

□ 원 저 □

Interleukin-2가 호산구 생존에 미치는 영향과 기전에 관한 연구

순천향 의과대학 내과학교실, 현암 신장 연구소

김효석, 이영목, 최영수, 김경호, 임건일
문승혁, 정성환, 김현태, 어수택, 김용훈, 박춘식

= Abstract =

A Study of EFFECT and MECHANISM of IL-2 on SURVIVAL of EOSINOPHILS

Hyo Seok Kim, M.D., Lee Young Mok, M.D., Choi Young Soo, M.D.,
Kim Kyung Ho, M.D., Im Geon Il, M.D., Jeong Sung Whan, M.D.,
Moon Seung Hyug, M.D., Kim Hyeon Tae, M.D., Uh Soo Taek, M.D.,
Kim Yong Hun, M.D., Park Choon Sik, M.D.

Department of Internal Medicine, Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea

Background : Interleukin-5 (IL-5) is responsible for eosinophilia in allergic diseases. In allergic bronchial asthma, there is a correlation between the extent of eosinophil infiltration in bronchial mucosa and IL-5 concentrations. In addition, IL-2 concentration is elevated in the airways and associated with eosinophilia in symptomatic patients with bronchial asthma. In animal studies, IL-2 can induce eosinophilia by increasing the synthesis of IL-5, however, it is still unknown how IL-2 can induce eosinophilia in human being. The aim of this study is to evaluation the effect and mechanism of IL-2 on prolongation of eosinophil survival.

Methods : After purifying the eosinophils from the venous blood of allergic patients with eosinophilia, we measured the survival rates of eosinophils using trypan blue dye exclusion test, and the number of eosinophils with Randolp's solution. We compared the survival rates of eosinophils in the presence of IL-2 or IL-5. Neutralizing antibody for IL-5 was added in IL-2 treated eosinophils to reveal whether IL-2 induced prolongation of eosinophil survival was mediated by IL-5. We checked IL-5 m-RNA expression of lymphocytes in the presence of IL-2 by using Reverse transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) method to revealed the effect of IL-2 on IL-5 m-RNA expression on lymphocyte. α and β IL-2 receptors were measured on

eosinophils and lymphocytes with flow-cytometer after stimulated with IL-2.

Results :

- 1) Eosinophil survival rates increased dose dependently on IL-5 and IL-2.
- 2) The eosinophil survival rates increased by IL-2 were not inhibited by the pretreatment with neutralizing antibody for IL-5.
- 3) IL-5 m-RNA was not expressed on lymphocytes by the treatment with IL-2 up to 96 hours.
- 4) IL-2 upregulate the expression of IL-2R α on eosinophils, instead of no effect on the expression of IL-2R β .

Conclusion : Interleukin-2 had the enhancing effect on the survival rates of eosinophils. The mechanism behind IL-2 induced eosinophilia might be the increment of IL-2 receptors on eosinophils rather than IL-5 synthesis by lymphocytes.

Key Word : Eosinophils, IL-5, IL-2, IL-2R

서 론

기관지천식 환자의 기도점막에 호산구의 수가 증가되어 있으며¹⁾ 침윤된 호산구도 형태학적, 기능적으로 활성화 되어있다. 호산구 활성화에 관여하는 인자로 여러가지 물질이 알려져 있으나²⁻⁶⁾ T-림프구에서 분비되는 lymphokine이 중요한 역할을 하며, lymphokine중에서 Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-5 (IL-5)와 granulocyte-mono cyte-colony stimulating factor (GM-CSF)는 호산구의 분화, 활성화, 생존능에 관여한다⁷⁻⁹⁾. 말초혈액이나 기도내의 호산구의 증가정도는 기도과민성의 항진정도와 관련이 있는 것으로 보아 호산구는 천식 발생에 직접적으로 작용하는 것으로 사료되고 있다.¹⁰⁻¹⁶⁾ 천식환자의 기관지폐포세척액내에서 IL-5 농도의 증가정도는 호산구의 침윤과 밀접한 관계가 있는 것으로 보아 천식환자의 기도내에서 호산구의 침윤과 활성화는 주로 IL-5에 의해서 조절되는 것으로 추정된다. 동물실험에서도 호산구증다증과 IL-5와의 상호작용이 연구되었으며, 기생충에 감염되어 호산구증다증을 보인 쥐에서 IL-5 mRNA의 표현이 증가됨이 보고된 바 있다.¹⁷⁾

