

## 패혈증 환자에서 NF- $\kappa$ B 활성화에 의한 호중구 아포프토시스의 억제

서울대학교 의과대학 내과학교실, 서울대학교병원 의학연구소, 서울대학교 의학연구원 폐연구소

권성연, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규

=Abstract=

### Decreased Neutrophil Apoptosis in Patients with Sepsis is Related to the Activation of NF- $\kappa$ B

Sung Youn Kwon, M.D., Choon-Taek Lee, M.D., Young Whan Kim, M.D.,  
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.

*Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Seoul National University,  
College of Medicine, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital,  
Lung Institute, Medical Research Center, Seoul National University*

**Background** : Neutrophil-mediated inflammation is usually self-limiting, because neutrophils have a remarkably short life span. Prolonged neutrophil survival, which is caused by decreased spontaneous apoptosis, leads to persistent inflammation in sepsis. Because many inflammatory cytokines, which generate signals that delay apoptosis, are regulated by nuclear factor- $\kappa$ B transcription factor, we hypothesized that nuclear factor- $\kappa$ B might be related to the reduced neutrophil apoptosis observed in sepsis.

**Methods** : Neutrophils of healthy volunteers and sepsis patients were freshly isolated from venous blood. Neutrophil apoptosis was assayed with two approaches : by counting apoptotic cells under a microscope and by flow cytometry using Annexin V. The activity of nuclear factor- $\kappa$ B was assessed by immunofluorescent staining or electrophoretic mobility shift assay. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis was measured by western blot assay.

**Results** : We confirmed reduced spontaneous neutrophil apoptosis in patients with sepsis. The number of apoptotic neutrophils in patients with sepsis increased to the level of that in healthy controls after

---

Address for correspondence:

**Chul-Gyu Yoo, M.D.**

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Seoul National University Hospital, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, Korea  
Phone : 82-2-760-3760 Fax : 82-2-762-9662 E-mail : cgyoo@snu.ac.kr

cycloheximide treatment, suggesting that decreased spontaneous neutrophil apoptosis is dependent on de novo protein synthesis. In patients with sepsis, basal neutrophil nuclear factor- $\kappa$ B was activated compared to the level in healthy controls. Moreover, a blockade of nuclear factor- $\kappa$ B activity reversed the decreased spontaneous neutrophil apoptosis in sepsis patients. Meanwhile, X-linked inhibition of apoptosis expression, which is regulated by nuclear factor- $\kappa$ B, decreased 24 hours after incubation in healthy persons, but persisted for 24 hours in patients with sepsis.

**Conclusion** : These observations suggest that the reduced spontaneous neutrophil apoptosis observed in patients with sepsis may be related to the induction of survival protein by nuclear factor- $\kappa$ B. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 54:495-508)

---

**Key words** : Sepsis, Neutrophil, apoptosis, Nuclear factor- $\kappa$ B.

## 서론

호중구는 염증반응의 초기 단계에서 핵심적인 역할을 하는 세포이다. 정상적으로 호중구는 반감기가 6-10시간에 불과하여서 짧은 수명을 다하면 아포프토시스에 의해 사멸하게 된다<sup>1</sup>. 그러나 화상, 전신성 염증반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 패혈증, 급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory response syndrome, ARDS) 등의 염증성 질환에서는 호중구의 수명이 연장되어 있어서<sup>2-8</sup> 지속적인 염증 반응이 일어나게 된다. 실제로 급성 호흡곤란 증후군이나 류마티스성 관절염 같은 질병에서는 호중구의 아포프토시스 이상이 병적인 조직 파괴에 기여한다고 보고되어 있다<sup>9,10</sup>. 호중구의 아포프토시스를 억제하는 분자생물학적 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않지만 염증 병소에서 cytokine과 chemokine의 작용이 복합적으로 일어날 것으로 생각된다<sup>11</sup>. 염증 매개 물질인 interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, interferon- $\gamma$ , granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF) 등이 염증 반응 중 호중구의 아포프토시스를 억제하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>12-16</sup>.

Nuclear factor(NF)- $\kappa$ B는 여러 세포에 공통적으

로 존재하는 전사 인자이다. 중요한 염증 매개물질인 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, lymphotoxin, GM-CSF, interferon- $\beta$ , 그리고, 부착 분자(adhesion molecule) 등의 유전자에는 5' 단말부에  $\kappa$ B 결합부가 존재하고 있어서 이들의 전사가 NF- $\kappa$ B에 의해서 조절된다<sup>17</sup>. 이렇듯 NF- $\kappa$ B는 염증성 물질들의 전사를 촉진하기 때문에 염증 반응에서 중심적인 역할을 하게 된다. 또한 NF- $\kappa$ B의 조절 이상과 연관된 다양한 염증성 질환들이 보고되어 있고<sup>18-20</sup> 패혈증이나 급성 호흡곤란 증후군 환자의 예후나 사망률과 연관이 있다는 보고도 있다<sup>21-24</sup>. 한편 NF- $\kappa$ B의 항아포프토시스 기능도 다양한 세포에서 알려져 있다<sup>25-26</sup>. 따라서 NF- $\kappa$ B는 염증세포의 아포프토시스 억제를 통하여 염증을 증폭시키는 역할을 할 것으로 생각된다.

호중구의 아포프토시스를 조절하는 염증 매개물질들의 생산이 NF- $\kappa$ B에 의해서 조절되므로 패혈증에서 관찰되는 호중구의 아포프토시스 억제에도 NF- $\kappa$ B가 관여할 가능성이 있다. 실제로 NF- $\kappa$ B가 정상인의 호중구에서 아포프토시스를 조절한다는 보고가 있고<sup>27</sup>, 심한 외상 환자에서 호중구의 아포프토시스 억제가 NF- $\kappa$ B에 의존적이라는 보고도 있다<sup>28</sup>. 그러나 패혈증 환자에서 호중구의 아포프토시스 억제가 NF- $\kappa$ B에 의한 것인지는 밝혀져 있지 않다.

