大韓微生物學會誌 第34卷 第6號 1999
J. Korean Soc. Microbiol., Vol. 34, No. 6, 1999

세균독소와 Mycoplasmas 항원으로 자극시킨 사람 섬유아세포의 Interleukin-6와 Interleukin-8 생성의 변화

고신대학교 의과대학 미생물학교실

김 광 혁 · 장 명 웅

=Abstract=

Production of IL-6 and IL-8 in Human Fibroblasts Stimulated with Mycoplasma Lysates and Bacterial Toxins

Kwang-Hyuk Kim and Myung-Woong Chang

Department of Microbiology, Kosin Medical College, Pusan, Korea

Cytokines are hormone-like proteins which mediate and regulate inflammatory and immune responses. The purpose of this study was to investigate the effect of lipopolysaccharide (LPS), Staphylococcus enterotoxin B (SEB), and Mycoplasma lysates on regulation of IL-6 and IL-8 production by human nasal fibroblasts.

Primary cultured cells were incubated with LPS (1.0 μg/ml) from *E.coli*, SEB (1.0 μg/ml) from *S.aureus*, or Mycoplasma lysates (*M.pneumoniae*, Mp; *M. fermentans*, Mf; *M. hominis*, Mh, each 1.0 μg/ml). The culture supernatants were collected at 2, 6, and 24 hr and assessed for IL-6 and IL-8 production by enzyme-linked immunosorbent assay.

The production of IL-6 in the culture supernatant was downregulated by LPS, SEB, or Mycoplasma lysates. But IL-6 was upregulated by mixed exposure with Mp+LPS (2 hr), Mp+LPS+SEB (24 hr), Mf+LPS (24 hr), Mf+LPS+SEB (2 hr), Mh+LPS (24 hr), Mh+SEB (24 hr), or Mh+LPS+SEB (24 hr).

The production of IL-8 in the culture supernatant was similar to that of IL-6 by same stimulants. But IL-8 was upregulated by mixed exposure with Mf+LPS+SEB (2 hr), Mh+LPS (24 hr), Mh+SEB (24 hr), or Mh+LPS+SEB (24 hr). These studies show that costimulation of LPS or SEB with Mycoplasma whole cell lysates upregulates the production of IL-6 and IL-8.

Key Words: Human Fibroblast, Interleukin-6, Interleukin-8

서 론

Interleukin-6 (IL-6)은 단구, B 세포, T 세포, 혈관내피세포, 섬유아세포, 피부 각질세포 등의 세포에서 생성되는 다 기능성 사이토카인이다[14,15,17,21,30,38]. IL-6은 당초 B cell stimulatory factor 2 (BSF 2), hybridoma/plasmacytoma growth factor (HPGF), hepatocyte stimulating factor (HSF), interferon-β2 (IFN-β2) 등으로 각각 따로 분리되었으나 이들은 모두 26 KD의 같은 물질로 판명됨으로서 IL-6으로 통일되었다[19]. IL-6의 기능으로서 B 세포에 대하여는 면역글로불린 생성을 유도하고, T 세포에 대하여는 killer T 세포의 유도, IL-2 수용체 발현

접수 : 2000년 1월 27일, 게재결정 : 2000년 1월 27일
Corresponding author: 김광혁, Department of Microbiology, Kosin Medical College, Pusan, Korea

유도, 증식 유도, 조혈간세포에 대하여는 Go기의 단축, 거핵세포에 작용하여 혈소판 생성 유도, 각질세포, 신장 사구체간질세포, 골수종 세포의 증식 유도, 염증 시 간세포로부터의 급성기단백 생성 유도, 알부민 생성억제 등의 작용이 있음이 *in vitro* 실험을 통하여 밝혀졌다[24,29]. 생체에서 IL-6의 생성이 항진되면 고 감마 글로불린혈증, 급성기단백 증가, 혈소판 증가 등의 특징적인 증상을 보이게 되며 IL-6의 생성이 조절되지 않는 질환으로는 심장 점액종, 류마티스양 관절염, Castlemans's 질환, 형질세포종, 골수종, 건선 등이 있다[5,7,9,11,16,22,23,27,31,36,39]. 급성기반응은 염증이나 조직 손상에 대한 전신반응이다[34]. 보통 급성기단백이 상승됨과 함께 백혈구증다증, 발열, 혈관투과성항진, 혈장 내 금속이온 및 스텔로이드 농도의 변화가 나타난다[10,37]. 간세포에 의한 급성기단백의 생 합성은 몇몇 인자, 즉 IL-1, TNF, HSF에 의해서 조절된다[8,28,35]. IL-1은 주요 급성기 조절자로 처음에는 생각되었지만 단지 부분적으로 급성기반응을 유도할 수 있다. 재 조합 IL-6과 항-IL-6 항체를 이용한 실험을 통하여 IL-6가 HSF로서 작용하게 되며 단구배양에서의 HSF 활성은 IL-6에 의해서 발휘된다는 것이 밝혀졌다[2,12]. IL-6은 사람 간암세포주인 HepG2 세포에서 파이브리노젠, 알파1-항키모트립신, 알파1-산-당단백, 합토글로빈과 같은 다양한 급성기단백을 유도한다. 이러한 단백들에 추가하여 사람 간세포의 초대배양 (primary culture)에서는 혈청 아밀로이드 A, C-반응단백, 알파1-항트립신을 유도한다[6]. 쥐에 IL-6를 투여했을 때 turpentine을 주사하여 나타나는 반응과 유사한 전형적인 급성기반응을 유도한다. 더욱이, IL-6으로 유도시킨 급성기단백에 대한 mRNA의 발현은 turpentine에 의해서 유도되는 반응보다 빨리 나타난다[13]. 이러한 결과를 통하여 급성기반응에 있어서 IL-6의 생체 내 역할을 알 수 있다. 또한 혈청 내 IL-6의 량은 화상 환자에서 발열 및 C-반응단백의 량과 깊은 상관관계를 나타내며 이러한 것들은 급성기반응에서의 IL-6의 원인론적 역할을 보여주게 된다[25].

