

□ 원 저 □

인체 기도상피세포주에서 Theophylline에 의한 Eotaxin mRNA 발현억제

동수원병원 내과, 경희대학교 의과대학 내과학교실*

한민수, 유지홍*, 강홍모*

= Abstract =

The Effect of Theophylline on Eotaxin mRNA Expression in Pulmonary Epithelial Cell Line A549

Min Soo Han, M.D., Jee-Hong Yoo, M.D.*, Hong Mo Kang, M.D.*

Department of Internal Medicine, Dong Suwon Hospital, Suwon, Korea,

*Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea**

Background : Eotaxin, a CC chemokine specific for eosinophils, is implicated in the pathogenesis of asthma by recruiting eosinophils into the airways. Theophylline has been used for the treatment of asthma and recently was proposed to have an anti-inflammatory action. The aim of this study is to examine whether theophylline may inhibit the eosinophilic airway inflammation by reducing the expression of eotaxin.

Methods : The expression of eotaxin mRNA was assessed by Northern analysis in A549 cells 4 h after stimulation with TNF- α or IL-1 β . And then, theophylline was added to A549 cells stimulated with 0.1 ng/mL IL-1 β .

Results : Eotaxin mRNA expression rates induced by 0.1, 1, 10 ng/mL TNF- α as compared with β -actin, were 7%, 22%, 28%, respectively. Eotaxin mRNA expression rates induced by 0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL IL-1 β as compared with β -actin, were 10%, 42%, 63%, 72%, respectively. Eotaxin mRNA expression rates after the addition of 0, 0.001, 0.01, 0.1 μ M dexamethasone induced by 10 ng/mL TNF- α as compared with β -actin, were 27%, 18%, 8%, respectively. Eotaxin mRNA expression rates after the addition of 0, 0.001, 0.01, 0.1 μ M dexamethasone induced by 0.1 ng/mL IL-1 β as compared with β -actin, were 43%, 47%, 12%, 8%, respectively. Eotaxin mRNA expression rates after the addition of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mM theophylline in-

Address for correspondence :

Jee-Hong Yoo, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kyung Hee University.

1 Hoiki-dong, Dongdaemun-ku, Seoul, 130-072, Korea

Phone : 02-958-8193 Fax : 02-968-1848 E-mail : honglung@chollian.net

duced by 0.1 ng/mL IL-1 β as compared with β -actin, were 48%, 40%, 33%, 22%, 16%, 14%, respectively.

Conclusion : These results suggest that theophylline may reduce eosinophil infiltration of the airway at least in part by reducing the expression of eotaxin under the conditions of these experiments. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 898-908)

Key words : Eotaxin, Asthma, Theophylline.

서 론

기관지천식은 기도의 호산구 침윤을 동반한 염증이 특징적인 조직 소견으로¹ 천식 발작시 기도에 호산구 침윤이 증가되고 증상이 호전되면 감소된다는 사실은 조직의 호산구 침윤이 기관지천식의 병태생리에 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다².

Chemokine은 염증세포에 강력한 화학주성을 갖는 세포매개물질들의 총칭으로서 현재까지 약 40여종이 넘는 것으로 확인되었고, 약 8-10 kD 크기의 단백질이며 아미노산 서열에 있어서 상호간에 20-70%의 유사성이 있다³. Cysteine residue의 위치에 따라 CXC chemokine과 CC chemokine으로 구분하며 IL(interleukin)-8를 포함하는 CXC chemokine은 주로 호중구에 강한 화학주성을 보이고 RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), MCP(monocyte chemoattractant protein) 등을 포함하는 CC chemokine은 주로 호산구 및 단핵구에 강한 화학주성을 보인다.

Eotaxin은 guinea pig의 폐에서 알러젠으로 자극 후 분리되는 단백질로서 CC chemokine의 일종이며 호산구에만 특이적으로 작용하여 조직으로 호산구의 집결을 유도한다⁴. Eotaxin은 정상인의 소장과 대장에서 강하게, 그리고 폐, 흉선, 비장, 간, 전립선, 난소, 태반, 골격근에서는 약하게 발현된다⁵. TNF (tumor necrosis factor)- α 또는 IL-1 β 의 자극에 의해서 기도상피세포주인 A549와 BEAS 2B 에서 eotaxin mRNA의 발현이 증가되며 증가된 eotaxin mRNA의 발현은 dexamethasone에 의해 억제된다⁶. 또한 기관지천식 환자들의 기도 및 기관지폐포 세척액내에서 eotaxin 발현의 증가가 관찰되는데⁷ 이

러한 소견은 eotaxin이 기관지천식때 호산구가 염증 부위로 집결하는 과정에 중요한 역할을 하며 궁극적으로 기관지천식의 병태생리에 관여함을 시사한다.