이 연구에서는 패혈증 환자의 호중구에서 자발적 아포토시스가 억제되어 있으며 이것이 새로운 단백 합성과 관련이 있음을 보였다. 기저 상태에서 패혈증 환자의 호중구에서는 정상인에서와는 달리 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 있음을 밝혔고 이를 억제하였을 때 아포토시스 억제가 반전됨을 확인하였다. NF- $\kappa$ B에 의해서 조절되는 항아포토시스 단백질인 X-linked inhibitor of apoptosis(XIAP)가 패혈증 환자의 호중구에서는 지속적으로 높은 발현 수준을 유지하였다. 이상의 소견으로 패혈증 환자에서 관찰되는 호중구의 아포토시스 억제에는 NF- $\kappa$ B에 의한 생존 관여 단백질의 합성이 관여할 것으로 생각하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상의 선정

연구 대상은 건강한 정상인과 서울대학교병원에 입원한 패혈증 환자의 호중구를 대상으로 하였다. 패혈증은 기존의 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee의 기준을 따라 “전신성 염증반응 증후군의 진단 기준을 만족하며 그 원인이 감염에 의한 것으로 증명되거나 추정되는 경우”로 하였으며 원인 미생물의 종류나 쇼크 유무는 기준으로 삼지 않았다<sup>29</sup>. 패혈증을 진단한 시점으로부터 48시간 이내에 채혈하였으며 혈액 질환이나 골체조직 질환을 가지고 있거나 granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF), GM-CSF, 부신피질 호르몬제, 혹은 다른 면역 억제 치료를 받고 있는 환자들은 대상에서 제외하였다.

### 2. 연구재료

Ficoll-Hypaque과 cycloheximide는 Sigma(St

Louis, MO, USA)에서 구입하였고 Annexin V-FITC apoptosis detection kit I은 PharMingen(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Anti-human p65 IgG polyclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서, Rhodamine (TRITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody는 Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)에서 구입하였다. 단백질 분해효소 억제제들은 Roche(Mannheim, Germany)에서 구입하였고 proteasome 억제제인 N-carboxybenzoxyl-Leu-Leu-Leu-leucinal(MG132)는 Peptide Institute(Osaka, Japan)에서, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP는 Amersham Biosciences(Piscataway, NJ, USA)에서 각각 구입하였다. X-linked inhibitor of apoptosis(XIAP)에 대한 항체는 Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA)에서 구입하였고 Dehydroxymethylepoxyquinomicin(DHMEQ)<sup>30</sup>은 Dr. Kazuo Umezawa(Keio University, Yokohama, Japan)로부터 기증 받아 사용하였다.

### 3. 호중구의 분리

호중구는 헤파린으로 처리한 혈액으로부터 기존에 알려진 방법대로 즉각적으로 분리하였다<sup>31</sup>. 간략히 기술하면, 호중구를 내독소가 없는 조건에서 Ficoll-Hypaque 원심분리를 통하여 분리하고 dextran으로 적혈구를 침강시킨 후 잔여 적혈구를 저장성(hypotonic) 용액을 이용하여 제거하였다. 분리된 세포는 Wright-Giemsa 염색법으로 확인하였을 때 98% 이상이 호중구였고 trypan blue 염색으로 확인하였을 때 98% 이상이 생존 상태였다. 분리된 호중구는 10% fetal bovine serum, penicillin 60 $\mu$ g/ml, streptomycin 100 $\mu$ g/ml이 포함된 RPMI 1640 배지에서, polypropylene 용기에 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에 지정된 시간 동안 배양하였다.

#### 4. 아포프토시스의 정량

호중구의 아포프토시스는 형태적으로 아포프토시스가 일어난 세포를 세는 방법과 유세포 분석법의 두 가지 방법으로 정량하였다. 호중구를 cyto-centrifuge를 이용하여 슬라이드에 부착시킨 후 메탄올로 고정하고 Wright-Giemsa 염색을 시행하였다. 최소한 300개의 세포를 광학 현미경 하에서 (400배) 관찰하고 그 중 특이적 아포프토시스의 형태적 변화를 보인 세포 수를 기록하였다. 이와는 독립적으로 상용화된 Annexin-V-FITC apoptosis detection kit를 사용하여 생산자의 지시 사항에 따라 유세포분석법으로 아포프토시스를 정량하였다. 아포프토시스 측정에는 FACStarplus 유세포 분석기(Becton Dickinson, USA)를 이용하였다. 유세포 분석은 검체가 환자와 정상인의 두 군 중 어디에 속하는 것인지를 알지 못하는 검사자에 의해서 시행되었다.

#### 5. NF- $\kappa$ B에 대한 면역형광염색

NF- $\kappa$ B에 대한 면역형광염색은 기존에 알려져 있는 방법에 따라 시행하였다<sup>32</sup>. 간략히 기술하면 호중구를 cyto-centrifuge를 통해 슬라이드에 부착한 후 고정을 위하여 3% formaldehyde로 5분간 처리하였고 침투촉진을 위하여 0.5% Triton X-100을 처리한 후 5분간 얼음 위에서 반응시켰다. 등장성의 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후 1% bovine serum albumin(BSA)로 30분간 비특이적 결합을 차단하고 1% BSA에 1:100으로 희석된 p65에 대한 다클론 항체와 30분간 반응시켰다. 등장성 PBS로 2회 세척한 후 1% BSA에 1:100으로 희석된 rhodamine(TRITC) 결합 2차 항체와 30분간 암실에서 반응시켰다. 슬라이드를 50% glycerol로 제작한 후 형광현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

