

## 면역세포 활성화에 대한 Substance P의 영향

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

전북대학교 치과대학 치주과학교실<sup>1</sup>

전북대학교 치과대학 약리학교실<sup>2</sup>

### I. 서 론

Substance P(SP)는 mammalian tachykinin family에 속하는 11개의 아미노산으로 이루어진 peptide로서 중추 및 말초 신경계에 널리 분포되어 있으며, 손상성 자극이 있을 때 지각신경으로부터 유리되어 나온다<sup>1-5)</sup>.

지각신경외에도 eosinophil, endothelial cell 및 macrophage와 같은 non-neuronal cell도 SP를 생산한다고 보고되었다<sup>6-8)</sup>. SP와 같은 neuropeptide가 신경계와 면역계를 연결시키는 역할을 하며, lymphoid organ에 peptidergic innervation이 되어 있어 지각신경말단과 면역세포들간에 위치적으로 밀접한 관계를 유지하는 것으로 알려져 왔다<sup>9-16)</sup>. 따라서 lymphoid population을 다량 포함하고 있는 조직-소화기, 호흡기, 및 비뇨기관-들이 이러한 면역조절 pathway의 가장 적당한 장소로서 여겨졌다. 선택적으로 peptide가 유리됨으로써, 지각신경계에 의한 면역조절기전이 지니게되는 장점으로는 첫째, 신경자극을 포함하여 면역반응의 inductive events양상을 확장할 수 있다는 점, 둘째, 일정한 mucosal site에

서의 자극이 넓은 부위에 걸쳐 면역반응을 유발할 수 있다는 점, 셋째, 면역반응을 여러 가지 방법으로(임파구 이동양상, Ig 합성, 면역매개체의 유리 등) 미세하게 조절할 수 있다는 점 등을 들 수 있다. 또한 neuropeptides에 의한 조절 기전은 mucosa-bearing organ이 가지는 독특한 구조 - 즉 lumen내의 immunogenic 또는 mitogenic substance가 lamina propria내의 임파구와 매우 근접하게 위치한다는 것 - 에 대한 적응현상의 하나로 볼 수 있다<sup>17)</sup>.

최근에 주요 organ system, 특히 소화기계의 점막에 존재하는 B, T임파구의 기능조절에 neural input이 중요한 역할을 하리라는 것을 뒷받침하는 여러 보고가 있었다<sup>18-21)</sup>. 즉, 항원에 의하여 활성화된 T 임파구<sup>22)</sup>와 mitogen에 의하여 활성화된 T 임파구로부터 SP가 IL-2 유리를 증가시키며, 이것은 T 임파구 성장과 무관한 기능항진을 뜻한다고 보고되었다<sup>22)</sup>. 또한 수용체 결합분석에 의하여 T, B 임파구 및 macrophage에 SP의 수용체가 있음이 밝혀졌다<sup>23-28)</sup>. 뿐만아니라 SP는 T 임파구의 성장<sup>19, 29)</sup>, Ig의 합성<sup>21, 30-33)</sup>, 임파구 traffic<sup>34)</sup>,

macrophage의 활성화<sup>8, 28, 35</sup>), mast cell 탈과립, histamine 유리 및 mast cell-dependent granulocyte 침윤<sup>36~38</sup>)과 같은 다양한 종류의 면역 반응을 조절하는 것으로 알려졌다.

SP는 여러 종류의 세포에서 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IFN- $\gamma$ 와 같은 cytokine의 발현에 영향을 주며<sup>39~43</sup>), IL-3와 GM-CSF induction을 통해 in vitro 조혈 촉진작용을 지니고 있다고 Rameshwar<sup>44</sup>) 등은 보고하였다.

또한 rheumatoid arthritis와 같은 만성 염증 질환에서 SP가 pathogenesis에 중요한 역할을 하리라는 보고가 여럿 있었다. 즉 흰 쥐에서 실험적으로 일으킨 관절염을 SP가 더 악화시켰으며<sup>45</sup>), macrophage를 활성화시켜 prostaglandin과 다른 염증성 mediator 및 IL-1 유리를 촉진시켰고<sup>26, 39, 46</sup>), synovioocyte에서 PGE<sub>2</sub>와 collagenase생산을 증가시켰다고 Lotz<sup>47</sup>) 등은 보고하였다.

여러 가지 pathogenesis 및 질병의 진행상황에 있어 치주염은 rheumatoid arthritis와 유사한 점이 많으며, 치주염의 진단, 치료 및 예후를 정확하게 할 수 있는 방법이 아직은 개발되어있지 않다.

SP의 면역 및 염증 조절 기능을 파악하여 이를 치주염 원인 규명과 질병퇴치에 이용할 가능성이 매우 높으나 아직까지 이 방면에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

또한 구강내에는 면역 및 염증세포를 자극하는 항원 및 mitogen들이 항상 존재하는 장소이므로 SP와 이들 mitogen들이 면역세포에 동시에 어떠한 영향을 미치는 지를 밝히는 것도 중요한 과제의 하나로 사료된다. 본 연구실에서는 macrophage, mast cell, granulocyte 및 macrophage로 분화된 promyelocytic cell을 이용하여 세포의 항균작용, cytokine 합성 및 탈과립등에 대한 SP의 작용, 다른 mitogen과의 interaction을 포함하여 다양하게 분석함으로써, SP의 면역조절 기전을 밝히고 치주질환의 치료에 응용코자

본 실험에 임하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 세포배양

Human promyelocytic cell line인 HL-60은 10%의 fetal calf serum(FCS, Hyclone), 100U/ml의 penicillin 및 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin이 포함된 RPMI1640(Gibco) medium에서 5%의 CO<sub>2</sub>와 100% 습도의 조건으로 37°C에서 배양하였다. Mouse macrophage cell line인 RAW264.7은 위와 동일 조건의 FCS과 항생제가 포함된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco)에서 역시 위와 동일한 조건으로 배양하였다.

### 2. Antimicrobial assay

#### ① HL-60 cell의 분화유도

사람의 promyelocytic cell line인 HL-60 cell을 500 $\mu$ M의 N<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3'5' cyclic monophosphate(dibutyl cAMP, Sigma)가 포함된 배양액에서 초기 세포종도 2 $\times$ 10<sup>5</sup>cell/ml로 3일간 배양하여, granulocyte와 유사한 기능을 갖는 세포로 분화시켰다. 한편, 20ng/ml의 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)로 3일간 배양하여 macrophage와 유사한 세포로 분화시켰다<sup>48</sup>).