50년 이상 기관지천식의 치료제로 사용되어온 theophylline은 작용기전이 phosphodiesterase를 비특이적으로 억제하여 기관지 평활근세포내의 cyclic AMP 농도를 증가시킴으로써 기관지 확장효과를 일으키는 것으로 알려져 왔다⁸. 그러나 실제로 적절한 혈중 치료농도인 10-20 mg/L 에서는 기관지 확장작용은 비교적 적고⁹⁻¹¹ 면역조절¹¹ 및 항염증작용^{12,13}을 주로 보이는데 이것이 기관지천식 치료에 주된 작용임이 최근에 밝혀졌다. 이러한 관점에서 볼 때 기관지천식에서 theophylline의 치료 효과는 호산구성 염증작용의 억제를 통해서 이루어지고, 이는 eotaxin의 억제와 관련이 있을 것으로 추정할 수 있다. 그러나 아직 theophylline과 eotaxin 발현에 대한 연구보고는 국내외에 없었으므로 만약 theophylline이 eotaxin의 발현을 억제한다면 이는 theophylline의 알레르기성 염증질환의 중요한 치료기전의 하나가 될 것이다. 따라서 본 연구는 theophylline이 기도상피세포주에서 eotaxin mRNA의 발현을 억제하는지 알아보기 위하여 우선 인체 기도상피세포를 IL- β 또는 TNF- α 로 자극하여 eotaxin mRNA의 발현을 증가시킨 후 theophylline을 가하여 eotaxin mRNA 발현을 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 세포 배양

인체 기도상피세포주인 A549(lung adenocarci-

noma)는 한국세포주은행에서 분양받았다. 세포주 배양은 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 F12K 조직배양액(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 penicillin-streptomycin 100 U/mL을 넣은 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 계대배양 하였다. Cytokine (IL- β TNF- α) 으로 자극하기 24시간 전에는 FBS가 들어있지 않은 조직배양액으로 교환하였다.

2. 세포자극 실험

1) IL- β

Recombinant human IL- β (GENZYME, Cambridge, MA, USA) 를 0.1% BSA-PBS로 희석하여 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL의 농도로 A549 세포를 각각 4시간 동안 자극한 후에 세포를 수거하였다.

2) TNF- α

Recombinant human TNF- α (GENZYME, Cambridge, MA, USA)를 0.1% BSA-PBS로 희석하여 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL의 농도로 A549 세포를 각각 4시간 동안 자극한 후에 세포를 수거하였다.

3) Dexamethasone

Dexamethasone(Sigma, St. Louis, Mo, USA) 은 ethanol로 희석하여 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M의 농도로 IL- β (0.1 ng/mL) 또는 TNF- α (10 ng/mL) 로 자극하기 30분 전에 각각 부여하고 IL- β 나 TNF- α 부여 4시간 후에 세포를 수거하였다.

4) Theophylline

Theophylline(Sigma, St. Louis, Mo, USA) 은 증류수로 희석하여 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mM의 농도로 IL- β (0.1 ng/mL)와 동시에 부여하고 4시간 후에 세포를 수거하였다.

3. RNA 분리

RNA 분리는 RNeasy mini kit(QIAGEN, Hilden, Germany) 를 이용하였다. 배양된 세포주를 수거하여 300 g에 5분간 원심분리한 후 상층액을 버리고, 세포 침전물에 600 mL의 RLT buffer에 10 μ L/mL의 β -mercaptoethanol을 첨가하여 세포를 균질화하였다. 1배 용량의 70% ethanol을 첨가하여 혼합한 다음 RNeasy mini spin column에 넣고 8,000 g에서 15초간 원심분리 하였다. Column에 700 μ L의 RW1 buffer를 넣고 8,000 g에서 15초간 원심분리 하였다. 새로운 2 mL tube에 column을 옮긴 다음 500 μ L의 RPE buffer를 넣고 동일한 방법으로 원심분리 하였다. 다시 column에 500 μ L의 RPE buffer를 넣고 14,000 g에서 2분간 원심분리하여 column에 부착된 membrane을 건조시켰다. Column을 1.5 mL tube에 옮긴다음 50 μ L의 RNase-free water를 넣고 800 g에 1분간 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 -70°C에 보관하였다.

4. Northern blot analysis

1) Northern transfer

20 μ g의 RNA에 2.5 μ L의 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수, 4.0 μ L의 5 \times formaldehyde gel-running buffer(0.1M MOPS, pH 7.0, 40 mM sodium acetate, 5 mM EDTA pH 8.0), 3.5 μ L의 formaldehyde(37%), 10 μ L의 formamide를 혼합하여 65°C에서 15분간 가열한 후 얼음에 10분간 방치한 다음 수초간 미세 원심분리하고 2 μ L의 RNA 부하완충액(50% glycerol, 1mM EDTA, pH 8.0, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF)과 1 μ L의 ethidium bromide (1 mg/mL) 을 첨가하여 혼합한 후 원심분리 하였다.