#### 6. 핵 추출물의 준비

핵 추출물은 기존의 방법을 이용하여  $5 \times 10^7$  세포로부터 추출하였다<sup>32</sup>. 간략히 기술하면 세포를 원심분리를 통하여 모으고 등장성 PBS로 3회 세척한 후 냉각시킨 세포질 추출 완충액(cytoplasmic extraction buffer, CEB)에 5분간 넣어 두었다. CEB의 구성은 10 mM Tris-HCl(pH 7.9), 60 mM KCl, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM dithiothreitol(DTT)이었다. 세포를 다시 원심분리하여 모은 후 0.4% Nonidet P(NP)-40/CEB/단백 분해 억제제(50 $\mu$ g/ml antipain, 40 $\mu$ g/ml bestatin, 50 $\mu$ g/ml chymostatin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 2 $\mu$ g/ml pepstatin, 1 mg/ml pefabloc SC, 20 $\mu$ g/ml aprotinin, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)로 구성된 완충액과 5 분간 얼음 위에서 반응시켜 세포질을 추출하였다. 세포와 완충액을 2500 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액(세포질 추출물)을 모아서 즉시 얼려 두었다. 남은 핵 내용물을 핵 추출 완충액(nuclear extraction buffer, NEB)에 넣어 안정시켰다. NEB는 20 mM Tris-HCl(pH 7.9), 0.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 25% glycerol, 그리고 단백질 분해 억제제로 구성되었다. 원심분리하여 상층액 (핵 추출물)을 모은 후 즉시 얼려 -70°C에서 보관하였다. 단백질의 농도는 Bradford 방법(Bio-Rad)으로 측정하였다.

#### 7. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

NF- $\kappa$ B의 DNA 결합능은 이전에 기술된 방법으로 측정하였다<sup>32</sup>. 간략히 기술하면 10 $\mu$ g의 핵 추출물을 방사선 동위원소가 표지된 NF- $\kappa$ B consensus sequence (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')와 20분간 실온에서 반응시켰다.

경쟁실험을 위해서는 50배의 동위원소가 표지되지 않은 oligonucleotide를 결합반응에 첨가하였고 supershift 실험에서는 0.4 $\mu$ g의 항 p65 항체나 항 p50 항체를 첨가하고 45분간 실온에서 핵 추출물과 반응시켰다. DNA-단백 결합체는 4% 비변성 polyacrylamide gel을 이용하여 전개시키되 냉장실에서 시행하였고 전개가 끝난 후 gel을 말려서 -70 $^{\circ}$ C에서 감광, 발현시켰다.

## 8. Western blot

Western blot 분석은 이전에 기술된 대로 시행하였다<sup>32</sup>. 전세포 추출물을  $2 \times 10^7$  세포로부터 추출하였다. 전세포 추출 완충액의 성분은 20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 그리고 단백 분해 억제제들(50 $\mu$ g/ml antipain, 40 $\mu$ g/ml bestatin, 50 $\mu$ g/ml chymostatin, 10 $\mu$ g/ml leupeptin, 2 $\mu$ g/ml pepstatin, 1 mg/ml pefabloc SC, 20 $\mu$ g/ml aprotinin, 그리고 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)이었다. 추출물 중 80 $\mu$ g의 단백을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 이 membrane을 5% skim milk-PBS-0.1% Tween 20과 1시간 동안 반응시켜 비특이적 단백 결합을 차단하고 하루 밤 동안 5% skim milk-PBS-0.1% Tween 20에 1:1,000으로 희석된 1차 항체와 결합시켰다. 이 membrane을 1 $\times$ PBS-0.1% Tween 20으로 3회 세척하고 5% skim milk-PBS-0.1% Tween 20에 1:2,000의 비율로 희석된 2차 항체(goat-anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody)와 1시간 동안 반응시킨 후 다시 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence kit를 사용하여 발현시켰다.

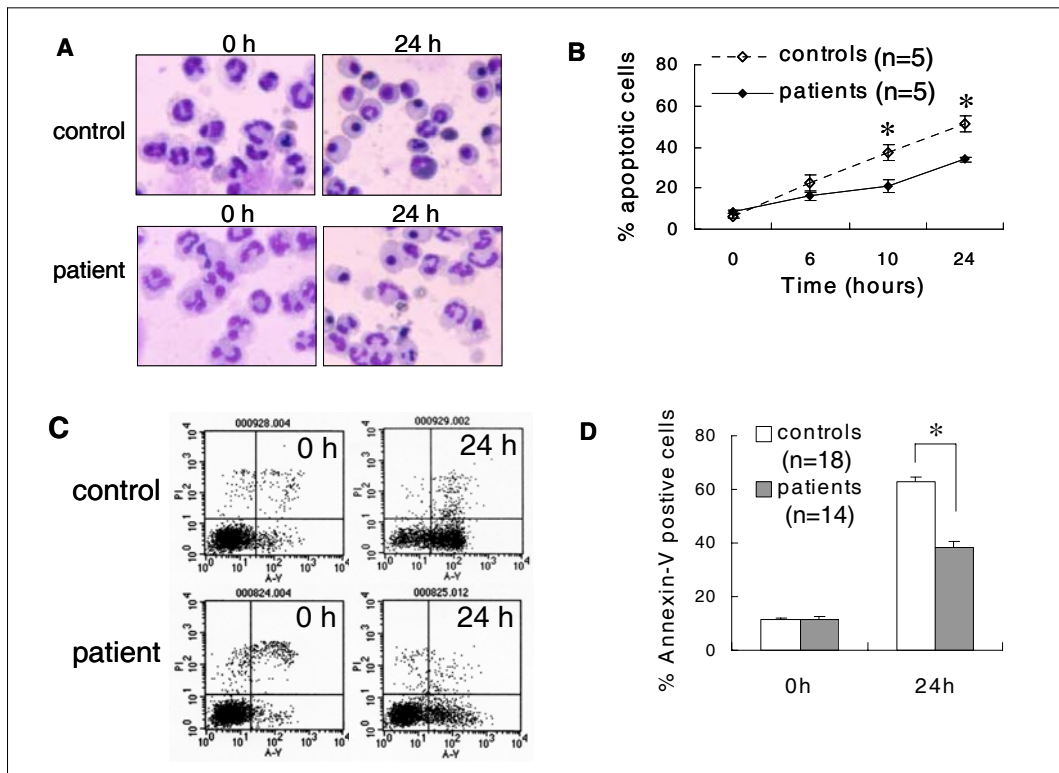
## 9. 통계적 분석

SPSS(ver. 10.0) 통계 package를 사용하였다. 결과는 평균 $\pm$ 표준오차(standard error of mean, SEM)으로 표시하였고 통계적 분석에서는 독립변수에 대해서 Mann-Whitney test를, 짝지은 변수에 대해서 Wilcoxon signed ranks test를 이용하였다. 통계적 유의성은  $p < 0.05$ 를 기준으로 판단하였다.

