

Human Peripheral Polymorphonuclear Leukocyte에 대한 Proinflammatory Cytokines의 작용

송요한¹ · 외귀옥² · 이인규³ · 소서영²
문대희² · 이인우² · 김형섭³
전북대학교 치과대학 구강미생물학교실¹
치과약리학교실², 치주과학교실³ 및 치학연구소

I. 서 론

미생물에 의하여 감염되거나 면역계에 자극이 있게 되면 IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-6 및 IL-8과 같은 cytokine cascade가 신속히 induction되어 이들이 기염증성 활성(proinflammatory activities)을 나타냄으로써 외부자극에 대한 복잡한 대응을 하는 것은 생체 방어의 중요 기전으로 알려져 있다¹⁾.

IL-1 β 는 치주염과 같은 G(-) 감염에 특히 중요한 기염증물질로서, 치은연하에 존재하는 G(-) periodontogen들은 IL-1 β 의 강력한 inducer로 알려져 있으며^{2,3)}, LPS는 1ng/ml의 저농도로도 macrophage에서 IL-1 β 의 유리를 강력하게 증강시키는 것으로 보고되었다^{4,5)}.

IL-1 β 의 기염증 작용으로서는 첫째, endothelial cell에 작용하여 neutrophil과 monocyte 혈관부 부착을 도모하여^{6,7)} 염증부위로 이들 세포들이 모여들게 함으로써 치주병 환자의 병소에 neutrophil과 macrophage가 많이 축적된다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다⁸⁾. 둘째로, IL-1 β 는 macrophage나 gingival fibroblast에 의한 PGE₂ 합성을 유도하며⁹⁾, 이렇게 합성된 PGE₂는 혈관이완 및 모세혈관 투과성

증가^{10,11)} 및 골흡수¹²⁾를 일으키는 강력한 염증 매개체 역할을 한다. 셋째로, IL-1 β 는 또한 강력한 catabolic effect를 나타내며¹³⁾, 이러한 효과는 사람이 치주염에서 조직파괴를 일으키는 국소적 매개체로서 역할을 하리라는 가능성을 시사한다¹⁴⁾. 즉 IL-1 β 는 생체내 실험에서 TNF- α , PTH 및 PGE₂에 비하여 10배정도 강력한 골흡수작용을 나타내며 PTH¹⁵⁾, TNF- α ¹⁶⁾ 및 lymphotoxin¹⁶⁾의 골흡수능에 대하여 상승작용을 나타낸다고 보고되었다.

한편 IL-1 β 는 prostaglandin과 thromboxane 합성¹⁷⁾과 collagenase 및 protease 생산^{18,19)}을 촉진하며, neutrophil degranulation 및 superoxide 생산을 증진²⁰⁾시키는 등, 조직파괴와 관련된 여러 생물학적 작용을 지니는 것으로 알려져 있다. 치주염증부위의 치은열구액내에서 IL-1 like activity가 증가되었다는 보고²¹⁾가 있는 이래 최근에는 치주낭에서 채취된 치은 열구액^{22,23)} 및 치주조직¹⁴⁾에서 고농도의 IL-1 β 가 검출되었고, 이에 반해 정상인에서는 거의 발견되지 않았으며, 치주염의 치료후에는 거의 background 수준으로 저하되었다는 보고들이 있었다¹³⁾.

치주낭 IL-1 β 의 source로 추정되는 세포로

본 논문은 1993년도 학술진흥재단 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

는 monocyte, fibroblast, epithelial cell, endothelial cell³¹⁾ 등이며, 치주낭에서 가장 많이 발견되는 숙주세포인 polymorphonuclear leukocyte(PMN)은 senescent, nonsynthetic cell로 여겨지므로 IL-1 β 의 source로는 생각되어지지 않았었다²⁵⁾. 그러나 PMN에 의한 단백질 및 mRNA 합성이 보고되었고^{27, 28)}, 토끼의 PMN에서 IL-1 like expression이 Goto등(1984)²⁹⁾에 의하여 처음 보고된 이래, 최근에는 PMN으로부터 IL-1 β 유전자의 발현이 GM-CSF, LPS, TNF^{25, 30)}에 의하여 촉진된다는 보고가 있었다.

IL-1 β 는 PMN에서도 G(-)세균의 내독소인 LPS 자극등 여러 염증성 물질의 자극에 의해서도 유리되므로 유리된 매개물질에 의하여 반응이 증폭되는 이른바 autocrine 역할을 PMN에 대하여 하고 있다. 따라서 IL-1 β 는 치주질환의 방어뿐만 아니라 그 자체가 pathogenesis(조직손상, 골 흡수등)에도 관여하므로 IL-1 β 분비량의 미세한 조절에 의하여 치주질환의 양상이 조절될 수 있는 것으로 보인다. 따라서 PMN 으로부터의 IL-1 β 의 발현 조절과 PMN의 기능에 대한 IL-1 β 의 작용을 규명하는 일이 반드시 필요하다. 그러나 사람의 PMN은 수명이 짧고 지속적 배양이 불가능하며, 또한 사람마다 혹은 채혈시 마다 PMN의 활성화 정도가 경우에 따라 서로 상이하게 일어나므로 사람의 말초 granulocyte로 IL-1 β 작용, 혹은 발현의 fine regulation 을 알아내기는 매우 힘들다.