전기영동은 겔을 1 \times formaldehyde gel-running

buffer에 넣고, RNA sample을 각 well에 넣기 전에 5 volts/cm로 5분간 미리 가동한 다음 RNA sample을 넣은 후 5 volts/cm로 3시간 30분 동안 전기영동을 하였으며, 전기영동 중에 매 1시간 간격으로 겔의 방향과 함께 극성을 바꿔주었다. 전이는 $20\times$ SSC 용액에서 Turboblottter(Schleicher & Schull, Dassel, Germany) 장치로 16시간 전이를 하였다. 전이가 끝난 후 membrane을 $6\times$ SSC로 5분간 세척한 다음 실온에서 30분간 말린 후 80°C vacuum oven에 2시간 동안 방치했다.

2) 소식자 방사성 표지

소식자 방사성 표지는 Rediprime Kit(Amersham, United Kingdom)를 이용한 random primer 방법으로 시행하였다¹⁴. ^{32}P 로 표지된 human eotaxin c-DNA 소식자를 Sephadex G-50 spin column (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)으로 정제하여 사용하였다.

Human eotaxin c-DNA는 고려대학교 의과대학 인광호 교수로부터 제공받았다. c-DNA 소식자는 3개의 exon으로 구성된 human eotaxin gene으로서 길이는 297 bp 이다.

3) Hybridization

Hybridization은 QuikHyb hybridization solution (Stratagene, La Jolla, CA, USA)을 이용하였다. Mini oven(Hybaid, Middlesex, United Kingdom)에 membrane을 넣고 9 mL의 QuikHyb hybridization solution을 첨가하여 68°C 에서 20분간 prehybridization을 하였다. ^{32}P -labeled human eotaxin c-DNA 소식자 또는 β -actin에 특이적인 소식자와 100 μL 의 salmon sperm DNA(10 mg/mL)를 5분간 끓인 후 1 mL의 QuikHyb hybridization solution과 혼합한 다음 prehybridization solution에 첨가하여 68°C 에서 1시간 동안 hybridization하였다.

양성대조군인 β -actin mRNA에 대한 eotaxin mRNA의 비는 densitometer(Bio-Rad, Hercules,

CA, USA)를 이용하여 정량화하여 eotaxin mRNA의 발현을 간접적으로 측정하였다.

결 과

1. A549 세포에서 TNF- α 또는 IL- β 로 유도된 eotaxin mRNA의 발현

0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL의 TNF- α 또는 IL- β 농도로 A549세포를 4시간 동안 각각 자극한 결과 TNF- α 의 경우는 0.1 ng/mL의 농도에서 eotaxin mRNA의 발현이 처음 관찰되었으며 β -actin과 비교한 발현율은 0.1 ng/mL에서 7%, 1 ng/mL에서 22%, 10 ng/mL에서 28%로서 투여 농도가 증가함에 따라 발현이 증가하였다(Fig. 1). IL- β

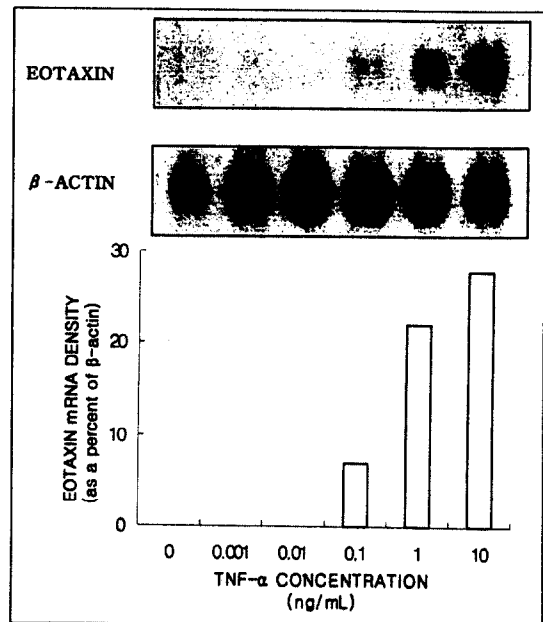


Fig. 1. Changes of eotaxin mRNA expression in A549 cells after stimulation with TNF- α . Eotaxin mRNA expression, which was detected at 0.1 ng/mL TNF- α and increased in a dose-dependent manner.