Interleukin-2 (IL-2)는 주로 림프구 클론의 증식에 관여 하는 림포카인으로 처음 알려졌으나, 호산구증다증에도 관여하는 증거가 있다. IL-2는 호산구 colony형성능을 항진시키는 데 관여하며, 이 기능은 anti IL-5에 의해 억제되어 IL-2가 호산구증다증을 일으키는 기전은 주로 IL-5 형성증가를 통한 것으로 설명되어지고 있다. IL-2를 투여한 쥐의 비장세포내에서 IL-5 m-RNA의 표현이 증가되면서 동시에 IL-2의 투여로 호산구증다증이 유발되며^{17,18)} in vitro 실험에서도 IL-2가 쥐의 비장세포내의 IL-5 m-RNA의 발현을 증가시키는 사실이 확인되었다. 또한 호산구는 활성화되면 세포표면에 저친화성 IL-2수용체(IL-2 receptor α , 이하 IL-2R α)를 발현하며¹⁹⁾ IL-2가 IL-2R α 를 통하여 호산구를 직접자극할 가능성이 있으며, 그 예로 IL-2는 IL-2R α 가 표현된 호산구에 대한 화학주성능이 있음이 밝혀져있다. 저자들도 기관지 천식환자의 기관지폐포세척액내에서 IL-2의 농도가 증가하고 IL-2의 농도와 호산구의 침윤이 유의한 상관관계를 관찰한 바 있었고, T 림프구의 IL-2수용체의 발현이 호산구의 침윤과 밀접한 상관관계가 있음을 관찰한 바 있으며²⁰⁾, 가용성 IL-2 수용체의 농도

및 IL-2의 농도와 밀접한 관계가 있음을 관찰한 바 있어^{19,21)} 기도내 호산구 증가에 IL-2가 영향을 미칠수 있다는 결과를 얻은바 있다. 그러나 인체내에서는 아직 IL-2가 호산구의 생존과 림프구에서의 IL-5 합성에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 자세히 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 IL-2가 호산구의 생존에 미치는 영향을 관찰하였고, 그 기전에 대한 분석을 하고자 하였다.

대상 및 방법

실험 방법은 2단계로 구분하여 시행하였다. 1단계실험은 순수하게 분리된 사람의 호산구를 IL-2와 IL-5에 배양시 호산구 생존의 변화를 관찰하고, 2단계실험은 아토피성 천식환자의 말초혈액 단핵구를 분리한 후 Concanavalin A(Con-A), 그리고 IL-2로 자극하여 배양한 말초혈액단핵구층을 acid-guanine phenol chloroform method로 총 RNA를 분리한 후 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 시행하여 IL-5의 m-RNA 발현에 미치는 IL-2의 영향을 관찰하였고 IL-2 수용체에 대한 단클론 항체를 이용하여 면역염색 후 유세포 분석기로 호산구 및 림프구의 IL-2 수용체의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

1. 방법

1) 호산구의 분리

말초혈액 호산구증다증을 보이는 아토피성 천식환자 4예에서 말초정맥혈 20ml을 0.1M EDTA 2ml와 6% dextran-dextrose solution 5ml가 들어있는 주사기에 채혈하여 Falcon tube에 옮긴 후 실온에서 60분간 방치하여 상청부를 분리하고 300g에서 10분간 원심분리한 다음, PBS(Phosphate Buffer Saline)로

세척하고 PIPES buffer(25mM IPES, 110mM NaCl, 5mM KCl, 25mM NaOH, 15.4mM glucose)에 부유시킨 후 비중 1.080, 1.090, 1.095, 1.100, 1.115, 1.133, 의 gradient Percoll 을 이용하여 분리하였다^{27/28)}. 90%이상의 호산구 순수도와 생존율을 보인 경우 실험에 이용하였다.

2) 호산구 생존율 측정

호산구의 생존율은 0.4% trypan blue dye exclusion 방법으로 hemocytometer에서 6회 반복 측정하였고 호산구의 수는 0.1% phloxine, 1% CaCl₂와 동량의 propylene glycol이 함유된 Randolp's 용액을 이용하여 측정하였다. 생존율은 실험에 사용된 총 호산구의 수를 분모로, 실험후 생존 호산구의 수를 분자로 하여 백분율을 구하였다.

3) IL-2와 IL-5가 호산구 생존율에 미치는 영향

순수하게 분리된 호산구 1×10⁶/ml를 non-essential amino acid(0.1mmol/L), glutamine (2mmol/L), HEPES(25mM) 및 gentamycin (25μg/ml)이 함유된 RPMI-1640(이하 TCM으로 약함)에 10% fetal calf serum(FCS)이 있는 상태로 부유시킨후 재조합형의 IL-2(KAIST, Korea)를 40ng/ml, 400ng/ml의 농도로 첨가하였다. 재조합형의 IL-5 (Genzyme, MA)는 30ng/ml부터 5배씩 희석하여 0.048ng/ml의 농도까지 첨가하였으며 중화실험을 위해서 polyclonal rabbit anti human IL-5(Genzyme, MA)를 10μg/ml의 농도(25ng의 IL-5을 중화시키는 농도)로 IL-2나 IL-5와 4℃에서 1시간 전처리 후 순수분리된 호산구 배양에 사용하였다.

