

□ 원 저 □

## 말초혈액 단핵구에 대한 내독소 자극의 신호 전달에서 Protein Kinase C와 Protein Tyrosine Kinase의 역할

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 폐연구소, 단국대학교 의과대학 내과학교실\*, 한국보훈병원\*\*

김재열, 박재석\*, 이귀래\*, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

### The Role of Protein Kinase C and Protein Tyrosine Kinase in the Signal Transduction Pathway of Stimulus Induced by Endotoxin in Peripheral Blood Monocyte

Jae Yeol Kim, M.D., Jae Suk Park\*, M.D., Gwi Lae Lee\*\*, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.,  
Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.

*Department of Internal Medicine and Lung Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Department of Internal Medicine Dankook University College of Medicine\*, Korea Veterans Hospital\*\*, Seoul, Korea*

**Background :** Endotoxin, the component of outer membrane of gram negative organism, plays an important role in the initiation and amplification of inflammatory reaction by its effects on inflammatory cells. Until recently, there have been continuing efforts to delineate the mechanisms of the signal transduction pathway of endotoxin stimuli on inflammatory cells. By uncovering the mechanisms of signal transduction pathway of endotoxin stimuli, we can expect to have tools to control the excessive inflammatory responses which sometimes may be fatal to the involved host. It was generally accepted that endotoxin exerts its inflammatory effects through inflammatory cytokines that are produced by endotoxin-stimulated inflammatory cells and there were some reports on the importance of protein kinase C and protein tyrosine kinase activation in the production of inflammatory cytokines by endotoxin. So we evaluated the effect of pretreatment of protein kinase C inhibitors (H7, Staurosporin) and protein tyrosine kinase inhibitors (Herbimycin, Genistein) on the endotoxin-stimulated cytokines (IL-8 & TNF- $\alpha$ ) mRNA expression.

**Method :** Peripheral blood monocytes were isolated from healthy volunteers by Ficoll-Hypaque density gradient method and purified by adhesion to 60mm Petri dishes. Endotoxin (LPS 100ng/ml) was added to each dishes except one control dish, and each endotoxin-stimulated dishes was preincubated with H7, Staurosporin (protein kinase C inhibitor), Herbimycin or Genistein (protein tyrosine kinase inhibitor) respectively except one dish. Four hours later the endotoxin stimulation, total RNA was extracted and Northern blot analysis for IL-8

이 논문은 95년도 추계 결핵 및 호흡기 학회에 같은 제목하에 발표된 논문임.

mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA was done.

**Result :** Endotoxin stimulation increased the expression of IL-8 mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA expression in human peripheral blood monocyte as expected and the stimulatory effect of endotoxin on TNF- $\alpha$  mRNA expression was inhibited by protein kinase C inhibitors(H7, Staurosporin) and protein tyrosine kinase inhibitors (Herbimycin, Genistein). The inhibitory effect of each drugs was increased with increasing concentration. The stimulatory effect of endotoxin on IL-8 mRNA was also inhibited by H7 and protein tyrosine kinase inhibitors (Herbimycin, Genistein) dose-dependently but not by Staurosporin.

**Conclusion :** Protein kinase C and protein tyrosine kinase are involved in the endotoxin induced signal transduction pathway in human peripheral blood monocyte.

**Key Words :** Endotoxin, Signal transduction pathway, Protein kinase C, Protein tyrosine kinase

## 서 론

그람 음성균의 세포벽을 구성하는 성분 중의 하나인 내독소(Endotoxin)는 염증 매개 세포들인 B 림프구, Myelomonocyte 계통의 세포들, Megakaryocyte 계통의 세포들, 혈관내벽세포 등에 작용하여 TNF- $\alpha$ , IL-8 등을 위시한 다양한 염증매개물질들을 분비하게하며<sup>1-5)</sup>, 이러한 염증매개물질들이 패혈증성 쇼크 등의 염증반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다. 지금까지 알려진 바로는 내독소의 이러한 작용은 혈장내에 존재하는 LPS binding protein(LBP)과 complex를 이루었을 때 더욱 증진되며<sup>6-8)</sup>, Myelomonocyte 계통의 세포들은 CD 14 이라는 glycosylphosphatidylinositol(GPI) anchored membrane protein이 내독소-LBP complex에 대한 수용체 역할을 하는 것으로 이해되고 있다<sup>8-9)</sup>. 하지만 CD14은 intracellular domain이 존재하지 않는 것으로 알려져있으며 따라서 내독소-LBP complex와 수용체인 CD14의 결합의 신호가 어떤 secondary messenger를 통해 전달되는 지에 대해서는 그 동안의 많은 노력에도 불구하고 아직까지는 확실한 규명이 이루어지지 않은 상태이다. 지금까지 밝혀진 바에 의하면 내독소의 수용체인 CD14이 내재적으로 secondary messenger system의 enzyme 중 하나인 protein tyrosine kinase의 활성을