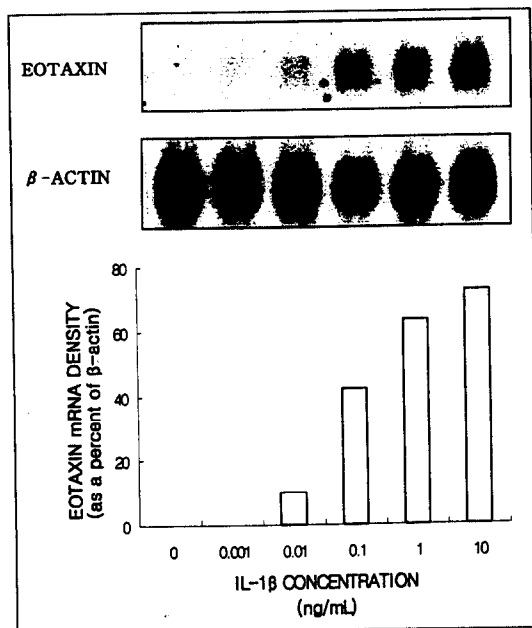


Fig. 2. Changes of eotaxin mRNA expression in A549 cells after stimulation with IL-1 β . Eotaxin mRNA expression, which was detected at 0.01 ng/mL IL-1 β , and increased in a dose-dependent manner.

의 경우는 0.01 ng/mL의 농도에서 eotaxin mRNA의 발현이 처음 관찰되었으며 β -actin과 비교한 발현율은 0.01 ng/mL에서 10%, 0.1 ng/mL에서 42%, 1 ng/mL에서 63%, 10 ng/mL에서 72%로서 투여 농도가 증가함에 따라 발현도가 증가하였다(Fig. 2).

2. A549 세포에서 TNF- α 또는 IL- β 로 유도된 eotaxin mRNA에 대한 dexamethasone의 영향

Dexamethasone을 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M의 농도로 A549세포에 각각 투여하고 30분 후에 TNF- α (10 ng/mL) 또는 IL- β (0.1 ng/mL)로 4시간 동안 자극한 후의 β -actin과 비교한 eotaxin mRNA의 발현율은 TNF- α 로 자극한 경우 0 μ M에서 27%, 0.001 μ M에서 18%, 0.01 μ M에서 8%로서 dexamethasone의 농도가 증가함에 따라 발현

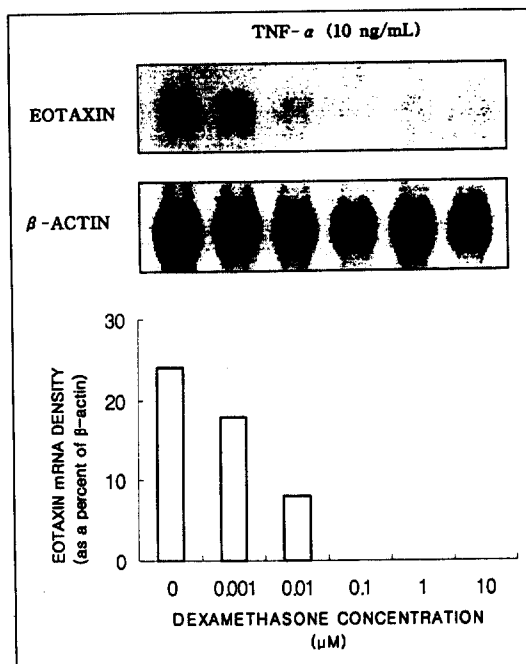


Fig. 3. Effect of dexamethasone on TNF- α -induced eotaxin mRNA expression in A549 cells. Eotaxin mRNA expression was inhibited by dexamethasone in a dose-dependent manner. No signal was detected above 0.1 μ M dexamethasone.

이 감소하는 양상이었고 0.1 μ M이상의 농도에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 3). IL- β 로 자극한 경우 0 μ M에서 43%, 0.001 μ M에서 47%, 0.01 μ M에서 12%, 0.1 μ M에서 8%로서 dexamethasone의 농도가 증가함에 따라 발현이 감소하는 양상이었고 1 μ M이상의 농도에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 4).

3. A549 세포에서 IL- β 로 유도된 eotaxin mRNA의 theophylline에 의한 발현

0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mM농도의 theophylline과 IL- β (0.1 ng/mL)를 동시에 A549세포에 가하여 4시간 동안 자극한 후 β -actin과 비교한 eotaxin

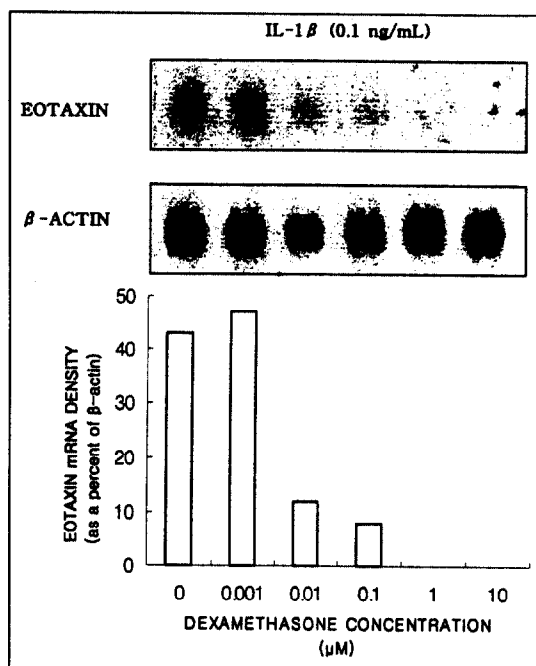


Fig. 4. Effect of dexamethasone on IL-1 β -induced eotaxin mRNA expression. Eotaxin mRNA expression was inhibited by dexamethasone in a dose-dependent manner. No signal was detected above 1 μ M dexamethasone.