Human leukemic cell line인 HL-60 cell은 promyelocytic leukemia 환자로부터 유래된 cell로서, myeloblast와 promyelocyte로서 성장하면서 여러 약물들에 의하여 성숙한 myeloid 형태로 분화가 유도된다. 예를 들어 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 HL-60 cell을 3일간 처리하면 nuclear-cytoplasmic ratio가 감소하고 nucleoli가 소실되며, azurophilic granule이 감소하는 등 metamyelocyte의 형태를 나타내게 된다^{31, 32)}. 생화학적으로는 nitroblue tetrazolium(NBT)이 감소하고 superoxide가 생성되

며 complement 및 formyl peptide의 receptor가 형성된다^{33, 34, 35)}. 기능적으로는 분화된 세포가 chemotaxis, chemokinesis, adherence, phagocytosis 및 효소유리등의 PMN, 특히 neutrophil과 유사한 기능들을 나타내게 된다^{33, 34, 35, 36)}, 이러한 DMSO의 작용은 세포내 cyclic AMP(cAMP)의 증가에 의한 것으로서 DMSO보다 좀더 완전하고 신속한 분화를 유도하는 cAMP analogue로서 N⁶, O²-dibutyryl adenosine 3'5' cyclic monophosphate dbcAMP)를 들 수 있다³⁷⁾. DMSO와 dbcAMP가 HL-60을 neutrophils과 기능적으로 유사한 세포로 분화시키는 한편, phorbol myristate acetate는 monocyte 및 macrophage와 유사한 세포로 분화를 유도한다. 이렇게 PMN 혹은 monocyte로 분화된 HL-60 cell을 이용하면 사람의 혈액에서 분리한 PMN이나 monocyte와는 달리 표준화된 동일 조건에서 반복실험을 할 수 있어 기염증성 cytokine의 생물학적 기능검사를 하는데 유리한 조건이 된다.

IL-1 β 외에도 최근 macrophage에서 LPS 자극에 의하여 분비가 유도된다고 보고된 macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)는 염증과 관련된 여러 생물학적 활성을 나타내므로^{38, 39)} 이 물질이 또 다른 기염성 cytokine일 가능성이 대두되고 있다. 그러나 아직까지 치주질환과의 관계가능성 여부는 전혀 알려지지 않은 상태이다. 따라서 PMN에서의 IL-1 β 유전자 발현에 관한 여러 조절인자를 규명하여 치주질환의 pathogenesis를 밝히고, 아직 생물학적 활성이 잘 알려지지않은 기염성 cytokine인 MIP-1 α 의 유전자 발현이 과연 PMN에서도 일어나는지를 관찰함으로써 MIP-1 α 의 치주질환과의 관계 가능성 여부를 추정하기 위하여 본 연구를 시도하게 되었다. 아울러 PMN으로 분화된 HL-60와 human peripheral PMN에서 MIP-1 α 의 수용체가 존재하는지 여부와 항균작용에 대한 cytokine의 작용을 비교함으로써, PMN의 생물학적 활성검사를 HL-60로써 대신 할 수 있는지를 밝히기위한 연구도 시행하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 시약

PMN 분리에 사용된 Histopaque 1077과 Histopaque 1119는 sigma제품을, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS), fetal bovine serum(FBS)과 Dulbecco's modified eagles medium(DMEM)과 minimum essential medium(MEM)등은 Gibco laboratory제품을 사용하였으며, penicillin과 streptomycin은 Sigma제품을 사용하였다. 자극을 위한 human recombinant IL-1 β 와 murine recombinant IL-2는 Genzyme 제품을 사용하였고, recombinant MIP-1 α 는 본 실험실에서 cloning한 stable transformant C127-48 cell의 배양상청액을 순수분리하여 이용하였으며 lipopolysaccharide(LPS: from E. coli 0127: B8)와 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)와 N⁶, O²-dibutyryl adenosine 3'5' cyclic monophosphate dbcAMP)는 Sigma제품을 사용하였다. RNA 추출에 사용된 RNasin은 Sigma사 제품을 사용하였으며, northern blot에 사용된 membrane은 NEN research사의 Gene screen Plus membrane을 사용하였고 기타 시약들은 특급제품을 사용하였다.

2. Polymorphonuclear leukocytes의 분리

20세 전후의 정상 여자의 혈액을 채취하여 mononuclear cell을 분리시키는 방법으로서 histopaque density gradient centrifugation method를 이용하였다. 채취된 혈액을 histopaque 1077/1119의 상층부에 깔아주고 700g, 실온(18-26 $^{\circ}$ C)에서 30분간 원심분리하였다. 적혈구는 바닥에 깔리고 granulocytes는 histopaque 1077과 1119의 중간층에서 분포하고 mononuclear cells와 platelet는 plasma와 histopaque 1077의 중간층에 분포하게 된다. 이 중 granulocyte층을 모아 DPBS로 2번 세척한 다음 0.1% FBS이 포함되어 있는 MEM 배양액에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양후 Giemsa염색을 하여 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정 한 후 자극시키려는 cytokine에 따라 group을

정하였다.

3. Polymorphonuclear leukocytes 자극

PMN세포들은 recombinant human IL-1 β (2ng/ml), recombinant murine IL-2(1u/ml), C127-48 배양상청액(MIP-1 α 의 source) 등의 cytokine과, LPS(1 μ g/ml), TPA (10.7nM)등의 물질을 MEM(serum free)배양액에 각각 농도별로 처리하여 0, 1, 2, 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양시간이 경과된 후에 원심분리한 다음 harvest하여 RNA extraction에 사용하였다.