나타낸다는 것이 알려져 있으며<sup>10)</sup> 내독소에 의하여 자극을 받은 세포에서 protein tyrosine kinase의 활성이 증가함이 보고된 바가 있다<sup>11)</sup>. 또한 insulin 등의 수용체에서 신호전달과정에 중요한 역할을 수행하는 protein kinase C의 활성이 내독소에 의한 신호전달과정에서도 중요한 역할을 수행하고 있다는 근거들이 제시된 바 있다<sup>12-14)</sup>. 이에 연구자들은 내독소에 의하여 유발된 염증반응의 신호전달에 있어서 protein tyrosine kinase와 protein kinase C의 역할을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 시약

Protein kinase C inhibitor인 H7과 Staurosporin은 Sigma Chemical Co에서 구입하였으며, H7은 증류수에 녹여서 10mM의 농도로 stock solution을 만든 뒤에 이를 희석하여 사용하였다. Staurosporin은 DMSO에 100  $\mu$ M의 농도로 stock solution을 만든 뒤에 희석하여 사용하였다. Protein tyrosine kinase inhibitor인 Herbimycin과 Genistein도 Sigma Chemical Co에서 구입하였으며 Herbimycin은 DMSO에 0.1mg/ml의 농도로 stock solution을 만든 뒤 희석하여 사용하였고, Ge-

nistein은 DMSO에 녹여서 10mg/ml의 농도로 stock solution을 만든 뒤 희석하여 사용하였다. stock LPS는 200 µg/ml의 농도로 RPMI1640에 녹여서 사용하였다.

## 2. 말초혈액 단핵구의 분리

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

## 3. TNF-α mRNA와 IL-8 mRNA 발현

### 3-1. 실험 조건

내독소 자극에 의한 염증매개성 cytokine의 발현에 secondary messenger system에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 protein kinase C와 pro-

tein tyrosine kinase에 대한 inhibitor를 전처리하였을 때 대표적인 염증매개성 cytokine인 TNF-α와 IL-8의 mRNA의 발현이 어떻게 달라지는지를 확인하기 위하여 내독소를 가하지 않은 군과 내독소(100 ng/ml)를 가한 군 그리고 내독소를 가하기 전에 protein kinase C inhibitor인 H7(50M, 30분전에 전처리)과 Staurosporin (50 µM, 30분전에 전처리) 그리고 protein tyrosine kinase inhibitor인 Herbimycin(1 µg/ml, 2시간전 전처리)과 Genistein(50 µg/ml, 전처리 시간없이 내독소와 같이 투여)으로 전처리한 군으로 나누었으며 내독소를 가한 지 4시간 뒤에 RNA를 분리하여 TNF-α mRNA와 IL-8 mRNA의 발현을 Northern blot analysis를 통하여 분석하였다(Table 1).

### 3-2. Northern Blot Analysis

Chomczynski와 Sacchi의 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 추출법<sup>15)</sup>을 이용하여 총 RNA를 추출하여 정량화한 뒤 동량의 RNA를 formaldehyde를 함유하는 1.2% agarose gel에 전기영동을 시행하여 분리시켰다. 전기영동 후 28S와 18S rRNA band의 정도로 동량의 RNA loading 여부

**Table 1.** The condition of experiment on TNF-α and IL-8 mRNA expression induced by endotoxin after pretreatment with protein kinase C inhibitors(H7, Staurosporin) or protein tyrosine kinase inhibitors(Herbimycin, Genistein).

	전처리 약제 작용	전처리 시간	RNA 분리 시간
Control			내독소 후 4시간
LPS			"
LPS + H7	PKC & PKA	30분	"
LPS + Herbimycin	PTK	2시간	"
LPS + Genistein	PTK	내독소와 동시투여	"
LPS + Staurosporin	PKC	30분	"

\*LPS ; lipopolysaccharide

PKC & PKA ; Protein kinase C & A

PTK ; Protein tyrosine kinase

를 관찰하였다. 전기영동한 gel의 RNA를 nylon membrane에 transfer시키고, RNA가 transfer된 membrane을 UV crosslinking을 시행하여 RNA를 membrane에 고정시켰다. Prehybridization후 65°

C에서  $^{32}\text{P}$ 로 labeling한 human TNF- $\alpha$  와 IL-8 cDNA를 표지자로 사용하여 hybridization을 시행하였다. IL-8 cDNA는 미국 NIH의 Dr. Crystal에게서 기증받았다. cDNA의 labeling은 Random

