

□ 원      저 □

## 말초 혈액 단핵구에서 IL-8 발현에 관한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵 연구소, 서울특별시 보라매병원 내과\*

김재열 · 이재철 · 강민종 · 박재석 · 유철규 · 김영환 · 한성구 · 심영수 · 이재호

= Abstract =

### Study on IL-8 Expression in Peripheral Blood Monocytes

Jae Yeol Kim, M.D., Jae Cheol Lee, M.D., Min-Jong Kang, M.D., Jae Seok Park, 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*

*Deaprtment of Internal Medicine, Seoul City Boramae Hospital, Seoul, Korea*

**Background:** Peripheral blood monocytes are important immune effector cells that play a fundamental role in cellular immunity. In addition to their antigen-presenting and phagocytic activities, monocytes/macrophage produce a vast array of regulatory and chemotactic cytokines. Interleukin-8(IL-8), a potent neutrophil-activating and chemotactic peptide, is produced in large quantities by mononuclear phagocytes and may be an important mediator of local and systemic inflammation. Overexpression by IL-8 of such inflammation may be an important step of tissue injury frequently seen in inflammatory reaction. So it could be hypothesized that the agents which block the production of IL-8 can decrease the inflammatory reaction and tissue injury. To evaluate this, we described the effect of Dexamethasone, PGE<sub>2</sub>, Indomethacin and Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) on IL-8 mRNA and protein expression from LPS-stimulated human peripheral blood monocytes (PBMC).

**Method:** PBMC was isolated from healthy volunteers. To evaluate the effect of Dexamethasone, PGE<sub>2</sub> & Indomethacin, these drug were treated for 1 hour before and after LPS stimulation and IFN- $\gamma$  was only treated 1 hour before the LPS stimulation. Northern blot analysis for IL-8 mRNA and ELISA for immunoreactive IL-8 protein in culture supernatant were performed. We repeated above experiment three times for Northern blot analysis and two times for ELISA and got the same result.

#### Results:

1) Pre- and post-treatment of Dexamethasone suppressed both the LPS stimulated IL-8 mRNA

이 논문은 1994년도 서울대학교병원 일반 연구비(수정연구비)의 보조로 이루어진 것임.  
본 연구는 1994년도 대한 결핵 및 호흡기학회 추계학술대회에서 발표하였음.

expression and IL-8 protein release in PBMC.

2) IFN- $\gamma$  pre-treatment suppressed the IL-8 mRNA expression and IL-8 protein release in unstimulated cells.

3) In LPS stimulated cells, IFN- $\gamma$  suppressed the IL-8 mRNA expression but IL-8 protein release suppression was not observed.

4) PGE<sub>2</sub> and Indomethacin exert no effect on the LPS-stimulated IL-8 mRNA and protein expression in concentration used in this experiment (PGE<sub>2</sub>; 10<sup>-6</sup>M, Indomethacin; 10 $\mu$ M).

**Conclusion:** One of the mechanism of antiinflammatory action of Dexamethasone can be explained by the suppressing effect of IL-8 production in some extent and by this antiinflammatory effect, dexamethasone can be used to suppress local and systemic inflammation mediated by IL-8.

**Key Words:** LPS, IL-8, PBMC, Dexamethasone, PGE<sub>2</sub>, Indomethacin, Interferon- $\gamma$

## 서 론

말초혈액 단핵구는 외부 자극에 의해 여러 종류의 염증 매개성 물질을 분비하여 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 이러한 염증 반응은 신체 방어 기전에 중요한 역할을 하게 되나 정도가 지나치면 불가역적인 조직 손상을 동반하게 되며, 이러한 과도한 염증 반응이 급성 폐손상<sup>1,2)</sup>, 특발성 폐 섬유증<sup>3)</sup> 등의 주된 발병 기전으로 생각되고 있다. 따라서 염증에 의한 조직 손상의 예방 및 치료법의 개발에 앞서 염증의 기전을 이해하는 것은 필수적이라 하겠다. 염증은 여러 종류의 세포에서 분비되는 염증 매개성 물질에 의해 발생하는 것으로 이해되고 있는데, 이중 단핵 식세포를 포함한 여러가지 세포<sup>4~10)</sup>에서 분비되는 Interleukin-8(IL-8)은 호중구에 대한 특이적인 주화 작용과 함께 호중구를 직접 활성화시키는 등<sup>6,11~20)</sup>의 염증 반응을 증폭시키는 역할을 하는 Chemokine이다. 따라서 IL-8의 생성의 억제는 국소 및 전신의 염증 반응을 억제할 수 있을 것으로 생각되며<sup>21~24)</sup>, 이러한 IL-8의 생성의 억제를 통해서 염증 반응을 줄일 수 있는 방법의 개발에 대한 관심이 계속되어 왔다<sup>25)</sup>. 기존의 보고 중에서 IL-8의 생성을 억제할 수 있는 약제로서 Dexamethasone과 Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 등이 알려진 바가 있다<sup>10,26~29)</sup>.