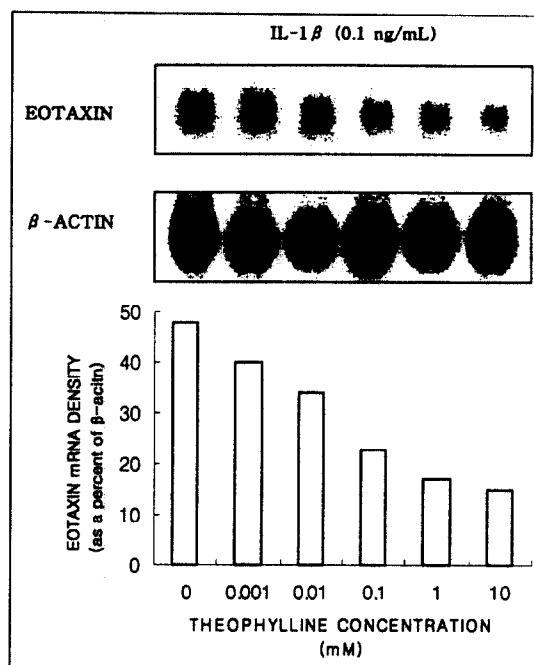


Fig. 5. Effect of theophylline on IL-1 β -induced eotaxin mRNA expression in A549 cells. Eotaxin mRNA expression was inhibited by theophylline in a dose-dependent manner. This effect was maximal at a dose of 10 mM.

mRNA의 발현율은 0 mM에서 48%, 0.001 mM에서 40%, 0.01 mM에서 33%, 0.1 mM에서 22%, 1 mM에서 16%, 10 mM에서 14%로서 theophylline의 농도가 증가함에 따라 eotaxin mRNA의 발현이 감소하였다(Fig. 5).

고 찰

기관지천식은 기도의 수축, 기도과민성 및 기도염증 등이 특징이고¹⁵ 기도에 침윤되는 주된 염증세포는 호산구이다. 말초혈액에서 조직으로 호산구가 이동하는데에는 접착분자 및 cytokine 등이 관여하는 복잡한 과정을 통하여 이루어지는 호산구와 내피세포간의 상호작용이 중요하다¹⁶. 즉, cytokine에는 IL-3, IL-5,

GM-CSF 등이 호산구의 성장, 이동, 활성화 등을 촉진시키며¹⁷ IL- β , IL-4, IL-5, TNF- α 등은 혈관내피에 존재하는 접착계통을 활성화 시킴으로써 호산구의 이동을 조절하는 것으로 알려져 있다¹⁸.

Chemokine은 염증세포에 대해서 화학주성이 있는 물질로서 일정한 세포만을 유도하는 세포 특이성이 있다³. Chemokine은 cysteine residue 사이에 아미노산의 존재 유무에 따라 크게 CXC(또는 α)와 CC(또는 β)의 두 가지 아형으로 분류된다¹⁹. CXC chemokine에는 IL-8, growth-related oncogene protein(GRO- α , β , γ), interferon-inducible protein(IP)-10, stromal cell-derived factor(SDF)-1 등이 있으며 주로 호중구와 T세포에 화학주성이 있다. CC chemokine에는 MCP, MIP(macrophage

inflammatory protein), eotaxin, RANTES 등이 있으며 이들은 호중구에는 화학주성이 거의 없고 주로 단구, 호산구, 호염구 및 임파구에 화학주성이 있다²⁰.

Eotaxin은 CC chemokine의 일종으로서 감작된 guinea pig에 알러젠을 투여한 후 기관지폐포 세척액에서 처음으로 분리되었으며⁴ 이 후에 사람과 쥐간에 유사성이 있다는 것이 밝혀졌다^{5, 14, 21}. 여러 종류의 백혈구에 화학주성이 있는 대부분의 다른 CC chemokine과는 달리 eotaxin은 호산구에만 선택적으로 작용하는 강력한 화학주성이 있다²². 사람의 eotaxin 유전자는 소장, 대장 등에서는 강하게 발현되지만, 폐를 비롯한 몇몇 장기조직에서는 약하게 발현되며 염기서열은 MCP-1 유전자와는 약 66%에서, guinea pig eotaxin 유전자와는 약 60%에서 유사성이 있다²³.

