

## Promyelocytic Cell Line HL-60의 생물학적 활성에 대한 기염증성 Cytokines의 작용

이인규<sup>1</sup> · 오귀옥<sup>2</sup> · 김형섭<sup>1</sup>

전북대학교 치과대학 치주과학교실<sup>1</sup>

전북대학교 치과대학 약리학교실<sup>2</sup>

### I. 서 론

치주질환에 이환된 치주낭에서 가장 많이 발견되는 숙주세포인 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte ; PMN)는 치주질환에서 세균과 치주조직 사이의 보호방벽의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 치주낭 세균의 수나 독성이 증가하거나, 방벽을 형성하는 PMN의 수 혹은 기능이 감소하여 이 보호방벽이 무너지게 되면 방벽의 산물이 숙주세포로 침입해 들어와 결합조직 부착부위에 손상을 주게 된다. 따라서 치주낭에서의 PMN의 recruitment와 기능은 connective tissue attachment의 지속적 건강에 가장 중요한 인자가 된다<sup>1)</sup>.

PMN이 염증조직에서 기능을 하기 위하여는 혈관으로부터 손상 혹은 세균의 침범이 있는 곳으로 이동되어야 하는데 여러 기염증성 cytokine들, 즉 interleukin-1(IL-1)이나 tumor necrosis factor(TNF)등이 이러한 PMN의 이동을 매개하는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 뿐만 아니라 이러한 기염증성 cytokine들은 PMN의 여러 기능을 상승시켜, 예를 들면 oxidative metabolism, 염증매개물질의 유리, 항균능력의 증가 등이 나타난다<sup>3)</sup>.

특히 IL-1 $\beta$ 의 경우는 osteoclast activating factor<sup>4)</sup>라고 한때 불렀던 골흡수의 가장 중요한 매개체<sup>5,6)</sup>로서, 치주질환시 치조골의 비가역적

흡수를 유발함으로써 결과적으로 치아 상실을 일으키는 가장 직접적인 인자이기도 하다. 치주질환시 치은열구액내<sup>7,8)</sup>, 혹은 치주조직<sup>9)</sup>내에서 IL-1 $\beta$ 의 농도가 증가한다는 것이 이러한 사실의 간접적 증거이기도 하다.

IL-1 $\beta$ 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 $\beta$ 는 치주질환의 방어뿐만 아니라 그 자체가 pathogenesis(조직손상, 골흡수등)에도 관여하므로 IL-1 $\beta$  분비량의 미세한 조절에 의하여 치주질환의 양상이 조절될 수 있는 것으로 보인다. 따라서 PMN 으로부터의 IL-1 $\beta$ 의 발현 조절과 PMN의 기능에 대한 IL-1 $\beta$ 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 $\beta$  작용, 혹은 발현의 정확한 조절을 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<sup>10,11</sup>. 생화학적으로는 nitroblue tetrazolium (NBT)이 감소하고 superoxide가 생성되며 complement 및 formyl peptide의 receptor가 형성된다<sup>12-14</sup>. 기능적으로는 분화된 세포가 chemotaxis, chemokinesis, adherence, phagocytosis 및 효소유리등의 PMN, 특히 neutrophil과 유사한 기능들을 나타내게 된다<sup>12-15</sup>. 이러한 DMSO의 작용은 세포내 cyclic AMP(cAMP)의 증가에 의한 것으로서 DMSO보다 좀더 완전하고 신속한 분화를 유도하는 cAMP analogue로서 N<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3'5' cyclic monophosphate(dbcAMP)를 들 수 있다<sup>16</sup>. 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.

한편, IL-1 $\beta$  외에도 치주질환의 주요원인균인 G(-)균의 내독소인 LPS로 자극된 macrophage에서 유리된다고 보고되었고, 새로운 chemokine family member의 하나로 알려진 macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )는, 이미 알려진 기염증성 작용<sup>17,18</sup>들로 미루어 PMN에 대하여도 매우 중요한 기능을 하고 있을 것으로 추측된다. MIP-1 $\alpha$ 로 자극된 PMN에서 IL-1 $\beta$ 의 유리가 유도된 것이 그중 하나이다. granulocyte로 분화된 HL-60과 human PMN에서 MIP-1 $\alpha$ 의 수용체가 존재하는지 여부와 이들의 항균작용에 영향을 미치는가를 밝히는 일은 MIP-1 $\alpha$ 가 PMN의 기능에 어느 정도 기여하며, 치주질환에서 이 cytokine이 어떠한 역할을 하는지를 알아내기 위하여 수행해야 할 필수적인 일들이다.

따라서 인류가 가장 많이 앓고 있는 질환중의 하나인 치주질환의 진행 기전을 규명하기 위한 자료를 제공하고, 아울러 앞으로 PMN의 생체 방어기전을 알아내기 위한 방편으로서 HL-60 cell line과 같은 유용한 수단을 이용하려면 HL-60 cell line과 human PMN의 결과를 비교분석하는 연구가 선행되어야 하므로 이러한 목적으로 본 연구가 시행되었다.

## 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 $\beta$ 는 Genzyme 제품을 사용하였고, recombinant MIP-1 $\alpha$ 는 본 실험실에서 cloning한 stable transformant C127-48 cell의 배양상청액을 순수 분리하여 이용하였으며, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)와 N<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3'5' cyclic monophosphate(dbcAMP)는 Sigma제품을 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. 이중 granulocyte층을 모아 DPBS로 2번 세척한 다음 0.1% FBS이 포함되어 있는 MEM 배양액에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>

incubator에서 1시간 배양후 Giemsa염색을 하여 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였다.