IFN- $\gamma$ 는 T 림프구에서 생성되는 Cytokine으로 단핵

식세포의 활성화 외에 여러 면역 반응에 관여하는 물질이며, 국소 염증 부위에서 단핵식세포와 T 림프구가 같이 관찰되는 사실은 IFN- $\gamma$ 가 단핵식세포의 IL-8 분비를 조절하여 전체 염증 반응에 영향을 미칠 가능성을 뒷받침하는 소견이다. 기존의 보고에 의하면 IFN- $\gamma$  자체가 IL-8의 생성에 미치는 효과는 실험에 사용한 세포의 종류에 따라 다르다. 즉 IFN- $\gamma$ 가 IL-8의 생성을 촉진한다는 보고가 있는가 하면, 반대로 억제한다는 보고도 있으며, 아무런 영향을 미치지 못한다는 보고도 있다. 심지어는 같은 세포주로 실험한 경우에도 보고자에 따라서 서로 상반되는 결과를 보고하고 있다<sup>5,8,9,24,30~37)</sup>. 또한 사람의 염증반응에서 초기에 주도적 역할을 하는 것으로 알려진 말초혈액 단핵구에서 IFN- $\gamma$ 의 투여가 IL-8의 생성에 미치는 효과에 대해서도 아직 확실하게 결론이 내려지지 않은 상태이다. 그러나 말초혈액 단핵구에서 내독소에 의한 자극에 의하여 생성되는 IL-8의 분비에 영향을 미치는 약제들을 조사함으로써 이러한 과정에 의하여 야기되는 염증 반응을 억제할 수 있는 수단을 획득하게 될 수 있으므로, 이러한 작용을 나타낼 수 있는 약제들을 확인하고 정립하는 것은 큰 의미가 있다고 생각된다.

이에 저자들은 말초혈액 단핵구에서 항염제인 Dexamethasone, Indomethacin, PGE<sub>2</sub>와 Cytokine인 IFN- $\gamma$ 가 내독소 자극에 의한 IL-8 mRNA 및 IL-8 protein의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 시 약

Dexamethasone은 Sigma Chemical Co에서 구입하였으며, ethanol에  $10^{-1}$ M의 농도로 stock solution을 만들어서 사용하였다. PGE<sub>2</sub>는 ethanol에  $10^{-2}$ M의 농도로 stock solution을 만들어서 사용하였다. Indomethacin은 4% sodium bicarbonate가 포함된 0.9% saline에 1 µg/λ의 농도로 하여 사용하였다. IFN-γ는 100 unit/ml로 희석되어 있는 상태로 사용하였다. stock LPS는 200 µg/ml의 농도로 RPMI1640에 녹여서 사용하였다.

### 2. 말초혈액 단핵구의 분리

Heparin으로 처리된 주사기로 정상인 자원자에서 약 100ml의 정맥혈을 채취하였다. 혈액을 생리적 식염수와 1:1 비율로 섞은 뒤 Ficoll-Hypaque으로 단핵세포층을 얻어 완전한 배양액에 재부양시키고 2~3회 씻은 후  $10^6$ /ml로 세포수를 조정하여 같은 양을 35mm 배양 접시에 분주하고 1시간 배양하여 단핵세포를 배양접시에 부착시키고 상층액을 제거하여 림프구로부터 단핵세포를 분리하였다.

### 3. IL-8 mRNA 발현

#### (1) 실험 조건

항염제와 IFN-γ의 효과를 보기 위하여 내독소를 가지지 않은 군과 내독소(100ng/ml)를 가한 군 그리고 내독소를 가하기 한시간 전, 후에 Dexamethasone( $10^{-6}$ M), PGE<sub>2</sub>( $10^{-6}$ M), Indomethacin( $10^{-6}$ M)을 처리한 군으로 나누었으며, IFN-γ는 내독소로 전처리만을 시행하였다. 각각의 조건을 가한 뒤 가한 후로부터 4시간 뒤에 RNA를 분리하여 IL-8 mRNA를 Northern blot analysis를 통하여 분석하였고, 동일한 조건을 가한 well의 상층액에서 24시간 뒤에 ELISA 방법으로 IL-8 protein 정량을 시행하였다(Table 1).

#### (2) Northern Blot Analysis

Chomczynski와 Sacchi의 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출법<sup>(12)</sup>을 이용하여 총 RNA를 추출하여 정량화한 뒤 동량의 RNA를 formaldehyde

Table 1. The Condition of Stimulation with PGE<sub>2</sub> Dexamethasone and Indomethacin & IFN-γ

	-1hr	0hr	1hr	4hr	24hr
1. Control					
2. LPS		○			
3. Indo+LPS	○	○			
4. PGE <sub>2</sub> +LPS	○	○			
5. Dexa+LPS	○	○			
6. LPS+Indo		○	○		
7. LPS+PGE <sub>2</sub>		○	○		
8. LPS+Dexa		○	○		
9. IFN-γ+LPS	○	○			

LPS(Lipopolysaccharide); 100ng/ml

Indo(Indomethacin);  $10^{-6}$ M/ml

PGE<sub>2</sub>(Prostaglandin E<sub>2</sub>);  $10^{-6}$ M

Dexa(Dexamethasone);  $10^{-6}$ M

IFN-γ; 100unit/ml

를 함유하는 1.2% agarose gel에 전기영동을 시행하여 분리시켰다. 전기영동 후 28S와 18S rRNA band의 정도로 동량의 RNA loading 여부를 관찰하였다. 전기영동한 gel의 RNA를 nylon membrane에 transfer시키고 RNA가 transfer된 membrane을 UV crosslinking을 시행하여 RNA를 membrane에 고정시켰다. Prehybridization후 65℃에서 <sup>32</sup>P로 labeling한 사람 IL-8 cDNA를 표지자로 사용하여 hybridization을 시행하였다. IL-8 cDNA는 미국 NIH의 Dr. Crystal에게서 기증받았다. cDNA의 labeling은 Random Primed DNA Labeling Kit를 이용하였다. Hybridization을 시행한 후 nylon membrane을 intensifying screen이 들어 있는 X-ray film cassette에 넣고 -70℃에서 1~2일간 autoradiography를 시행하고 laser densitometry로 정량하였다. 이상의 실험을 같은 조건 하에서 3회 반복하였다.