Eotaxin은 기도상피세포, T-세포, 폐포대식세포 등에서 생산되며 특히 호산구 자체에서도 생산되어 국소적으로 호산구집결에 관여하는 중요한 autocrine pathway를 형성한다⁷. Eotaxin은 호산구의 표면에 높은 농도로 발현되어 있는 CCR3 수용체에 특이적으로 결합한다^{23, 24}.

기관지천식의 중증도와 호산구의 수 및 활성화 등은 서로 밀접한 관계가 있다고 알려져 있는데²⁵ 호산구가 기도에 침윤되기 까지의 이동 과정은 아직 확실하게 밝혀지지는 않았지만 몇 가지 기전들이 제시되어 있다²⁶. 즉, RANTES, MCP-3, MCP-4, eotaxin 등과 같은 CC chemokine들이 호산구의 이동 및 활성화를 유도한다. 이중 eotaxin은 생체에서 호산구 집결에 다른 chemokine보다 훨씬 더 선택적으로 작용한다⁴. Eotaxin이 호산구 집결에 중요한 역할을 할 것이라는 여러 동물 모델에서의 연구가 있다^{5, 14, 21, 27}. 항원으로 유도된 기도의 알레르기성 염증과 폐의 호산구 증가의 guinea pig와 쥐의 모델에서 항원 자극과 기생충 감염으로 eotaxin mRNA의 발현이 폐에서 유도되었으며^{4, 14, 28}, 쥐를 anti-CD3 monoclonal antibody로 전처치 했을 때 eotaxin mRNA의 발현이 억제되고 폐의 호산구 침윤이 현저하게 감소하는 것이 관찰되었다²⁸.

알레르기성 천식환자를 대상으로 알러젠으로 유도된 eotaxin의 발현과 기도에서의 호산구 침윤의 관계를 알아본 최근의 연구에서는 후기 천식반응이 나타나기 전에 기관지 조직 및 기관지폐포 세척액에서 eotaxin 유전자의 전사 증가가 관찰되며, 이는 활성화된 호산구수 증가와 동반되어²⁹ eotaxin은 주로 후기 천식반응 초기에 작용하는 것으로 추정된다. 또한 eotaxin은 알러젠으로 자극된 조직에서 IL-5와의 상승작용을 통해 신속하게 호산구 집결을 유도한다³⁰.

이와 같이 eotaxin은 기관지천식을 비롯한 여러 호산구성 염증질환에서 호산구가 조직내로 집결하는데 중요한 역할을 하므로 호산구가 침윤되는 질환의 치료적인 측면에서도 중요한 가능성을 제시해 준다²⁰. 즉 세포에서 분비된 eotaxin을 중화시키거나, eotaxin 수용체를 차단시키거나, eotaxin 유전자의 발현을 억제시키면 호산구의 집결이 감소되어 결과적으로 호산구성 염증이 억제될 것이라는 가정을 할 수가 있다.

기도상피세포주인 A549와 BEAS 2B를 TNF- α 또는 IL- β 로 자극하면 eotaxin mRNA의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다⁶. 본 연구에서도 cytokine의 자극이 없는 상태에서는 eotaxin mRNA의 발현이 관찰되지 않고 A549 세포를 TNF- α 또는 IL- β 로 자극한 후에 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 이것은 폐포대식세포에서 생산되는 IL- β 가 기도상피세포에 작용하여 eotaxin을 생산하게 한다는 가설⁶을 뒷받침 해주는 중요한 소견으로서 IL- β 의 증가, 기도 내 호산구증가, 천식증상 등과의 상호 연관성을 설명할 수 있는 근거가 된다.

Glucocorticoid는 항염증성 스테로이드로서 기도내에 증가된 호산구를 감소시키고, 기도의 긴장도를 정상화시켜서, 기관지천식의 증상을 완화시키는 작용이 있다³. Glucocorticoid는 여러 가지 기전에 의해 기도 내의 호산구를 감소시키는데 첫째로 호산구의 세포사멸을 유도하며³¹, 둘째로 호산구의 성장 및 분화인자의 생산을 억제하고³², 셋째로 cytokine의 발현을 변화시킨다³³. 본 연구에서 IL- β 또는 TNF- α 에 의해 유도된 eotaxin mRNA의 발현이 dexamethasone에 의

해 억제되듯이 glucocorticoid에 의한 eotaxin의 발현 억제는 기도의 호산구성 염증감소의 또 하나의 기전이다. Glucocorticoid에 의한 eotaxin발현의 조절은 glucocorticoid가 eotaxin의 전사 조절부위중 glucocorticoid responsive element에 결합함으로써 이루어 질 것으로 추정된다³⁴.