Interleukin-8 (IL-8)은 lipopolysaccharide (LPS)로 자극시킨 단핵구에서 분비되는 호중구주화성인자로 처음 밝혀졌지만 이후 비교적 다양한 세포들에서 생성되고 있음이 알려지고 있다. 즉, 단구를 비롯하여 mitogen으로 자극시킨 T림프구, 호중구, 호산구, 섬유아세포, 활액세포, 내피세포, 중피세포, 상피세포, 각질세포 등이 생성세포에 포함된다[4,10,18,20,22,32,33]. 또한 그 기능에 있어서도 호중구의 주화를 자극시킬 뿐만이 아니라 호중구의 탈 과립을 유도하고 T림프구와 호염기구의 주화를 유도시킴이 시험관 실험 결과 나타났다. 생체실험에 있어서 IL-8이 나타내는 생물활성은 피부에 주사하였을 때 호중구와 림프구가 주사부위로 침윤되는 것을 볼 수 있게 되고 국소 림프절로의 림프구 유주현상, 말초혈액 내에 호중구 수의 증가, 혈관의 투과성항진, 관절활막과 폐포의 파괴 등이 나타난다[1,3,26].

본 실험에서는 정상인의 하비갑개 (inferior turbinate of nose)로부터 분리한 섬유아세포를 초대배양하고 여기에 mycoplasmas 항원이나 *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB), LPS와 같은 독소를 노출시키거나 이들을 혼합 자극시켰을 때 나타나는 염증관련 물질로서의 IL-6과 IL-8의 생성능을 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 섬유아세포의 배양

정상인의 하비갑개 (inferior turbinate of nose)로부터의 조직절편 2~5 mm^3를 무균적으로 생검하여 1 mm^3 크기로 절편한 후 조직을 우태아혈청 (fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 10% 추가하여 만든 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco, Grand Island, USA) 2 ml을 적하한 60 mm 조직배양용 접시 (Costar, Cambridge, USA)에 정치하고 멸균된 cover slip으로 고정한 뒤 37℃, 5% CO_2 배양기에 넣어 3~4일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 약 3주 후에 배양용 접시 전체에 단층으로 형성된 섬유아세포로부터 배지를 흡입하여 버리고 phosphate buffered saline (PBS)로 1회 세척한 후 0.25% trypsin 0.3 ml을 첨가한 후 배양기에서 5분 동안 방치하였다. 박리된 세포들은 10% FCS EMEM으로 재 부유시켜 사이토카인 생성세포로 사용하였다.

2. 섬유아세포 배양상층액의 준비

1) Mycoplasmas 항원, LPS 및 SEB의 준비

Deep freezer에 보관중인 Mycoplasma 균주들 중 *M. pneumoniae* (Mp), *M. fermentans* (Mf), *M. hominis* (Mh)를 각각 Chanock 증균배지 5 ml에 접종하

여 5~7일간 배양하였다. 배양된 균액을 증균용배지 100 ml, 1000 ml, 4000 ml 순으로 증균시켜 이를 20,000 g에서 1시간 원침하였다. 상층액을 제거한 후 균체들 만을 다시 PBS로 3회 씻은 다음 20 ml의 PBS로 부유시켰다. 균부유액을 100 watt에서 10분간 초음파처리 한 후 단백질 농도를 측정하여 사용하였다. Lipopolysaccharide (LPS)와 *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB)는 Sigma 사 (Sigma, St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) Interleukin-6 (IL-6)과 interleukin-8 (IL-8)의 생성

부유시킨 섬유아세포 (2.5×10^5/ml) 1 ml씩을 24 wells 배양용 plate (Corning, NY, USA)에 분주한 후 단독노출의 경우에는 ml 당 mycoplasmas 항원 1.0 μg, LPS 1.0 μg, SEB 1.0 μg을 각각 작용시켰다. 중복노출의 경우에는 먼저 mycoplasmas 항원 1.0 μg씩을 작용시킨 후 LPS나 SEB를 추가노출시켰다. 이들을 37℃, 5% CO_2 배양기에서 2, 6, 24시간 동안 배양하여 배양상층액을 수거하였다. 용량별 시험 well은 triplicate로 시행하였다. 수거된 배양상층액은 300 g에서 30분간 원침시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70℃에 보관하면서 IL-6와 IL-8 생성효과 측정에 사용하였다.