### 4. IL-8 단백질

5% 자가 혈청이 포함된 RPMI 액으로 well 당  $2 \times 10^5$  으로 단핵구 세포 수를 맞춘 뒤, 96 well plate에서 배양 및 표면 부착에 의하여 단핵구 만을 분리하였고, 앞의 IL-8 mRNA의 생성을 보는 것과 동일한 조건을 가한 뒤, 24시간이 경과한 후의 배양액에서 IL-8 단백

의 정량을 시행하였다. 면역 반응성(immunoreactive) IL-8은 각 sample을 duplication하여 human IL-8 ELISA kit(R & D system Co.)로 정량하였다. ELISA는 같은 조건 하에서 2회 시행하였다.

## 결 과

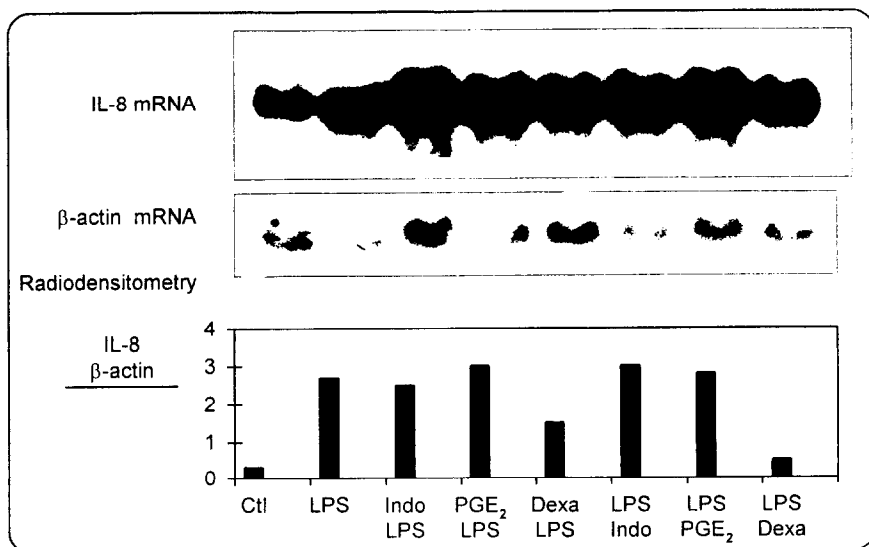
### 1. Dexamethasone, PGE<sub>2</sub>, Indomethacin, IFN- $\gamma$ 가 내독소 자극에 의한 IL-8 mRNA 생성에 미치는 영향

내독소(100ng/ml)로 자극한 군에서 대조군에 비하여 IL-8 mRNA 발현이 현저히 증가하였으며, 이는 기존의 실험 결과와 일치하였다. 이러한 내독소에 의한 IL-8 mRNA expression의 증가 효과는 Dexamethasone( $10^{-6}$ M)으로 한 시간 전, 후에 처치를 하였을 때 일관되게 억제되었으나, 내독소로 자극받기 전의 대조군의 농도 정도까지는 억제되지 않아서 부분적인 억제 효과로 나타났다. 하지만 저자들이 실험에 사용한 농도에서 PGE<sub>2</sub>( $10^{-6}$ M)와 Indomethacin( $10\mu$ M)의 한 시간

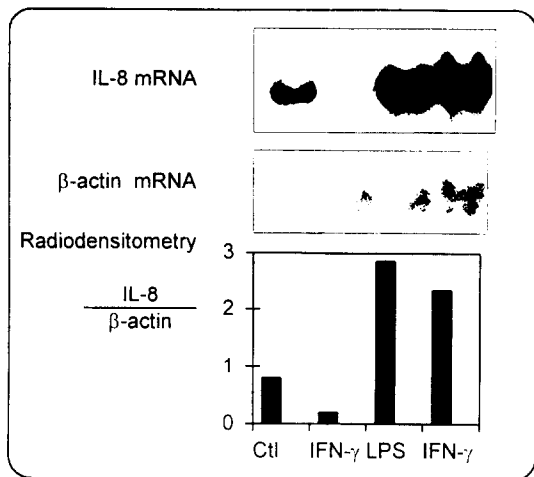
전, 후처치는 내독소에 의한 IL-8 mRNA의 발현의 증가 효과에 대한 일관적인 억제 효과를 나타내지 않았다(Fig. 1). IFN- $\gamma$ (100unit/ml)로 내독소(100ng/ml)를 투여하기 한 시간 전에 전처치 하였을 때, 내독소에 의한 IL-8 mRNA의 생성 자극 효과가 억제되었다. 하지만 IFN- $\gamma$ 의 전처치로 내독소로 자극 받기 전의 대조군의 농도 정도까지 억제되지는 않는 부분적인 억제 효과로 나타났다. 또한 IFN- $\gamma$ 는 내독소로 자극 받지 않은 대조군에서의 IL-8 mRNA의 생성도 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이상의 결과는 같은 조건 하에서 3회 반복하였을 때 일관되게 나타났다.