4) IL-2가 IL-5의 m-RNA 표현에 미치는 영향

아토피성 천식환자의 말초혈액 단핵구 (PBMC: peripheral blood mononuclear cells) 는 말초정맥혈액을 Ficoll-Hypaque 용액(비중 1.077)으로 분리하여 5×10^6 cells/ml의 농도로 10% FCS이 함유된 TCM에 부유시켰다. $10 \mu\text{g/ml}$ 의 Con-A로 각각 24시간동안 37°C 에서 자극한 후 총 RNA를 분리하여 m-RNA 발현에서 RT-PCR 양성지표로 채택하였고 400ng/ml 의 IL-2를 가하여 PBMC를 0, 4, 24, 48, 72, 96시간 동안 37°C 에서 자극한후 총 RNA를 분리한 후, IL-5에 대한 RT-PCR을 통하여 IL-5 m-RNA의 발현을 관찰하였다.

5) Reverse Transcription(RT)/Polymerase Chain Reaction(PCR)

Acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method를 사용하여 총 RNA를 분리하였고 RNA 분리가 잘 되었는지는 agarose 에서 전기영동 후 28s와 18s band의 비를 확인하였다. 총 RNA의 농도는 분광분석기를 이용하여 파장 260nm 와 280nm 의 자외선 하에서 측정하였으며 얻어진 RNA pellet은 사용전까지 DEPC로 처리된 증류수에 녹여 -70°C에서 보관하였다.

RT는 아무런 자극도 가하지 않은 PBMC 와 Con-A(RT과정의 positive control) 및 IL-2로 자극하여 배양한 말초혈액 단핵구로부터 얻은 총 RNA를 $10 \mu\text{g}$ 이 되게 취한 후 DEPC로 처리된 증류수와 섞어서 $11 \mu\text{l}$ 가 되게 한 후 65°C에서 5분간 가열한 후 얼음 위에서 식혔다. 각 sample 당 RNase inhibitor $0.5 \mu\text{l}$, 10mM dNTP $1 \mu\text{l}$, RT buffer $4 \mu\text{l}$, dTT $2 \mu\text{l}$, oligo dT $0.5 \mu\text{l}$, Moloney murine leukemia virus(MLV) reverse transcriptase $1 \mu\text{l}$ 를 각 sample이 든 tube에 가하고, 37°C에서 80분, 95°C에서 5분간 가열한 후 얼음 위에서 식힌다. RT 과정에서 생성된 cDNA와 negative control로서 DEPC treated water만

넣은 것, 그리고 positive control로서 DEPC water에 ATCC사에서 구입한 IL-5 cDNA (Cat No.59394) $0.6 \mu\text{l}$ 를 넣은 것, $20 \mu\text{l}$ 의 sample에 PCR buffer $18 \mu\text{l}$, 1.25mM dNTP $16 \mu\text{l}$, IL-5의 up primer(5'-GGA-AGC-TTC-TGC-ATT-TGA-GTT-T-3') $5 \mu\text{l}$, IL-5 down primer(5'-ATG-GAT-CCA-CTC-GGT-GTT-CAA-A-3') $5 \mu\text{l}$, Taq polymerase 0.25unit 씩을 넣고 잘 섞은 후 총량이 $40 \mu\text{l}$ 이 되도록 맞춘 후 mineral oil을 가하여 1분간 10,000g에서 원심분리하고 95°C에서 2분간 가열한 후, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간 가열하는 과정을 35회 반복하고 72°C에서 10분간 가열한 후 얼음위에서 식힌 후에 전기영동한 후 자외선하에서 PCR 산물을 DNA marker III와 비교한 후 사진을 찍었으며 남은 product는 -20°C에서 저장하였다.

6) 호산구와 림프구의 IL-2 수용체 표현의 측정

림프구는 monoclonal antibody인 CD25 (IL-2 α R, Beckton-Dickinson사), TU27 (IL-2R β , Toshikazu Takeshita, PhD, Dept of microbiology Tohoku Univ School of Med에서 기증)를 일차항체로 반응시키고 FITC conjugated anti-mouse Ig로 염색한 후 phycoerythrin conjugated CD3로 이차염색하였다. Flowcytometer (FACScan)을 이용 FSC와 SSC에서 gate한후 이중염색법으로 분석하였으며 호산구는 CD25, TU27를 일차염색만하고 FSC와 SSC에서 gate한후 FACScan을 이용하여 호산구 표면에 표현된 IL-2수용체를 측정하였다.

2. 통계 분석

측정한 결과는 평균±표준편차 (mean±SEM)로 나타내었고, 모든 성적의 통계적 유

의성은 Wilcoxon signed rank test를 이용하여 검증 하였으며, p값이 0.05미만시 유의 있는 것으로 하였다.

결 과

1. 호산구의 생존율에 대한 IL-5의 효과

순수 분리된 호산구의 자연 생존율은 배양 24시간째부터 생존율이 감소되기 시작하여 4 일째까지 급속히 감소하였으며 배양 5일째부터는 생존율이 약 10%이하를 보였다. 반면 여러 농도의 IL-5(6, 1.2, 0.24, 0.048ng/ml)로 처리한 호산구의 생존율은 각각 농도의존성을 보이며 호산구 생존율이 증가하였으며 6ng/ml의 IL-5는 배양 5일째에도 50%이상의 생존율을 보였으며, 0.24ng/ml이상의 IL-5농도에서 대조군에 비하여 유의하게 높은 호산구 생존율의 증가를 보였다 (Figure 1).

