백구를 10ng/ml의 저농도 내독소로 24시간 전처치한 후 2회 세척하고 다시 1 ng/ml의 내독소로 각각 4시간, 6시간, 24시간 자극하여 TNF- α 와 IL-8의 단백량을 측정하고 총 RNA를 분비하였다. 내독소 내성 획득 기전을 밝히고자 내독소 전처치 시에 자가혈청, PMA, antiCD14 Ab, Indomethacin, PGF₂를 각각 첨가하여 내성획득에 영향을 주는지 알아보았다. TNF- α 와 IL-8의 단백량은 ELISA를 이용하여 측정하였고 분리한 총 RNA를 이용하여 TNF- α 와 IL-8에 대한 Northern blot analysis를 시행하였다.

결 과 :

말초혈액을 단백구를 저농도 내독소로 전처치하면 TNF- α 단백 생성 및 mRNA발현을 억제하였으나 IL-8에 대해서는 이러한 현상을 관찰할 수 없었다.

전처치 시에 antiCD14 Ab를 내독소와 같이 준 경우 억제된 TNF- α 생성이 부분적으로 회복되었다.

PMA만으로 전처치 하여도 저농도 내독소 전처치와 유사하게 내독소 내성을 유도할 수 있었다.

결 론 :

내독소에 의한 내성획득에는 CD14가 관여하고 Protein kinase C 경로를 통하여 pretranslational 수준에서 조절되는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Murray JF : Respiratory Medicine, 2nd edition, p 473, W.D.Saunders, 1997
2. Dentener MA, Bazil V, Von Asmuth EJU, Ceska M, Buurman W : Involvement of CD14 in LPS-induced TNF- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. J Immunology 150:2885, 1993
3. Mathison J, Wolfson E, Steinemann S, Tobias P, Ulevitch R : LPS recognition in macrophages : Participation of LPS-binding protein and CD 14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudate macrophages. J Clin Invest 92:2053, 1993
4. Kirkland TN, Finley F, Leturcq D, Moriarty A, Lee JD, Ulevitch RJ, Tobias PS : Analysis of LPS binding by CD14. J Biological Chem 25: 24818, 1993
5. Wright SD, Ramos RA, Patel M, Miller DS : Septin : A factor in plasma that opsonizes LPS-bearing particles for recognition by CD14 on phagocytes. J Exp Med 176:719, 1992
6. Tobias PS, Soldau K, Kline L, Lee JD, Kato K, Martin TP, Ulevitch RJ : Cross-linking of LPS to CD14 on THP-1 cells mediated by LPS-binding protein. J Immunology 150:3011, 1993
7. Martin TR, Mathison JC, Tobias PS, Leturcq DJ, Moriarty AM, Maunder RJ, Ulevitch RJ : LBP enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. J Clin Invest 90:2209, 1992
8. Hass JG, Thiel C, Blomer K, Weiss EH, Riethmuller G, Ziegler-Heitbrock HW : Down-regulation of TNF expression in the human Mono-Mac-6 cell line by lipopolysaccharide. J Leukocyte Biology 46:11, 1989
9. Matic M, Simon SR : TNF release from LPS-stimulated human monocytes : LPS tolerance in vitro. Cytokine 3:576, 1991
10. Gallay P, Victor Jongeneel C, Barras C, Burnier M, Baumgartner J, Glauser M, Heumann D : Short time exposure to LPS is sufficient to activate human monocytes. J Immunol 150:5086, 1993
11. Mathison JC, Virca GD, Wolfson PS, Ulevitch RJ : Adaptation to bacterial LPS controls LPS induced TNF production in rabbit macrophages. J Clin Invest 85:1108, 1990
12. Mengozzi M, Fantuzzi G, Sironi, Bianchi M, Fratelli M, Feri G, Bernasconi S, Ghezzi P : Early down-regulation of TNF production by LPS tolerance in human monocytes : comparison with IL-1b, IL-6 and IL-8. Lymphokine & Cytokine Research 12:231, 1993
13. Takasuka N, Tokunaga T, Akagawa KS : Pre-exposure of macrophages to low doses of LPS inhibits the expression of TNF- α mRNA but not IL-1 β mRNA. J Immunol 146:3824, 1993
14. Ziegler-Heitbrock HW, Blumenstein M, Kafferlein E, Kieper D, Petersmann I, Endres S, Flegel WA, Hass JG : *In vitro* desensitization to LPS suppresses TNF, IL-1 and IL-6 gene expression in a similar fashion. Immunology 75:264, 1992
15. Labeta MO, Durieux JJ, Spagnoli G, Fernandez N, Wudenes J, Herrmann R : CD14 and tolerance to LPS : biochemical and functional analysis. Immunology 80:415, 1993
16. Kunkel SL, Wiggins RC, Chensue SW, Larrick J : Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E₂. Biochem and Biophy Research Comm 137:404, 1986
17. Coffey RG, Weakland LL, Alberts VA : Para-

- doxical stimulation and inhibition by protein kinase C modulation agents of LPS evoked production of TNF in human monocytes. *Immunology* **76**: 48, 1992
18. Wightman PD, Raetz CR : The activation of protein kinase C by biologically active lipid moieties by LPS. *J Biol Chem* **259** : 10048, 1984
19. Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke TE : Involvement of protein kinase C and protein tyrosin kinase in LPS-induced TNF- α and IL-1 β production by human monocytes. *J Immunol* **153** : 1818, 1994
20. Sironi M, Bianchi M, Franca R, Pietro G : Suppression of IL-6 production in endotoxin tolerance in a mouse glioma cell line : reversal by phorbol ester. *Lymphokine & Cytokine Research* **12** : 39, 1993
21. Turner M, Feldmann M : Comparison of patterns of expression of TNF, lymphotoxin and IL-6 mRNA. *Biochem and Biophy Research Comm* **153** : 1144, 1988
-