4. RNA 추출

RNA를 분리 정제하기 위한 방법으로는 guanidium thiocyanate 추출방법을 사용하였고⁴⁰⁾, RNA추출에 사용된 모든 용액은 diethylpyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수로 준비하였다. PMN을 PBS로 세척한 후 10⁷ cell 당 1ml의 용액 D(4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate pH 8.0, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)를 첨가하였다. 50 μ l의 2 M sodium acetate, pH 4.0, 500 μ l의 phenol, 100 μ l의 chloroform-isomylalcohol 혼합물 (49:1)등을 계속적으로 첨가하여 혼합한 후 10초동안 세게 진탕하여 15분동안 얼음에 놓아둔 후, 4 $^{\circ}$ C에서 10,000g로 20분간 원심분리 하였다. 수용액층을 다른 microtube에 옮긴 후 500 μ l의 isopropanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 이상 놓아둠으로써 RNA를 침전시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 10,000g로 20분간 원심분리한 후 침전물을 300 μ l의 0.1U/1 RNasin이 포함된 증류수에 녹이고, 20 μ l의 3M sodium acetate, pH 5.2와 900 μ l의 100% ethanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 하루동안 놓아두었다. 4 $^{\circ}$ C에서 10,000g로 15분간 원심분리하여 얻어진 RNA 침전물을 70% ethanol로 1회 세척한후 진공 건조시켜 RNasin 0.1U/ μ l가 포함된 증류수 20 μ l에 용해시켰다.

5. Northern Blotting and Hybridization

RNA에 formaldehyde, formamide, MOPS

를 혼합하여 55°C에서 15분간 denature 시킨 다음, loading buffer를 혼합하여 1.4% agarose/formaldehyde gel에서 1xMOPS buffer (0.04M morpho-linopropanesulfonic acid, pH 7.0, 50mM sodium acetate, 5mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 전기영동하였다. 이 gel을 증류수로 짧은 시간동안 세척한 후 20xSSC (3 M NaCl, 0.3M sodium citrate, pH 7.0)에 30분간 soaking하여 Gene screen Plus membrane에 overnight transfer한 다음 membrane을 2xSSC로 세척하여 공기중에 건조시켜 80°C에서 2시간 구웠다.

준비된 membrane을 sealable bag에 넣고 prehybridization용액 (50% formamide, 10% dextran sulfate, 0.5% SDS, 1M sodium chloride)으로 42°C에서 30분동안 반응 시킨후 Multiprimer DNA labeling kit(Amersham)와 [α - 32 P]dCTP(Amersham)를 사용하여 만든 radioactive probe를 최종농도 hybridization용액 ml당 4×10^5 cpm 되는 양을 100°C에서 5분간 denature시켰다. 이때 salmon sperm DNA도 같이 denature시켜 hybridization solution에 첨가하여 42°C에서 진탕하면서 16-24시간 반응시켰다. Bag에 든 용액을 제거한 후, membrane을 제조회사의 설명서에 따라 세척하여 -80°C에서 X-Omat AR film(Eastman, Rochester, NY)에 5일 동안 감광시켰다.

6. MIP-1 α 의 Iodination

3 μ g의 MIP-1 α 를 Bolton-Hunter reagent (NEN)로 Rizzino와 Kozokoff(1991)⁴¹⁾의 방법에 따라 [125 I] labeling 하였고, MIP-1 α cDNA를 포함하는 bovine papilloma viral expression vector⁴²⁾를 지니고 있는 C127-48 cell의 serum-free 배양상청액으로부터 순수 분리한 MIP-1 α 를 사용하였다. 0.2% gelatin/5mM acetic acid용액으로부터 pre-equilibration된 sephadex G-25 column(Pharmacia Fine Chemical, Piscataway, NY)을 이용하여 free [125 I]로부터 [125 I] MIP-1 α 를 분리하였다.

0.3ml의 분획을 collect하여 각 fraction의 10

μ l를 glass microfiber filter에 15% TCA precipitate한 다음 gamma counter로 radioactivity (cpm/ μ g)를 계산하였다.

7. Receptor Binding Assay

Receptor binding assay를 실시하기 전에 acidic buffer(10mM sodium citrate, pH 4.0, 0.14M NaCl, 0.1% BSA)로 0°C에서 20초간 세척함으로써 receptor에 미리 결합되어 있을지 모르는⁴³⁾ endogenous ligand를 제거하였다. 세포를 binding buffer(Hank's balanced salt solution, 25mM HEPES, pH 7.5, 1% BSA)에 resuspend하여 세포수를 8×10^6 /ml로 맞췄다. 여러 농도의 [125 I] MIP-1 α 와 100배 excess 농도의 unlabeled MIP-1 α 존재하에 4°C에서 2시간 gentle rotation 하면서 cell은 incubation하였다. Ice-cold binding buffer 0.5 ml을 첨가함으로써 반응을 종료시킨 후, dibutyl phthalate/ diethyphthalate 1.5/ 1.0(v/v) mixture 위에 100 μ l의 aliquots를 올려놓고 3분간 400rpm으로 원심분리함으로써 free와 bound [125 I] MIP-1 α 를 separation하였다⁴⁴⁾. Cell pellet을 supernatant로 부터 분리하여 pellet과 supernatant의 radioactivity를 count하였다.