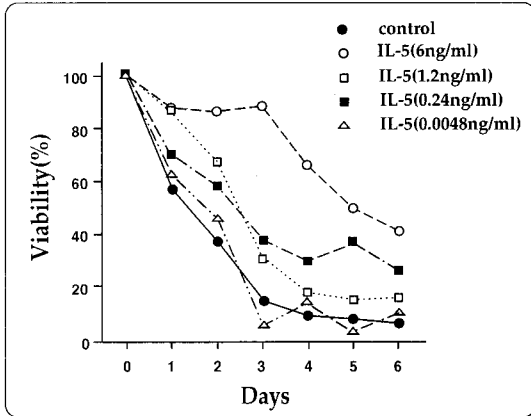


Fig. 1 Time and dose response curve of IL-5 on the survival of eosinophils

10 μ g/ml의 polyclonal rabbit anti IL-5로 처리한 호산구의 생존율은 TCM으로만 처리한 호산구의 자연 생존율에 비교하여 약간 상승하는 경향을 보였다. 6ng/ml의 IL-5만으로 처리한 경우에 비하여 polyclonal anti IL-5로 같이 처리한 경우, IL-5에 의한 호산

구 생존 증가를 유의하게 억제 시켰다. 그러나 완전 억제되지는 않고 약 50%정도 억제 되었으며 10 μ g/ml의 polyclonal anti IL-5만으로 처리한 호산구나 대조호산구의 자연 생존율보다 유의하게 높았다. 상기소견은 배양 3일 이후인 7일, 11일째 뚜렷히 나타났으며 배양 14일째는 6ng/ml의 IL-5만으로 처리한 경우도 30% 정도의 생존율을 보였다(Figure 2).

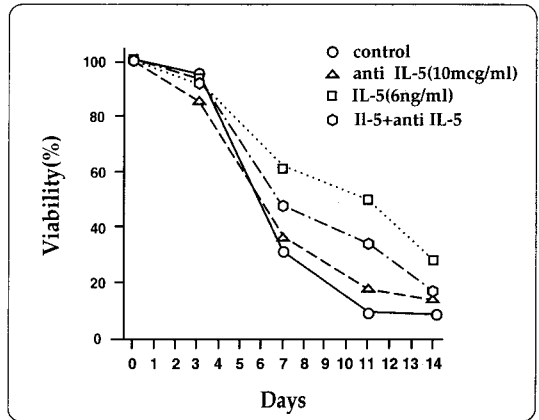


Fig. 2 Effect of neutralizing Ab for IL-5 on survival of eosinophils treated with IL-5.

2. 호산구 생존율에 대한 IL-2의 효과

16ng/ml, 160ng/ml의 IL-2로 처리한 호산구의 생존율은 TCM으로만 배양한 호산구의 자연 생존율에 비하여 유의하게 높은 생존율의 상승을 보였으며 IL-2에 대한 농도의존성을 보이며 증가하였다.상기 현상은 배양 6일째까지도 유의하게 관찰되었으며 배양 3일째부터 IL-2농도 16ng/ml과 160ng/ml사이에 호산구 생존율의 차이를 보이며 16ng/ml농도에서의 호산구 생존율이 급격히 감소되었다 (Figure 3).

호산구의 생존율에 대한 IL-2의 효과는 IL-5(6ng/ml)과 IL-2(160ng/ml)로 처리한 호산구의 생존율이 비슷한 역가를 보였다. 상기 결과로 IL-2는 IL-5에 비하여 농도비로 0.037배의

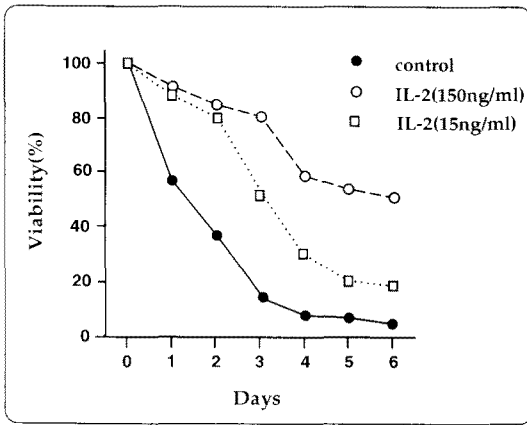


Fig. 3 Time and dose response curves of IL-2 on the survival of eosinophils

호산구 생존능 상승효과를 가지고 있었다 (Figure 4).

160ng/ml의 IL-2와 10μg/ml의 polyclonal anti IL-5로 배양한 호산구의 생존율은 동량의 IL-2로만 배양한 호산구의 생존율과 비교하여 배양 14일까지 차이가 없어 IL-2에 의한 호산구 생존율의 증가는 IL-5에 의해서 작용되지 않음을 확인할 수 있었다 (Figure 5).