#### ② Antimicrobial assay

분화된 또는 미분화된 HL-60 cell을 항생제가 포함되지 않은 배양액에서 SP 30nM로 24시간 자극한 후, Staphylococcus aureus와 세포수 1:1로 혼합하여 37°C에서 2시간 rotation시키면서 반응시켰다.

반응물을 bovine serum albumin 0.01% 수용액으로 1:10,000 희석하여 100 $\mu$ l의 희석액을 BHI agar plate로 plating하였다. 37°C로

overnight 배양 후 colony 수를 측정하였고, 모든 실험은 triplate으로 하였다.

### 3. Mast cell 탈과립

#### ① 복강 mast cell의 분리

복강 mast cell의 분리는 Cochrane과 Douglas<sup>49)</sup>의 방법을 응용하여 시행하였다. Sprague-Dewley계 흰쥐를 에테르로 마취시킨 후 약 20ml의 Ca-Locke 용액(150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mg/ml glucose, 1mg/ml bovine serum albumin, 1mg/ml heparin)을 복강내에 주입하고 90초간 복벽을 가볍게 마사지한 후, 복벽을 절개하고 복강 세척액을 채취하였다. 채취한 복강액을 400g로 5분간 원심시킨 후 상층 부유액을 버리고 Ca-Locke 용액으로 재부유시켰다. 원심분리용 시험관에 등장성 Percoll 용액(10X Hank 용액 1ml+Percoll 9ml) 3.5 ml를 넣은 후 재부유된 mast cell 부유액 0.75ml를 조심스럽게 올려놓고 Hank 용액 0.5ml를 상층에 채우고 10분간 정치시킨다. 그런 다음 125xg로 15분간 원심분리시킨 후 상층액 2ml를 피펫으로 제거한 다음 Ca-Locke 용액으로 2번 세척 후 4×10<sup>5</sup> cells/ml 농도의 mast cell 부유액을 만들었다.

#### ② 도립현미경상에서의 mast cell의 관찰

Substance P와 MIP-1 $\alpha$ 가 각각 mast cell을 탈과립시키는지를 관찰하기 위하여는 재부유시킨 mast cell 부유액 100 $\mu$ l를 도립현미경 chamber에 넣고 세포들이 침전되도록 10분간 정치한 후 Ca-Locke 용액 50 $\mu$ l를 mast cell 부유액에 첨가하고, 여러 농도의 Substance P(4×10<sup>-5</sup>M/ml, 4×10<sup>-6</sup>M/ml, 4×10<sup>-7</sup>M/ml)와 MIP-1 $\alpha$ (10ng/ml, 1ng/ml)를 각각 50 $\mu$ l씩 첨가하여 농도별 효과를 관찰하였다. 또한 Substance P와 MIP-1 $\alpha$ 의 mast cell에 대한 상호작용을 관찰하기 위하여는 Substance P(4×

10<sup>-6</sup>M/ml, 4×10<sup>-7</sup>M/ml) 50 $\mu$ l를 mast cell 부유액에 첨가하고 5분후에 MIP-1 $\alpha$ (10ng/ml, 1ng/ml) 50 $\mu$ l를 첨가한 다음 그 효과를 관찰하였다. 도립현미경은 Olympus IMT-2를 사용하였고, mast cell의 형태 변화 여부는 450배로 관찰하였다.

### 4. Immunoblot 분석

RAW264.7 cell을 LPS 1 $\mu$ g/ml과 SP 30nM, LPS + SP등의 대조군으로 나누어 FBS가 들어있지 않은 상태의 DMEM media에서 군당 10<sup>6</sup>cells/ml씩 24시간 자극한 후, 원심분리를 하여 순수 supernatant만을 얻었다. 10% TCA (Trichloroacetic acid)를 사용하여 이미 얻은 supernatant를 농축시켰다. 20% acrylamide/ Bis(30:0.8) gel을 사용하여 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 하였다.

이 gel을 TBS(Tris-Buffered Saline)로 세차례 세척한 후, nitrocellulose membrane에 western blotting한 다음 membrane을 TBS에 세척하였다. 세척한 membrane을 blocking soln.(5% Nonfat dry milk, 0.2% Tween 20, 0.02% Sodium azide in TBS)에 넣고 실온에서 2시간 배양하였다. 이후 TBS로 두 차례 철저히 세척한 후 rabbit anti-IL-1 $\beta$  Ab를 희석한 용액에 membrane을 넣고 실온에서 2시간 배양하였고, TBS로 세척한 후 anti-rabbit Ig-Alkaline phosphatase conjugate(Bio-Rad)를 희석한 용액에 membrane을 실온에서 1시간 30분 동안 배양하였다.

TBS로 세척 후, alkaline phosphatase의 substrate로 작용하는 BCIP/NBT (Bromochloroindolyl phosphate/nitroblue tetrazolium) soln.에 membrane을 넣고 band가 보일 때까지 실온에서 배양하였고, 이 반응을 종료시키기 위하여 20mM EDTA soln.에 membrane을 넣었다.

### III. 결 과

표 1은 미분화된 HL-60 세포의 항균작용에 미치는 SP의 영향을 관찰한 것으로서, HL-60의 첨가로 *S. aureus*의 세균수가  $3682 \pm 442$ 에서  $1324 \pm 168$ 로 크게 감소하여, HL-60이 확실한 항균작용을 지니고 있음을 나타내었으나, SP 30nM로 HL-60를 처리하였을 경우, 혹은 LPS와 함께 SP를 처리하였을 경우, 더이상의 통계적으로 유의한 항균작용 증가는 나타나지 않았다.

표 2는 TPA로 HL-60를 3일간 처리하여 macrophage/monocyte의 기능을 가진 세포로 분화시켰을 경우, 이에 대한 SP의 작용을 관찰한 것이다. 분화된 HL-60가 TPA처리 하지 않은 대조군에 비하여  $1324 \pm 168$ 에서  $697 \pm 67$ 로 현저한 항균작용의 상승을 나타내었다. 또한 SP 30nM로 HL-60를 자극하였을 경우  $392 \pm 50$ 의 세균수를 나타내어 자극하지 않은 경우보다 통계적으로 유의한 항균작용의 증가를 나타내었으며 LPS와 SP를 동시 작용하였을 경우에는 이보다 약간 더 큰 항균작용을 보였으나, synergism의 관계를 보이진 않았다.