8. HL-60 cell의 분화 유도

HL-60 cell을 PMN으로 분화 유도하기 위해서는 500 M의 dbcAMP로 3일간 배양하였다. HL-60 cell은 10%의 FCS, 100U/ml의 penicillin과 100 μ g/ml의 streptomycin이 포함된 DMEM에서 5%의 CO₂ 공급하에 37°C로 배양하였다.

9. HL-60 cell의 항균작용 실험

분화된 또는 미분화된 HL-60 cell을 5×10^6 cell/ml의 농도로 DMEM/10% FCS 배양액에 suspend한 다음 MIP-1 α 10nM 또는 IL-1 β 10nM을 혼합하여 1시간 동안 CO₂ incubator에서 37°C로 배양하였다. Log phase에 있는 *S. aureus* 균주를 HL-60와 1:1의 비율로 혼합하여 2시간 동안 rotation 시키면서 37°C로 배양하였다. Sample을 0.01% BSA 용액으로 1:

10000 회석하여 BHI agar plate에 100 μ l씩 도말하고 37°C에서 overnight incubation 한 다음 colony를 count 하였다.

III. 결과 및 고찰

TPA, IL-1 β , MIP-1 α , LPS 및 IL-2가 각각 PMN으로부터 IL-1 mRNA 발현을 촉진하는지 여부를 밝히기 위하여, PMN을 이들 물질 (MIP-1 α 의 경우는 rMIP-1 α DNA transfected cell인 C127-48 배양상청액)이 포함된 배양액 내에서 0, 1, 2 및 3시간 동안 단기배양한 다음 이에 대한 Northern blot 분석을 시행한 결과가 Fig. 1의 (A)와 (B)이다. Protein kinase C activator로 알려진 TPA 처리로 PMN은 자극 2시간에 IL-1 β mRNA의 최대 발현 정도를 나타내었고, IL-1 β 자극 시에는 1시간부터 매우 높은 mRNA 발현을 보였으며 3시간까지 거의 비슷한 상태를 유지하였다(Fig. 1A). 동일한 membrane을 actin probe로 hybridization하여 각 lane에 load된 RNA양들을 비교하여보면, loading한 RNA양의 상대적 차이에 의하여 IL-1 β mRNA 발현 정도에 차이가 나타난 것은 아님을 증명한다.

rIL-1 β 는 TPA보다 더욱 강한 IL-1 β induction 효과를 나타내었는데 이것은 Marucha등(1991)²⁵ 및 Dinarello등(1987)⁴⁵의 결과와 일치하는 것으로서 이러한 autostimulatory effect는 IL-1 β 가 치주조직의 염증반응과 조직 파괴를 증강시키고 영속시키는 데에 관여할 수 있음을 시사한다¹³. 또한, Marucha등(1991)²⁵의 보고에 의하면 IL-1 β 와 TNF- α 가 IL-1 β mRNA 발현 및 단백질 합성에 있어 서로 협동적 역할을 한다고 하여, 여러 종류의 cytokine들의 상호작용 및 autocrine적 작용이 치주조직에서 염증의 진행 및 조직 파괴작용을 증강시키는데 관여한다고 하였다.

rMIP-1 α 자극시 매우 약하지만 2, 3시간 내에 대조군과 확실히 구분되는 band를 확인할 수 있었다. MIP-1 α 는 IL-1과 마찬가지로 T cell과 macrophage에서 자극에 의해 유리되는 cytokine이며 그 기능이 아직 거의 밝혀지지는

않았지만 염증 및 면역 반응의 중요 매개체일 가능성이 많다. Native MIP-1(MIP-1 α 와 -1 β 의 복합물질)이 *in vivo*에서 PMN 침윤³⁹, prostaglandin과 무관한 발열반응⁸을 일으키며 *in vitro*에서 PMN에 대한 화학주성반응 및 oxidative burst³⁹을 유발한다는 보고 등, MIP-1이 PMN에 대한 여러가지 기능적 변화를 유도한다는 것은 기능적 일치라고 보여진다.

본 실험에서 보인 mRNA 발현은 macrophage나 T cell의 inducible mRNA 발현과는 시간적으로 특이한 차이점을 보인다. 즉 자극 초기에 mRNA 발현이 시작되어 빠른 시간에 최대에 도달하여 잠깐만 message가 유지된다는 사실이며, 이는 염증부위에서의 PMN의 단명적 특징과 관계가 있다고 보인다²⁵. 또한 monocyte나 치주 조직세포에서는 IL-1 β mRNA가 4시간에 peak에 도달했다가 24시간 후까지도 유지된 반면 PMN에서는 1시간에 peak를 보였다가 3시간에 baseline수준에 돌아왔다고 보고한 Lindemann등(1988)⁵¹이나 Marucha등(1991)²⁵의 결과와 일치한다.