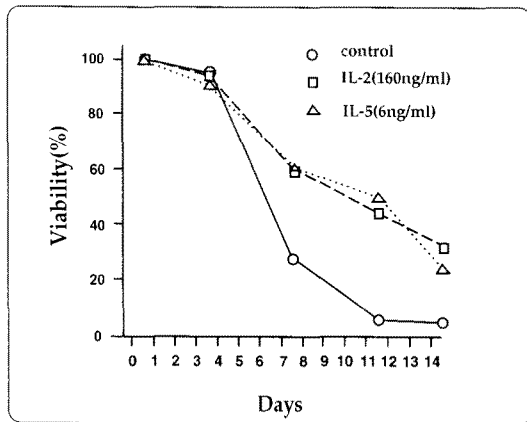


Fig. 4 Comparison of the effect of IL-2 with iL-5 on prolongation of eosinophil survival.

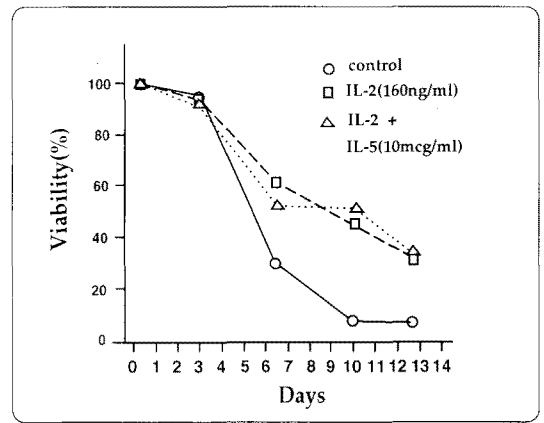


Fig. 5 Effect of neutralizing Ab for IL-5 on IL-2 induced prolongation of eosinophil survival.

3. IL-2에 의한 말초혈액단핵구에서의 IL-5 m-RNA 표현

IL-2 (160ng/ml)로 자극한 말초혈액단핵구에서 분리된 총 RNA를 RT-PCR한 결과 96 시간까지 IL-5의 m-RNA 발현을 관찰할 수 없었다. PCR의 양성대조군인 IL-5 cDNA와 RT-PCR의 양성대조군인 con-A로 자극한 말초혈액단핵구에서는 IL-5의 m-RNA 발현을 관찰할 수 있었으며 음성대조군으로 이용한 DEPC-water의 경우도 IL-5 m-RNA 발현을 볼 수가 없었다(Figure 6).

4. IL-2에 의한 호산구의 IL-2α, β 수용체의 발현

호산구에 표현된 IL-2 수용체는 IL-2 (160ng/ml)로 처치한 경우 CD25의 발현율이 대조호산구에 비하여 유의하게 증가 하였으나 IL-5에 의한 증가보다는 약하였다. TU27의 발현율은 IL-5로 처치한 호산구의 경우 약간 상승되는 경향을 보였으나 IL-2로 처치한 경우 변화가 없었다(Table 1, Figure 7, 8)

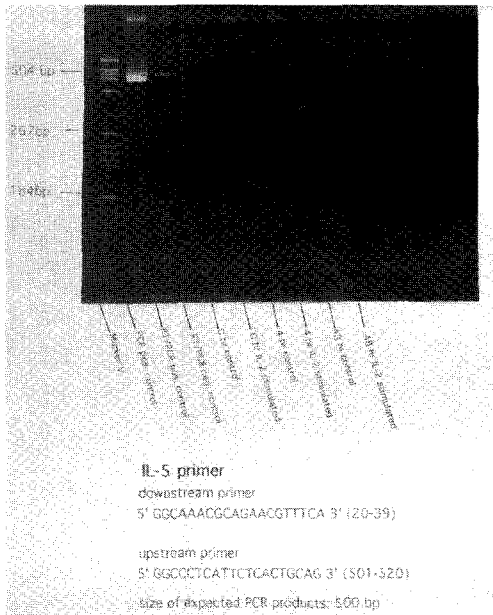


Fig. 6 Result of gel running with RT-PCR products from control and IL-2 stimulated PBMC RNA

Table 1. Expression of IL-2 receptors on eosinophils (%)