표 3는 dbcAMP로 HL-60를 3일간 처리하여 granulocyte의 기능을 가진 세포로 분화시킨

후 항균작용에 대한 SP의 영향을 관찰한 것이다. dbcAMP로 처리하지 않은 세포의 값이  $1324 \pm 168$ 인 것에 비하여 granulocyte로 분화된 세포는  $718 \pm 118$ 로서, 분화된 세포가 역시 현저하게 높은 항균작용을 나타내었다. SP 30nM로 처리한 경우  $474 \pm 73$ 으로서, 통계적으로 유의한 항균작용의 상승을 보였으며, SP와 LPS를 동시에 적용하였을 경우,  $430 \pm 79$ 로서 SP 단독효과와 큰 차이가 없는 항균작용을 나타내었다.

그림 2는 전형적인 mast cell 탈과립 유도물질인 compound 48/80으로 처리하였을 때 mast cell의 형태적 변화를 나타낸 그림으로서, 모든 mast cell이 탈과립현상을 나타냈음을 보여주고 있다.

그림 3는 mast cell 탈과립에 대한 SP의 농도별 효과를 관찰한 것으로서  $10^{-5}M$ 에서는 확실한 탈과립현상이 나타났으나, 그 이하의 농도에서는 눈에 띄는 변화가 없었다.

그림 4는 MIP-1 $\alpha$ 와 SP가 동시 적용되었을 때의 mast cell 탈과립 현상을 관찰한 것이다. MIP-1 $\alpha$  4 $\mu M$ (E2)적용시 약간의 탈과립 유도 현상이 나타났으나, SP  $10^{-5}M$ 과 MIP-1 $\alpha$  4 $\mu M$  동시적용시(A2), 오히려 SP  $10^{-5}M$ 에 의한 탈과립을 MIP-1 $\alpha$ 가 억제한 듯한 현상을 나타내었다.

표 1. Numbers of colonies of *S. aureus* cultured with undifferentiated HL-60 cell

Stimulant	HL-60	
	-	+
-	$3682 \pm 442$	$1324 \pm 168^a$
SP 30nM	-	$1154 \pm 104^b$
SP 30nM+LPS 1 $\mu g/ml$	-	$1108 \pm 31^b$

n=3 (mean $\pm$ SD)

a : p<0.0001 when compared with non-HL-60 control

b : statistically not significant when compared with non-stimulant control

**II' 2. Numbers of colonies of *S. aureus* cultured with TPA-treated HL-60 cell which is differentiated into macrophage/monocyte**

Stimulant	TPA treatment of HL-60	
	-	-
-	1324±168	697±67 <sup>a</sup>
SP 30nM	-	392±50 <sup>b</sup>
SP 30nM+LPS 1µg/ml	-	309±12 <sup>b</sup>

n=3 (mean±SD)

a : p<0.01 when compared with undifferentiated HL-60 control

b : p<0.01 when compared with non-stimulant control

**II 3. Numbers of colonies of *S. aureus* cultured with dbcAMP-treatment HL-60 cell which is differentiated into granulocyte**

Stimulant	dbcAMP treatment of HL-60	
	-	+
-	1324±168	718±118 <sup>a</sup>
SP 30nM	-	474±73 <sup>b</sup>
SP 30nM+LPS 1µg/ml	-	430±79 <sup>b</sup>

n=3 (mean±SD)

a : p<0.01 when compared with undifferentiated HL-60 control

b : p<0.01 when compared with non-stimulant control

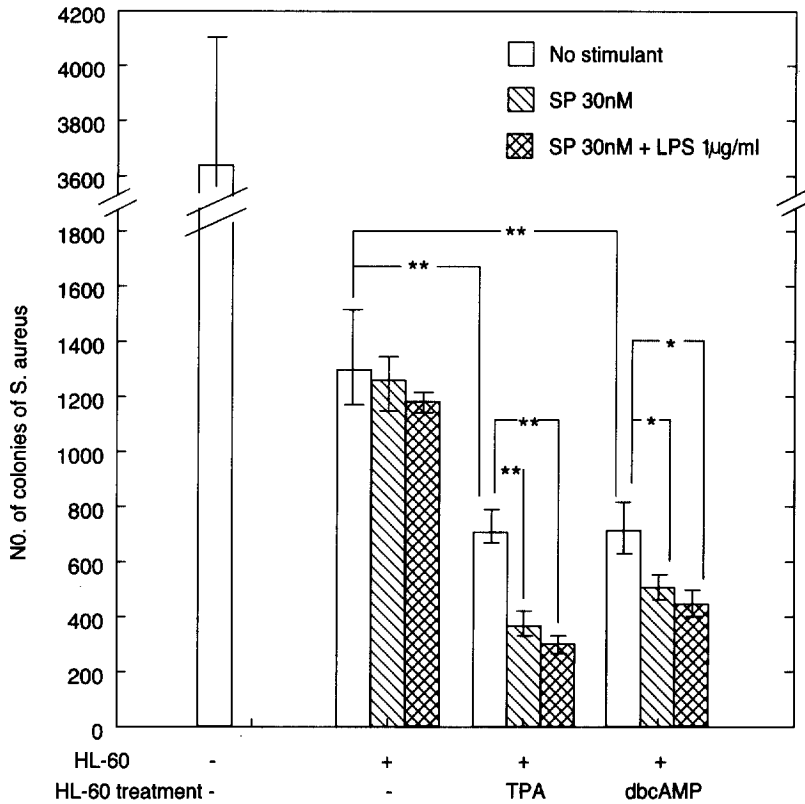


그림. 1. Enhancing effect of substance P on antimicrobial action of undifferentiated or differentiated HL-60 cell

\* :  $p < 0.05$

\*\* :  $p < 0.01$

A1 : Ca-Locke control

A2 : compound 48/80 2.5µg/ml

그림 2. Compound 48/80 - induced mast cell degranulation

A1 : Ca-Locke control

A2 : SP  $10^{-5}$ M

B1 : Ca-Locke control

B2 : SP  $10^{-6}$ M

C1 : Ca-Locke control

C2 : SP  $10^{-7}$ M

그림 3. Effects of substance P(SP) on the mast cell degranulation

A1 : Ca-Locke control

A2 : SP  $10^{-5}$ M + MIP-1 $\alpha$  4  $\mu$ M

B1 : Ca-Locke control

B2 : SP  $10^{-6}$ M + MIP-1 $\alpha$  0.4  $\mu$ M

C1 : Ca-Locke control

C2 : SP  $10^{-7}$ M + MIP-1 $\alpha$  0.4  $\mu$ M



D1 : Ca-Locke control

D2 : SP  $10^{-7}$ M + MIP-1 $\alpha$  4  $\mu$ M

E1 : Ca-Locke control

E2 : MIP-1 $\alpha$  4  $\mu$ M

F1 : Ca-Locke control

F2 : MIP-1 $\alpha$  0.4  $\mu$ M

그림 4. Effects of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ ) the substance P-induced change in mast cell degranulation