### 2. Dexamethasone, PGE<sub>2</sub>, Indomethacin, IFN- $\gamma$ 가 내독소 자극에 의한 IL-8 단백질 생성에 미치는 영향

IL-8 mRNA의 생성 자극 효과와 마찬가지로 내독소의 자극은 말초혈액 단핵구에서 IL-8 단백질의 생성을 촉진하는 효과를 나타내었으며, 이러한 내독소에 의한 IL-8 단백질 생성 자극 효과는 Dexamethasone( $10^{-6}$ M)으



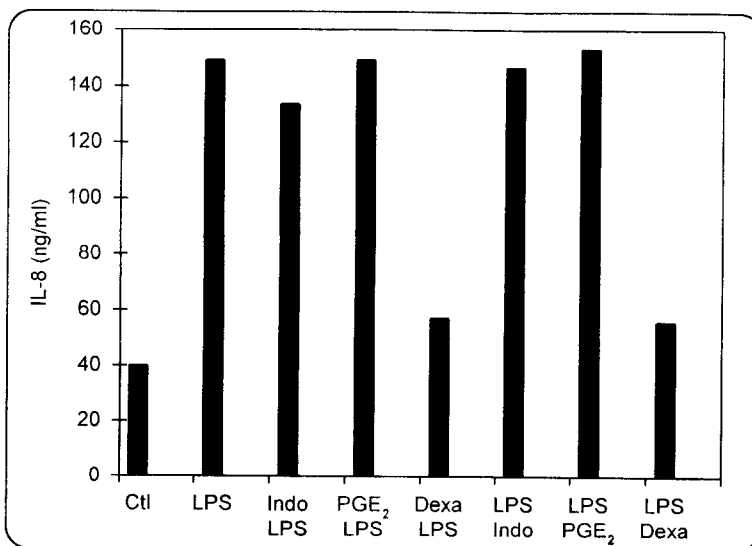
**Fig. 1.** The effect of Indomethacin( $10\mu$ M), PGE<sub>2</sub>( $10^{-6}$ M) and Dexamethasone( $10^{-6}$ M) on IL-8 mRNA expression of LPS (100ng/ml)-treated PBMC. Upper two panels represent autoradiographs of IL-8 mRNA and  $\beta$ -actin mRNA and lower panel represents the ratio of radiodensitometry of IL-8 mRNA and  $\beta$ -actin. Both pre and posttreatment of dexamethasone suppressed the LPS stimulated IL-8 mRNA expression in PBMC.



**Fig. 2.** The effect of IFN- $\gamma$ (100unit/ml) pretreatment on the LPS(100ng/ml) stimulated and unstimulated IL-8 mRNA production in PBMC. Upper two panels represent auto-radiography of IL-8 mRNA and  $\beta$ -actin and the lower panel represents the ratio of radiodensitometry of the two mRNA. IFN- $\gamma$  pretreatment suppressed IL-8 mRNA expression both in LPS unstimulated and stimulated states in PBMC.

로 한 시간 전, 후에 처리하였을 때 억제되었다. IL-8 mRNA에 대한 생성 억제 효과가 부분적으로만 나타난 것과는 달리 Dexamethasone의 전,후 처리를 한 뒤의 IL-8 단백질의 농도가 내독소로 자극 받지 않은 대조군의 IL-8 단백질의 농도와 거의 같은 농도로 나타나서 거의 완벽한 억제 효과를 나타내었다. 하지만 내독소에 의한 IL-8 mRNA의 발현에 대해서 억제 효과가 없었듯이 PGE<sub>2</sub>와 Indomethacin의 한 시간 전, 후 처리는, 사용한 농도에서 내독소 자극에 의한 IL-8 단백질의 생성 자극 효과에 대하여 억제 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 3). IFN- $\gamma$ (100unit/ml)의 투여는 내독소 자극이 없는 상태에서는 IL-8 단백질의 생성을 억제하는 것으로 나타났으나, 내독소 자극(100ng/ml)을 받은 군에 있어서는 IFN- $\gamma$ 로 한 시간 전에 전처리 하였을 때, 내독소 자극에 의한 IL-8 단백질 생성 증가 효과를 의미있게 억제시키지는 못하였다(Fig. 4).

이상의 결과는 같은 조건 하에서 2회 반복하였을 때 일관되게 나타났다.



**Fig. 3.** The effect of pretreatment and posttreatment of Indomethacin(10 $\mu$ M), PGE<sub>2</sub>(10<sup>-6</sup>M) and Dexamethasone(10<sup>-6</sup>M) on the production of IL-8 protein in LPS(100ng/ml) stimulated PBMC. IL-8 production(ng/2  $\times$  10<sup>5</sup> cells) was measured with ELISA at 24h from LPS stimulation. Both pre and posttreatment of dexamethasone suppressed the LPS stimulated IL-8 protein production in PBMC.