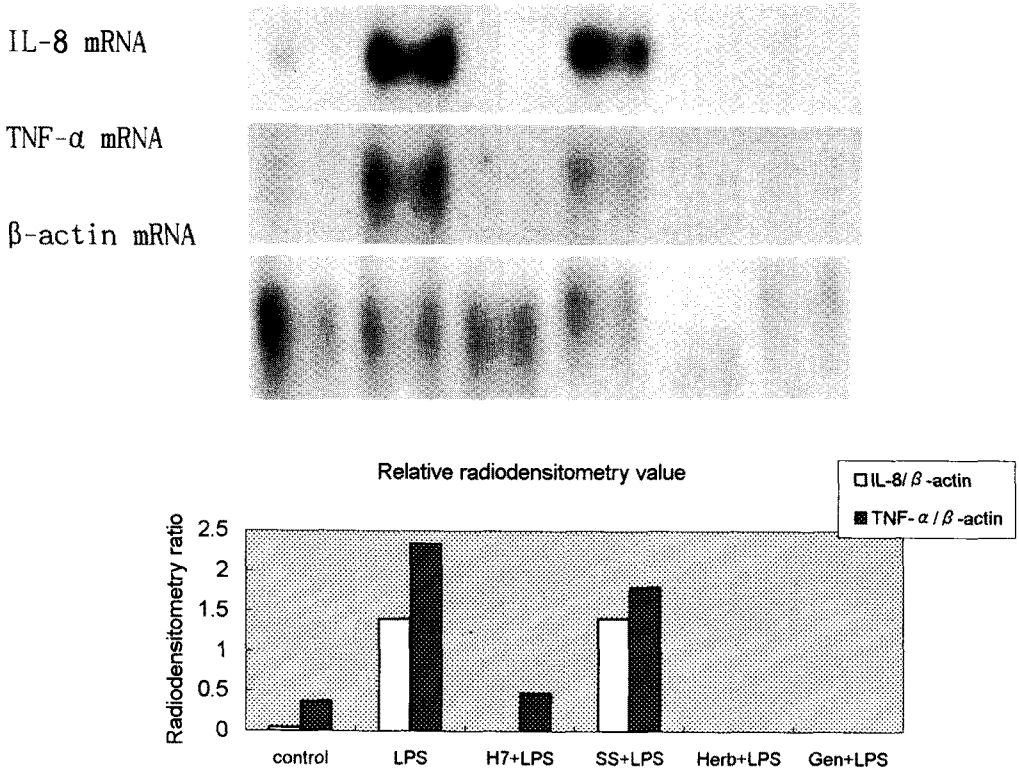


Fig. 1. The effect of protein kinase C inhibitors(H7, Staurosporin) and protein tyrosine kinase inhibitors(Herbimycin, Genistein) pretreatment on LPS induced IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression. The upper panel represents autoradiography results of Northern blot analysis for IL-8, TNF- $\alpha$  and  $\beta$ -actin mRNA respectively. The lower panel represents the relative radiodensitometry value of IL-8/ $\beta$ -actin and TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin ratio. Pretreatment with each drug before the LPS stimulation decreased the expression of TNF-8 mRNA. The expression of IL-8 mRNA after LPS was also decreased with pretreatment of H7, Herbimycin, Genistein, but pretreatment with Staurosporin did not decrease the expression of IL-8 mRNA.

LPS : Lipopolysaccharide (100 ng/ml)  
H7 : H7 (50  $\mu$ M)  
SS : Staurosporin (50nM)  
Herb : Herbimycin (1  $\mu$ g/ml)  
Gen : Genistein (50  $\mu$ g/ml)

IL-8 mRNA

TNF- $\alpha$  mRNA

$\beta$ -actin mRNA

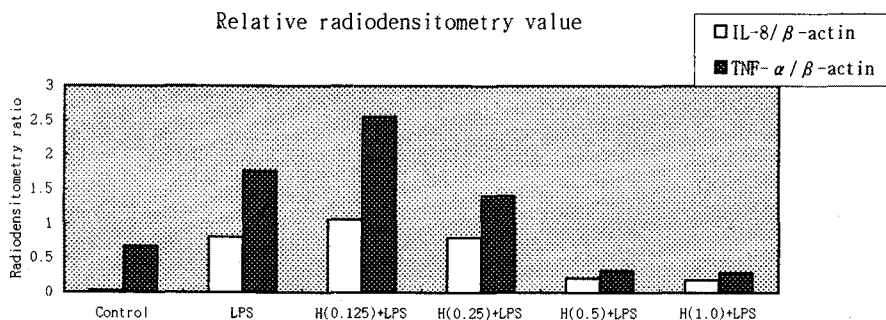
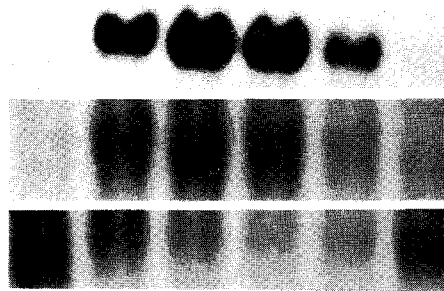