3. IL-6의 측정

IL-6의 측정은 PREDICTA® Human IL-6 ELISA kit (Genzyme, Cambridge, U.S.A.)을 이용하였다. 간략하면 미리 IL-6에 대한 모노클론항체가 부착된 96 wells microplate의 각 well에 시료 100 μl씩을 적하하여 37℃ 배양기에서 30분 동안 방치하였다.

Table 1. Production of IL-6 in cultures of human fibroblast with toxins and Mycoplasma lysate (ng/ml)

	Hours		
	2	6	24
Mp+LPS	1.90 ± 0.03^b	1.19 ± 0.06^b	1.28 ± 0.05^a
Mp+SEB	1.40 ± 0.05^b	1.54 ± 0.12^a	1.33 ± 0.08
Mp+LPS+SEB	1.21 ± 0.07^b	1.70 ± 0.01^b	1.73 ± 0.08^b
Mf+LPS	1.17 ± 0.05^b	1.47 ± 0.14^a	1.67 ± 0.03^b
Mf+SEB	1.48 ± 0.11^a	1.39 ± 0.09^b	1.23 ± 0.11
Mf+LPS+SEB	1.80 ± 0.03	1.65 ± 0.12	1.30 ± 0.01
Mh+LPS	1.40 ± 0.07^b	1.78 ± 0.12	1.86 ± 0.03^b
Mh+SEB	1.42 ± 0.17	1.58 ± 0.01^b	1.80 ± 0.04^b
Mh+LPS+SEB	1.70 ± 0.01	1.60 ± 0.01^b	1.60 ± 0.04^a
LPS	1.12 ± 0.06^b	0.98 ± 0.02^b	1.09 ± 0.08^b
SEB	1.30 ± 0.08^b	0.72 ± 0.03^b	0.91 ± 0.17^a
Mp	0.96 ± 0.04^b	1.30 ± 0.07^b	0.97 ± 0.10^b
Mf	0.81 ± 0.02^b	1.13 ± 0.06^b	1.23 ± 0.03^b
Mh	0.84 ± 0.04^b	0.99 ± 0.01^b	0.99 ± 0.01^b
Control	1.72 ± 0.03	1.85 ± 0.01	1.42 ± 0.04

Human fibroblasts (2.5×10^5/ml) were cultivated with toxins (lipopolysaccharide, LPS; Staphylococcus enterotoxin B, SEB, 1.0 μg each) and Mycoplasma (*M. pneumoniae*, MP; *M. fermentans*, Mf; *M. hominis*, Mh, 1.0 μg each) lysates for 2, 6, and 24 hr. IL-6 was mesured in the culture supernatant. Data are mean±SD.
[a] : $p<0.05$ compared with control. [b] : $p<0.01$ compared with control.

세척용 완충액으로 5번 세척한 후 biotinylated 항체액 100 μl씩을 적하하여 다시 37℃ 배양기에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 peroxidase labeled avidin 액 100 μl씩을 적하하여 다시 37℃ 배양기에서 15분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine 기질액 100 μl씩을 적하하여 다시 실온에서 10분 동안 방치하였다. 여기에 stop 액 100 μl씩을 가한다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. standard curve 작성을 위한 시험도 동시에 시행하였다.

4. IL-8의 측정

IL-8의 측정은 PREDICTA® Human IL-8 ELISA kit (Genzyme, Cambridge, U.S.A.)을 이용하였다. 간략하면 미리 IL-8에 대한 모노클론항체가 부착된 96 wells microplate의 각 well에 시료희석액 50 μl씩을 작용시킨다음 시료 50 μl씩을 적하하여 실온에서 60분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 biotinylated 항체액 100 μl씩을 적하하여 다시 실온에서 90분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 streptavidin 액 100 μl씩을 적하하여 다시 실온에서 20분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 tetramethylbenzidine 기질액 100 μl씩을 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 여기에 stop 액 100 μl씩을 가하였다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 표준곡선의 작성

Table 2. Production of IL-8 in cultures of human fibroblast with toxins and Mycoplasma lysate (ng/ml)