### 3. MIP-1 $\alpha$ 의 Iodination

3 $\mu$ g의 MIP-1 $\alpha$ 를 Bolton-Hunter reagent (NEN)로 Rizzino와 Kozokoff<sup>19)</sup>의 방법에 따라 [<sup>125</sup>I] labeling 하였고, MIP-1 $\alpha$  cDNA를 포함하는 bovine papilloma viral expression vector<sup>20)</sup>를 지니고 있는 C127-L2G25B48 cell의 serum-free 배양상청액으로부터 순수분리한 MIP-1 $\alpha$ 를 사용하였다. 0.2% gelatin/5mM acetic acid 용액으로 부터 pre-equilibration된 sephadex G-25 column(Pharmacia Fine Chemical, Piscataway, NY)을 이용하여 free [<sup>125</sup>I]로부터 [<sup>125</sup>I] MIP-1 $\alpha$ 를 분리하였다.

0.3ml의 분획을 collect하여 각 fraction의 10  $\mu$ l를 glass microfiber filter에 15% TCA precipitate한 다음 gamma counter로 radioactivity (cpm/ $\mu$ g)를 계산하였다.

### 4. Receptor Binding Assay

Receptor binding assay를 실시하기 전에 acidic buffer(10mM sodium citrate, pH 4.0, 0.14M NaCl, 0.1% BSA)로 0 $^{\circ}$ C에서 20초간 세척함으로써 receptor에 미리 결합되어 있을지 모르는 endogenous ligand를 제거하였다<sup>21)</sup>. 세포를 binding buffer(Hank's balanced salt solution, 25mM HEPES, pH 7.5, 1% BSA)에 resuspend하여 세포수를 8 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/ml로 맞췄다. 여러 농도의 [<sup>125</sup>I] MIP-1 $\alpha$ 와 100배 excess 농도의 unlabeled MIP-1 $\alpha$  존재하에 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 gentle rotation 하면서 cell은 incubation하였다. Ice-cold binding buffer 0.5 ml을 첨가함으로써 반응을 종료시킨 후, dibutyl phthalate/ diethyl phthalate 1.5/ 1.0(v/v) mixture 위에 100 l의 aliquots를 올려놓고 3분간 400rpm으로 원심분리함으로써 free와 bound [<sup>125</sup>I]MIP-1 $\alpha$ 를 separation하였다. Cell pellet을 supernatant로부터 분리하여 pellet과 supernatant의 radioactivity를 count하였다.

### 5. HL-60 cell의 분화 유도

HL-60 cell을 monocyte로 분화 유도하기 위해서는 TPA 20ng/ml을, granulocyte로 분화 유도하기 위해서는 500 M의 dbcAMP로 3일간 배양하였다. HL-60 cell은 10%의 FCS, 100U/ml의 penicillin과 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin이 포함된 DMEM에서 5%의 CO<sub>2</sub> 공급하에 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다.

### 6. HL-60 cell의 항균작용 실험

분화된 또는 미분화된 HL-60 cell을 5 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/ml의 농도로 DMEM/10% FCS 배양액에 suspend 한 다음 MIP-1 $\alpha$  10nM 또는 IL-1 $\beta$  10 nM을 혼합하여 1시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다. Log phase에 있는 *S. aureus* 균주를 HL-60와 1 : 1의 비율로 혼합하여 2시간 동안 rotation 시키면서 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다. Sample을 0.01% BSA 용액으로 1 : 10 000 희석하여 BHI agar plate에 100 l씩 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 overnight incubation 한 다음 colony를 count 하였다.

## III. 결과 및 고찰

사람의 PMN 에 관한 생물학적 활성검사가 human leukemic cells line인 HL-60 cell에도 적용되는지를 조사하기에 앞서 조사하려고 하는 cytokine의 수용체 존재여부 및 존재량등에 대한 정확한 특징 규명이 필요하다. 우선 첫번째 단계로서, MIP-1 $\alpha$ 의 PMN으로 분화된 HL-60 cell(dbcAMP-treated HL-60)의 항균작용에 대한 효과를 검사하여 PMN의 항균작용에 대한 효과와 비교하기에 앞서 MIP-1 $\alpha$ 의 수용체에 대한 분석을 시행하였다. Table 1과 Fig. 1에서 보듯이, 동일조건으로 시행한 수용체 결합분석에서, 방사능으로 표지된 MIP-1 $\alpha$ 와 여러 농도의 표지되지 않은 (cold) MIP-1 $\alpha$ 를 동시에 적용시킨 결과, PMN의 경우 2043 $\pm$ 14 부터 1611 $\pm$ 93 cpm 까지의 세포에 결합된 radioactivity가 측정되었으나, dbcAMP-treated HL-60의 경우는 3407 $\pm$ 205 부터 1660 $\pm$ 51 cpm 까지의 값을 나타내어, 분화된 HL-60가 PMN

Table 1. Bound  $^{125}\text{I}$ -MIP-1 $\alpha$  on human peripheral PMN and differentiated HL-60 when added by various amount of cold MIP-1 $\alpha$