A1 : Ca-Locke control

A2 : SP  $10^{-7}$ M + CGRP  $2.5 \times 10^{-6}$ M

B1 : Ca-Locke control

B2 : SP  $10^{-6}$ M + CGRP  $2.5 \times 10^{-6}$ M

C1 : Ca-Locke control

C2 : CGRP  $2.5 \times 10^{-6}$ M

그림 5. Effects of calcitonin gene-related peptide(CGRP) on the substance P-induced change in mast cell degranulation

그림 6. Immunostaining of RAW 264.7 culture supernatant with anti-IL-1 $\beta$  antibody

1. control
2. LPS 1 $\mu$ g/ml
3. SP 30nM
4. LPS 1 $\mu$ g/ml + SP 30nM

그림 5는 SP와 동일한 신경에서 흔히 존재하며, 동시에 유리되어 작용하는 CGRP와 SP의 mast cell 탈과립에 대한 동시작용을 관찰한 그림이다. 본실험의 조건에서는 두 peptide 사이에 탈과립 유도에 대한 상승작용을 관찰할 수 없었다.

그림 6는 macrophage cell line인 RAW264.7 세포를 SP 혹은 LPS로 자극하여, 배양상청액으로 유리되어 나온 IL-1 $\beta$ 를 western blot으로 분석한 것이다. LPS로 자극시 IL-1 $\beta$ 의 생산이 유도되었으나, SP는 단독 및 LPS와 동시 적용시 모두 IL-1 $\beta$ 의 발현이 유도되지 않았다.

#### IV. 고 찰

SP는 von Euler와 Gaddum<sup>50)</sup>에 의하여 약 60년 전 처음으로 알려진 peptide로서, 중추 및 말초신경계에 널리 분포되어 있으며, 주로 nociception에 관계된 지각신경에서 신경전달물질로 작용하는 것으로 알려져 왔다<sup>1-5)</sup>. 지각신경 외에 eosinophils, endothelial cell 및 macrophages도 SP를 생산한다고 보고되었으며<sup>6)~8)</sup>, SP와 같은 neuropeptides가 면역계와 신경계를 상호 연결시켜주는 역할을 하리라는 것을 뒷받침하는 현상들이 수 차례 관찰되었다. 즉 primary(골수, thymus) 및 secondary lymphoid organs(lymph node, spleen, gut-

associated -lymphoid tissue)에 peptidergic 신경이 와 있어, 면역 및 조혈세포와 지각신경이 위치적으로 긴밀한 관계에 있음이 보고되었다<sup>9-16)</sup>. 이렇듯 lymphoid organ의 미세환경내에 존재하는 면역 및 조혈 세포와 신경섬유 사이의 긴밀한 위치적 관계로 인하여, neuropeptide 또는 신경전달물질이 용이하게 유리되어 나오게 되어, 이들에 대한 특이적 수용체를 발현하는 세포들에 대하여 ligand 작용함으로써 여러 가지 생물학적 반응을 일으키게 된다. macrophage를 비롯하여 여러 subpopulations의 T cells 및 B cell에 SP 수용체가 존재하여<sup>23-28)</sup>, high affinity 수용체인 NK-1 수용체는 현재까지 알려져 있고<sup>1, 51)</sup>, human SP 수용체는 G-protein-coupled receptor family에 속하는 것으로 알려져 있다<sup>52-55)</sup>.

Interleukin(IL)은 면역세포가 유리하는 수용성 산물로서, 각종 면역반응에 대하여 다양한 조절기능을 나타내며, SP와 같은 neuropeptide의 면역 조절 기능도 상당 부분이 이들 IL의 발현에 영향을 미침으로서 매개된다고 볼 수 있다. 이러한 유형의 작용으로서, 여러 종류의 세포에서 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2 및 IFN- $\gamma$ 의 생산을 SP가 촉진시킨다는 보고가 있었다<sup>30-44)</sup>. 또한 SP는 조혈 촉진 효과를 매개한다고 Rameshwar<sup>44)</sup> 등은 보고하였다.

치주질환과 그 pathogenesis에서 매우 유사한

양상을 띠는 rheumatoid arthritis 환자의 synovial cell에서 SP는 PGE<sub>2</sub>와 collagenase의 분비를 촉진한다<sup>47</sup>). 따라서 arthritis의 진행양상에 가장 중요한 cytokine인 IL-1의 분비에도 영향을 주리라고 추측되며, rheumatoid arthritis 환자의 synovial fluid에서 다량의 IL-1이 검출되었다고 Wood<sup>56</sup>) 등과 Nouri<sup>57</sup>) 등은 보고하였다. 또한 정상보다 arthritic joint에서 SP를 함유한 신경섬유가 더욱 고농도로 발견되었고<sup>45</sup>), 실험동물에서도 arthritic joint tissue에서 높은 SP 농도를 보였다고 Levine<sup>45</sup>) 등은 보고하였다. Rheumatoid joint에는 정상 관절보다 더 많은 macrophage가 모여있으며 이들 세포에는 SP 수용체가 존재한다고 알려져 있다<sup>26, 46</sup>).

본 실험에서는 murine macrophage cell line인 RAW264.7을 SP로 자극하였으나 IL-1의 생산은 일어나지 않았고, LPS에 의한 IL-1 생산을 더 증가시키지도 못하였다(그림 6). 이러한 결과는 동일한 SP 농도에서 macrophage cell line P388D1의 IL-1 생산을 증가시킨 Kimball<sup>39</sup>)의 결과와는 매우 다른 것이었다. Macrophage에 대한 SP의 작용이 나타나지 않은 이유는 실험대상세포의 origin이 서로 달랐기 때문으로 추측된다. 사람의 monocyte에서 SP가 IL-1 분비를 증진시켰다고 보고한 Lotz<sup>40</sup>) 등의 결과와 위에서 기술한 Kimball<sup>39</sup>)의 결과는 일치하나, murine schistosomiasis의 splenic macrophage에서는 아무런 작용이 나타나지 않았다고 한 Weinberg의 보고와는 상반된 것이 이러한 가설을 뒷받침한다. 또다른 비슷한 예로서, 사람의 말초 단핵세포와 duodenal mucosa에서 SP가 IFN- $\gamma$  생산을 증진시켰으나<sup>42, 43</sup>), murine spleen cell에서는 효과가 나타나지 않은 것도<sup>44</sup>) cell origin에 따라 서로 다른 결과가 나올 수 있음을 입증한 것이다.