	Hours		
	2	6	24
Mp+LPS	2.09±0.05[b]	1.80±0.05[b]	1.73±0.01[b]
Mp+SEB	1.69±0.01[b]	1.73±0.10[b]	2.11±0.05[a]
Mp+LPS+SEB	1.76±0.01[b]	2.05±0.02[b]	2.10±0.05[a]
Mf+LPS	1.81±0.02[b]	2.15±0.01[b]	2.12±0.02[b]
Mf+SEB	1.76±0.05[b]	2.16±0.05[b]	2.17±0.06
Mf+LPS+SEB	2.42±0.01[b]	2.17±0.06[b]	2.20±0.02[a]
Mh+LPS	2.22±0.01[a]	2.21±0.08[a]	2.46±0.07[a]
Mh+SEB	2.23±0.02	2.33±0.11	2.44±0.04[a]
Mh+LPS+SEB	2.26±0.04	2.53±0.04	2.56±0.01[b]
LPS	1.44±0.02[b]	1.09±0.01[b]	1.14±0.01[b]
SEB	1.09±0.07[b]	1.14±0.03[b]	1.26±0.03[b]
Mp	1.07±0.05[b]	1.31±0.05[b]	1.36±0.01[b]
Mf	1.07±0.03[b]	1.31±0.02[b]	1.28±0.05[b]
Mh	1.09±0.01[b]	1.25±0.01[b]	1.03±0.04[b]
Control	2.28±0.02	2.55±0.09	2.28±0.03

Human fibroblasts (2.5×10^5/ml) were cultivated with toxins (lipopolysaccharide, LPS; Staphylococcus enterotoxin B, SEB, 1.0 μg each) and Mycoplasma (*M. pneumoniae*, MP; *M. fermentans*, Mf; *M. hominis*, Mh, 1.0 μg each) lysates for 2, 6, and 24 hr. IL-6 was mesured in the culture supernatant. Data are mean±SD.
[a] : $p<0.05$ compared with control. [b] : $p<0.01$ compared with control.

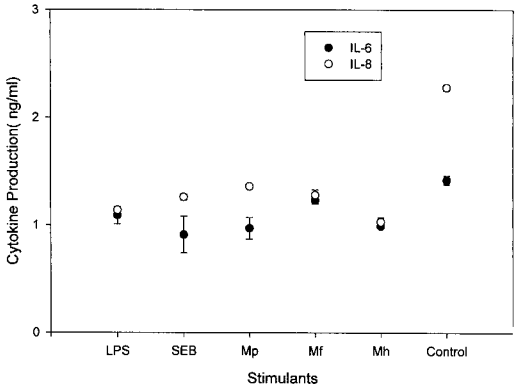

Figure 1. Production of IL-6 and IL-8 in cultures of human fibroblast exposed to stimulants. Supernatants were collected after 24 hr. Cultures were exposed to LPS (1.0 μg/ml), SEB (1.0 μg/ml), or Mycolyplasma lysates (*Mycoplasma pneumoniae*, Mp; *M. fermentans*, Mf; *M. hominis*, Mh each 1.0 μg/ml) during the entire culture period. Data are mean±SD.

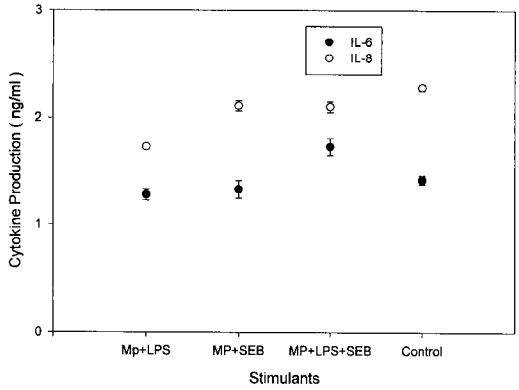

Figure 2. Production of IL-6 and IL-8 in cultures of human fibroblast exposed to *M. pneumoniae* plus bacterial toxins. Supernatants were collected after 24 hr. Cultures were exposed to *M. pneumoniae* lysate (Mp, 1.0 μg/ml) plus LPS (1.0 μg/ml) and SEB (1.0 μg/ml) during the entire culture period. Data are mean±SD.

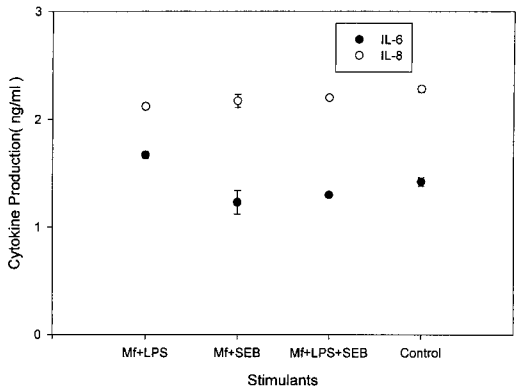

Figure 3. Production of IL-6 and IL-8 in cultures of human fibroblast exposed to *M. fermentans* plus bacterial toxins. Supernatants were collected after 24 hr. Cultures were exposed to *M. fermentans* lysate (Mp, 1.0 μg/ml) plus LPS (1.0 μg/ml) and SEB (1.0 μg/ml) during the entire culture period. Data are mean±SD.