## 결 과

### 1. 패혈증 환자에서 호중구의 자발적 아포프토시스 감소

패혈증 환자에서 관찰되는 호중구의 수명 연장이 아포프토시스 억제에 의한 것인지 확인하고자 패혈증 환자와 정상인으로부터 얻은 호중구의 시간에 따른 아포프토시스 변화를 비교하였다. 분리 직후의 호중구는 정상인과 환자에서 모두 정상 형태를 보였다. 그러나 24시간 동안 배양하면서 점차 많은 호중구들이 전형적인 아포프토시스의 형태, 즉, 세포의 위축, 염색질의 응축, 다형성 핵 모양의 소실 등을 보이게 되었다(Fig. 1A). 현미경으로 300 개 이상의 세포를 관찰하여 그 중 전형적인 아포프토시스의 형태를 보이는 호중구의 비율을 기록하였다. 분리 직후에는 정상인과 환자 사이에 아포프토시스가 일어난 호중구의 비율에 차이가 없었고(6.58 $\pm$ 0.85% vs. 8.56 $\pm$ 0.56%)(Fig. 1B) 24시간 동안 배양하면서 관찰하였을 때 두 군에서 모두 시간 경과에 따라 점차 아포프토시스가 증가하였다. 기록한 각 시간에 모두 정상인에서보다 패혈증 환자에서 아포프토시스가 감소되어 있었다(6시간에 각각 16.00 $\pm$ 2.12%, 22.67 $\pm$ 3.78%, 10시간에 각각 20.97 $\pm$ 3.44%, 37.32 $\pm$ 3.77%, 그리고 24시간에 각각 34.00 $\pm$ 1.00%, 51.25 $\pm$ 4.01%)(Fig. 1B).



**Fig. 1.** Spontaneous neutrophil apoptosis decreased in patients with sepsis. Human neutrophils ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) isolated from the peripheral blood of patients with sepsis and from healthy persons were incubated for the indicated times. **(A)** Cyto-centrifuged neutrophils were fixed in methanol and Wright-Giemsa stained. **(B)** Cells with distinctive apoptotic features were counted under a light microscope ( $\times 400$ ). At least 300 cells were counted per slide. The percentages of apoptotic neutrophils are shown as means  $\pm$  standard error of mean (SEM). \* $p < 0.05$  compared to healthy persons. **(C)** Neutrophils were incubated with Annexin V-FITC to determine phosphatidylserine exposure, a marker of apoptosis. Propidium iodide dual labeling was used to differentiate apoptosis from necrosis. Cells were fixed and analyzed using a FACStar<sup>plus</sup> flow cytometer, and five thousand events were counted for each sample. **(D)** The percentages of apoptotic neutrophils are shown as means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to healthy persons.

Annexin V-FITC를 이용한 유세포분석으로 아포프토시스를 정량하였을 때에도 같은 결과를 보였다. FITC(분리 직후 각각  $11.51 \pm 0.66\%$ ,  $11.45 \pm 0.70\%$ , 24 시간 후 각각  $38.47 \pm 1.82\%$ ,  $62.74 \pm 1.92\%$ ) (Fig. 1C, D). 이는 패혈증 환자에서 호중구의 자발적 아포프토시스가 억제되어 있음을 확인시켜 주는 결과이다.

## 2. 패혈증 환자에서 관찰되는 호중구의 아포프토시스 억제와 새로운 단백질 합성과의 연관성

패혈증 환자에서 관찰되는 호중구의 아포프토시스 억제가 새로운 단백질 합성에 의한 것인가를 알아보고자 단백질 합성 중 전사 억제제인 cycloheximide ( $10 \mu\text{g/ml}$ )를 전처리하고 아포프토시스의 변

화를 Annexin-V를 이용한 유세포분석법으로 분석하였다. Cycloheximide는 정상인의 호중구에서는 아포프토시스에 영향이 없었으나(64.77 $\pm$ 2.91% vs. 66.84 $\pm$ 3.90%) (Fig. 2) 패혈증 환자의 호중구에서는 아포프토시스를 유의하게 증가시켰다(39.19 $\pm$ 2.53% vs. 55.93 $\pm$ 4.01%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2). 이는 어떤 생존 단백질의 새로운 합성이 패혈증 환자에서 호중구의 아포프토시스 억제에 기여하고 있음을 시사한다.

### 3. 패혈증 환자의 호중구에서 기저상태의 NF- $\kappa$ B 활성화

패혈증 환자의 호중구에서 관찰되는 아포프토시스 억제가 NF- $\kappa$ B와 연관이 있는지 알아보고자 환자와 정상인으로부터 분리한 호중구에서 기저상태의 NF- $\kappa$ B 활성도를 비교하였다. NF- $\kappa$ B의 활성도는 p65 subunit에 대한 면역형광염색을 통해서 확인하였다. 패혈증 환자에서 p65는 핵 내에 위치하였지만 정상인에서는 세포질 내에 위치하여 차이를 보였다(Fig. 3). 이는 기저상태에서 정상인의 호중구에서는 NF- $\kappa$ B가 비활성화 상태이나 패혈증 환자의 호중구에서는 활성화되어 있음을 의미하고 NF- $\kappa$ B의 활성도가 패혈증 환자 호중구의 아포프토시스 억제와 관련이 있음을 시사한다.