Theophylline은 수 십년 동안 기관지천식의 치료제로서 최근까지 널리 사용되어 왔다⁸. 아직까지 그 작용기전은 확실하게 밝혀지지 않았지만 기도평활근에 작용하여 비특이적으로 phosphodiesterase를 억제하고 세포내의 cyclic AMP 농도를 증가시킴으로써 기도평활근을 이완시킨다는 것이 최근까지 인정되어 온 작용기전 이다³⁵. 그러나 실제로 실험관내 실험에서 기도평활근을 이완시키는데 필요한 theophylline의 농도는 적절한 혈중 치료농도(10-20 mg/L) 보다 높게 나타났다³⁶. 이러한 결과는 theophylline의 기관지천식 증상 완화 효과는 기관지 확장작용 이외에 다른 중요한 작용이 관여할 것이라는 사실을 시사해 준다. 이에 대한 연구로서 첫째로 theophylline이 혈중 치료 농도에서 T-임파구의 활성을 변화시키고 기도에서 보조 T-세포 및 억제 T-세포 수를 모두 억제시켰다¹¹. 둘째로 기관지천식 환자에게 theophylline을 투여한 후 시행한 기도조직 검사에서 활성화호산구가 감소되고¹³, IL-4와 IL-5의 발현도 감소되었다³⁷. 이러한 연구결과는 theophylline이 면역조절작용 및 항염증작용이 있다는 사실에 대한 근거를 제시해 준다. 특히 theophylline이 호산구의 성장, 분화 및 활성화 등에 관여하는 cytokine인 IL-4와 IL-5의 발현을 억제시킴으로써 호산구성 염증을 억제할 것임을 의미한다. 본 실험에 사용된 theophylline의 농도는 0.18-1, 800 mg/L로써 혈중 치료농도에서 eotaxin mRNA의 발현을 억제하였다.

이와 같은 theophylline의 작용으로 미루어 보아 theophylline이 eotaxin의 발현을 감소시킨다면 기도의 호산구성 염증 억제에 중요한 역할을 담당할 것으로 추정하였고 본 연구를 통해 theophylline이 IL- β 에 의해 유도된 eotaxin mRNA의 발현을 억제하는

것을 관찰하였다.

결론적으로 theophylline은 기도에서의 eotaxin 발현을 억제함으로써 기도의 호산구성 염증질환의 치료에 중요한 역할을 한다.

요 약

연구배경 :

기도의 알레르기성 질환에서는 기도점막에 발생하는 염증 특히 호산구의 집결 및 침윤의 역할이 중요하다. Eotaxin은 CC chemokine으로서 호산구에만 선택적으로 작용하여 조직으로의 호산구의 집결을 유도한다.

Theophylline의 항염증작용은 기관지천식 치료에 중요한 기전의 하나로 생각되며 특히 호산구성 기도염증에 관여하는 여러 인자들을 조절하는 작용이 중요하다. 본 연구는 theophylline의 항염증작용이 eotaxin mRNA의 발현 억제를 통해 이루어지는지 알아보고자 하였다.

방 법 :

A549 세포를 배양하여 IL- β 또는 TNF- α 로 자극한 후 Northern blot analysis를 시행하여 eotaxin mRNA의 발현을 관찰하였다. 그 후에 theophylline을 가하여 발현을 관찰하였다.

결 과 :

A549 세포에서 cytokine으로 유도된 eotaxin mRNA의 발현은 TNF- α 자극 후 β -actin과 비교한 발현율은 0.1, 1, 10 ng/mL의 농도에서 각각 7%, 22%, 28% 였고 IL- β 자극 후 0.01, 0.1, 1, 10 ng/mL의 농도에서 각각 10%, 42%, 63%, 72%로서 cytokine의 농도가 증가할수록 eotaxin mRNA의 발현이 증가하였다. Dexamethasone투여 후 eotaxin mRNA의 발현율은 TNF- α 로 자극한 경우 0, 0.001, 0.01 μ M의 dexamethasone농도에서 각각 27%, 18%, 8% 였고 IL- β 로 자극한 경우 0, 0.001, 0.01, 0.1 μ M의 농도에서 각각 43%, 47%, 12%, 8%로서 dexamethasone의 농도가 증가함에 따라 발현이 감소되었다. Theophylline 투여 후 IL-

β 로 자극한 경우 eotaxin mRNA의 발현율은 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mM의 theophylline 농도에서 각각 48%, 40%, 33%, 22%, 16%, 14%로서 theophylline의 농도가 증가함에 따라 발현이 감소되었다.

결 론 :

Theophylline의 항호산구성 염증작용은 eotaxin mRNA의 발현을 억제함으로써 이루어짐을 알 수 있었다.