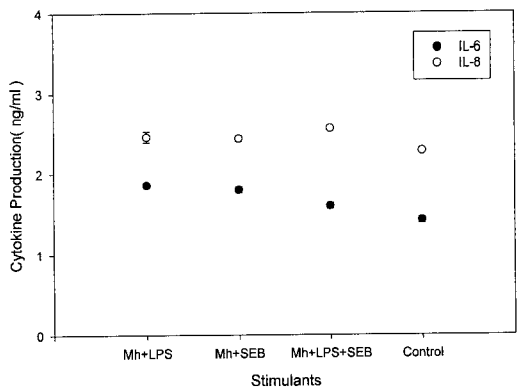

Figure 4. Production of IL-6 and IL-8 in cultures of human fibroblast exposed to *M. hominis* plus bacterial toxins. Supernatants were collected after 24 hr. Cultures were exposed to *M. hominis* lysate (Mp, 1.0 μg/ml) plus LPS (1.0 μg/ml) and SEB (1.0 μg/ml) during the entire culture period. Data are mean±SD.

을 위한 시험도 동시에 시행하였다.

5. 통계학적 분석

실험 성적은 평균 또는 평균±표준편차로 나타냈으며 각 군간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 p값이 0.05 이하일 때 의의있는 차로 간주하였다.

결 과

초대배양한 사람 섬유아세포에 lipopolysaccharide (LPS), *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB), 혹은 mycoplasmas 항원을 단독노출시키거나 mycoplasmas 항원노출과 함께 LPS 혹은 SEB를 중복노출시켰을 때 세포로부터 유출되어 나타나는 IL-6과 IL-8을 정량 분석하였다.

세포에 자극물들을 단독으로 작용시켜 얻은 배양상층액의 IL-6의 농도는 Table 1에 나타난 바와 같다. 대조 군에 비하여 유의성 있는 감소가 각 시간대에서 나타나고 있다. 그러나 mycoplasmas 항원노출과 함께 LPS나 SEB를 작용시켰을 때는 mycoplasmas 항원 단독노출 때보다 증가되는 경향을 보였으며 *M. pneumoniae* (Mp)+LPS 작용 2시간, Mp+LPS+SEB 작용 24시간, *M. fermentans* (Mf)+LPS 작용 24시간, Mf+LPS+SEB 작용 2시간, *M. hominis* (Mh)+LPS나 Mh+SEB 혹은 Mh+LPS+SEB 작용은 모두 24시간째에서 대조 군보다 상승되어 나타났다.

세포에 자극물들을 단독으로 작용시켜 얻은 배양상층액의 IL-8의 농도는 Table 2에 나타난 바와 같다. 모든 자극물의 노출에서 대조 군보다 유의성 있는 감소를 보였다. 그러나 중복노출의 경우에는 Mf+LPS+SEB 작용 2시간째에서 상승효과를 보였으며 Mh+LPS나 Mh+SEB 혹은 Mh+LPS+SEB 작용은 모두 24시간째에서 IL-6의 생성 때와 마찬가지로 대조 군에 비하여 상승을 보였다.

IL-6와 IL-8의 생성을 비교하면 세포만의 배양에서 24시간째에 IL-8이 IL-6 보다 높게 생성되고 있으며 각 자극물의 단독노출 시 IL-8의 생성이 IL-6의 생성 때보다 큰 폭으로 감소하고 있다. IL-6의 경우 Mh 노출에서 감소효과가 가장 크게 나타났으며 IL-8은 SEB 노출에서 가장 크게 저하되었다 (Fig. 1). Mp와의 중복노출에서는 IL-8의 경우 대조 군에 비하여 비교적 완만한 감소효과를 보였으며 Mp+LPS 작용군에서 가장 큰 감소효과를 보였다. 그러나 IL-6은 Mp+LPS+ SEB 작용 시 오히려 상승효과를 보이고 있다 (Fig. 2). Mf와의 중복노출에서는 Mf+LPS 작용군에서만 상승되고 있다 (Fig. 3). Mh와의 중복노출에서는 모든 노출군에서 IL-6 및 IL-8 모두 상승되는 특징을 보였다 (Fig. 4).

고 찰

사이토카인이 생체에 미치는 작용은 양면성을 가지고 있기 때문에 감염숙주로부터 생성된 각종 사이토카인은 감염방어의 직접적 발현이나 감염방어면역의 유도에 불가결한 작용을 나타내는 한편, 발열이나 쇼크, 염증성 육아종 등 생체에 이롭지 못한 감염병 형성에도 한 역할을 맡고 있다[24,29].

IL-6는 분자량 26 KD의 당단백질로서 212개의 아미노산으로 구성되어 있으며 B 세포에 작용하여 그의 분화와 항체 생성을 촉진하고 간세포에도 작용하여 단백질의 생성을 자극함으로서 여러 염증반응에 관여한다[23,27,31,36,39].

IL-8은 케모카인의 일종으로서 72~79개의 아미노산으로 이루어진 분자량 6~8 KD의 폴리펩타이드이다. 여러 가지 염증성 질환에서 그 생성이 증가하고 있으며 호중구, T림프구, 호염기구를 염증조직에 유주시키는 백혈구주화성활성인자로서 작용하고 있다[4,18,20,33].

감염부위에서 염증이 야기되면 IL-8과 같은 주화인자에 의해서 모여든 호중구나 대식세포 등이 세균과 접촉하여 IL-6 등의 염증성 사이토카인을 생성한다[1,3,26].