	Control	IL-2 (400ng/ml)	IL-5(6ng/ml)
CD25	30.2	36.4	40.2
TU27	1.8	2.0	2.5

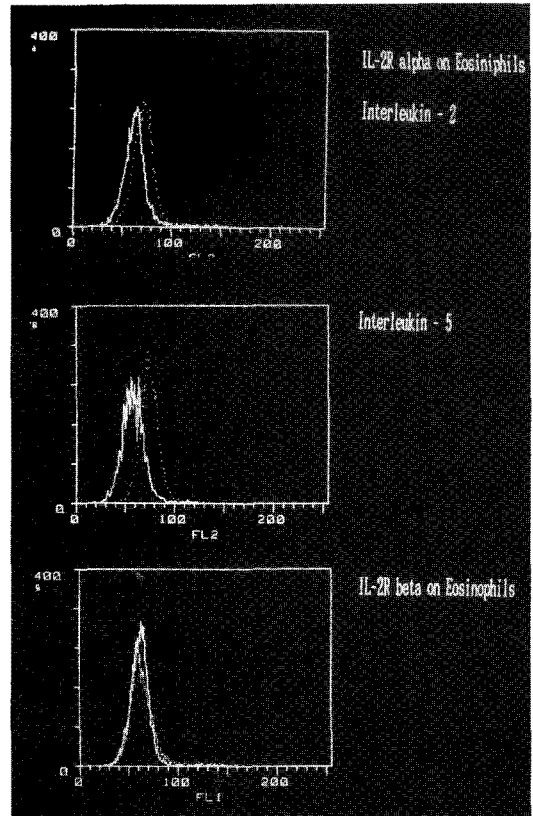


Fig. 8 Expression of IL-2 receptors

고 찰

IL-2가 호산구증다증에 관여한다는 여러가지 증거가 있다. 정제된 재조합형의 human IL-2로 치료받은 악성 종양환자에서 중등도의 지속적인 호산구증다증이 관찰되며, 저비중 호산구의 분획이 증가됨이 관찰되고 상기 환자의 혈청내에는 eosinophil colony 형성능을 향진시키는 물질이 발견되었다. 늑막내 전이암의 경우 치료제로 늑막내에 IL-2를 주입한 경우에도 늑막내 호산구의 증가와 호산구 colony 형성인자의 증가를 관찰할 수 있는데 IL-2가 사람에서 호산구증다증을 야기하는 작용기전은 분명치 않다^{17,18)}.

저자들은 IL-2가 호산구 생존을 증가시키는 것을 본 실험에서 관찰할 수 있었으며 IL-2의 농도는 IL-5의 농도에 비하여 약 5%의 농도

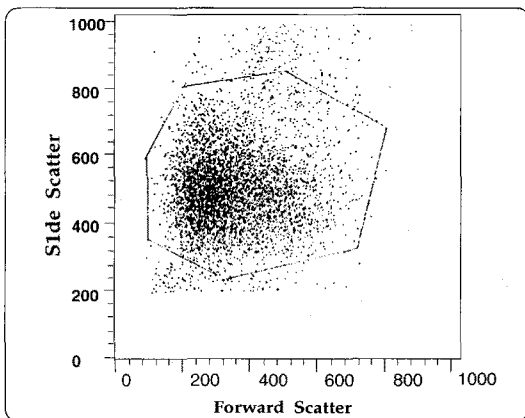


Fig. 7 Distribution of cells mapped on a 2-dimensional diagram after flow-cytometry: Cells on the closed circuit means eosinophils

비를 보임을 관찰할 수 있었다. polyclonal anti IL-5를 이용한 억제실험에 대한 저자들의 결과는 IL-2에 의한 호산구 생존율의 증가는 polyclonal anti IL-5에 의하여 억제되지 않는 것으로 보아 IL-2에 의한 호산구 생존율 증가는 IL-5형성 증가에 기인하지는 않는다고 해석된다.

재조합형의 human IL-2를 투여한 쥐들은 투여기간 동안에 호산구증다증을 보이며, PCR을 이용한 in vitro 실험에서 human IL-2를 주사한 생쥐의 비장 세포 내에서 IL-5 mRNA의 발현이 동시에 증가 되었다^{17,18)}. 이와 같이 in vivo 동물 실험에서 human IL-2는 호산구 증다증을 유발하며 in vitro에서 human IL-2가 쥐의 비장세포내의 IL-5 mRNA의 발현을 증가시킨다는 사실이 확인되었으나, 인체내에서는 IL-2에 의한 호산구의 생존 증가기전이 IL-5 합성 증가에 기인되는 것은 아닌 것 같다.

IL-2가 호산구 전구세포의 증식과 분화에 직접적으로 작용하지 않는 것은 확실하며^{22,23)} IL-2의 투여는 림프구에서 IL-5를 주로, 그리고 GM-CSF, IL-3는 소량 증가시키며 그 결과로 호산구증다증 및 저비중 호산구의 분화를 증가시키는 것으로 해석되고 있다³²⁾. 그러나 IL-2에 반응하는 다른 세포 즉 호산구, 자연 살해세포등의 기타세포의 역할에 대해서는 아직 규명된 바 없으나 호산구의 경우도 자극을 받으면 IL-3, GM-CSF를 분비할뿐 아니라 IL-2 수용체가 있어 IL-2에 자극받은 호산구가 IL-3나 GM-CSF를 분비하여 autocrine효과로 호산구의 수명을 연장할 가능성도 있다^{25,26)}. 즉 호산구가 분화되어 활성화된 상태에서는 직접 영향을 미칠 수도 있다고 사료 된다.

호산구는 활성화되면 세포표면에 저친화성 IL-2 수용체(IL-2R alpha, Tac antigen, P55)를 발현하며 IL-2R beta(P75)는 발현하지 않는다는 현상은 본실험에서도 증명되었다¹⁹⁾. 따라서 IL-2가 저친화성 IL-2R 수용체를

통해 호산구를 직접 자극할 가능성이 있으며, IL-2R alpha가 표현된 호산구는 IL-2에 대한 화학주성능이 있음은 호산구가 IL-2에 직접 반응할 수 있다는 그 하나의 증거가 된다.