Neuropeptides가 면역 및 염증 반응을 조절하는 데에 관여하는 또다른 하나의 기전은, 많은 종류의 세포(lymphocyte, granulocyte, connective

tissue) 표면에 존재하는 peptidase를 매개로 한 조절이다. 특히 neutral endopeptidase(NEP)는 주로 SP와 enkephalin을 파괴하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>58, 59</sup>). 기관지의 NEP는 virus나 mycoplasma 감염시 매우 유의하게 활성이 감소된다고 하며<sup>60, 61</sup>), glucocorticoid 치료시 기관지 상피세포에서 NEP의 발현이 증가되고<sup>62</sup>), SP 수용체 발현이 downregulation된다고 하였다<sup>63</sup>). 특히 polymorphonuclear cell(PMN)은 세포표면에 다량의 NEP분자를 가지고 있으며<sup>64</sup>), 이 효소가 chemotactic peptide인 fMLP를 파괴하고, NEP inhibitor는 chemotaxis를 증진시킨다고 하였다<sup>64, 65</sup>). 이와 같이 NEP가 염증세포 활성화에 큰 영향을 미치는 사실로부터, NEP의 활성화에 변화를 줄 수 있는 물질은 염증진행을 조절하는데 큰 역할을 할 것으로 추측된다. 또한 SP는 neutrophil chemotaxis, PMN의 lysosomal enzyme 유리, neutrophil 및 macrophage의 phagocytosis를 촉진하는 등, 다양한 염증 항진기능을 나타낸다고 알려져 있다<sup>35, 56</sup>). 본 실험에서는 사람의 promyelocytic cell line인 HL-60 cell을 이용하여 항균작용에 미치는 SP의 효과를 관찰한 결과, 미분화된 상태의 HL-60 cell에는 SP가 특별한 항균작용증진을 보이지 않았으나 분화된 상태의 세포들에서는 현저한 항균작용의 상승을 나타내었다. dbcAMP로 처리하여 PMN으로 분화된 세포에서의 항균작용 상승은, PMN의 chemotaxis, phagocytosis 및 lysosomal enzyme 유리작용등을 항진시켰던 Marasco<sup>66</sup>) 등 및 Bar-Shavit<sup>35</sup>) 등의 결과와 일치하는 것이었고, TPA로 처리하여 monocyte/macrophage로 분화된 HL-60의 항균작용 항진효과는 macrophage의 기염증성 활성 증진효과를 나타내었던 Hartung과 Toyka<sup>46</sup>)의 결과와 일치하는 것이다. 따라서 PMN이나 macrophage와 같은 세포에 작용하여 SP가 염증과정을 modulation 하며, 이들 염증세포가 내는 mediator는 다시 neuron에 작용하여 SP와 같은 peptide의 분비

가 조절되고 세포표면의 NEP활성이 neurogenic inflammation의 양상을 또다시 변화시키는, 매우 복잡한 상호관계로 염증의 진행은 조절된다고 볼 수 있다. 하지만 B cell의 Ig 생산에 SP와 LPS가 synergistic하게 작용하였다고 한 Pascual<sup>32)</sup> 등의 보고와는 일치되지 않는 결과가 본 실험에서 나타났다. 즉 분화된 HL-60의 항원작용 상승에 있어 LPS와 SP사이에는 synergism이 존재하지 않았다. Mitogen 처리에 의하여 SP의 수용체가 증가됨으로써 synergism 현상을 나타내는 예로써, T cell에 대한 PHA와 SP 동시작용과, B cell에 대한 LPS와 SP작용, 그리고 T cell에 대한 conA와 SP의 동시작용을 들 수 있다<sup>32, 44)</sup>. 그러나 anti-CD3 Ab와 동시적용한 SP는 T cell에 대하여 additive effect만 나타내어서 이들 cellular target과 signal transduction에 대한 분자수준의 작용기전이 서로 다르기 때문이라고 추측된다.

Mast cell이 활성화되었음을 나타내는 지표로써 흔히 탈과립과 mediator의 유리현상을 들 수 있다<sup>67)</sup>. SP는 micromole 단위의 농도에서 mast cell 탈과립을 유도하고 histamine을 유리 시킨다고 하며<sup>23, 24)</sup>, 본 실험의 결과에서도  $10^{-5}$ M의 SP만이 뚜렷한 탈과립 현상이 나타났다. 중요한 기염증성 cytokine인 MIP-1 $\alpha$ 는 고농도 단독처리시 약간의 탈과립현상을 나타내었으나, SP와 동시투여시에는 antagonism관계를 보인것이 예상밖의 결과였다. MIP-1 $\alpha$ 와 SP사이의 antagonism은 signal transduction과정에서 second messenger사이의 상호 관련성의 결과일 것으로 사료된다.

최근 Janiszewski<sup>68)</sup> 등의 보고에 의하면 탈과립을 유도치 못하는 picomole 내지 nanomole 단위의 저농도 SP가 mast cell의 outward Cl-current를 유도하여, 세포내 free Ca<sup>2+</sup>을 증가시킴으로써, 다른 additional signal이 존재할 시에 이에 대한 mast cell 활성화를 크게 potentiation 시킨다고 하였다. 즉, mast cell

membrane의 전기적 변화를 일으키는 정도의 낮은 농도 SP는 세포의 반응성을 증가시키는 이른바 'primary' 효과를 부여한다는 것이다. 이러한 priming 현상은 basophil<sup>69, 70)</sup> 및 다른 세포들<sup>71, 72)</sup>에서도 관찰된다. 알려진 priming factor들로서는 IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-5, IL-8 및 insulin-like growth factor I, GM-CSF, TNF- $\alpha$  및 protein kinase C activator등을 들 수 있으며, SP도 또 하나의 priming factor로 여겨진다고 하였다<sup>68)</sup>. 따라서 neuropeptide의 mast cell에 대한 생리학적 기능은 적어도 탈과립의 형태로 즉각적인 활성화를 시키는 것이 아니라 세포반응성의 modulation일 것으로 추정되었다.