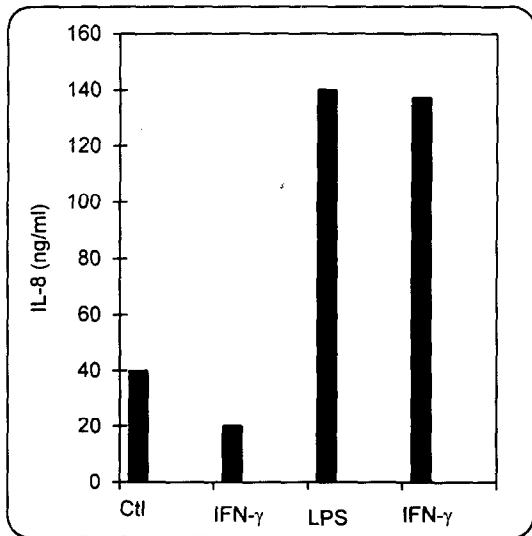


Fig. 4. The effect of IFN- $\gamma$ (100unit/ml) on the production of IL-8 protein in LPS(100ng/ml) stimulated and unstimulated PBMC. IL-8 production( $\text{ng}/2 \times 10^5$  cells) was measured with ELISA at 24h from LPS stimulation. IFN- $\gamma$  pretreatment suppressed the IL-8 protein production in unstimulated state but did not suppress the LPS stimulated IL-8 production in PBMC.

## 고 찰

말초혈액 단핵구는 정상적인 면역 반응에 매우 중요한 역할을 하는 세포로 정상적인 탐식 및 항원 제공에 중요한 기능을 할 뿐만 아니라, 여러 종류의 Cytokine을 분비하는 것으로 알려져 있다. 말초혈액 단핵구에서 분비되는 Cytokine 중에서 IL-8은 호중구에 대한 주화 작용과 호중구를 직접 활성화시키는 등의 작용을 통하여 여러 종류의 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 인식되고 있으며, 또한 여러 종류의 염증성 질환에서 체액에서 그 농도가 증가되어 있음이 입증됨으로써 이와 같은 추론이 뒷받침되어 왔다<sup>1~3,27)</sup>. 따라서 말초혈액 단핵구에서 IL-8의 생성을 조절하는 기전을 이해하는 것은 염증성 병변에 대한 치료를 시도함에 있어서 매우 중요한 일이라고 할 수 있다. 본 연구에서 저자들은 IL-8의 생성을 억제함으로써 IL-8에 의하여 야

기되는 염증반응을 억제할 수 있을 가능성이 있는 약제로써 Dexamethasone, PGE<sub>2</sub>, Indomethacin과 IFN- $\gamma$ 의 효과를 살펴보고 그 생성의 억제가 어느 수준에서 일어나는지를 보기 위하여 IL-8 단백질의 생성에 대한 효과 뿐만 아니라 IL-8 mRNA의 생성에 대한 억제 효과도 함께 알아보았다.

Dexamethasone은 기존의 연구 논문에서 다양한 세포주에서 이미 내독소와 그 밖의 다른 자극들에 의한 IL-8의 생성에 억제 효과가 있음이 많이 알려져 있었으며<sup>10,26~29)</sup>, PGE<sub>2</sub> 또한 세포마다 다르기는 하지만 역시 일부의 세포에서 억제 효과가 있음이 보고되었다<sup>10,26)</sup>. 따라서 이러한 효과를 재확인하는 의미에서 실험에 이용하였다. Indomethacin은 대표적인 비스테로이드성 소염제이지만 IL-8에 의해서 매개되는 염증에서의 효과에 대해서는 아직 알려진 바가 거의 없다. 따라서 이를 규명해 보고자 실험에 사용하였다. IFN- $\gamma$ 는 국소 염증 부위에서 말초혈액 단핵구와 같이 흔히 관찰되는 T 림프구에서 생성되므로, 면역 반응에 있어서 IL-8과의 상호 작용이 있는지의 여부에 대한 관심으로 대상에 선택되었으며, 기존의 보고에서는 사용한 세포주에 따라 상반되는 결과가 보고되고 있으며, 같은 세포 계통을 사용한 실험 사이에서도 서로 반대되는 결과가 보고되고 있는 상태이다<sup>5,8,9,24,30~37)</sup>.

이번 실험에서 Dexamethasone은 기존의 연구 결과와 일치되는 결과를 보여서, 내독소로 자극하기 한 시간 전, 후에 처리하였을 때 IL-8 단백질과 mRNA의 생성을 뚜렷하게 감소시켰다. 따라서 Dexamethasone의 IL-8의 생성에 대한 억제 효과는 mRNA level에서 이미 발현된다는 것을 확인할 수가 있었으며, Dexamethasone의 알려진 항염 효과는 이러한 Dexamethasone의 IL-8 mRNA 및 IL-8 단백질에 대한 생성의 억제 효과가 어느 정도 기여하는 것으로 판단된다. 대부분의 연구가 전처치에 의한 것인데 임상에서의 치료제로서 사용 가능성을 평가하기 위해서는 후처치의 효과가 입증되어야 하는데 이에 대한 연구는 많지 않은 실정이다. 이번 실험에서 Dexamethasone의 후처치에 의해서도 이러한 IL-8의 생성 억제가 발생하는 것은 임상적으로 큰 의의가 있다고 생각된다.