저자들의 결과인 IL-2 자극에 의한 IL-2 α 수용체이 증가는 IL-2가 직접 호산구에 작용하여 IL-2 수용체를 상승시키며 IL-2 수용체가 발현된 호산구는 IL-2의 존재하에서 생존능이 증가하는 것으로 보인다.

저자들은 기관지천식 환자의 기도내 염증세포의 구성을 기관지폐포세척액을 통하여 분석해본 결과 천식환자에서 호산구의 빈도가 높았으며 T 림프구중 특히 T 조력세포의 IL-2 수용체 발현이 증가되어, T 조력세포가 활성화 되어 있음을 관찰한 바 있다. 또한 기관지폐포세척액내 IL-2의 농도가 증가되며 증가된 정도는 호산구의 침윤과 비례하였고 또한 가용성 IL-2 수용체의 농도와 IL-2의 농도사이에 밀접한 상관 관계가 있었다^{19,20,21)}. 상기 결과로 IL-2가 호산구 침윤에 영향을 미치며 가용성 IL-2 수용체에 의해서 그 효과가 증대된다고 추정할 수 있었고, 이것은 본 연구에서 나타난 결과와도 일치하였다. IL-2 존재하의 호산구에서 IL-2R α 의 표현이 향진되었고 호산구의 생존율이 IL-2에 의해 증가되었으며 anti IL-5에 의해 억제되지 않았다는 사실은 IL-2에 의해 야기된 호산구 생존율의 증가가 호산구의 IL-2 수용체의 증가와 관련이 있다고 볼 수 있다.

RT-PCR의 결과는 상기사실을 뒷바침하여 주는데, IL-2로 자극된 말초혈액단핵구의 어떤 배양시간대에서도 IL-5 mRNA의 발현을 관찰할 수 없었다는 사실로 미루어 IL-2는 유전자 수준에서 IL-5 mRNA를 표현하지 않으며, 지금까지 생쥐에서 설명되어져 왔던 것과 같이 IL-2가 IL-5의 표현을 향진시킴으로써 호산구에 대한 작용을 증대시킬 것이라는 가설은 인체에서는 가능성이 떨어진다고 사료된다.

결론적으로, 호산구의 생존율은 IL-5와 마

찬가지로 IL-2에서도 용량의존성으로 증가하며, 그 기전은 림프구에서 IL-5의 m-RNA 발현을 통해서 보다는 호산구의 IL-2 수용체의 증가를 통하여 이루어진다고 사료되며, IL-2 자극에 따라 호산구가 활성화되고 활성화된 호산구가 IL-2에 대한 반응으로 생존율이 증가하거나 활성화된 호산구에서 IL-5, GM-CSF, IL-3등의 형성증가를 통하여 호산구의 생존능이 길어진다고 사료되며 두 기전 차이에 대한 연구는 추후 시행되어져야 할 것이다.

요 약

연구배경 : Interleukin-5(IL-5)는 호산구 증가를 보이는 여러 질환들과 관련이 있으며 특히 알레르기성 천식에서 호산구의 침윤 정도와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 IL-2도 증상있는 천식환자의 기도에서 상승됨이 관찰되어 호산구 침윤도와 상관관계가 있는 것이 밝혀졌다. IL-2가 호산구의 생존을 증가시키는 기전이 IL-5의 표현을 증가시키므로써인지 또는 다른 경로를 통하여 작용하는 것인지 알기위해 다음과 같은 방법으로 호산구 생존에 미치는 IL-2의 영향을 관찰하였다.

방법 : 호산구증다증을 보인 환자의 말초혈액으로부터 호산구를 분리하여 trypan blue dye exclusion test를 이용하여 생존율을 측정하였으며 Randolp 용액을 이용하여 호산구수를 계수하였다. 1) IL-2, IL-5 존재하의 호산구 생존율 및 IL-2와 anti IL-5 존재하의 호산구 생존율을 측정하였다. 2) IL-2 존재하의 말초혈액단핵구에서 IL-5 m-RNA 표현을 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) 방법을 통하여 관찰하였다. 3) IL-2로 자극한 호산구의 IL-2 수용체 발현 증가를 유세포분석기(Flow cytometer)로 측정하였다.

결과 :

- 1) 호산구의 생존율은 IL-2 및 IL-5에 대한 농도의존성을 보이며 증가하였다.
- 2) IL-2에 의해 증가된 호산구의 생존율은 anti IL-5에 의해 억제되지 않았다.
- 3) IL-2로 자극된 말초혈액단핵구는 IL-5 m-RNA를 표현하지 않았다.
- 4) IL-2는 호산구에서 IL-2 α 수용체의 표현을 증가시키며 IL-2 β 수용체의 표현은 변화가 없었다.

결론 : 사람에서는 IL-2는 IL-5 형성증가를 통하지 않고 호산구에 IL-2 수용체를 증가시키므로써 호산구의 생존율을 증가시킨다.