감사의 글

Human eotaxin c-DNA를 제공해 주신 고려대학교 의과대학 인광호 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Corrigan CJ, Kay AB. T cell and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992;13:501-7.
2. Adelroth E, Rosenhall L, Johansson SA, Linden M, Venge P. Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage. The effects of antiasthmatic treatment with budesonide or terbutaline. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:91-9.
3. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97-179.
4. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* 1994; 179:881-7.
5. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* 1996;2:449-56.
6. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA et al. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997;99:1767-73.
7. Lamkhioed B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepeda EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, Rothenberg MD, Luster AD, Hamid Q. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol* 1997;159:4593-601.
8. Becker AB, Simons KJ, Gillespie CA, Simons FE. The bronchodilator effects and pharmacokinetics of caffeine in asthma. *N Engl J Med* 1984;310: 743-6.
9. Weinberger MM, Bronsky EA. Evaluation of oral bronchodilator therapy in asthmatic children: bronchodilators in asthmatic children. *J pediatr* 1974;84:421-7.
10. Idem. Interaction of ephedrine and theophylline. *Clin Pharmacol Ther* 1975;17:585.
11. Kidney J, Dominguez M, Taylor PM, Rose M, Chung KF, Barnes PJ. Immunomodulation by theophylline in asthma: demonstration by withdrawal of therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1907-14.
12. Hendeles L, Harman E, Huang D, O'Brien R, Blake K, Delafuente J. Theophylline attenuation of airway response to allergen: comparison with cromolyn metered-dose inhaler. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:505-14.
13. Sullivan P, Bekir S, Jaffar Z, Page C, Jeffery P, Costello J. Anti-inflammatory effects of low-dose

- oral theophylline in atopic asthma. *Lancet* 1994; 343:1006-8.[Erratum, *Lancet* 1994;343:1512]
14. Gonzalo JA, Jia GQ, Aguirre V, Friend D, Coyle AJ, Jenkins NA et al. Mouse eotaxin expression parallels eosinophil accumulation during lung allergic inflammation but it is not restricted to Th -2-type response. *Immunity* 1996;4:1-14.
15. Cockcroft DW, Murdock KY. Changes in bronchial responsiveness to histamine at intervals after allergen challenge. *Thorax* 1987;42:302-8.
16. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Eng J Med* 1998;338:1592-1600.
17. Rothenberg ME, Owen WF, Jr., Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ, Austen KF et al. Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* 1988;81:1986-92.
18. Clutterbuck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ. Human interleukin 5(IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparisons and interactions with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* 1989;73:1504-12.
19. Idem. Human chemokines: An update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675-705.
20. David HA, Andrew RL. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997;349:490-5.
21. Rothenberg ME, Luster AD, Leder P. Murine eotaxin: An eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8960-4.
22. Kita H, Gleich GJ. Chemokines active on eosinophils: Potential roles in allergic inflammation. *J Exp Med* 1996;183:2421-6.
23. Ponath PD, Qin S, Post TW, Wang J, Wu L, Gerard NP et al. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med* 1996;183: 2437-48.
24. Daugherty BL, Siciliano SJ, DeMartino JA, Malkowitz L, Sirotina A, Springer MS. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J Exp Med* 1996;183: 2349-54.
25. Butterfield JH, Leiferman KM. Immunology of Eosinophils. In: H Smith and RM Cook, eds. Academic Press, New York, 1993;152-92.
26. Seminario MC, Gleich GJ. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Immunol* 1994;6:860-4.
27. Teixeira MM, Wells TN, Lukacs NW, Proudfoot AE, Kunkel SL, Williams TJ et al. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. *J Clin Invest* 1997;100: 1657-66.
28. MacLean JA, Ownbey R, Luster AD. T cell-dependent regulation of eotaxin in antigen-induced pulmonary eosinophilia. *J Exp Med* 1996;184: 1461-9.
29. Brown JR, Kleimberg J, Marini M, Sun G, Bellini A, Mattoli S. Kinetics of eotaxin expression and its relationship to eosinophil accumulation and activation in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after allergen inhalation. *Clin Exp Immunol* 1998;114:137-46.
30. Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 1995;182:1169-74.

31. Schleimer RP, Bochner BS. The effects of glucocorticoids on human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:1202-13.
 32. Rolfe FG, Hughes JM, Armour CL, Sewell WA. Inhibition of interleukin-5 gene expression by dexamethasone. *Immunology* 1992;77:494-9.
 33. Kwon OJ, Jose PJ, Robbins RA, Schall TJ, Williams TJ, Barnes PJ. Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:488-96.
 34. Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Weremowicz S, Sarafi MN, Morton CC, Luster AD. Genomic organization, complete sequence, and chromosomal location of the gene for human eotaxin(SCYA11), an eosinophil-specific CC chemokine. *Genomics* 1997;41:471-6.
 35. Barnes PJ : A new approach to the treatment of asthma therapy. *N Engl J Med* 1989;321:1517-27.
 36. National Heart Lung and Blood Institute 1991. National asthma education program expert panel report : guidelines for the diagnosis and management of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:425-534.
 37. Finnerty JP, Lee C, Wilson S, Madden J, Djukanovic R, Holgate ST. Effects of theophylline on inflammatory cells and cytokines in asthmatic subjects : a placebo-controlled parallel group study. *Eur Respir J* 1996;9:1672-7.
-