본 실험에서는 초대배양한 사람의 섬유아세포에 자극물로서 이용되는 세균독소인 lipopolysaccharide (LPS), *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB)나 mycoplasmas 항원을 단독으로 작용시키거나 mycoplasmas 항원과 함께 LPS나 SEB를 추가 작용시켰을 때 세포에서 생성되어 유출되는 IL-6과 IL-8의 양에 어떤 차이가 있는지를 결정하기 위하여 배양시간에 따른 세포 배양상층액을 수거하여 정량하였다.

IL-6의 생성은 자극물 없이 세포만의 배양에서 상당량 생성됨으로서 섬유아세포가 아닌 다른 종류의 세포들에서도 IL-6의 생성이 확인된 타 연구자들의 성적과 일치하였다[4]. 그러나 LPS를 비롯한 전 자극물들을 단독으로 노출시켰을 때 세포만의 배양 때보다 각각의 시간대에서 유의한 감소를 보임으로서 타 연구자들에 의해서 밝혀진[14,11,19,34], 대식세포를 비롯한 다른 세포배양에서 보여지는 증가효과와는 차이를 보였다 (Table 1). *M. pneumoniae* (Mp) 항원과의 중복노출에서는 전반적으로 단독노출 때보다 증가되는 양상을 보였으며 자극물과 배양시간에 따라서는 대조 군보다 높게 나타나는 경우도 있었다. 즉, Mp+LPS 노출, 2시간과 Mp+LPS+SEB 노출, 24시간째에 대조 군에 비하여 유의한 상승을 보였다. *M. fermentans* (Mf) 항원과의 중복노출에서도 마찬가지로 전반적인 상승효과를 보였으나 자극물과 배양시간에 따라서 Mp 때와는 다른 양상을 보였다. 즉, Mf+LPS 노출, 24시간과 Mf+LPS+SEB 노출, 2시간째에 대조 군보다 높게 나타났다. *M. hominis* (Mh) 항원과의 중복노출에서는 Mp나 Mf와는 또 다른

특성을 보였다. 즉, 중복노출 모두 24시간째에서만 대조 군보다 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 단독노출에서의 IL-6 생성억제력이 중복노출됨으로서 감소되는 것과 균종 즉 자극의 종류 및 자극시간에 따라서는 대조 군보다 높게 나타남으로서 면역환경에 섬유아세포가 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

IL-8의 생성은 자극물 없이 세포만의 배양에서 생성되어 나타나고 있으며 자극물의 단독 혹은 중복노출에서 대조 군에 비하여 감소되는 양상을 나타냈다. 그러나 Mf+LPS+SEB 노출, 2시간째에서 대조 군보다 높게 나타나는 것을 알 수 있었으며 IL-6 생성 때와 마찬가지로 Mh와의 중복노출에서는 24시간째에 증가되는 것을 알 수 있었다 (Table 2).

자극물들을 세포에 노출시킨지 24시간만의 IL-6과 IL-8 생성량을 비교하였을 때 자극물 단독노출 시 두 종의 사이토카인 모두 대조 군에 비하여 감소를 보이고 있지만 IL-8의 생성량이 IL-6의 경우보다 크게 감소를 보임으로서 IL-8의 영향을 받아 염증부위로 유주하는 세포는 줄어들 것으로 보인다 (Fig. 1). Mp 항원과 중복노출 시에는 Mp+LPS+SEB의 경우 IL-6의 량이 증가됨으로서 IL-6 관련 면역반응은 상승될 것이다 (Fig. 2). Mf 항원과의 중복노출 중에서 Mf+LPS에서도 IL-6 관련 면역반응의 상승이 예상되고 있다 (Fig. 3). Mh 항원과의 중복노출의 경우는 모두 IL-6와 IL-8의 생성이 증가됨으로서 염증부위로 유주하는 세포 수의 증가와 IL-6 관련 면역반응의 상승이 짐작된다 (Fig. 4).

이와 같이 LPS 등의 자극물의 영향을 받지 않고도 섬유아세포는 IL-6나 IL-8을 생성하여 생체 면역반응에 가담할 것으로 보여지며 이들 자극물들의 종류 및 노출시간에 따라서는 생체 내에서 전체 IL-6과 IL-8 생성량에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다. 대식세포를 비롯한 여러 종류의 세포들이 이들 자극물의 영향을 받아 다량의 IL-6나 IL-8을 생성할 때 섬유아세포는 이들 자극물에 노출됨으로서 이들 사이토카인의 생성을 줄일 수 있음은 IL-6나 IL-8과 관련된 면역반응의 하강조절작용 가능성을 예측케 한다. 또한 Mh항원의 중복노출의 경우와 같이 일정시간이 지난 후 IL-6나 IL-8과 관련된 면역반응의 상승조절작용을 나타낼 가능성도 보이고 있다.

결 론

사람 섬유아세포를 초대배양하고 여기에 mycoplasmas 항원이나 *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB), lipopolysaccharide (LPS)와 같은 독소를 노출시키거나 이들을 혼합 자극시켰을 때 나타나는 염증관련 물질로서의 interleukin-6 (IL-6)과 interleukin-8 (IL-8)의 생성능을 보고자 하였다.