Cold MIP-1 $\alpha$ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ( $\mu\text{l}$ )	bound radioactivity(cpm)	
	PMN	dbcAMP-treated 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)

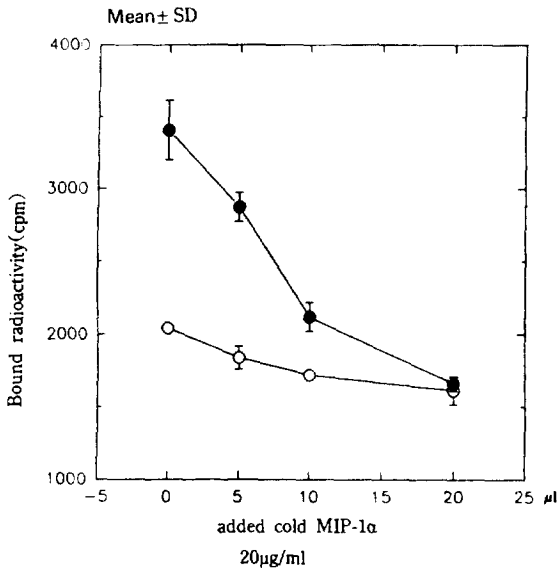


Fig. 1. Inhibition of  $^{125}\text{I}$ -MIP-1 $\alpha$  binding on human peripheral PMN(○-○) and differentiated HL-60 cell(●-●)

보다 더 많은 MIP-1 $\alpha$  수용체를 갖고 있음이 밝혀졌다. MIP-1 $\alpha$ 의 수용체는 T 림파구, macrophage, endothelial cell, 골수세포등에서 이미 발견되었으며<sup>20,22)</sup>, 수용체의 존재는 이들 세포에 MIP-1 $\alpha$ 가 autocrine, 혹은 paracrine 기능을 갖는다는 것을 간접적으로 시사하는 것으로서 실제 macrophage 기능 항진, 골수 stem cell 성장억제, T 림파구 성장억제 및 세포표면항원의 발현 변화, 혹은 화학주성유도등의 생물학적 활성들이 확인된 바있다<sup>20,23-29)</sup>. 역으로 이미 알려진 MIP-1 $\alpha$ 의 여러가지

기염증성 작용으로 부터 가장 중요한 염증세포인 PMN에 MIP-1 $\alpha$ 의 수용체가 존재하리라는 것은 쉽게 유추할 수 있다. 즉 염증 세포의 침윤을 동반한 국소염증작용<sup>30)</sup> 및 prostaglandin과 무관한 발열작용<sup>17)</sup>이 그것이다.

본 실험의 결과에서 PMN과 PMN으로 분화된 HL-60 cell에 MIP-1 $\alpha$ 의 수용체가 존재함이 밝혀짐으로써, PMN에 대하여 MIP-1 $\alpha$ 가 생물학적 기능 변화를 일으킬 수 있음을 알 수 있다. 이러한 사실은 Kim등<sup>31)</sup>의 보고에서 보듯이 사람의 PMN에 대한 MIP-1 $\alpha$ 의 항균작용 상승효과로서 입증될 수 있고, 아울러 PMN으로 분화된 HL-60 cell에 MIP-1 $\alpha$ 의 수용체가 PMN과 비교해서 더 많은 양이 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 비교될 만한 정도의 항균작용이 있으며, PMN으로 분

B

C

Fig. 2. Photographs of HL-60 cell treated with differentiation inducers for 3 days

A. control

B. TPA, 20 ng/ml

C. dbcAMP, 500 $\mu$ M

화유도된 HL-60는 매우 강한 항균작용을 가지고 있음이 Kim 등<sup>31)</sup>에 의하여 이미 밝혀졌다. 본 실험의 결과에서도 Table 2와 Fig. 3에서와 같이 이와 유사한 결과를 얻었으며, 특히 monocyte/macrophage로 분화된 TPA-treated HL-60 보다도 PMN으로 분화된 dbcAMP-treated HL-60가 훨씬 더 강력한 항균작용을 가지고 있었다. PMN은 자극에 대한 숙주방어기전의 최초에 작용하며, 치주질환의 급성 염증반응의 부분을 담당함으로써, 치주 파괴양상보다 치주조직보호라는 측면에서 더욱 중요시되는 세포이며<sup>1,32)</sup>, 항균작용과 같이 protective한 양상을 띄는 작용에서 TPA-treated HL-60 보다 dbcAMP-treated HL-60가 더욱 강한 작용을 가

진다는 것은 매우 의미있는 일이다. PMN은 치주질환을 유발하는 virulent bacteria에 대한 방어에 특히 중요한 phagocyte로서, 말초혈액 내의 백혈구중 70%를 차지하고 있으나 그 수명이 매우 짧다. 골수에서 다량 만들어진 후 혈액내에서 1/2 내지 1일간 순환한 후, 조직내로 이주한다. 조직내에서 감염인자를 탐식하고 분해하여 용해시킨다. PMN의 기능적 혹은 숫적 결함을 가지고 있는 agranulocytosis, cyclic neutropenia, diabetes, Down's syndrome 등의 환자들은 모두 심한 치주질환을 앓고 있는 것으로 보고되고 있고<sup>33-36)</sup>, 전체적으로 PMN은 치주질환에 있어 protective한 역할을 하는 것으로 추측된다<sup>37)</sup>. 이러한 사실을 입증하는 또