*E. coli*에서 추출한 endotoxin인 LPS로 자극하였을 때도 TPA 및 MIP-1 α 자극시와 비슷한 양상으로 IL-1 β mRNA가 발현되었다. 이러한 결과는 Lindemann등(1989)³⁰의 결과와 일치하였으나 Hanson등(1988)¹¹ 및 Windle등(1983)⁴⁶에 의하면 endotoxin 자극에 의하여 PMN으로부터 IL-1-like endogenous pyrogen이 유리되지 않았다고 하였다. 그러나 본 실험 결과에서 명확한 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다. LPS에 의한 IL-1 β induction을 치주질환이 주로 LPS의 source인 G(-)세균에 의한 감염이라는 사실로 비추어 볼 때 매우 중요한 의미를 가지며, G(-)로 주로 구성되어 있는 subgingival 세균들이 IL-1 β 생산을 효율적으로 증진시키는 반면^{2,3}, 주로 G(+)로 구성되어 있는 subgingival 세균들은 증진시키지 않았다는 보고^{47,48}와 비교할 때 일관성 있는 결과로 여겨진다.

rIL-2는 IL-1 β mRNA 발현을 유도하지 못하였다.

한편 macrophage에서 매우 다량으로 발현

되는 MIP-1 α 가 PMN에서도 과연 발현되는지를 밝히기 위하여 Fig. 1의 (A)와 (B)에 해당되는 동일 membrane을 MIP-1 α probe로 hybridization 해 본 결과 Fig. 1의 (C)에서 보듯이 모두 negative였다(membrane B에 대한 결과는 생략하였음).

사람의 PMN에 관한 생물학적 활성검사가 human leukemic cells line인 HL-60 cell에도 적용되는지를 조사하기에 앞서 test하려고 하는 cytokine의 수용체 존재여부 및 존재량등에 대한 정확한 특징 규명이 필요하다. 우선 첫번째 단계로서, MIP-1 α 의 PMN으로 분화된 HL-

Fig 1. IL-1 β and MIP-1 α gene expression on human peripheral polymorphonuclear leukocytes (PMNs)

PMNs were stimulated with : (A) and (C) PMA(TPA), rIL-1 β : (B) rMIP-1 α , LPS, IL-2 : for indicated hours.

Total cytoplasmic RNA extracted from 3×10^7 cells were fractionated on 1.4% formaldehyde-agarose gel., transferred to Gene Screen Plus, and hybridized to P-labeled IL-1, MIP-1, and actin cDNA, sequentially.

*(C) : RNA from C127-48 cell clone was used as a standard which expresses MIP-1 α mRNA by cadmium stimulation.

60 cell(dbcAMP-treated HL-60)의 항균작용에 대한 효과를 검사하여 PMN의 항균작용에 대한 작용과 비교하기에 앞서 MIP-1 α 의 수용체에 대한 분석을 시행하였다. Table 1에서 보듯이, 동일조건으로 시행한 수용체 결합분석에서, 방사능으로 표지된 MIP-1 α 와 여러 농도의 표지되지 않은 (cold) MIP-1 α 를 동시에 적용시킨 결과, PMN의 경우 2043 \pm 14 부터 1611 \pm 93cpm까지의 세포에 결합된 radioactivity가 측정되었으나, dbcAMP-treated HL-60의 경우는 3407 \pm 205 부터 1660 \pm 51 cpm까지의 값을 나타내어, 분화된 HL-60가 PMN 보다 더 많은 MIP-1 α 수용체를 갖고 있음이 밝혀졌다.

MIP-1 α 의 수용체는 T 임파구, macrophage, endothelial cell, bone marrow cell등에서 발견되었고^{42, 49}, 이는 MIP-1 α 가 이들 세포에 대하여 autocrine 및 paracrine modulator로서 작용함을 시사하는 것이다. 수용체 존재의 확인에 따라 T 임파구에 대하여 MIP-1 α 가 chemoattraction과 세포성장 억제작용을 나타냄이 발견되었듯이^{42, 50, 51}, 본 실험의 결과에서 PMN과 PMN으로 분화된 HL-60 cell에 MIP-1 α 의 수용체가 존재함이 밝혀짐으로써, PMN에 대하여 MIP-1 α 가 생물학적 기능 변화를 일으킬 수 있음을 알 수 있다. 이러한 사실은 Kim등(1993)⁵²의 보고에서 보듯이 사람의 PMN에 대한 MIP-1 α 의 항균작용 상승효과로서 입증될 수 있고, 아울러 PMN으로 분화된 HL-60 cell에 MIP-1 α 의 수용체가 PMN과 비교해서 더 많은 양 존재하리라는 본 실험의 결과에서 PMN 보다 dbcAMP-treated HL-60 cell에서 더욱 강력한 효과가 나타날 가능성도 있음을 유추할 수 있다. 분화되지 않은 HL-60 cell도 PMN과 비교될만한 정도의 항균작용이 있으며, PMN으로 분화유도된 HL-60는 매우 강한 항균작용이 있음이 Kim등(1993)⁵²에 의하여 이미 밝혀졌으며, 본 실험의 결과에서도 Table 2에서와 같이 이와 유사한 결과를 얻었다. PMN은 자극에 대한 숙주방어 기전의 최초에 작용하며, 치주질환의 급성 염증반응의 부분을 담당함으로써, 치주 파괴양

Table 1. Comparison of inhibition pattern of ¹²⁵I-MIP-1 α binding on human polymorphonuclear leukocyte(PMN) and differentiated HL-60 cell

Cold MIP-1 α 20 μ g/ml(μ l)	cpm	
	PMN	differentiated HL-60
0	2043 \pm 14	3407 \pm 205
5	1841 \pm 80	2879 \pm 102
10	1717 \pm 24	2121 \pm 98
20	1611 \pm 93	1660 \pm 51

Mean \pm SD (n=3)

Table 2. Effects of cytokines on the numbers of colonies of *S.aureus* cultured with differentiated or undifferentiated HL-60 cell.