### 4. NF- $\kappa$ B의 억제가 패혈증 환자의 호중구 아포프토시스에 미치는 영향

아포프토시스 억제와 NF- $\kappa$ B의 연관성을 더 명확히 조사해 보고자 NF- $\kappa$ B를 억제하였을 때의 아포프토시스 변화를 Annexin-V를 이용한 유세포분석법으로 분석하였다. NF- $\kappa$ B의 활성화는 다음의 두 가지 방법으로 억제하였다. 한편으로는 proteasome 억제제인 MG132 (N-carbobenzoxy-L-Leu-Leu-Leu-leucinal)를 사용하여 I $\kappa$ B의 분해를 막음

으로써, 다른 한편으로는 DHMEQ (Dehydroxymethyllepoxyquinomicin)<sup>30</sup>를 사용하여 NF- $\kappa$ B의 핵 내로의 이동을 억제함으로써 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제하였다. 먼저 MG132의 용량에 따른 NF- $\kappa$ B 억제 효과를 알아보기 위하여 호중구에 TNF- $\alpha$ 로 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합능 향상을 유도한 후 MG132를 처리하고 결합능의 변화를 관찰하였다. 정상인으로부터 얻은 호중구에 MG132를 2.5, 5, 10  $\mu$ M의 농도로 전처리하여 2시간 동안 반응시키고 TNF- $\alpha$  (20 ng/ml)로 30 분간 자극한 후 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합능을 평가하였다. MG132는 이 실험에서 사용된 모든 농도에서 TNF- $\alpha$ 로 유도한 NF- $\kappa$ B의 활성화를 효과적으로 억제하였다 (Fig. 4A). 또한 정상인의 호중구는 MG132나 (63.97 $\pm$ 1.94% vs. 68.53 $\pm$ 3.39%) DHMEQ (71.04 $\pm$ 0.37% vs. 73.27 $\pm$ 1.14%)의 처리에 의해서 아포

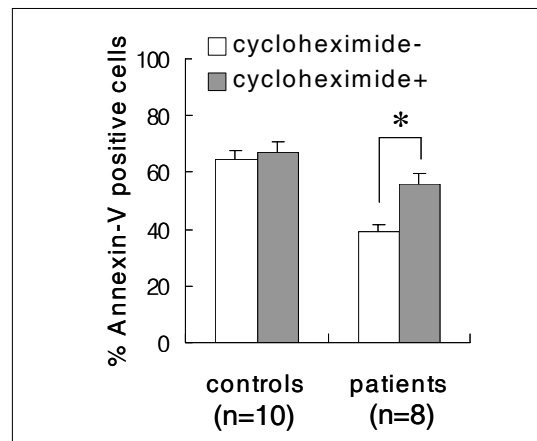
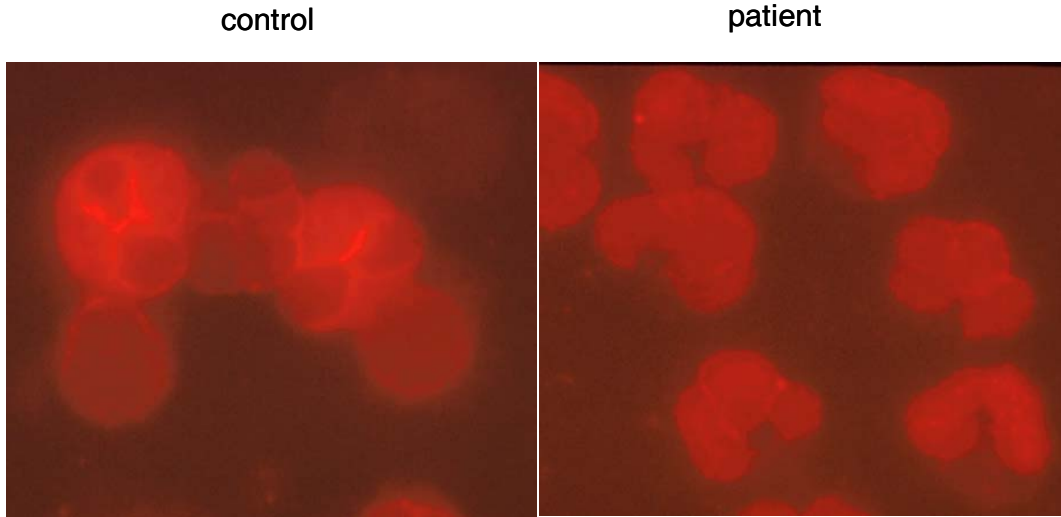


Fig. 2. Cycloheximide treatment reversed the reduced spontaneous neutrophil apoptosis in patients with sepsis.

Neutrophils from healthy persons and patients with sepsis were purified and incubated for 24 hours, either in the presence or absence of cycloheximide(10  $\mu$ g/ml). Apoptotic neutrophils were quantitated by FACS using Annexin V. The percentages of apoptotic neutrophils are shown as means $\pm$ SEM. \*: $p < 0.05$  compared to the media controls.



**Fig. 3.** NF- $\kappa$ B was activated in the basal state neutrophils of sepsis patients.

Freshly isolated neutrophils from sepsis patients and healthy persons were cyto-centrifuged, fixed with 3% formaldehyde, and permeabilized with 0.5% Triton X-100. Immunofluorescent staining for the NF- $\kappa$ B subunit p65 was performed using p65 antibody, followed by incubation with rhodamine(TRITC)-conjugated secondary antibody. Slides were analyzed under a fluorescent light microscope. Experiments were performed in triplicate.

프토시스의 변화가 초래되지 않았으나 패혈증 환자의 호중구는 MG132와 ( $38.69 \pm 2.09\%$  vs.  $61.01 \pm 3.97\%$ ,  $p < 0.05$ ) DHMEQ ( $41.52 \pm 4.43\%$  vs.  $64.70 \pm 4.26\%$ ) 전처치에 의해서 아포프토시스가 유의하게 증가하였다. 이 결과는 패혈증 환자 호중구의 자발적 아포프토시스의 감소가 NF- $\kappa$ B의 활성화와 밀접하게 연관이 있다는 사실을 시사한다.