Table 2. Numbers of colonies of *S. aureus* cultured with undifferentiated or differentiated HL-60 cell

Treatment of HL-60	HL-60	
	-	+
Phosphate buffered saline	338 $\pm$ 37	229 $\pm$ 12 <sup>a</sup>
TPA 20ng/ml	-	49 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
dbcAMP 500 $\mu$ M	-	14 $\pm$ 4 <sup>b</sup>

Mean $\pm$  SD(n=3)

a : p&lt;0.05 when compared with non-HL-60 control

b : p&lt;0.001 when compared with undifferentiated HL-60

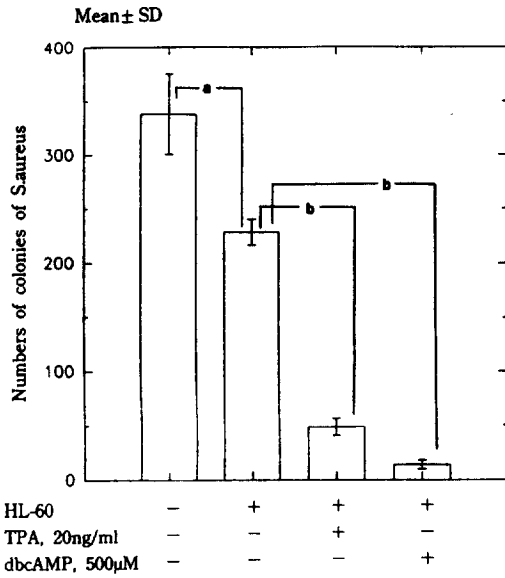


Fig. 3. Enhancing effect of TPA and dbcAMP on the antimicrobial action of HL-60  
 a :  $p < 0.05$   
 b :  $p < 0.01$

다른 것으로는 AIDS 환자에서 심한 치주질환도 여기 동시에 나타난다는 것이다. AIDS 환자는 임파구에 주된 결함이 나타나지만, neutrophil의 결함을 포함한 phagocytic disorder 이기도 하다. 그외에도 신체의 다른 부분은 건강하지만 심한 치주염을 앓고 있는 환자들중에 PMN 기능이상을 갖고 있는 질환으로서 유년성

치주염(localized juvenile periodontitis, LJP); acute necrotizing ulcerative gingivitis (ANUG), 및 refractory periodontitis등을 들 수 있다<sup>34,36</sup>. LJP 환자의 PMN 연구결과에 의하면, 이들의 PMN은 Actinomyces actinomycetemcomitans에 대한 항균작용의 결함<sup>36</sup>, Phagocytosis의 결함<sup>36</sup>, 화학주성 결함<sup>36-40</sup>등을 가지고 있음이 밝혀졌다. 또한 임상 실험을 통하여서도 PMN 기능저하가 치주질환에 risk factor로 작용한다는 간접적 증거들이 밝혀졌다<sup>37</sup>. 따라서 PMN의 기능을 측정하고 이들의 기능에 대하여 영향을 줄 수 있는 인자를 찾아 기전을 이해하는 일은 치주질환의 진단과 예후에 대한 정보를 제공하는데 반드시 필요하다고 사료된다.

한편, HL-60 cell의 항균작용에 대한 cytokine의 작용을 살펴본 결과에 의하면(Table 3, Fig. 4, Table 4, Fig. 5) TPA 및 dbcAMP 처리된 세포들에서 서로 유사한 양상을 보였다. 즉, monocyte /macrophage로 분화된 HL-60은 미분화된 HL-60가 MIP-1 $\alpha$  항균효과가 증진된 것과 유사한 정도로 항균효과가 증진되었으며, IL-1 $\beta$ 는 이보다 훨씬 못 미치는 작용을 나타내었다. 그러나, PMN으로 분화된 dbcAMP-treated HL-60 cell의 경우에는 IL-1 $\beta$ 도 MIP-1 $\alpha$ 에 거의 육박하는 항균효과 증진을 나타내었다. So 등<sup>41</sup>의 결과에 의하면, PMN의 IL-1 유전자 발현에 대한 작용에 있어서는 IL-1 $\beta$ 가

Table 3. Effects of cytokines on the numbers of colonies of *S. aureus* cultured with TPA-treated or untreated HL-60 cell

Cytokine	HL-60		
	-	+	
		No treatment	TPA treatment
-	373 ± 71	167 ± 17 <sup>a</sup>	73 ± 1 <sup>b</sup>
MIP-1 $\alpha$ , 10nM	-	90 ± 13 <sup>c</sup>	44 ± 7 <sup>b,c</sup>
IL-1 $\beta$ , 10nM	-	101 ± 27 <sup>d</sup>	84 ± 17

Mean ± SD (n=3)  
 a :  $p < 0.05$  when compared with non-HL-60 control  
 b :  $p < 0.01$  when compared with undifferentiated HL-60  
 c :  $p < 0.01$  when compared with cytokine-untreated control  
 d :  $p < 0.05$  when compared with cytokine-untreated control

Table 4. Effects of cytokines on the numbers of colonies of *S. aureus* cultured with dbcAMP-treated or untreated HL-60 cell

Cytokine	HL-60		
	-	+	
		No treatment	dbcAMP treatment
-	197 ± 68	74 ± 6 <sup>a</sup>	63 ± 4
MIP-1α, 10nM	-	30 ± 7 <sup>b</sup>	26 ± 5 <sup>b</sup>
IL-1β, 10nM	-	39 ± 5 <sup>b</sup>	35 ± 4 <sup>b</sup>