Cytokine	HL-60		
	-	+	
		undifferentiated	differentiated
-	197 \pm 68	74 \pm 6 ^a	63 \pm 4
MIP-1 α , 10nM	-	30 \pm 7 ^b	26 \pm 5 ^b
IL-1 β , 10nM	-	39 \pm 5 ^b	35 \pm 4 ^b

Mean \pm SD (n=3)

a : p<0.05 when compared with non-HL-60 control

b : p<0.01 when compared with cytokine-untreated control

상보다 치주조직보호라는 측면에서 더욱 중요시되는 세포이며^{25, 33}, 항균작용과 같이 강한 protective한 양상을 띄는 작용에서 dbcAMP-treated HL-60가 강한 작용을 가진다는 것은 매우 의미있는 일이다.

한편, HL-60 cell의 항균작용에 대한 cytokine의 작용을 살펴본 결과에 의하면(Table 2), PMN으로 분화된 HL-60 cell의 경우, IL-1 β 보다 MIP-1 α 가 더 강력한 항균효과 증진을 나타내었다. 이로써 사람의 PMN IL-1 β 유전자의 발현에 있어서는 IL-1 β 가 MIP-1 α 보다 강한 작용을 나타내었지만(Fig. 1), PMN의 항균작용에 대한 작용은 MIP-1 α 가 더욱 강

력하게 영향을 미침으로써 세포의 활성종류에 따라 cytokine들이 각각 다른 정도로 작용할 수 있음을 보여주었다. 특히 MIP-1 α 는 주로 macrophage에 의하여 분비되어 PMN에 강한 작용을 나타내는 반면 IL-1 β 는 PMN에서 IL-1 β 의 유전자발현을 증진시킴으로써 세포활성을 증폭시키는 작용을 하고 있음이 본 실험의 결과에서 나타났다.

이상의 사실로 비추어 볼 때 IL-1 β 의 가장 중요한 source인 macrophage 외에 염증의 초기 단계에서 신속한 반응을 나타내는 PMN도 IL-1 β 를 생산하는 machinery를 가지며, 자극에 의한 IL-1 β mRNA 발현이 신속하게 유도되었다가 일찍 종식한다는 것은 macrophage와는 기능적으로 다른 일을 수행하도록 programming되어 있다는 것을 입증하고^{5,25)}, LPS에 의하여 효과적으로 발현되며 IL-1 β 자체에 의해 positive feedback regulation을 받는다는 사실로부터 치주질환의 pathogenesis에 IL-1 β 가 그 일부 역할을 담당하리라는 강한 추론을 낳게 한다.

급성염증질환은 보호적인 형태로 숙주반응이 나타나지만, 만성질환에서는 보호적인 것보다 파괴적인 쪽의 숙주반응 기전을 활성화시키는 양상으로 pathogenesis가 나타나기 일쑤이다. 치주염과 같은 치주질환에서는 이러한 급성과 만성 of 두가지 양상이 복합적으로 존재하여 각각이 중요한 역할을 담당하므로 치주염의 예방과 치료는 미묘한 숙주반응기전을 좀 더 자세히 이해하여야만 가능하다²⁶⁾. PMN, macrophage, lymphocyte 등의 여러 면역세포들은 여러단계의 염증과정에서 자기 독립적 및 상호 복잡한 관계를 가지면서 숙주반응을 매개하므로, 앞에서 열거된 PMN의 여러 기능적 변화와 이러한 cytokine 발현과 상관관계를 밝히는 작업이 이루어짐으로써 PMN기능저하로 인한 여러 질병 상태를 원천적으로 치유하기 위한 분자생물학적 응용이 가능하다고 사료된다.

IV. 참고문헌

1. Hanson, D., Tracey, K., Fong, Y., Manogue,

K., Palladino, M.Jr., Cerami, A., Shires, G., and Lowry, S. : Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg. Gynecol. Obstet.* 166 : 147, 1988.

2. Burchett, S., Weaver, W., Westall, J., Larsen, A., Kronheim, S., and Wilson, C. : Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 140 : 3473, 1988.
3. Hanazawa, S., Nakada, K., Ohmori, Y., Myoshi, T., Amano, S., and Kitano, S. : Functional role of interleukin-1 in periodontal disease induction of interleukin-1 production by *Bacteroides gingivalis* lipopolysaccharides in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* 50 : 262, 1985.
4. Lindemann, R., and Economou, J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* activate human peripheral monocytes to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Periodontol.* 59 : 728, 1988.
5. Lindemann, R., Economou, J., and Rothermel, H. : Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J. Dent. Res.* 67 : 1131, 1988.
6. Bevilacqua, M., Pober, J., Mendrick, D., Cotran, R., and Gimbrone, M. Jr. : Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 9238, 1987.
7. Bevilacqua, M., Pober, J., Wheeler, M., Cotran, R., and Gimbrone, M. Jr. : Interleukin 1 acts on cultures human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J. Clin.*