PGE<sub>2</sub>는 기존의 보고에서 실험에 사용한 세포주에

따라 내독소에 의한 IL-8 mRNA 및 단백질의 생성에서 상반된 연구 결과가 알려져 있다. 즉, Standiford 등<sup>26)</sup>은 PGE<sub>2</sub>는 말초혈액 단핵구에서 내독소에 의한 IL-8 mRNA와 IL-8 단백질의 생성을 억제하였으며, 농도의 증가에 따라 그 억제 효과도 함께 증가하였다고 보고하였지만 PGE<sub>2</sub>의 이러한 효과는 폐포대식세포에서는 관찰되지 않아서 세포의 분화도에 따라 반응성이 다른 것으로 보고를 한 바가 있다. 하지만 Wertheim 등<sup>10)</sup>은 호중구에서 내독소에 의한 IL-8의 생성 자극 효과는 말초혈액 단핵구에서와는 달리 PGE<sub>2</sub>의 투여에 의해서 억제되지 않았다고 보고하고 있다. 이번 실험에서는 Standiford 등의 실험과 같이 말초혈액 단핵구를 사용했고, 그들이 사용했던 PGE<sub>2</sub>의 농도 중 가장 강한 억제를 보인 농도를 선택하여 실험에 사용했음에도 불구하고 PGE<sub>2</sub>의 투여가 내독소에 의한 IL-8 mRNA 및 IL-8 protein의 생성 자극 효과를 억제 하지 못한 것으로 나타났다. 이러한 결과에 대한 뚜렷한 이유를 추론하기는 힘들지만 다른 보고에서 가장 강력한 억제 효과가 관찰된 농도를 본 실험에서 사용하였기 때문에 낮은 농도 때문일 가능성은 낮을 것으로 생각되며, 저자들의 실험이 Standiford 등과 같이 말초혈액 단핵구를 대상으로 하였는데도 결과는 오히려 호중구를 대상으로 실험한 Wertheim 등의 결과와 같이 PGE<sub>2</sub>가 내독소 자극에 의한 IL-8 mRNA 및 IL-8 protein의 생성에 대해서 영향이 없는 것으로 나타난 것은 저자들도 의외의 결과로 받아들이고 있으며, 저자들의 결과만으로 PGE<sub>2</sub>의 역할에 대해서 결론을 내리는 것은 무리가 있을 것으로 생각한다.

Indomethacin은 비스테로이드성 항염제로 Cyclooxygenase의 경로를 차단하여 Prostaglandin의 합성을 억제함으로써 항염 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 Indomethacin의 전, 후 처치가 내독소 자극에 의한 IL-8의 생성에 별다른 영향을 미치지 못하는 것으로 나타나서, Indomethacin의 항염 효과는 IL-8의 생성에 의한 기전과는 무관한 것으로 판단된다.

IFN- $\gamma$ 의 전처치가 내독소 자극에 의한 IL-8의 생성에 미치는 영향에 대해서 기존의 보고들은 사용한 세포주에 따라 다른 보고들을 하여왔으며, 심지어는 같은 계통의 세포주를 실험에 사용한 경우에도 IFN- $\gamma$ 의 전

처치나 IFN- $\gamma$ 의 직접적인 자극이 내독소 자극을 받은 또는 자극을 받지 않은 세포에서 IL-8의 생성을 억제, 증가 또는 영향이 없다는 상반되는 결과를 보고하고 있다. 저자들의 실험에서는 IFN- $\gamma$ 의 투여가 내독소 자극을 받은 말초혈액 단핵구와 자극을 받지 않은 말초혈액 단핵구 모두에서 IL-8 mRNA의 생성을 억제시키는 것으로 나타났으며, 또한 IFN- $\gamma$ 는 내독소 자극을 받지 않은 세포에서는 IL-8 단백질의 생성을 억제하였으나, 내독소 자극에 의한 IL-8 단백질의 생성은 억제시키지 못하는 것으로 나타났다. 내독소 자극을 받은 세포에서 IFN- $\gamma$ 의 투여가 IL-8 mRNA의 생성을 억제시키나 IL-8 단백질의 생성을 억제시키지 못한 것은 의외의 결과라고 하겠으며, 이 부분에 대해서는 추가의 실험을 통한 확인이 필요할 것으로 생각된다.

본 실험에서 저자들은 내독소 자극에 의한 IL-8 생성 자극 효과를 억제시킬 수 있을 것으로 기대되는 약제 및 Cytokine에 대하여 말초혈액 단핵구를 사용하여 그 효과를 확인하여 보았다. 그 결과 Dexamethasone은 내독소에 의한 IL-8의 생성 자극 효과를 억제하는 것으로 나타났고, PGE<sub>2</sub>는 기대와는 달리 억제 효과를 보이지 않는 것으로 나타났다. Dexamethasone의 다양한 염증성 질환에서의 항염 효과는 이러한 IL-8의 생성 억제 효과가 어느 정도 기여할 것으로 생각된다. 그러나 IFN- $\gamma$ 는 일관된 결과를 얻지 못하였다. 또한 본 실험에서는 사용한 모든 약제에 대해서 농도에 따른 억제 효과의 차이, Dexamethasone이 IL-8의 생성에 억제 효과를 나타내는 기전에 대해서는 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구배경:** 말초혈액 단핵구는 정상적인 면역반응에 중요한 세포로서 탐식 기능과 항원 제공 기능외에 다양한 종류의 Cytokine을 생성하며, 이중 IL-8은 호중구에 대한 강력한 주화 작용과 직접적인 활성화 작용 등을 통해서 염증 작용을 증폭시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 IL-8 작용의 억제를 통하여 항염 효과를 기대할 수 있으며, 이러한 작용을 나타낼 것으로 기대되는 Dexamethasone, PGE<sub>2</sub>, Indomethacin 및

IFN- $\gamma$ 를 이용하여 이러한 약제들이 말초혈액 단핵구에서 내독소 자극에 의한 IL-8의 생성 자극 효과에 어떤 영향을 미치는 지에 대해서 알아보았다.