### 5. 패혈증 환자의 호중구에서 지속적인 XIAP의 발현

XIAP는 NF- $\kappa$ B에 의해서 조절되기 때문에 정상인과 패혈증 환자의 호중구에서 XIAP의 발현을 비교하였다. XIAP의 발현 수준이 분리 직후의 호중구에서는 정상인과 패혈증 환자 사이에 차이가 없었다. 그러나 24시간 동안 배양하면서 정상인의 호중구에서는 XIAP의 발현 수준이 점차 감소하는

데 반하여 패혈증 환자에서는 지속적으로 높은 발현 수준이 관찰되었다(Fig. 5). 이는 XIAP의 발현 수준이 지속적으로 높게 유지되는 것이 패혈증 환자의 호중구에서 관찰되는 아포프토시스 감소와 연관이 있을 가능성을 시사한다.

### 고 찰

호중구에서 분비되는 염증 매개 물질들은 조직 손상을 일으키는데, 정상적으로는 호중구의 수명이 짧기 때문에 이러한 반응이 제한적으로 일어나지만 호중구의 수명이 연장되면 지속적인 조직 손상이 초래된다. 이 연구에서는 패혈증 환자의 호중구 수명 연장이 아포프토시스의 감소 때문임을 확인하였고 이는 기존의 보고와 일치한다<sup>45</sup>. 새로운 단백질 합성을 억제하는 cycloheximide와 actinomycin D가 생체 외에서 호중구의 아포프토시스를 촉진하

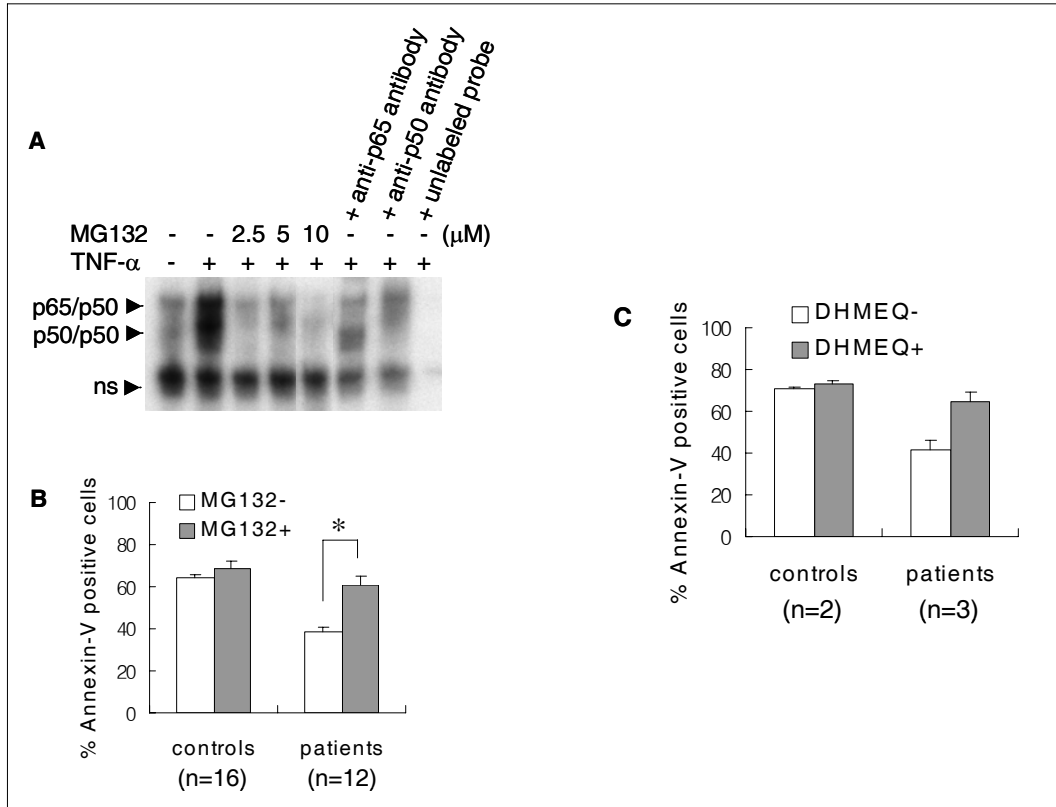


므로<sup>33,34</sup> 생존 단백질의 발현이 호중구의 아포프토시스 억제에 관여할 것으로 생각되고 있다. 이 연구에서는 기존의 연구와 달리 cycloheximide 처리시 정상인의 호중구에서는 아포프토시스가 촉진되지 않았는데 이는 아포프토시스를 정량한 시간의 차이에 의한 것으로 생각된다. 기존의 연구에서는<sup>33</sup> 8 시간에 아포프토시스를 정량, 비교하였는데 이 연구에서는 24시간에 시행하였다. Cycloheximide가 정상 호중구의 아포프토시스를 촉진시키나 24시간에 측정된 아포프토시스의 누적량에는 차이를 초래하지 않았을 것으로 생각된다. 패혈증 환자에서는 cycloheximide 처리로 감소되었던 아포프토시스가 정상인의 수준으로 회복되었다. 이 결과는 패혈증 환자의 호중구 내에서 아포프토시스를 억제하는 작용을 하는 생존 단백질의 존재를 뒷받침하는 증거이다.

호중구의 아포프토시스를 억제하는 대부분의 cytokine들의 발현이 NF- $\kappa$ B에 의해서 조절되므로 연구에서는 NF- $\kappa$ B 의존성인 생존 단백질의 유도가 패혈증 환자에서 관찰되는 아포프토시스 억제에 기여할 것으로 가정하였다. 항아포프토시스 단백질의 생산이 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의존적으로 이루어지는지 알아보기 위하여 NF- $\kappa$ B의 활성화 억제가 자발적 아포프토시스에 미치는 영향을 조사하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ 를 분해하는 proteasome 경로가 NF- $\kappa$ B 활성화에 반드시 필요하므로 이 경로를 차단하는 MG132를 사용하여 NF- $\kappa$ B의 활성화를 차단하였다. 다음 TNF- $\alpha$ 로 유도한 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합능 증가가 MG132의 작용에 의해 효과적으로 차단됨을 확인하였다. 패혈증 환자 호중구의 자발적 아포프토시스 감소는 MG132 처리에 의하여 반전되었다. 한편 cyclin, cyclin 의존성 인산화 효소 억제제, myc, p53, p27, c-fos, and c-jun 등의 단백질도 proteasome 경로를 거쳐 분해된다고 알려져 있다<sup>35,36</sup>. 이와 같은 proteasome 경로 억제제의 비특이성 때문에 MG132의 효과만으로는 아포프토시스