한편 본 실험에서는 SP와 흔히 동일 신경섬유에 coexisting 되어있는 것으로 알려진 또 다른 neuropeptide CGRP<sup>73)</sup>와 SP의 동시작용을 관찰한 결과, 눈에 띄는 변화를 관찰하지 못하였다. 그러나 SP와 CGRP, CGRP와 somatostatin, 그리고 SP와 cholecystokinin등이 동일 신경섬유에 동시에 존재하는 경우가 많으며<sup>73~75)</sup>, 이러한 peptide의 colocalization 현상은 각 기관마다 매우 다른 양상을 나타내어<sup>76)</sup>, 면역조절기전의 복잡성을 한층 더하고 있다. 즉 tissue-specific한 염증 및 면역반응현상이 일부나마 이러한 사실로써 설명이 가능해지며, rheumatoid arthritis나 만성치주염 같은 특별한 기관의 만성염증적 질환을 치료하는데 있어 neuropeptidergic 신경의 면역 및 염증 조절기전을 이용하는 방법은, 가까운 장래에 neuroimmunomodulation 연구의 구체적 목적이 되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결론

신경계와 면역계의 상호관계를 매개하는 neuropeptides의 하나인 SP의 면역 및 염증세포에 대한 작용을 관찰함으로써, 치주질환과 같은 만성염증질환의 치료에 응용코저

macrophage, PMN, 및 mast cell등을 이용해서 염증세포의 항균작용, cytokine 유리 및 mast cell 탈과립현상에 대한 SP의 효과를 측정하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 미분화된 promyelocytic cell HL-60의 항균 작용에 대하여 SP는 별 영향이 없었으나, PMN 및 monocyte/macrophage로 분화된 HL-60의 항균효과는 크게 증진시켜서, SP가 이들 염증세포활성 항진효과를 가지고 있음을 나타냈다.
2. 분화된 HL-60의 항균작용에 대한 SP의 증진효과는 LPS에 의하여 더이상 증가하지 않아서, SP에 대한 세포 반응성이 mitogen에 의하여 증가하는 현상이 관찰되지 않았다.
3. Macrophage cell line RAW264.7에 대하여 SP는 IL-1의 유리를 일으키지 못하였으며, LPS에 의한 IL-1 생산도 SP가 더이상 증가시키지 않았다.
4. Mast cell 탈과립은 SP  $10^{-5}$ M에서만 뚜렷하게 나타났고, 그이하의 농도에서는 일어나지 않았다. MIP-1 $\alpha$ 와 SP 동시투여로 탈과립에 대한 약간의 길항작용이 관찰되었으며, CGRP와 SP 동시투여에 의해서는 아무런 변화가 관찰되지 않았다.

이상에서 neuropeptide는 면역세포에 직접적인 활성화와, 간접적인 반응성 촉진의 두 기전을 통하여 작용함으로써, 신경계와 면역계를 상호연결시키는 immunomodulator로서의 역할을 한다는 결론을 얻었다.

### 참고문헌

1. Maggio, J.E. : Tachykinins. Annu. Rev. Neurosci. 11 : 13, 1988.
2. Pernow, B. : Substance P. Pharmacol. Rev. 35 : 85, 1983.
3. Holzer, P. : Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings : involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. Neuroscience 24 : 39, 1988.
4. Lembeck, F., and Holzer, P. : Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. Naunyn-Schmiedebergs Archs. Pharmacol. 310 : 175, 1979.
5. Goetzl, E.J., Adelman, D.C., and Sreedharan, S.P. : Neuroimmunology. Adv. Immunol. 48 : 161, 1990.
6. Weinstock, J.V., Blum, A., Walder, J., and Walder, R. : Eosinophils from granulomas in murine Schistosomiasis mansoni produce substance P. J. Immunol. 141 : 961, 1988.
7. Linnik, D.M., and Moskowitz, A.M. : Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. Peptides 10 : 957, 1989.
8. Pascual, D.W., and Bost, K.L. : Substance P production by P388D1 macrophages : a possible autocrine function for this neuropeptide. Immunology 71 : 52, 1990.
9. Felten, D.L., Felten, S.Y., Carlson, S.L., Oishchowka, J.A., and Livnat, S. : Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. J. Immunol. 135 : 755, 1985.
10. Stead, R.H., Tomioka, M., Quinonez, G., Simon, G.T., Felten, S.Y., and Bienstock, J. L. : Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 2975, 1987.
11. Weihe, E., Muller, S., Fink, T., and Zentel, H.J. : Tachykinins, calcitonin-gene related peptide and neuropeptide Y bi nerves of

- the mammalian thymus : interactions with mast cells in autonomic and sensory neuroimmunomodulation?. *Neurosci. Lett.* 100 : 77, 1989.
12. Weihe, E., Nohr, D., Michel, S., Muller, S., Zentel, H.J., Fink, T., and Krekel, J. : Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Intern. J. Neurosci.* 59 : 1, 1991.
  13. Bellinger, D.L., Lorton, D., Romano, T.D., Oischowka, J.A., Felten, S.Y., and Felten, D.L. : Neuropeptide innervation of lymphoid organs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 254 : 17, 1990.
  14. Fink, T., and Weihe, E. : Multiple neuropeptides in nerves supplying mammalian lymph nodes : messenger candidates for sensory and automatic neuroimmunomodulation ?. *Neurosci. Lett.* 90 : 39, 1988.
  15. Kurkowski, R., Kummer, W., and Heym, C. : Substance P immunoreactive nerve fibers in tracheobronchial lymph nodes of the guinea pig : origin, ultrastructure and coexistence with other peptides. *Peptides.* 11 : 13, 1990.
  16. Zentel, H.J., Nohr, D., Albrecht, R., Jeurissen, S.H.M., Vainio, O., and Weihe, E. : Peptidergic innervation of the bursa fabricii : interrelation with T-lymphocyte subsets. *Int. J. Neurosci.* 59 : 177, 1991.
  17. Roche, J.K. : Immunological mechanisms for chronic inflammatory diseases of mucosa. In *Inflammatory cells and Lung Disease*. W.S. Lynn, ed. CRC Press, New York, pp 63-84, 1983.
  18. Ottaway, C.A., and Greenberg, G.R. : In vitro alteration of receptors for vasoactive intestinal peptide changes the in vivo localization of mouse T cells. *J. Exp. Med.* 160 : 1054, 1984.
  19. Payan, D.G., and Goetzl, E.J. : Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J. Immunol.* 135 : 783, 1985.
  20. Stanis, A.M., Scicahitano, R., Payan, D., and Bienestock, J. : In vitro studies of immunoregulation by substance P and somatostatin. *Ann. NY Acad. Sci.* 496 : 217, 1987a.
  21. Stanis, A.M., Befus, D., and Bienestock, J. : Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocyte from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J. Immunol.* 136 : 152, 1986.
  22. Nio, D.A., Moylan, R.N., and Roche, J.K. : Modulation of T lymphocyte function by neuropeptides. Evidence for their role as local immuno-regulatory elements. *J. Immunol.* 150 : 5281, 1993.
  23. Payan, D.G., Brewster, D.R., and Goetzl, E.J. : Stereospecific receptors for substance P on cultures IM-9 lymphoblasts. *J. Immunol.* 133 : 3260, 1984a.
  24. Payan, D.G., Brewster, D.R., Missirian-Basian, A., and Goetzl, E.J. : Substance P recognition by a subset of human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 14 : 1532, 1984b.
  25. Stanis, A.M., Scicahitano, R., Dazin, P., Bienestock, J., and Payan, D.G. : Distribution of substance P receptors on murine Peyer's patch and plenic T and B lymphocyte. *J. Immunol.* 139 : 749, 1987b.
  26. Hartung, H.-P., Wolters, K., and Toyka, K.V. : Substance P : binding properties and studies on cellular responses in guinea