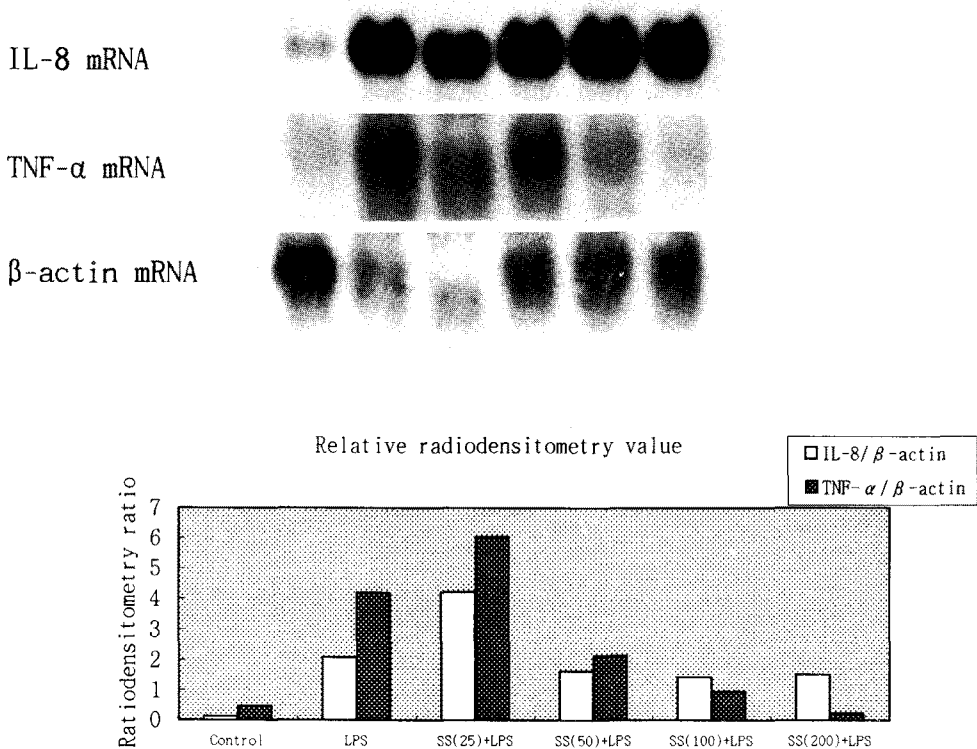
Fig. 2. The effect of H7 pretreatment on LPS induced IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression with increasing concentration. IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expressions were suppressed only in high concentration of H7(50  $\mu$ M) pretreatment.

Primed DNA Labeling Kit(StratageneR)를 이용하였다. Hybridization을 시행한 후 nylon membrane을 intensifying screen이 들어 있는 X-ray film cassette에 넣고  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 1~2일간 autoradiography를 시행하고 laser densitometry로 정량하였다.

## 결 과

1. Protein kinase C inhibitor(H7, Staurosporin)와 Protein tyrosine kinase inhibitor(Herbimycin, Genistein)의 전처치가 내독소 자극에 의한 TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 영향

내독소(100 ng/ml)로 자극한 군에서 대조군에 비하여 TNF- $\alpha$  mRNA 발현이 현저히 증가하였다. 이러한 내독소에 의한 TNF- $\alpha$  mRNA expression의 증가 효과는 protein kinase C inhibitor인 H7(50  $\mu$ M)과 Staurosporin(50nM)으로 30분 전에 전처치하였을 때 일관되게 억제되었으며, 또한 protein tyrosine kinase inhibitor인 Herbimycin(1  $\mu$ g/ml)으로 두 시간 전에 전처치한 경우와 같은 protein tyrosine kinase inhibitor인 Genistein(50  $\mu$ g/ml)을 내독소와 같이 투여한 경우에도 내독소에 의한 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 일관되게 억제되었다(Fig. 1). 각 약제들에 의한 이러한 억제효과는 농도의 증가에 따라 억제효과도 증가함이 확인되었는데, protein kinase C inhibitor로 전처치한 H7의 농도를 각각