스 억제에 있어서의 NF- $\kappa$ B의 역할을 단정하기 어렵다. 따라서 세포막을 자유로이 통과하여 NF- $\kappa$ B의 핵 내로의 이동을 억제하는 물질인 DHMEQ<sup>30</sup>를 처리하고 아포프토시스의 변화를 관찰하였다. DHMEQ도 역시 패혈증 환자의 호중구 아포프토시스를 증가시켰다. 주목할 만한 것은 이러한 MG132나 DHMEQ가 정상인의 호중구에서는 아포프토시스에 영향을 미치지 않았다는 점이다. 이는 기저상태의 NF- $\kappa$ B 활성도와 연관이 있을 것으로 생각된다. 즉, 정상인의 호중구에서는 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 있지 않았지만 패혈증 환자에서는 활성화되어 있어서 NF- $\kappa$ B 억제가 아포프토시스에 미치는 영향이 다르게 나타났을 것으로 보인다. 정리하면, 이 결과들은 패혈증 환자에서 호중구 아포프토시스 억제가 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의해서 매개되고 있음을 보여 준다.

호중구에서 NF- $\kappa$ B에 의해서 유도되어 작용하는 생존단백이 무엇인지는 아직 알려져 있지 않다. NF- $\kappa$ B에 의해서 조절된다고 알려져 있는 항아포프토시스 단백질으로는 A20, IAP, TRAF1, A1/Bfl1, IEX-IL, and Bcl-xL 등이 있다<sup>37-40</sup>. 이 중 inhibitor of apoptosis(IAP) 단백질은 진화 단계에서 지속적으로 유지되어 온 내인성 아포프토시스 조절 물질의 하나이다<sup>40</sup>. XIAP는 이 IAP 단백질군 중에서 가장 효과적인 아포프토시스의 억제 물질이다<sup>40</sup>. 최근까지 호중구 아포프토시스 조절에 있어서 이 XIAP의 역할이 잘 알려져 있지 않았으나 최근 XIAP의 감소가 정상 호중구의 아포프토시스 억제에 기여한다는 보고가 있었다<sup>41</sup>. 이 연구에서도 기존에 알려진 바대로 정상인의 호중구에서 XIAP의 발현은 24 시간 동안 배양하면서 크게 감소하였으나<sup>41</sup>, 패혈증 환자의 호중구에서는 24시간 동안 발현 수준이 유지되었다. 만일 생존 단백질의 반감기가 짧다면 생존 단백질의 세포 내 발현 수준은 지속적인 새로운 단백질 합성이 이루어지지 않는 한 급격히 감소할 것이다. 패혈증 환자에서 관찰되는 아포



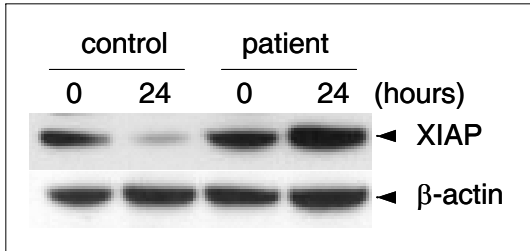
**Fig. 4.** The blockade of NF-κB activation increased the apoptosis of neutrophils from sepsis patients.

(A) The proteasome inhibitor MG132 effectively blocked TNF-α-induced NF-κB activation in neutrophils. Neutrophils isolated from healthy persons were incubated with medium alone or with 2.5, 5, or 10 μM of MG132 for 2 hours, and then stimulated with TNF-α (20 ng/ml) for 30 minutes. Nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA using a κB site DNA probe, as described in 'Materials and Methods'. (B) MG132 treatment reversed the decreased spontaneous apoptosis observed in patients with sepsis. Human peripheral blood neutrophils ( $2 \times 10^9$ /ml) from sepsis patients and normal controls were incubated for 24 hours, either in the presence or absence of MG132 (10 μM). Apoptotic neutrophils were quantitated by FACS using Annexin V. The percentages of apoptotic neutrophils are shown as means±SEM. \*:p<0.05 compared to the media controls. (C) DHMEQ (40 μg/ml) treatment had the same effect as MG132 on neutrophil apoptosis.

프토시스 억제제는 생존 단백질의 발현 수준이 지속적으로 유지됨으로써 이루어지는 것으로 생각되고 특히 새로운 단백질의 합성이 기여하고 있는 것으로 보인다. 한편, 호중구의 아포프토시스는 Mcl-1이라는 단백질의 발현과 관련이 있다는 보고가 있는데 이 단백질은 NF-κB의 조절을 받지 않는다<sup>42</sup>. 또한

호중구의 아포프토시스를 억제하는 강력한 물질 중 하나인 GM-CSF는 NF-κB를 활성화시키는 신호를 전달하지 않는다. 따라서 NF-κB가 아마도 호중구의 아포프토시스를 조절하는 유일한 경로는 아닐 것으로 생각된다.

이 연구에서 패혈증 환자의 호중구에서는 NF-κB



**Fig. 5.** XIAP expression in neutrophils lasted longer in patients with sepsis.

Neutrophils from healthy persons and from patients with sepsis were purified and incubated for 24 hours. Equal amounts of whole cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed for XIAP by western blot analysis using rabbit polyclonal anti-XIAP antibody (upper panel). To confirm equal protein loadings, the membrane was stripped and reprobed with  $\beta$ -actin antibody (lower panel). Results are representative of three separate experiments.