- pig macrophages. *J. Immunol.* 136 : 3856, 1986.
27. Payan, D.G., McGillis, J.P., and Organist, M.L. : Binding characteristics and affinity labeling of protein constituents of the human IM-9 lymphoblast receptor for substance P. *J. Biol. Chem.* 261 : 14321, 1986.
  28. Bost, K.L. : Hormone and neuropeptide receptors on mononuclear leukocytes. *Prog. Allergy* 43 : 68, 1988.
  29. Payan, D.G., Brewster, D.R., and Goetzl, E.J. : Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J. Immunol.* 131 : 1613, 1983.
  30. Eglezos, A., Andrews, P.V., Boyd, R.L., and Helme, R.D. : Effect of capsaicin treatment on immunoglobulin secretion in the rat : further evidence for involvement of tachykinin-containing afferent nerves. *J. Neuroimmunol.* 26 : 131, 1990.
  31. Laurenzi, M.A., Persson, M.A.A., Dalsgaard, C.J., and Ringden, O. : Stimulation of B lymphocyte differentiation by the neuropeptide substance P and neurokinin A. *Scand. J. Immunol.* 30 : 695, 1989.
  32. Pascual, D.W., Xu-Amano, J., Kiyono, H., McGhee, J.R., and Bost, K.L. : Substance P acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. *J. Immunol.* 146 : 2130, 1991.
  33. Bost, K.L., and Pascual, D.W. : Substance P : a late-acting B lymphocyte differentiation factor. *Am. J. Physiol.* 262 : C537, 1992.
  34. Moore, T.C., Lami, J.L., and Spruck, C.H. : Substance P increases lymphocyte traffic and lymph node flow through peripheral lymph nodes of sheep. *Immunology* 67 : 109, 1989.
  35. Bar-Shavit, Z., Goldman, R., Stabinsky, Y., Gottlieb, P., Fridkin, M., Teiberg, V.I., and Blumberg, S. : Enhancement of phagocytosis : a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94 : 1445, 1980.
  36. Fewtrell, C.M.S., Foreman, J.C., Jordan, C.C., Oehme, P., Renner, H., and Stewart, J.M. : The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat. *J. Physiol.* 330 : 393, 1982.
  37. Lowman, M.A., Benyon, R.C., and Church, M.K. : Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. *Br. J. Pharmacol.* 95 : 121, 1988.
  38. Iwamoto, I., Tomoe, S., Tomioka, H., and Yoshida, S. : Substance P-induced granulocyte infiltration in mouse skin. *Clin. Exp. Immunol.* 87 : 203, 1992.
  39. Kimball, E.S., Persico, F.J., and Vaught, J.L. : Substance P, neurokinin A, and neurokinin B induce generation of IL-1-like activity in P338D1 cells. *J. Immunol.* 141 : 3564, 1988.
  40. Lotz, M., Voughan, J.H., and Carson, D.A. : Effect of neuropeptides on the production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 241 : 1218, 1988.
  41. Laurenzi, M.A., Persson, M.A.A., Dalsgaard, C., and Hoegerstrand, A. : The neuropeptide substance P stimulates production of IL-1 in human blood monocytes : activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand. J. Immunol.* 31 : 529, 1990.
  42. Wagner, F., Fink, R., Hart, R., and Dancygier, H. : Substance P enhances



- interferon- $\gamma$  production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul. Pept.* 19 : 355, 1987.
43. Hart, R., Dancygier, H., Wagner, F., Lersch, C., and Classen, M. : Effect of substance P on immunoglobulin and interferon-gamma secretion by cultured human duodenal mucosa. *Immunol. Lett.* 23 : 199, 1989/1990.
  44. Rameshwar, P., Ganea, D., and Gascon, P. : In Vitro stimulatory effect of hematopoiesis. *Blood* 81 : 391, 1993.
  45. Levine, J.D., Clark, R., Devor, M., Helms, C., Moskowitz, M.A., and Busbaum, A.I. : Intra-neuronal substance P contributes to severity of experimental arthritis. *Science* 226 : 547, 1984.
  46. Hartung, H.-P. and Toyka, K.V. : Activation of macrophages by substance P induction of oxidative burst and thromboxane release. *Eur. J. Pharmacol.* 89 : 301, 1983.
  47. Lotz, M., Carson, D.A., and Vaughn, J.H. : Substance P activation of rheumatoid synoviocytes neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 235 : 893, 1987.
  48. Zipfel, P.F., Balke, J., Irving, S.G., Kelly, K., and Sienbenlist, U. : Mitogenic activation of human T cells induces two closely related genes which share structural similarities with a new family of secreted factors. *J. Immunol.* 142 : 1582, 1989.
  49. Cochrane, D.E., and Douglas, W.W. : Calcium-induced extrusion of secretory granule (exocytosis) in the mast cells exposed to 48/80 or the ionophores A23187 and X-537A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 : 408, 1974.
  50. Von Euler, U.S., and Gaddum, J.H. : An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.* 72 : 74, 1931.
  51. Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S., and D'Orleans-Juste, P. : Receptors for substance P and related neurokinins. *Pharmacology* 38 : 1, 1989.
  52. Shigemoto, R., Yokota, Y., Tsuchida, K., and Nakanishi, S. : Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *J. Biol. Chem.* 265 : 623, 1990.
  53. Yokota, Y., Sasai, Y., Tanaka, K., Fujiwara, T., Tsuchida, K., Shigemoto, R., Kakizuka, A., Ohkubo, H., and Nakanishi, S. : Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.* 264 : 17649, 1989.
  54. Nakanishi, S. : Substance P precursor and kininogen : their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol. Rev.* 67 : 1117, 1987.
  55. Takeda, Y., Chou, K.B., Sachais, B.S., and Krause, J.E. : Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 : 122, 1991.
  56. Wood, D.D., Ihrie, E.J., Dinarello, C.A., and Cohen, P.L. : Isolation of an interleukin-1 factor from human joint effusions. *Arthritis Rheum.* 26 : 975, 1983.
  57. Nouri, A.M.E., Panayi, G.S., and Goodman, S.M. : Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. I. The presence of interleukin-1 in synovial fluid. *Clin. Exp. Immunol.* 55 : 295, 1984.
  58. Matsas, R., Kenny, J. and Turner, A.J. : The metabolism of neuropeptides. *Biochem. J.* 223 : 433, 1984.
  59. Turner, A.J., ed. : *Neuropeptides and Their*