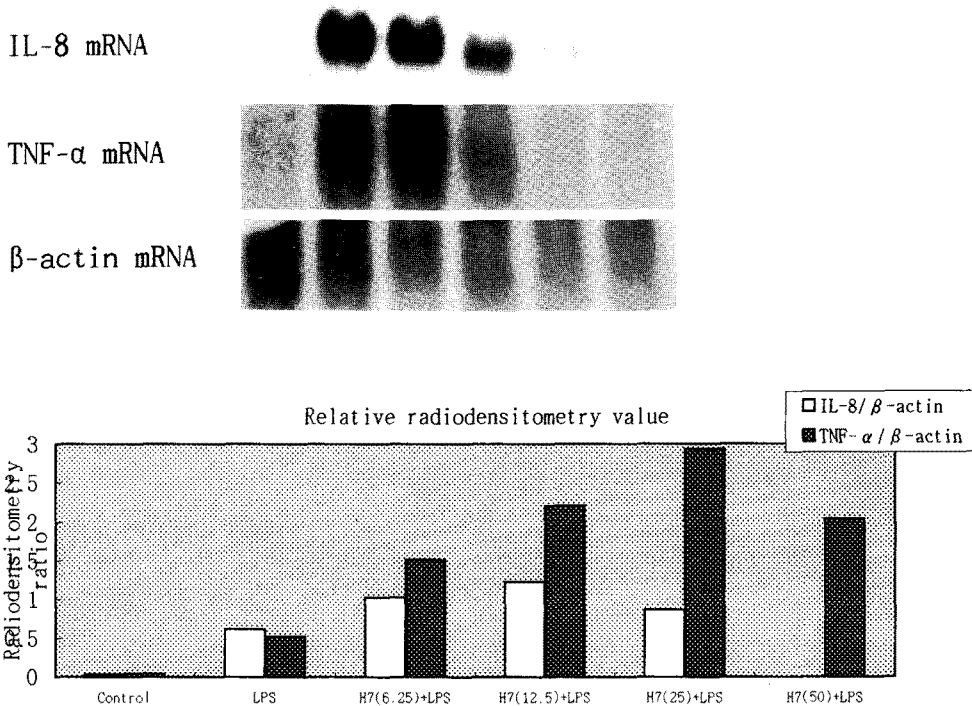
**Fig. 3.** The effect of Staurosporin pretreatment on LPS induced IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression with increasing concentration. The expression of TNF- $\alpha$  mRNA expression after LPS stimulation was suppressed by 30 minute pretreatment with Staurosporin and the suppressive effect was increased with increasing concentration of Staurosporin. But even with the highest concentration of Staurosporin we used, IL-8 mRNA expression was not suppressed.

6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M로 두 배씩 증가하였을 때, 처음의 세 농도 범위에서는 억제효과가 나타나지 않다가 50  $\mu$ M의 농도에서는 억제효과가 나타났으며(Fig. 2), 또한 전처치한 Staurosporin의 농도를 25nM부터 시작하여 50, 100, 200nM로 두 배씩 증가하였을 때 처음 25nM의 농도에서는 억제효과가 없었으나 나머지의 높은 농도들에서는 억제효과가 나타났다(Fig. 3). Protein tyrosine kinase inhibitor로 전처치한 Herbimycin의 농도를 0.125  $\mu$ g/ml부터 시작하여 0.25, 0.5, 1.0  $\mu$ g/ml로 각각 두 배씩 증가하였을 때, 처음의 낮은 두 농도보다 나중의 높은 두 농도의

전처치 시에 억제정도가 큰 것이 확인되었고(Fig. 4), Genistein의 농도를 6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ g/ml로 배가하면서 주었을 때 농도의 증가에 따라 억제정도가 더욱 큰 것이 확인되었다(Fig. 5).

## 2. Protein kinase C inhibitor(H7, Staurosporin)와 Protein tyrosine kinase inhibitor(Herbimycin, Genistein)의 전처치가 내독소 자극에 의한 IL-8 mRNA의 발현에 미치는 영향

내독소(100ng/ml)로 자극한 군에서 대조군에 비



**Fig. 4.** The effect of Herbimycin pretreatment on LPS induced IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression with increasing concentration. The expressions of both IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA after LPS stimulation were suppressed with 2 hour preincubation of Herbimycin and the effect was dose-dependent.