- Invest. 76 : 2003, 1985.
8. Davatelis, G., Wolpe, S., Sherry, B., Dayer, J., Chicheportiche, R., and Cerami, A. : Macrophage inflammatory protein-1 : a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science*. 243 : 1066, 1989.
 9. Richards, D., and Rutherford, R. : The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Arch. Oral Biol.* 33 : 237, 1988.
 10. Belch, J. : The role of eicosanoids in inflammation. In : Goodacre, J., Dick, W., eds. *Immunopathogenetic mechanisms of arthritis*. Boston, MTP Press, 26, 1988.
 11. Allison, A. : Role of macrophage activation in the pathogenesis of chronic inflammation and its pharmacological control. In : Otterness, I., Capetola, R., Wong, S., eds. *Advances in inflammation research*, vol 7. New York, Raven Press. 201, 1984.
 12. Klein, D., and Raisz, L. : Prostaglandins : stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86 : 1436, 1970.
 13. Page, R. : The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 26 : 230, 1991.
 14. Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M.S., Probst, L. Haffajee, A.D., and Socransky, S.S. : levels of interleukin 1 in tissue from sites of active periodontal disease. *J. Clin. Periodontol* 18 : 58, 1991.
 15. Dewhirst, F.E., Ago, J.M., Peros, W.J., and Stashenko, P. : Synergism between parathyroid hormone and interleukin 1 in stimulating bone resorption in organ culture. *J. Bone Miner Res.* 2 : 127, 1987.
 16. Stashenko, P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L., and Ago, J.M. : Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J. Immunol.* 138 : 1464, 1987.
 17. Tatakis, D., Schneeberger, G., and Dziak, R. : Recombinant interleukin-1 stimulates prostaglandin E2 production by osteoblastic cells : synergy with parathyroid hormone. *Calcified Tissue International* 42 : 358, 1988.
 18. Saklatvala, J., Sarsfield, S., and Townsend, Y. : Pig interleukin-1. Purification of two immunologically different leukocyte proteins that cause cartilage resorption, lymphocyte activation, and fever. *J. Exp. Med.* 162 : 1208, 1985.
 19. Mizel, S., Dayer, J., Krane, S., and Mergenhagen, S. : Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte activtin factor (interleukin-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 2474, 1981.
 20. Dinarello, C. : Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* 44 : 153, 1989.
 21. Charon, J., Luger, T., Mergenhagen, S., and Oppenheim, J. : Increased thymocyte-activation factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infect. Immun.* 38 : 1190, 1982.
 22. Jandinski, J., Bilobron, S., Aboyoussef, H., Feder, L., Rynar, J., and Deasy, M. : Interleukin-1 beta in crevicular fluid during peiodontal health and disease. *J. Dent. Res.* 68 : 1021, 1989.
 23. Kaplan, E., Dinarello, C., and Gelfand, J. : Interleukin-1 and the response to injury. *Immunol. Res.* 8 : 118, 1989.
 24. Marucha, P., Zeff, R., and Kreutzer, D. : Regulation of IL-1 gene expression in human peripheral blood PMN. *J. Periodontal Res.* 26 : 264, 1991.
 25. Hughes, V., Humphreys, J., and Edwards, S. : Protein synthesis is activated in primed neutrophils : possible role in inflam-

- mation. *Bioscience Reports* 7 : 881, 1987.
28. Granelli-Piperno, A., Vassalli, J., and Reich, E. : PNA and protein synthesis in human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 194 : 284, 1979.
 29. Goto, F., Nakamura, S., Goto, K., and Yoshinaga, M. : Production of a lymphocyte proliferation potentiating factor by purified polymorphonuclear leukocytes from mice and rabbits. *Immunology.* 53 : 683, 1984.
 30. Lindemann, R., Riedel, D., Oster, W., Ziegler-Heitbrock, H., Mertelsmann, R., and Herrmann, F. : Granulocyte - macrophage colony - stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 140 : 837, 1989.
 31. Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R. E. : Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. *Nature* 260:347, 1977.
 32. Collins, S.J., Ruscetti, F.M., Gallagher, R. E., and Gallo, R.C. : Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2458, 1978.
 33. Newburger, P.E., Chovaniec, M.E., Greenberger, J.S., and Cohen, H.J. : Functional changes in human leukemic cell line HL-60. *J. Cell Biol.* 82 : 315, 1979.
 34. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R. E., and Gallo, R.C. : Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemic cells(HL60) after induction of differentiation by dimethyl sulfoxide. *J. Exp. Med.* 149 : 969. 1979.
 35. Niedel, J.E., Kahane, I., Lachman, L., and Cuatrecasas, P. : A subpopulation of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) display the formyl peptide chemotactic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 1000, 1980.
 36. Fontana, J.A., Wright, D.G., Schiffman, E., Corcoran, B.A., and Deisseroth, A.B. : Development of chemotactic responsiveness in myeloid precursor cells : studies with a human leukemia cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 3664, 1980.
 37. Chaplinski, T.J., and Niedel, J.E. : Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 70:953, 1982.
 38. Devatelis, G., Wolpe, S., Sherry, B., Dayer, J., Chicheportiche, R., and Cerami, A. : Macrophage inflammatory protein-1 : a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. *Science.* 243 : 1066, 1989.
 39. Wolpe, S., Davatelis, G., Sherry, B., Beutler, B., Hesse, D., Nguyen, H., Moldawer, L., Nathan, C., Lowry, S., and Cerami, A. : Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167 : 570, 1988.
 40. Chomczynski, P., and Sacchi, N. : Single-Step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 156, 1987.
 41. Rizzino, A., and Kazakoff, P. : Iodination of peptide growth factors : platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor. In *Methods Enzymol.* vol.198 Barnes,D., Mather,J.P., and Sato,G.H., eds. Academic Press Inc. San Diego, pp 467-479, 1991.
 42. Oh, K.O., Zhou, Z., Kim, K.K., Samanta, H., Fraser, M., Kim, Y.J., Broxmeyer, H.E., Kwon, B.S. : Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein-1 . *J. Immunol.* 147 : 2978, 1991.
 43. Tsudo, M., Kozak, R.W., Goldman, C.K.,