**방법:** 말초혈액 단핵구는 자원자에게서 채취한 혈액을 Ficoll Hypaque density gradient method에 의해서 백혈구 층을 분리한 뒤에 플라스틱 접시에 부착함으로써 분리하였다. Dexamethasone, PGE<sub>2</sub>, Indomethacin은 내독소로 자극하기 한 시간 전, 후에 처리하였고, IFN- $\gamma$ 는 내독소로 자극하기 한 시간 전에만 전처리하였다. 내독소로 자극한 뒤 4시간 뒤에 RNA를 extraction한 뒤 Northern blot analysis를 시행하여 IL-8 mRNA를 분석하였고, 24시간 뒤에 ELISA를 통하여 IL-8 단백을 정량하였다. 이 과정을 3회 반복하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

#### 결과:

- 1) Dexamethasone의 전, 후 처리는 내독소 자극에 의한 IL-8 mRNA와 단백질의 생성을 감소시켰다.
- 2) IFN- $\gamma$ 의 단독 투여는 내독소 자극을 받지 않은 군에서 IL-8 mRNA와 단백질의 생성을 감소시켰다.
- 3) 내독소 투여 전에 IFN- $\gamma$ 를 전 처리 하였을 때, 내독소 단독 투여군에 비해 IL-8 mRNA 발현은 감소하였으나 IL-8 단백질의 분비에는 차이가 없었다.
- 4) PGE<sub>2</sub>와 Indomethacin은 각각 사용한 농도(10<sup>-6</sup>M, 10 $\mu$ M)에서는 내독소 자극에 의한 IL-8 mRNA 및 단백질의 생성에 별다른 영향을 미치지 못하였다.

**결론:** Dexamethasone은 말초혈액 단핵구에서 내독소의 자극에 의한 IL-8 mRNA 발현 및 단백질의 생성을 억제함으로써 염증 반응을 억제할 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Martin SCM, Montravers P, Gilbert C, Elbim C, Desmonts JM, Facon JY, Gougerat-Paciodalo MA: High level of Interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia in adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun* **61**:4553, 1993
- 2) Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter PC, Grant IS, Pollok AJ, Haslett C: Interleukin-8 and development of ARDS in at risk patient group. *Lancet* **341**:643, 1993
- 3) Carre PC, Mortenson RL, King, Jr TE, Noble PW, Sable CL, Riches DWH: Increased expression of the Interleukin-8 gene by alveolar macrophage in IPF. *J Clin Invest* **88**:1802, 1991
- 4) Bedard M, McClure CD, Schiller NL, Francoeur C, Cantin A, Denis M: Release of Interleukin-8, Interleukin 6, and Colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: Implication for cystic fibrosis. *Am J Resp Cell Mol Biol* **9**:455, 1993
- 5) Weetman AP, Bennett GL, Wong WL: Thyroid follicular cells produce Interleukin-8. *JCE & M* **75**:328, 1992
- 6) Jonathan N, Barker WN, Jones ML, Mitra RS, Torabe EC, Fantone JC, Kunkel SL, Warren JS, Dixit VM, Nickoloff BJ: Modulation of keratinocyte-derived Interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes. *Am J Pathol* **139**:869, 1991
- 7) Rathanaswami P, Hachicha M, Sadick M, Schall TJ, McColl SR: Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblast. *J Biol Chem* **268**:5834, 1993
- 8) Oliveira IC, Sciavolino PJ, Lee TH, Vilcek J: Downregulation of Interleukin-8 gene expression in human fibroblast: Unique mechanism of transcriptional inhibition by interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:9049, 1992
- 9) Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H: Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce Interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun* **60**:4932, 1992
- 10) Wertheim WA, Kunkel SL, Standiford TJ, Burdick MD, Becker FS, Wilke CA, Gilbert AR,