Mean ± SD (n=3)

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

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

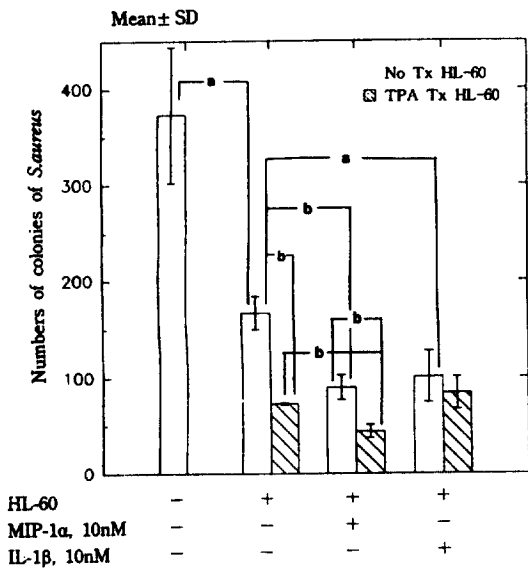


Fig. 4. Enhancing effect of cytokines on the antimicrobial action of TPA-treated or untreated HL-60

a : p < 0.05

b : p < 0.01

MIP-1α보다 강력한 효과를 나타내었는데, 본 실험의 PMN의 항균작용에 대한 효과는 MIP-1α가 더욱 강력하게 영향을 미침으로써, 세포의 활성종류에 따라서는 cytokine들이 각각 다른 정도로 작용할 수 있음을 보여주었다.

Bacterial substance가 치주염과 같은 만성 염증질환에서 조직파괴를 유발하고 지속시키는

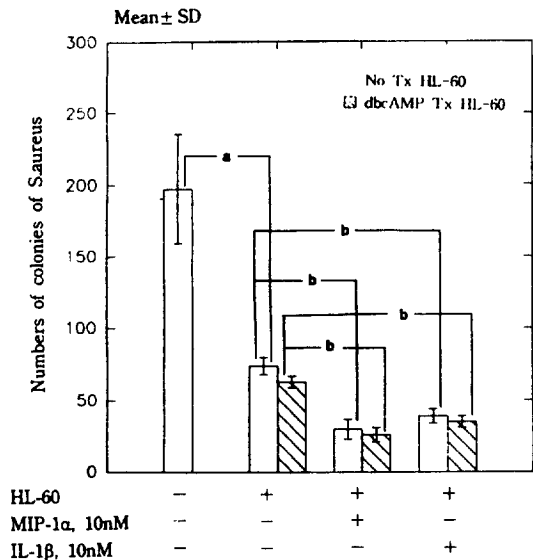


Fig. 5. Enhancing effect of cytokines on the antimicrobial action of dbcAMP-treated or untreated HL-60

a : p < 0.05

b : p < 0.01

기전에 대하여 그동안 많은 연구결과에 의한 정보들이 있지만, 조직파괴의 pathway를 분자 수준에서 규명하기 위한 연구는 아직 초보적 단계에 불과하다. 염증과 조직파괴가 있는 장소에서 세포들은 cytokine 및 관련분자들을 통하여 specific receptor로 서로 교류(communiation)하는데, 이러한 세포간의 교류는 매우

복잡한 양상을 띄며 또한 알려진 부분이 많지 않다. mediator 분자들은 서로 여러 작용을 공통적으로 공유하는데, 세포내에서 constitutive하게 생산되거나 저장되어있는 대신, LPS와 같은 bacterial substance를 포함하여 여러 가지 specific inducer들에 의해 유전자들이 활성화됨으로써 생산된다. 특히 cytokine들의 작용은 매우 근접되어 있는 영역에 국한되며, 그들의 반감기도 매우 짧다. 일반적으로 한 cytokine 및 그 활성을 upregulation 시키는 자극은 또 한편으로는 동일 활성을 downregulation 시키는 인자들의 생산을 유도함으로써, 어떤 event의 치밀한 control과 regulation이 일어난다고 볼 수 있다. 치주질환에서 active하게 조직파괴가 있는 부위에서 IL-1 $\beta$ 와 같은 cytokine의 농도가 높게 나타난 것은 이 cytokine이 다른 염증성 mediator들과 함께 활동적 치주염에서 조직파괴에 중심적 역할을 한다는 것을 증명하는 사실이다<sup>8)</sup>. 특히 IL-1 $\beta$ 의 기염증성 작용외에도, neutrophil과 monocyte의 endothelial cell에 대한 부착도 IL-1 $\beta$ 가 증가시킨다고 하여<sup>45,46)</sup> 염증부위로 세포의 recruitment에도 IL-1 $\beta$ 가 관여한다는 것이 알려져 있다. 치주염의 활동적 병소에 neutrophil이나 monocyte에서 유래한 macrophage가 다량 모인다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다<sup>47)</sup>. IL-1 $\beta$ 는 치은섬유아세포와 macrophage로부터 PGE2의 생산을 유도하며<sup>48)</sup>, 이 PGE2는 염증 매개체 역할을 할 뿐만 아니라<sup>49,50)</sup> 골흡수를 일으키는 강력한 매개체이기도 하다<sup>51)</sup>. 또한 IL-1 $\beta$ 는 그자체가 PTH, PGE2 및 TNF- $\alpha$ 에 비하여 10배이상 강력한 in vitro 골흡수능을 지니며, 이들 물질과 골흡수에 있어 synergism 관계를 지니기도 한다<sup>5,6)</sup>. 최근에는 rheumatoid arthritis 환자의 혈청에서 IL-1을 neutralize 시킬 수 있는 autoantibody가 검출되기도 하여<sup>52)</sup>, 만성 염증반응에서 IL-1에 대한 항체가 일종의 regulatory factor로 작용할지도 모른다는 추측을 가능케하였다. IL-1 $\beta$ 의 PMN에 대한 영향으로는, IL-1 $\beta$ 가 endothelial cell에 작용하여 PMN의 혈관 부착을 도모하여<sup>45,46)</sup> 염증부위로 이들 세포들이 모여들게하고, PMN의 degra-