하여 IL-8 mRNA 발현이 현저히 증가하였다. 이러한 내독소에 의한 IL-8 mRNA expression의 증가 효과는 protein kinase C inhibitor인 H7(50  $\mu$ M)으로 30분 전에 전처리하였을 때 일관되게 억제되었으나 같은 protein kinase C inhibitor인 Staurosporin(50nM)으로 30분 전에 전처리하였을 때는 이러한 억제효과가 나타나지 않았다. 또한 protein tyrosine kinase inhibitor인 Herbimycin(1  $\mu$ g/ml)으로 두 시간 전에 전처리한 경우와 같은 protein tyrosine kinase inhibitor인 Genistein(50  $\mu$ g/ml)을 내독소와 같이 투여한 경우에도 내독소에 의한 IL-8 mRNA의 발현이 일관되게 억제되었다(Fig. 1). 각 약제들에 의한 이러한 억제효과는 농도의 증가에 따라 억제효과도 증가함이 확인되었는데, protein ki-

nase C inhibitor로 전처리한 H7의 농도를 각각 6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M로 두 배씩 증가하였을 때, 처음의 낮은 두 농도에서는 억제효과가 뚜렷하지 않다가 25  $\mu$ M의 농도에서는 억제효과가 나타났으며 50  $\mu$ M의 농도에서는 거의 완벽한 억제효과가 나타났다(Fig. 2). Protein tyrosine kinase inhibitor로 전처리한 Herbimycin의 농도를 0.125  $\mu$ g/ml부터 시작하여 0.25, 0.5, 1.0  $\mu$ g/ml로 각각 두 배씩 증가하였을 때, 처음의 낮은 두 농도보다 나중의 높은 두 농도의 전처치시에 억제정도가 큰 것이 확인되었고(Fig. 4), Genistein의 농도를 6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ g/ml로 배가하면서 주었을 때 농도의 증가에 따라 억제정도가 더욱 큰 것이 확인되었다(Fig. 5). Staurosporin은 IL-8 mRNA 발현에 대한 억제효과를

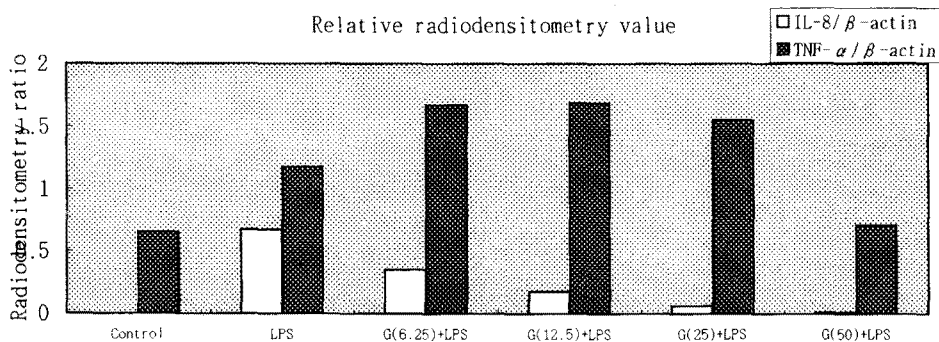
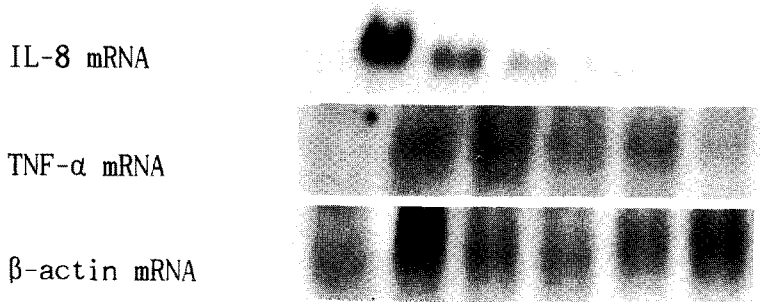


Fig. 5. The effect of Genistein pretreatment on LPS induced IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA expression with increasing concentration. The expressions of both IL-8 and TNF- $\alpha$  mRNA after LPS stimulation were suppressed by the treatment of Genistein with LPS and the effect was dose-dependent.

나타내지 않았으며 농도에 따른 억제효과의 차이도 나타나지 않았다(Fig. 3).