IL-6의 생성은 자극물 없이 세포만의 배양에서도 생성되었으며 LPS를 비롯한 전 자극물들을 단독으로 노출시켰을 때 세포만의 배양 때보다 각각의 시간대에서 유의한 감소를 보였다. *M. pneumoniae* 항원과의 중복노출에서는 단독노출 때보다 증가되는 양상을 보였으며 자극물과 배양시간에 따라서는 대조 군보다 높게 나타나는 경우도 있었다. *M. fermentans* 항원과의 중복노출에서도 전반적인 상승효과를 보였으나 자극물과 배양시간에 따라서 *M. pneumoniae* 항원노출 때와는 다른 양상을 보였다. *M. hominis* 항원과의 중복노출에서는 *M. pneumoniae* 항원이나 *M. fermentans* 항원노출 때와는 또 다른 특성을 보였다. 이와 같은 결과는 단독노출에서의 IL-6 생성억제력이 중복노출됨으로서 감소되는 것과 균종 즉 자극의 종류 및 자극시간에 따라서는 대조 군보다 높게 나타남으로서 면역환경에 섬유아세포가 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

IL-8의 생성은 자극물 없이 세포만의 배양에서도 나타나고 있으며 자극물의 단독 혹은 중복노출에서 대조 군에 비하여 감소되는 양상을 나타냈으나 *M. fermentans* 항원과의 중복노출, 2시간째에서 대조 군보다 높게 나타났으며 IL-6 생성 때와 마찬가지로 *M. hominis* 항원과의 중복노출에서는 24시간째에 증가되었다.

자극물들을 세포에 노출시킨지 24시간만의 IL-6과 IL-8 생성량을 비교하면 자극물 단독노출 시 두 종의 사이토카인 모두 대조 군에 비하여 감소를 보이지만 IL-8의 생성량이 IL-6의 경우보다 크게 감소를 보였다. *M. pneumoniae* 항원과 중복노출 시에는 IL-6의 량이 증가되었으며 *M. fermentans* 항원과의 중복노출 중에서도 IL-6의 량이 증가하였다. *M. hominis* 항원과의 중복노출에서는 IL-6와 IL-8의 생성이 모두 증가되었다.

이와 같이 LPS 등과 같은 자극물의 영향을 받지 않고도 섬유아세포는 IL-6나 IL-8을 생성하여

생체면역반응에 가담할 것으로 보여지며 이들 자극물들의 종류 및 노출시간에 따라서는 생체 내에서 전체 IL-6과 IL-8 생성량에 영향을 줄 수 있을 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1) Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, Mukaida N, Matsushima K: Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN 45. *Infect Immun* **65:** 3218-3224, 1997.

2) Andus T, Geiger T, Hirano T, Northoff H, Ganter U, Bauer J, Kishimoto T, Heinrich PC: Recombinant human B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFNβ2) regulates β-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett* **221:** 18-22, 1987.

3) Bansal AS, Hogan PG, Prichard P, Powell EE: Serum soluble CD23 but not IL8, IL10, GM-csf, or IFN-γ is elevated in patients with hepatitis C infection. *Cli Immunol Immunopathol* **84:** 139-144, 1997.

4) Basol F, Conaldi PG, Fiore L, Calvo S, Toniolo A: Normal breast epithlial cells produce interleukin 6 and 8 together with tumor necrosis factor: Defective IL6 expression in mammary carcinoma. *Int J Cancer* **55:** 926-930, 1993.

5) Black K, Garrett IR, Mundy GR: Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and thrombocytosis in tumor-bearing nude mice. *Endocrinology* **128:** 2657-2659, 1991.

6) Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC: Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* **232:** 347-350, 1988.

7) Kishimoto T: The Biology of Interleukin-6. *Blood* **74:** 1-10, 1988.

8) Muhlradt P, Schade U: MDHM, a macrophage-stimulatory product of Mycoplasma fermentans, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infect Immun* **59:** 3969-3974, 1991.

9) Erroi A, Fantuzzi G, Mengozzi M, Sironi M, Orencole SF, Clark BD, Dinarello CA, Isetta A, Gnocchi P, Giovarelli M, Ghezzi P: Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infect Immun* **61:** 4356-4359, 1993.

10) Foreback JL, Remick DG, Crockett-Torabi E, Ward PA: Cytokine responses of human blood monocytes stimulated with Igs. *Inflammation* **21:** 501-517, 1997.

11) Fuseler JW, Conner EM, Davis JM, Wolf RE, Grisham MB: Cytokine and nitric oxide production in the acute phase of bacterial cell wall-induced arthritis. *Inflammation* **21:** 113-131, 1997.

12) Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H: Interferonβ2/B-cell stimulating factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84:** 7251-7255, 1987.

13) Geiger T, Andus T, Klapproth J, Hirono T, Kishimoto T, Heinrich PC: Induction of rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. *Eur J Immunol* **18:** 717-721, 1988.