nulation 및 superoxide 생산을 증진시킨다는 것등이 있다<sup>53)</sup>. 이렇듯 IL-1 $\beta$ 가 치주질환 pathogenesis에 중요한 cytokine일 것이라는 evidence는 많으나 MIP-1 $\alpha$ 의 역할에 대하여는 그동안 알려진 바 없다. 본 실험의 결과 PMN의 항균작용에 대한 항진효과에 있어 IL-1 $\beta$ 를 증가하는 영향을 주는 것으로 보아, 치주질환의 진행양상에 MIP-1 $\alpha$ 라는 새로운 cytokine이 그동안 알려졌던 그 어느 cytokine보다 큰 영향을 미칠 가능성이 있을 것으로 예측된다.

급성염증질환은 보호적인 형태로 숙주반응이 나타나지만, 만성질환에서는 보호적인 것보다 파괴적인 쪽의 숙주반응 기전을 활성화시키는 양상으로 pathogenesis가 나타나기 일쑤이다. 치주염과 같은 치주질환에서는 이러한 급성과 만성에 두가지 양상이 복합적으로 존재하여 각각이 중요한 역할을 담당하므로 치주염의 예방과 치료는 미묘한 숙주반응기전을 좀 더 자세히 이해하여야만 가능하다<sup>31)</sup>. PMN, macrophage, lymphocyte등의 여러 면역세포들은 여러단계의 염증과정에서 각기 독립적 및 상호 복잡한 관계를 가지면서 숙주반응을 매개하므로, 앞에서 열거된 PMN의 기능적 변화와 이러한 cytokine 발현과 상관관계를 밝히는 작업이 이루어짐으로써 PMN 기능저하로 인한 여러 질병 상태를 원천적으로 치유하기 위한 분자생물학적 응용이 가능하다고 사료된다. 아울러 분화된 HL-60 cell을 사용함으로써 PMN보다 표준화된 조건으로 다양한 생물학적 활성검사를 시행할 수 있을 것이라는 결론을 본 실험을 통해 얻음으로써, 앞으로 치주질환에서의 PMN의 역할 및 cytokine에 의한 이들 세포 및 치주질환에서의 면역병리학적 관계를 규명하는데 HL-60 cell이 크게 이용될 수 있으리라 본다.

#### IV. 결 론

Polymorphonuclear leukocyte(PMN)은 치주질환에서 가장 중요한 보호적 방어세포로서, 그 기능이 질환의 진행양상에 큰 영향을 미친다. PMN은 IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6와 같은 cytokine들에 의하여 질환부위에서의 생



물학적 활성변화를 나타낸다.

HL-60 cell은 사람의 promyelocytic cell line으로서 TPA로 처리하면 monocyte/macrophage로 분화되며, dbcAMP로 처리하면 PMN과 유사한 세포로 분화된다. 이 세포는 말초혈액 PMN에 대한 생물학적 활성검사시, 흔히 문제가 되는 PMN 세포의 단명성과 heterogeneity를 해결할 수 있으므로, PMN대신 HL-60 cell을 PMN에 대한 cytokine의 기능검사에 대신 이용할 수 있는지 여부를 가리기 위하여, MIP-1 $\alpha$  수용체분석 및 *S. aureus*에 대한 항균효과를 시행하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 말초혈액 PMN과 dbcAMP 처리된 HL-60에서 모두 MIP-1 $\alpha$ 의 수용체가 확인되었으나, 방사능표지된 MIP-1 $\alpha$ 의 세포결합정도에 있어 dbcAMP 처리된 HL-60가 더 높았다.
2. PMN-like HL-60(dbcAMP 처리)와 macrophage/monocyte-like HL-60 (TPA 처리) 모두에서 미분화된 HL-60의 항균작용이 현저히 증가되었으나, PMN-like HL-60가 더욱 큰 항균작용 증진효과를 나타내었다.
3. MIP-1 $\alpha$ 는 분화 및 미분화된 HL-60 모두의 항균작용을 크게 증가시켰으나 IL-1 $\beta$ 의 경우, 미분화세포 및 PMN-like HL-60에서만 통계적으로 유의한 항균작용 상승효과를 보였다.

이상의 결과에서, HL-60 cell은 cytokine 수용체의 존재와 기능의 유사성으로 인하여, 말초혈액 PMN을 대신하여 cytokine의 생물학적 활성검사에 부분적으로 이용할 수 있다고 사료된다.