- Peptidases. Weinheim, Germany, VCH Publishers, 1987.
60. Borson, D.B., Brokow, J.J., Sekizawa, K., McDonald, D.W., and Nadel, J.A. : Neutral endopeptidase and neurogenic inflammation in rats with respiratory infections. *J. Appl. Physiol.* 66 : 2653, 1989.
  61. Jacoby, D.B., Tamioki, J., Borson, D.B., and Nadel, J.A. : Influenza infection increases airway smooth muscle responsiveness to substance P in ferrets by decreasing enkephalinase. *J. Appl. Physiol.* 64 : 2653, 1988.
  62. Borson, D.B., and Gruenert, D.C. : Glucocorticoids induce neutral endopeptidase in transformed tracheal epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 260 : L83, 1991.
  63. Ihara, H., and Nakanishi, S. : Selective inhibition of expression of the substance P receptor mRNA in pancreatic acinar AR42J cells by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 265 : 22441, 1990.
  64. Connelly, J.C., Skidgel, R.A., Schultz, W.W., Johnson, A.R., and Erdos, E.G. : Neutral endopeptidase 24-11 in human neutrophils : cleavage of chemotactic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 : 8737, 1985.
  65. Kohrogi, H., Nadel, J.A., and Malfroy, B. : Recombinant human enkephalinase (neutral endopeptidase) prevents cough induced by tachykinins in awake guinea pigs. *J. Clin. Invest.* 84 : 781, 1989.
  66. Marasco, W.A., Showell, H.J., and Becker, E.L. : Substance P binds to the formylpeptide chemotaxis receptor on the rabbit neutrophil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 : 1065, 1981.
  67. Dvorak, A.M. : Basophil and Mast Cell Degranulation and Recovery. New York, Plenum, 1991.
  68. Janiszewski, J., Bienenstock, J., and Blennerhassett, M.G. : Picomolar doses of substance P trigger electrical responses in mast cells without degranulation. *Am. J. Physiol.* 267 : C138, 1994.
  69. Bischoff, S.C., Brunner, T., De Weck, A.L., and Dahinden, C.A. : Interleukin 5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to deverse agonists. *J. Exp. Med.* 172 : 1577, 1990a.
  70. Bischoff, S.C., De Weck, A.L., and Dahinden, C.A. : Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 6813, 1990b.
  71. Bourgoin, S., Plante, E., Gaudry, M., Maccache, P.H., Borgeat, P., and Poubelle, P.E. : Involvement of a phospholipase D in the mechanism of action of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) : priming of human neutrophils in vitro with GM-CSF is associated with accumulation of phosphatidic acid and diacylglycerol. *J. Exp. Med.* 172 : 767, 1990.
  72. Brom, J., Brom, C., and Konig, W. : Basic mechanisms of cellular priming and release of inflammatory mediators. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 94 : 64, 1991.
  73. Polak, J.M., and Bloom, S.R. : Regulatory peptides in autonomic and sensory neuron systems. *Exp. Brain Res.* 16 : 11, 1987.
  74. Wallengren, J., Ekman, R., and Sundler, F. : Occurrence and distribution of neuropeptides in the human skin. *Acta.*

- Derm. Venereol. (Stockh) 67 : 185, 1987.
75. Gibbins, I.L., Furness, J.B., and Costa, M. : Pathway specific patterns of co-existence of substance P, calcitonin gene related peptide, cholecystokinin, and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglion of the guinea pig. Cell Tissue Res. 248 : 417, 1987.
76. Felten, S.Y., and Felten, D.L. : Innervation of lymphoid tissue. In : Psychoneuroimmunology, Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N., eds., 2nd ed. New York, Academic Press, pp27, 1991.

## Effects of Substance P on the Activities of Immune Cell

Hyung-Seop Kim<sup>1</sup>, Kwi-Ok Oh<sup>2</sup>, Chong-Deuk Lim<sup>1</sup>

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

The neuropeptide substance P(SP) has been recognized to modulate immune systems, with close proximity between peptidergic sensory nerve endings and immune cells. These include the macrophage and neutrophil activation, IL-2 production in T cell, augmentation of Ig synthesis, mast cell degranulation, PGE<sub>2</sub> and collagenase secretion in synoviocytes. In this study I examined SP-induced various biological activities such as antimicrobial action, cytokine production, and mast cell degranulation in the presence or absence of other inflammatory cell activators. Antimicrobial studies showed that undifferentiated HL-60 cells were not affected by SP. However, SP significantly enhanced antimicrobial action of TPA-treated or dbcAMP-treated HL-60 cells which had been differentiated into PMN or macrophage/monocyte. I could not find synergistic relationship between SP and LPS in parallel experiments of the above. SP did not induce IL-1 production from murine macrophage cell line RAW264.7 whether costimulated with LPS or not. Mast cell degranulation was occurred only when stimulated with high dose (10<sup>-5</sup>M) of SP and the degree of this activation was slightly reduced by simultaneous application of MIP-1 $\alpha$ . In addition, CGRP which is known to be a common coexisting neuropeptide with SP within specific fibers did not augment the function of SP on mast cell degranulation. These results suggest that immunoregulatory activities of SP could be mediated through direct upregulation of various functions of immune cells and also upregulation of responsiveness of immune cells to other immune activators.