14) Ghanekar S, Zheng L, Logar A, Navratil J, Borowski L, Gupta P, Rinaldo C: Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and Herpes simplex virus. *J Immunol* **157:** 4028-4036, 1996.

15) Gollnick SO, Liu X, Owczarczak B, Musser DA, Henderson BW: Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res* **57:** 3904-3909, 1997.

16) Ito R, Yasui W, Kuniyasu H, Yokoyaki H, Tahara E: Expression of interleukin-6 and its effect on the cell growth of Gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* **88:** 953-958, 1997.

17) Jotwani R, Tanaka Y, Watanabe K, Tanaka-Bandoh K, Kato N: Comparison of cytokine induction by lipopolysaccharide of *Bacteroides fragilis* with *Salmonella typhimurium* in mice. *Microbiol*

Immunol **38:** 763-766, 1994.

18) Kammouni W, Figarella C, Marchand S, Merten M: Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells. *Infect Immun* **65:** 5176-5183, 1997.

19) Edmiston KH, Gangopadhyay A, Shoji Y, Nachman AP, Thomas P, Jessup JM: *In vivo* induction of murine cytokine production by carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **57:** 4432-4436, 1997.

20) Kusner DJ, Luebbers EL, Nowinski RJ, Koniecczkowski M, King CH, Sedor JR: Cytokine- and LPS-induced synthesis of interleukin-8 from human mesangial cells. *Kidney Intl* **39:** 1240-1248, 1991.

21) Lacasse C, Turcotte S, Gingras D, Stankova J, Rola-Pleszczynski M: Platelet-activating factor stimulates interleukin-6 production by human endothelial cells and synergizes with tumor necrosis factor for enhanced production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Inflammation* **21:** 145-158, 1997.

22) Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herlyn M: Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer* **56:** 853-857, 1994.

23) Mori N, Shirakawa F, Murakami S, Oda S, Eto S: Inhibitory effect of interleukin 4 on production of interleukin 6 by adult T-cell leukemia cells. *Cancer Res* **53:** 4643-4647, 1993.

24) Elias JA, Lentz V: IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* **145:** 161-166, 1990.

25) Nijstein NWN, De Groot E, Ten Duis JH, Hack CE, Aarden LA: Serum levels of interleukin-6 and acute phase reponses. *Lancet* **ii:** 921, 1987.

26) Noah TL, Henderson FW, Wortman IA, Devlin RB, Handy J, Koren HS, Becker S: Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *J Infect Dis* **171:** 584-592, 1995.

27) Ogle C, Guo X, Szczur K, Hartmann S, Ogle JD: Production of tumor necrosis factor, interleukin-6 and prostaglandin E_2 by LPS-stimulated rat bone marrow macrophages after thermal injury: effect of indomethacin. *Inflammation* **18:** 175-185, 1994.

28) Ogle CK, Wu J, Mao X, Szczur K, Alexander W, Ogle JD: Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. *Inflammation* **18:** 511-523, 1994.

29) Powell JL, Wright AC, Wasserman SS, Hone DM, Morris JG: Release of tumor necrosis factor alpha in reponse to *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide in in vivo and in vitro models. *Infect Immun* **65:** 3713-3718, 1997.

30) Salas MA, Brown OA, Perone MJ, Castro MG, Goya RG: Effect of the corticotrophin releasing hormone precursor on interleukin-6 release by human mononuclear cells. *Clin Immunol Immunopathol* **85:** 35-39, 1997.

31) Scambia G, Testa U, Panici PB, Martucci R, Foti E, Petrini M, Amoroso M, Masciullo V, Peschle C, Mancuso S: Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors. *Int J Cancer* **57:** 318-323, 1994.

32) Stanciu LA, Shute J, Holgate ST, Djukanovic R: Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected $CD4^+$ and $CD8^+$ human T cells following a four-step cell separation method including magnetic cell sorting (MACS). *J Immunol Methods* **189:** 107-115, 1996.

33) Standiford TJ, Arenberg DA, Danforth JM, Kunkel SL, VanOtteren GM, Strieter RM: Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes : a cellular and molecular analysis. *Infect Immun* **62:** 119-125, 1994.

34) Starnes HF, Pearce MK, Tewari A, Yim JH, Zou J, Abrams JS: Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal *Escherichia coli* infection and lethal tumor necrosis factor-α challenge in mice. *J Immunol* **145:** 4185-4191, 1990.

35) Steinshamn S, Waage A: Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice. *Infect Immun* **60:** 4003-4008, 1992.

36) Strassman G, Fong M, Kenny JS, Jacob CO: Evidence for the involvement of interleukin 6 in

experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* **89:** 1681-1684, 1992.

37) van der Poll T, Jansen J, Endert E, Sauerwein HP, van Deventer SJH: Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun* **62:** 2046-2050, 1994.

38) von Hunolstein C, Totolian A, Alfarone G, Mancuso G, Cusumano V, Teti G, Orefici G: Soluble antigens from Group B Streptococci induce cytokine production in human blood cultures. *Infect Immun* **65:** 4017-4021, 1997.

39) Zhang XG, Klein B, Bataille R: Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. *Blood* **74:** 11-13, 1989.