### 고찰

패혈증성 쇼크는 입원환자 특히 중증의 환자를 사망하게 하는 가장 중요한 원인 질환 중의 하나이며, 또한 패혈증성 쇼크는 다른 쇼크보다도 성인형 호흡곤란 증후군의 합병증을 유발하는 빈도가 더욱 높아서 호흡기의학 분야에서도 이의 병태생리와 궁극적으로는 치료 방법의 규명에 대한 지속적인 관심이 있어왔다. 지금까지 알려진 바로는 그람음성균에 의한 패혈증의 발생에는 그람음성균의 세포벽의 구성성분 중의 하나인 내

독소(LPS ; lipopolysaccharide)가 염증세포를 자극한 뒤 이 염증세포에서 분비되는 강력한 cytokine들인 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 등과 함께 혈액응고인자와 보체계통 그리고 kinin system 등의 생체활성물질들의 작용이 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다<sup>16)</sup>. 이러한 패혈증의 상태는 처음에는 숙주의 정상적인 방어작용의 일환으로 시작되지만 어떤 경우에는 항생제의 투여를 통하여 원인균이 제거된 뒤에도 숙주의 반응이 지속되고 증폭되어 결국에는 숙주의 사망까지 초래할 수 있는 것으로 이해되고 있다. 따라서 이러한 염증반응을 적절한 수준으로 조절함으로써 숙주를 보호할 수 있을 것이라는 가정이 가능하며 이를 위해서는 내독소에 의하여 발생한 자극이 어떤 경로를



통하여 염증반응의 발생 및 증폭을 가져오는 지에 대한 규명이 선행되어야 할 것으로 생각된다. 지금까지 알려진 바로는 단핵구 계통의 세포들에서는 세포막에 부착된 CD14이라는 단백질이 내독소와 내독소결합단백질(LPS binding protein)에 대한 수용체 역할을 하는 것으로 알려져 있으며<sup>17-19)</sup>, 내독소-내독소결합단백질의 복합체가 수용체인 CD14에 결합되면서 이에 대한 반응이 세포내에서 전달되어 염증을 일으키는 cytokine의 생성을 증가시키는 것으로 가정되어지고 있다. 하지만 CD14은 세포막 밖으로만 돌출되어있을 뿐이고 세포막내로는 돌출이 되어지지 않은 것으로 알려져 있어서 내독소와 수용체와의 결합이 어떻게 신호전달체계에 전달이 되는 지에 대한 의문은 아직 해결이 되지 않고 있으며, 또한 어떤 식으로든 이 신호가 전달이 된다고 할지라도 다양한 신호전달체계에 관여하는 여러 계통물질 중에서도 어떤 것에 의하여 이루어지는 지는 아직 확실하게 규명이 되지 않은 상태이다. 지금까지 알려지 바로는 CD14의 immunoprecipitates가 protein tyrosine kinase의 활성을 나타내는 것이 확인이 되어서<sup>10)</sup>, 이 효소계통과 연관이 있음이 시사된 바가 있으며, 사람의 혈소판세포를 Salmonella Minnesota Re595의 내독소로 자극하였을 경우에는 protein kinase C가 활성화되는 것이 확인된 바가 있다<sup>20)</sup>. 이에 연자들은 사람의 염증반응의 발생 및 증폭과정에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 말초혈액단핵구를 대상으로하여 내독소에 의한 자극이 세포내로 전달되는 과정에서 상기한 protein tyrosine kinase와 protein kinase C의 활성이 이루어지는 지를 살펴보고자 하였으며, 이의 확인을 위하여 protein tyrosine kinase와 protein kinase C의 활성을 방해하는 것으로 알려져 있는 약제에 의한 전처치에 의하여 과연 내독소에 의한 자극에 의하여 발생이 증가되는 것으로 확인된 TNF- $\alpha$ 와 IL-8 mRNA의 발현이 억제되는 지를 확인하여, 내독소 자극 신호의 전달과정에서 상기한 두 효소의 역할을 간접적으로 알아보았다. 결과에서 나타난 바와 같이 protein kinase C inhibitor인 H7과 Staurosporin