참 고 문 헌

- 1) 이남민, 임건일, 박명제, 김기업 외 다수: 기관지 천식환자에서 기관지 폐포세척액의 세포조성에 관한 연구. 대한내과학회잡지 **41**: 53, 1991
- 2) Wang JM, Rambaldi A, Biondi A et al: Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant. Eur J Immunol **19**: 701, 1989
- 3) Warringa RAJ, Koenderman L, Kok PTM et al: Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. Blood **77**: 2694, 1991
- 4) 박춘식, 김중원, 어수택, 외 다수: 기관지 천식환자의 기관지 폐포세척액내의 가용성 Interleukin-2 수용체에 관한 연구. 알레르기 **11-3**: 328, 1991
- 5) 문중호, 이남민, 김현태, 어수택 외 다수: IgE 수용체 발현 및 혈청 IgE 농도와 T림프구 활성의 관계. 알레르기 **11-3**: 318, 1991
- 6) 박춘식, 김 욱, 김현태 외 다수: 호흡기 알레르기 환자에서 수용성 Interleukin-2 수용체에 관한 연구. 대한내과학회잡지 **41**: 367, 1991

- 7) Clutterbuck EJ, Hirst EMA, Sanderson CJ: Human interleukin-5 regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* **73**: 1504, 1988 .
- 8) Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HR, Young IG, Vadas MA: Recombinant human interleukin-5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* **167**: 219, 1988
- 9) Y Yamaguchi, Y Hayashi, Y Miura, T Kasahara, S Kitamura, M Torisu, S Mita: Highly purified murine interleukin-5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. *J Exp Med* **167**: 1737, 1988
- 10) Schatz M, Wasserman S, Patterson R: The eosinophil and the lung. *Arch Intern Med* **142**: 1515, 1982
- 11) Charles TJ, Williams SJ, Seaton A, Bruce C, Taylor WH: Histamines, basophils, and eosinophils in severe asthma. *Clin Sci* **57**: 39, 1979
- 12) Baigelman W, Chodosh S, Pizzuto D, Cupples LA: Sputum and blood eosinophils during corticosteroid treatment of acute exacerbations of asthma. *Am J Med* **75**: 929, 1983
- 13) Vieira VG, Prolla JC: Clinical evaluation of eosinophils in the sputum. *J Clin Pathol* **32**: 1054, 1979
- 14) Diaz P, Galleguillos FR, Gonzalez MC, Pantin CF, Kay AB: Bronchoalveolar lavage in asthma: the effect of disodium cromoglycate (cromolyn) on leukocyte counts, immunoglobulins, and complement. *J Allergy Clin Immunol* **74**: 42, 1984
- 15) Godard P, Chaintreuil J, Damon M et al: Functional assessment of alveolar macrophages: comparison of cells from asthmatics and normal subjects. *J Allergy Clin Immunol* **70**: 88, 1982
- 16) Clutterbuck EJ, Sanderson CJ: Human eosinophil hematopoiesis studied in vitro by means of murine eosinophil differentiation factor(IL-5): production of functionally active eosinophils from normal bone marrow. *Blood* **71**: 646, 1988
- 17) Cher DJ, Mosmann TR: Two types of murine helper T cell clone. 2. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones, *J Immunol* **138**: 3688, 1987
- 18) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE: Observation on the systemic administration of autologous lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* **313**: 1485, 1985
- 19) Choon Sik Park, Sang Moo Lee, Soo Taek Uh, et al: Soluble Interleukin-2 receptor in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* **91**: 623, 1983
- 20) Choon Sik Park, Sang Moo Lee, Soo Taek Uh, et al: Soluble Interleukin-2 receptor in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma. *Advances in Asthmology* **445**, 1990
- 21) Choon Sik Park, Sang Moo Lee, Sung Whan Chung: Interleukin-2 and Interleukin-2 receptor in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma. *Chest* **109**: 400, 1984
- 22) Sedwick JB, Frick WE, Sondel PM et al: The appearance of hypodense eosinophils during interleukin-2 treatment. *J Allergy Clin Immunol* **85**: 557, 1990
- 23) Enokihara H, Furusawa S, Nakakubo H et al: T cells from eosinophilic patients produce interleukin-5 with interleukin-2 stimulation. *Blood* **73**: 1809, 1989
- 24) Moqbel R, Hamid Q, Ying S et al: Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated eosinophils. *J Exp Med* **174**: 749, 1991
- 25) Kita H, Ohnishi T, Okubo Y et al: Granul-

- ocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med* **174**: 745, 1991
- 26) Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK et al: Identification of activated T lymphocyte eosinophils in stable atopic asthma, *Am Rev Respir Dis* **142**: 1407, 1990
- 27) Vadas MA, David JR, Butterworth A et al: A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* **122**: 1228, 1979
- 28) Tai PC, Spry CJ: The effects of recombinant granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on the secretory capacity of human blood eosinophils. *Clin Exp Immunol* **80**: 426, 1990