#### 참고문헌

1. Marucha, P., Zeff, R., and Kreutzer, D. : Regulation of IL-1 $\beta$  gene expression in human peripheral blood PMN. *J. Periodontal Res.* 26 : 264, 1991.
2. Mason, M.J., and Van Epps, D.E. : In vitro

migration in response to interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Leuk. Biol.* 45 : 62, 1989.

3. Ferrante, A., Nandoskar, M., Walz, A., Goh, D., and Kowanko, I.C. : Effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 86 : 82, 1988.
4. Dewhirst, F.E., Stashenko, P., Mole, J.E., and Tsurumachi, T. : Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor : Identity with interleukin 1 $\beta$ . *J. Immunol.* 135 : 2562, 1985.
5. 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.
6. 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.
7. Jandinski, J.J., Rynar, J.E., Steinle, M., Leung, C.E., Deasey, M.J., and Stashenko, P. : Localization of interleukin-1 and tumor necrosis factor- in human gingiva. *J. Dent. Res.* 68(Special Issue) abstract #526, 1989.
8. Masada, M.P., Persson, R., Kenny, J.S., Lee, S.W., Page, R.C., and Allison, A.C. : Measurement of interleukin-1 $\alpha$  and -1 $\beta$  in gingival crevicular fluid : implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont Res.* 25 : 156, 1990.
9. Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M.S., Prostack, 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.

10. 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.
11. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., 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.
12. 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.
13. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R. E., and Gallo, R.C. : Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemic cells(HL-60) after induction of differentiation by dimethyl sulfoxide. *J. Exp. Med.* 149 : 969, 1979.
14. Niedel, J.E., Kahane, I., Lachman, L., and Cuatrecasas, P. : A sub-population of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) display the formyl peptide chemotactic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 1000, 1980.
15. 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.
16. Chaplinski, T.J., and Niedel, J.E. : Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 70 : 953, 1982.
17. 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.
18. Wolpe, S. D., 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.
19. 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.
20. 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 $\alpha$ . *J. Immunol.* 147 : 2978, 1991.
21. 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.
22. 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 $\alpha$  and -1 $\beta$ . *J. oral Biol.* 17(2) : 93, 1993.
23. Fahey III, T.J., Tracey, K.J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L.S., Jones, W.G., Shires, G.T., Cerami, A., and Sherry, B. : Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J. Immunol.* 148 : 2764, 1992.
24. Dunlop, D.J., Wright, E.G., Lorimore, S., Graham, G.J., Holyoake, T., Kerr, D.J., Wolpe, S.D., and Pragnell, I.G. : Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of SCI/rhMIP-1 $\alpha$  *in vivo*.

- Blood 79 : 2221, 1992.
25. Graham, G.J., Wright, E.G., Hewick, R., Wolpe, S.D., Wilkie, N.M., Donaldson, D., Lorimore, S., and Pragnell, I.B. : Identification and characterization of an inhibitor of haematopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344 : 442, 1990.
  26. Broxmeyer, H.E., Sherry, B., Cooper, S., Ruscetti, F.W., Williams, D.E., Arosio, P., Kwon, B.S., and Cerami, A. : Macrophage inflammatory protein(MIP)-1 $\alpha$  abrogates the capacity of MIP-1 $\alpha$  to suppress myeloid progenitor cell growth. *J. Immunol.* 147 : 2586, 1991.
  27. Broxmeyer, H.E., Sherry, B., Lu, L., Cooper, S., Oh, K.O., Tekamp-Olson, P., Kwon, B.S., and Cerami, A. : Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 76 : 1110, 1990.
  28. Taub, D., Colon, K., Lyoyd, A.R., Oppenheim, J.J., and Kelvin, D.J. : Preferential migration of activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in response to MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$ . *Science* 260 : 355, 1993.
  29. 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.
  30. Wolpe, S.D. and Cerami, A. : Macrophage inflammatory proteins 1 and 2 : members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 3 : 2565, 1989.
  31. Kim, P.W., Lim, J.D., Lee, S.H., Oh, K.O., and Kim, H.S. : Effect of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  on the antimicrobial action of polymorphonuclear leukocytes. *J. Oral Biol.* 17(2) : 113, 1993.
  32. 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.
  33. Genco, R.J., and Slops, J. : Host responses in periodontal diseases. *J. Dent. Res.* 163 : 441, 1984.
  34. Van Dyke, T.E., and Hoop, G.A. : Neutrophil function in oral diseases. *J. Dent. Res.* 63 : 441, 1984.
  35. Wilson, M.E., and Genco, R.J. : The role of antibody, complement and neutrophils in host defense against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Immunol. Invest.* 18 : 187, 1989.
  36. Genco, R.J., Van Dyke, T.E., Lavine, M.J., Nelson, R.D., and Wilson, M.E. : Molecular factors influencing neutrophil defects in periodontal disease. *J. Dent. Res.* 65 : 1379, 1986.
  37. Genco, R.J. : Host responses in periodontal diseases : Current concepts. *J. Periodontol.* 63 : 338, 1992.
  38. Kalmar, J.R., Arnold, R.R., and Van Dyke, T.E. : Direct interaction of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with normal and defective LJP neutrophils. *J. Periodont. Res.* 22 : 179, 1987.
  39. Cianciola, L.J., Genco, R.J., Patters, M.R., McKenna, J., and Van Oss, J. : Defective polymorphonuclear leukocyte function in human periodontal disease. *Nature* 265 : 445, 1977.
  40. Clark, R.A., Page, R.D., and Wilde, G. : Defective neutrophil chemotaxis in juvenile periodontitis. *Infect. Immun.* 18 : 694, 1977.
  41. Lavine, W.S., Maderazo, E.G., Stolman, J., et al : Impaired neutrophil chemotaxis in