- and Waldmann, T.A. : Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2 : a potential participant in multichain interleukin 2 receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 9694, 1986.
44. Miyazawa, K., Mantel, C., Lu, L., Morrison, D.C., and Broxmeyer, H.E. : Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage -differentiated HL-60 cells. *J. Immunol.* 146 : 723, 1991.
 45. Dinarello, C., Ikejima, T., and Warner, S. : Interleukin-1 induces interleukin-1. Induction of interleukin-1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* 139 : 1902, 1987.
 46. Windle, B., Murphy, P., and Cooperman, S. : Rabbit polymorphonuclear leukocytes do not secrete endogenous pyrogens or interleukin-1 when stimulated by endotoxin, polyinosine, polycytosine or muramyl dipeptide. *Infect. Immun.* 39 : 1142, 1983.
 47. Socransky, S. : Microbiology of periodontal disease. Present status and considerations. *J. Periodontol.* 48:497, 1977.
 48. Van Palenstein-Helderman, W. : Total viable count and differential count of *Vibrio* (*Campylobacter*) *stutorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas sputigena*, *Bacteroides inflamed* and noninflamed human gingival crevice. *J. Periodont. Res.* 10 : 294, 1975.
 49. Oh, K.O., Jeong, S.R., Yu, K.R., Oh, H.J., Lee, D.W., Lee, S.H., Kwak, Y.H., Kim, H. S., and Kwon, B.S. : Receptor binding characteristics of macrophage inflammatory protein -1 and -1 . *J. oral Biol.* 17(2):93, 1993.
 50. Taub, D., Colon, K., Lyoyd, A.R., Oppenheim, J.J., and Kelvin, D.J. : Preferential migratin of activated CD4% and CD8% T cells in response to MIP-1 and MIP-1 . *Science.* 260 : 355, 1993.
 51. Zhou, Z., Kim, Y.J., Pollok, K., Hurtado, J., Lee, J.K., Broxmeyer, H.E., and Kwon, B.S. : Macrophage inflammatory protein -1 rapidly its receptors and inhibits the anti-CD3 mAb-mediated proliferation of T lymphocytes. *J. Immunol.* 151:4333, 1993.
 52. Kim, P.W., Lim, J.D., Lee, S.H., Oh, K.O., and Kim, H.S. : Effect of macrophage inflammatory protein-1 and MIP-1 on the antimicrobial action of polymorphonuclear leukocytes. *J. Oral Biol.* 17(2) : 113, 1993.
 53. Schluger, S., Yuodelis, R., Page, R.C., and Jhonson, R.H. : Pathogenic mechanism. In *Periodontal disease : Basic Phenomena, Clinical Management, and Occlusal and Restorative Interrelationships*. 2nd edition, p221-262, Lea and Febiger, Philadelphia London, 1990.

EFFECTS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES ON THE HUMAN PERIPHERAL POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

Yo-Han Song¹, Kwi-Ok Oh², In-Kyu Lee³, In-Woo Lee², Dae-Hee Moon²,
Seo-Young So², Hyung-Seop Kim³

*Dept. of Oral Microbiology¹, Dept. of Dental Pharmacology², and Dept. of Periodontology³,
College of Dentistry, Chonbuk National University*

Human polymorphonuclear leukocytes (PMN) are the most numerous host cell in periodontal pockets and their presumed role is to form a protective barrier between the bacteria and periodontal tissues. Microbial component LPS activates macrophages to produce IL-1 β , MIP-1 α , -1 β , TNF- α and IL-6, etc. These cytokines have autocrine function to the macrophages, and paracrine function to other cell such as PMN and affect them to produce some biological functions.

In the present study, human PMN were tested for the expression of IL-1 β and MIP-1 α mRNA. Also we performed the receptor binding assay and in vitro assay for the antimicrobial action of HL-60 cell to determine whether HL-60 can replace the peripheral PMN in analyzing the biological functions.

PMN were stimulated with IL-1 β , TPA, MIP-1 α , LPS, IL-2 and total cytoplasmic RNA were extracted for the northern blot analysis. In order to determine the induction kinetics of IL-1 β or MIP-1 α mRNA expression, cells were stimulated for 0,1,2,3 hours. We found peak expression of IL-1 β mRNA after 1hr of induction with IL-1 β , LPS and after 2hr of induction with TPA. MIP-1 α also induced but a scarce IL-1 β message from PMN. In contrast to the IL-1 β mRNA expression, MIP-1 α were not induced from PMN in any culture conditions.

Receptors for MIP-1 α were identified on dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP)-treated HL-60 as well as peripheral PMN. dbcAMP treatment significantly enhanced antimicrobial action of undifferentiated HL-60 cell. MIP-1 further increased enhancing effect of dbcAMP. IL-1 β , to a lesser extent, also increased dbcAMP-induced enhancing effect of antimicrobial action of HL-60 cell.