- Strieter RM: Regulation of Prostaglandin E<sub>2</sub>, Dexamethasone, and IL-4. *J Immunol* **151**:2166, 1993
- 11) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* **84**: 1045, 1989
- 12) Forschungsinstitut S: Neutrophil attractant/activation protein-1(Interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J Immunol* **23**:303, 1993
- 13) Agace WW, Hedges SR, Ceska M, Svanborg C: Interleukin-8 and the neutrophil response to mucosal gram-negative infection. *J Clin Invest.* **92**:780, 1993
- 14) Leonard EJ, Yoshimura T: Neutrophil attractant/activation protein-1(NAP-1[IL-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**:479, 1990
- 15) Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K: Properties of the novel proinflammatory supergene "Intercrine" cytokine family. *Ann Rev Immunol* **9**:617, 1991
- 16) Christensen PJ, Rolfe MW, Standiford TJ, Burdick MB, Toews CB, Strieter RM: Characterization of the production of monocyte chemoattractant protein-1 and IL-8 in an allogeneic immune response. *J Immunol* **151**:1205, 1993
- 17) Nibbering PH, Po SO, Steinhagen A, Furth RV: Interleukin-8 enhances nonoxidative intracellular killing of *Mycobacterium fortuitum* by human granulocytes. *Infect Immun* **61**:3111, 1993
- 18) Kunkel SL, Strieter RM, Chensue SW, Remick DG: Chapter 12, Regulation of tumor necrosis factor-alpha and neutrophil activating protein-1 gene expression. Mediators of lung injury and repair, *In* Kenneth LB, Mildred TS(Ed) respiratory distress syndromes, 1st Ed, p150, Tennessee, Vanderbilt University Press 1990
- 19) Meurer R, Riper GV, Feeney W, Cunningham P, Hora, Jr D, Springer MS, MacIntyre DE, Rosen H: Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES, but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha or human IL-8. *J Exp Med* **178**:1913, 1993
- 20) Baggiolini M, Dahinden CA: CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* **15**:127, 1994
- 21) Mukaida N, Hishinuma A, Zachariae COC, Oppenheim JJ, Matsushima K: Regulation of human Interleukin-8 gene expression and binding of several other members of the intercrine family to receptors for Interleukin-8. Plenum Press New York. 31, 1991
- 22) Strieter RM, Standiford T, Chensue SW, Kasa-hara K, Kunkel SL: Induction and Regulation of interleukin-8 gene expression. Plenum Press New York. 23, 1991
- 23) Osipovich OA, Fegeding KV, Misuno NI, Kolesnikova TS, Savostin IK, Suaarikov AB, Boitenok NN: Differential action of cycloheximide and activation stimuli on transcription of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, and p53 genes in human monocytes. *J Immunol* **150**:4958, 1993
- 24) Wilson L, Butcher CJ, Kellie S: Calcium ionophore A23187 induces IL-8 gene expression and protein secretion in human monocytic cells, *FEBS Lett* **325**:295, 1993
- 25) Mulligan MS, Jones ML, Bolanowski MA, Baganoff MP, Deppeler CL, Meyers DM, Ryan US, Ward PA: Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. *J Immunol* **150**:5585, 1993
- 26) Standiford TJ, Kunkel SL, Rolfe MW, Evanoff HL, Allen RM, Strieter RM: Regulation of human alveolar macrophage and blood monocyte derived Interleukin-8 by prostaglandin E<sub>2</sub> and

- dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**:75, 1992
- 27) Jorens PG, Jongh RD, Backer WD, Damme JV, Overveld FV, Bossaert L, Walter P, Herman AG, Rampart: Interleukin-8 production in patients undergoing cardiopulmonary bypass-the influence of pretreatment with methylprednisolone. *Am Rev Respir Dis* **148**:890, 1993
  - 28) Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Shelhamer JH: Corticosteroids differentially regulate secretion of IL-6, IL-8 and G-CSF by a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol* **L360**, 1993
  - 29) Mukaida N, Gussella GL, Kasahara T, Ko Y, Zachariae COC, Kawai T, Matsushima K: Molecular analysis of the inhibition of Interleukin-8 production by dexamethasone in a human fibrosarcoma cell line. *Immunology* **75**:674, 1992
  - 30) Gusella GL, Musso T, Bosco MC, Espinoza-Delgado I, Matsushima K, Varesio L: IL-2 up-regulates but IFN- $\gamma$  suppress IL-8 expression in human monocytes. *J Immunol* **151**:2725, 1993
  - 31) Cassatella MA, Guasparri I, Ceska M, Bazzoni F, Rossi: Interferon- $\gamma$  inhibits IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology* **78**:177, 1993
  - 32) Javad Aman M, Rudolf G, Goldschmitt J, Aulitzky WE, Lam C, Huber C, Peschel C: Type-1 Interferons are potent inhibitors of IL-8 production in hematopoietic and bone marrow stromal cytokines and bacterial lipopolysaccharides. *Immunology* **81**:85, 1994
  - 36) Goodman RB, Wood RG, Martin TR, Hanson-Painton O, Kinasewitz GT: Cytokine-stimulated human mesothelial cells produce chemotactic activity for neutrophils including NAP-1/IL-8. *J Immunol* **148**:457, 1992
  - 37) Seitz M, Dewald B, Gerber N, Baggiolini: Enhanced production of neutrophil-activating peptide-1/IL-8 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **87**:463, 1991
  - 38) Chomczynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analy Biochem* **162**:156, 1987
  - cells. *Blood* **82**:2371, 1993
  - 33) Cassatella MA, Aste M, Calzetti F, Constatin G, Guasparri I, Ceska M, Rossi F: Studies on the regulatory mechanisms of IL-8 gene expression in resting and IFN- $\gamma$  treated neutrophils. *Biochem Biophys Res Comm* **190**:660, 1993
  - 34) Bosco MC, Gusella GL, Espinoza-Delgado I, Longo DL, Varesio L: Interferon- $\gamma$  upregulates Interleukin-8 gene expression in human monocytic cells by a posttranscriptional mechanism. *Blood* **83**:537, 1994
  - 35) Schuerer CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE: Colonic epithelial cell lines as a source of IL-8: Stimulation by inflammatory