- patients with juvenile and rapidly progressing periodontitis. *J. Periodont. Res.* 14 : 10, 1979.
42. Van Dyke, T.E., Wilson-Burroughs, C., Offenbacher, S., and Henson, P. : Association of an abnormality of neutrophil chemotaxis in human periodontal disease with a cell surface protein. *Infect. Immune.* 55 : 2262, 1987.
  43. Culp, K., Offenbacher, S., and Van Dyke, T.E. : Reduced protein kinase C(PKC) in LJP neutrophils. *J. Dent. Res.* 68(Spec. Issue) : 240(Abst. 468), 1989.
  44. So, S.Y., Song, I.T., Kim, J.H., Yu, K.R., Oh, H.J., Kim, H.S., and Oh, K.O. : Interleukin-1 $\beta$  gene expression in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Dent. Sci. Chonbuk. Nat'l. Univ.* 10 : 31, 1992.
  45. Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A.Jr. : Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 9238, 1987.
  46. Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Wheeler, M.E., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A.Jr. : Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J. Clin. Invest.* 76 : 2003, 1985.
  47. Page, R.C., and Schroeder, H.E. : Discussion. In : *Periodontitis in man and other animals.* Basel : S. Karger, 222-279, 1982.
  48. Richards, D., and Rutherford, R.B. : 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.
  49. Allison, A.C. : Role of macrophage activation in the pathogenesis of chronic inflammation and its pharmacological control. In : *Advances in inflammation research*, Otterness, I., Capetola, R., Wong, S., eds., Raven Press. New York, 201-221, 1984.
  50. Belch, J. : The role of eicosanoids in inflammation. In : *Immunopathogenetic mechanisms of arthritis.* Goodacre, J., Dick, W.C., eds., MTP Press, Boston, 26-50, 1988.
  51. Klein, D.C., and Raisz, L.G. : *Prostaglandin-research*, Otterness, I., Capetola, R., Wong, S., eds., Raven Press. New York, 201-221, 1984.
  50. Belch, J. : The role of eicosanoids in inflammation. In : *Immunopathogenetic mechanisms of arthritis.* Goodacre, J., Dick, W.C., eds., MTP Press, Boston, 26-50, 1988.
  51. Klein, D.C., and Raisz, L.G. : Prostaglandins : Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86 : 1436, 1970.
  52. Suzuki, H., Kamimura, J., Ayabe, T., and Kashiwagi, H. : Demonstration of neutralizing autoantibodies against IL-1 $\alpha$  in sera from patients with rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 145 : 2140, 1990.
  53. Dinarello, C.A. : Interleukin-1 and its biologically-related cytokines. *Advances in Immunology* 44 : 153, 1989.

## EFFECTS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE ON THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF PROMYELOCYTIC CELL LINE HL-60

In-Kyu Lee<sup>1</sup>, Kwi-Ok Oh<sup>2</sup>, Hyung-Seop Kim<sup>1</sup>

*Dept. of Periodontology<sup>1</sup>, Dept. of Pharmacology<sup>2</sup>, College of Dentistry,  
Chonbuk National University*

Human polymorphonuclear leukocytes (PMN) constitute a first line of defense against all forms of injury and microbial challenge, which share a common cell lineage with macrophage. Microbial component LPS activates macrophages to produce IL-1, MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6, etc. Those cytokines have autocrine function to the macrophages, and paracrine function to other cell such as PMN and affect them to produce some biological functions. Having a responsive homogeneous cell line, HL-60, offers us the possibility of studying extensively on the function of PMN, which were not possible previously with peripheral PMN, due to the short-lived nature and difficulty of getting a purified PMN.

In the present study, I performed MIP-1 receptor binding assay using HL-60 cell and human peripheral PMN. Also, *in vitro* antimicrobial assay was performed using differentiated or undifferentiated HL-60 cell. Differentiation was induced by treatment with 500 M of N<sup>6</sup>,O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3'5' cyclic monophosphate (dbcAMP) (PMN-like cell), or 20ng/ml of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (macrophage/monocyte-like cell).

Receptors for MIP-1 $\alpha$  were identified on dbcAMP-treated HL-60 as well as peripheral PMN. However, bound radioactive MIP-1 $\alpha$  on differentiated HL-60 was much higher than that of peripheral PMN, which suggest receptor number of differentiated HL-60 cell is higher than that of peripheral PMN. Although both of TPA and dbcAMP treatment significantly enhanced antimicrobial action of HL-60 cell, dbcAMP-treated cell (PMN-like HL-60) killed *S.aureus* more effectively in this experiment. TPA or dbcAMP treatment significantly enhanced antimicrobial action of undifferentiated HL-60 cell. MIP-1 $\alpha$  further increased enhancing effect of TPA or dbcAMP. IL-1 $\alpha$ , however, increased only dbcAMP-induced enhancing effect of antimicrobial action of HL-60 cell. These results suggest that differentiated HL-60 cell could replace peripheral PMN in analysis of various biological functions of cytokines on PMN cell.