그리고 protein tyrosine kinase inhibitor인 Herbimycin과 Genistein 모두 내독소 자극에 의한 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현을 억제하였으며, 이러한 억제 효과는 전반적으로 농도의 증가에 따라 억제효과가 또한 증가함이 확인되었다. TNF- $\alpha$ 와 함께 염증반응에서 호중구에 대한 주화작용 등을 포함한 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 IL-8 mRNA의 발현에 대한 상기한 약제들의 억제효과를 확인한 실험에 있어서는 다른 결과들은 TNF- $\alpha$ 의 경우와 같은 결과를 보였으나, protein kinase C inhibitor 중 하나였던 Staurosporin은 TNF- $\alpha$ 의 경우와는 달리 내독소에 의한 IL-8 mRNA의 발현증가에 대한 억제효과를 나타내지 않았다. 이것은 Staurosporin 자체가 IL-8 mRNA의 발현을 촉진시키는 효과가 있기 때문으로 생각된다. Cassatella 등에 의하면<sup>21)</sup> human neutrophil에서 Staurosporin은 내재적으로 IL-8 mRNA 발현을 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났으며, Staurosporin 자체에 내재하는 이러한 작용이 protein kinase C inhibitor로서 IL-8 mRNA 발현을 억제시키는 효과와 상충되어 최종적으로는 IL-8 mRNA 발현에 별다른 영향을 미치지 못하는 결과 나온 것으로 판단된다. 이상의 결과를 요약하여 볼 때 사람의 말초혈액단핵구에서 내독소에 의한 자극은 protein tyrosine kinase와 protein kinase C의 활성을 통하여 이루어진다는 추론이 가능하며, 본 연구에서 얻어진 결과를 바탕으로하여 내독소에 의하여 일어나는 염증의 증폭반응을 억제할 수 있는 또 하나의 수단을 알아낼 수 있다는 나름대로의 의의가 있다고 생각된다. 하지만 결과에서도 관찰되었듯이 상기한 약제들에 의한 억제효과는 실험에 이용한 가장 높은 농도에서도 완전한 억제효과를 나타내지 못하고 부분적인 효과만 나타내었다는 점이 문제가 될 수가 있으며, 이러한 in vitro 실험의 결과를 바탕으로 하여 상기한 약제들이 실제적으로 폐혈증과 같은 질환에서의 치료제로서 사용할 수 있기까지는 아직 해결해야 될 문제가 많을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL : Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84** : 1045, 1989
2. Forschungsinstitut S : Neutrophil attractant/activation protein-1(Interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur. J. Immunol.* **23** : 303, 1993
3. Agace WW, Hedges SR, Ceska M, Svanborg C : Interleukin-8 and the neutrophil response to mucosal gram-negative infection. *J. Clin. Invest.* **92** : 780, 1993
4. Leonard EJ, Yoshimura T : Neutrophil attractant/activation protein-1(NAP-1[IL-8]). *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* **2** : 479, 1990
5. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K : Properties of the novel proinflammatory supergene "Interleukin" cytokine family. *Ann. Rev. Immunol.* **9** : 617, 1991
6. Peter S, Tobias J, John C. Mathison, Richard J. Ulevitch : A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis. *J. Biol. Chem.* **263** : 13479, 1988
7. Samuel D. Wright, Robert A. Ramos, Anne Hermanowski-Vosatka, Pamela Rockwell, Patricia A. Detmers. Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin : Dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J. Exp. Med.* **173** : 1281, 1991
8. Christian R. H. Raetz, Richard J. Ulevitch, Samuel D. Wright, Carol H. Sibley, Alhao Ding, Carl F. Nathan : Gram-negative endotoxin : an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.* **5** : 2652, 1991
9. Steven L. Weinstein, Carl H. June, Anthony L. DeFranco : Lipopolysaccharide-induced protein tyrosine phosphorylation in human macrophage is mediated by CD14. *J. Immunol.* **151** : 3829, 1993
10. Stifanova I, Horejsi V, Ansoategui IJ, Knapp W, Stockinger H. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinase. *Science* **254** : 1016, 1991
11. Wernstein SL, Gold MR, DeFranco AL : Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 4148, 1991
12. Grabarek J, Timmons S, Hawiger J : Modulation of human platelet protein kinase C by endotoxic lipid A. *J. Clin. Invest.* **82** : 964, 1988
13. Romano M, Hawiger J : Interaction of endotoxic lipid A and lipid X with purified human platelet protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **265** : 1765, 1990
14. Grabarek J, Her G-R, Reinhold VN, Hawiger J : Endotoxic lipid A interaction with human platelets. Structure-function analysis of lipid A homologs obtained from *Salmonella minnesota* Re595 lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **265** : 8117, 1990
15. Chomczynski P, Sacchi N : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem.* **162** : 156, 1987
16. Morrison DC, Ryan JL : Endotoxin and disease mechanism. *Annu. Rev. Med.* **38** : 417, 1987
17. Wright SD, Ramos RA, Hermanowski-Vosatka S, Rockwell P, Detmers PA : Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J. Exp. Med.* **173** : 1281, 1991
18. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ,

- Mathison JC : CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide(LPS) and LPS binding protein. *Science* **249** : 1431, 1990
19. Low MG : The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* **988** : 427, 1989
20. Grabarek J, Timmons S, Hawiger J : Modulation of human platelet protein kinase C by endotoxic lipid A. *J. Clin. Invest* **82** ; 964, 1988
21. Marco A, Cassatella, M, Aste, F, Calzetti, G, Constantin, I, Guasparri, M, Ceska, F, Rossi : Studies on the regulatory mechanisms of interleukin-8 gene expression in resting and IFN- $\gamma$ -treated neutrophils : Evidence on the capability of staurosporin of inducing the production of interleukin-8 by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190** : 660, 1992