가 기저상태에서도 활성화되어 있었고 NF- $\kappa$ B를 억제하였을 때 아포프토시스 억제가 반전되었으며 NF- $\kappa$ B의 조절을 받는 XIAP의 발현 수준이 지속적으로 유지되었다. 이러한 결과는 패혈증 환자에서 호중구의 생존 증가가 NF- $\kappa$ B의 활성화와 밀접한 연관이 있음을 시사한다. 아는 범위 내에서 이 연구는 실제 패혈증 환자에서 호중구의 아포프토시스 감소와 NF- $\kappa$ B 전사인자 간의 관계를 기술한 최초의 연구이다.

## 요 약

### 연구배경 :

호중구에 의해 매개되는 염증반응은 호중구의 수명이 매우 짧기 때문에 대부분 자연 종결된다. 패혈증에서는 이러한 호중구의 아포프토시스가 감소되어 수명이 연장되어 있어서 지속적인 염증반응이 일어나게 된다. 호중구의 수명 연장을 유도하는

많은 염증 매개 물질들이 nuclear factor- $\kappa$ B 전사인자에 의해 조절되기 때문에 이 연구에서는 nuclear factor- $\kappa$ B가 패혈증 환자에서 관찰되는 호중구의 아포프토시스 억제와 연관이 있을 것으로 가정하였다.

### 방 법 :

건강한 정상인과 패혈증 환자의 호중구를 정맥혈로부터 신선하게 분리하여 실험하였다. 호중구의 아포프토시스는 특징적인 아포프토시스의 형태를 보이는 세포를 광학현미경으로 세거나 Annexin V를 이용한 유세포분석법으로 정량하였다. Nuclear factor- $\kappa$ B의 활성도는 면역형광 염색법 또는 electrophoretic mobility shift assay로 판단하였다. 항아포프토시스 단백질인 X-linked inhibitor of apoptosis의 발현 정도는 western blot으로 평가하였다.

### 결 과 :

패혈증 환자에서 자발적 아포프토시스가 감소되어 있음을 확인하였다. 패혈증 환자의 호중구에 cycloheximide를 처리하였을 때 아포프토시스가 유의하게 증가하여 아포프토시스 감소가 새로운 단백질 합성에 의존적임을 관찰하였다. 패혈증 환자의 호중구에서는 정상인과는 달리 기저상태에서도 nuclear factor- $\kappa$ B가 핵 내로 이동되어 활성화되어 있었고 nuclear factor- $\kappa$ B의 활성을 억제하였을 때 아포프토시스의 억제가 반전되었다. 또한 nuclear factor- $\kappa$ B에 의존적인 X-linked inhibitor of apoptosis 단백질 발현 수준이 정상인의 호중구에서는 24시간 동안 배양하면서 점차 감소하였지만 패혈증 환자의 호중구에서는 지속적으로 발현 수준이 유지되었다.

### 결 론 :

패혈증 환자에서 관찰되는 호중구의 아포프토시스 억제에는 nuclear factor- $\kappa$ B 전사인자의 활성화에 의한 생존 단백질의 유도가 관여할 것으로 생각하였다.

### 참 고 문 헌

1. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation : programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989;83:865-75.
2. Chitnis D, Dickerson C, Munster A, Winchester R. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *J Leukoc Biol* 1996;59:835-9.
3. Jimenez MF, Watson RWG, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M, Rostein OD, Marshall JC. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 1997; 132:1263-9.
4. Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 1997;90:3356-63.
5. Ertel W, Keel M, Infranger M, Ungethum U, Steckholzer U, Trentz O. Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation. *J Trauma* 1998;44:767-73.
6. Fanning NF, Kell M R, Shorten GD, Kinwan WO, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, Remond HP. Circulating granulocyte macrophage colony-stimulating factor in plasma of patients with the systemic inflammatory response syndrome delays neutrophil apoptosis through inhibition of spontaneous reactive oxygen species generation. *Shock* 1999;11:167-74.
7. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F II, Steinberg KP, Ruzinski JT, Jonas M, Chi EY, Hudson LD, Martin TR. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1969-77.
8. Matute-Bello G, Liles C, Il FR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, Martin TR. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2000;28:1-7.
9. Chilvers ER, Cadwallader KA, Reed BJ, White JF, Condliffe AM. The function and fate of neutrophils at the inflamed site: Prospects for therapeutic intervention. *J Royal College Physicians* 2000;34:68-74.
10. Edwards S, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: The forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1997;18:320-4.
11. Fadok VA, Bratton DL, Konowal, A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101:890-8.
12. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte

- survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; 80:2012–20.
13. Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 1992;80:2920–4.
  14. Cox G, Gauldie J, Jordana M. Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:507–13.
  15. Pericle F, Liu JH, Diaz JI, Blanchard DK, Wei S, Forni G, Djeu JY. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol* 1994;24:440–4.
  16. Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1993;54:283–8.
  17. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225–60.
  18. Marok R, Winyard PG, Coumbe A, Kus ML, Gaffney K, Blades S, Mapp PI, Morris CJ, Blake DR, Kaltschmidt C, Baeuerle PA. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1996;39:583–91.
  19. Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsbury JR, Cogswell JP, Stimpson SA, Baldwin AS, Makarov SS. NF- $\kappa$ B activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13859–64.
  20. Neurath M, Petterson S, Buschenfelde K, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the RelA subunit of NF- $\kappa$ B abrogates established experimental colitis. *Nat Med* 1996; 2:998–1004.
  21. Foulds S, Galustian C, Mansfield AO, Schachter M. Transcription factor NF- $\kappa$ B expression and postsurgical organ dysfunction. *Ann Surg* 2001;233:70–8.
  22. Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK, Webster NR. Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die. *Crit Care Med* 2000;28:1047–51.
  23. Browder W, Ha T, Chuanfu L, Kalbfleisch JH, Ferguson DA Jr, Williams DL. Early activation of pulmonary nuclear factor kappaB and nuclear factor interleukin-6 in polymicrobial sepsis. *J Trauma* 1999;46:590–6.
  24. Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. Role of NF- $\kappa$ B in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 1997;100:972–85.
  25. Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH, Sonenshein GE. Inhibition of NF- $\kappa$ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* 1996;15:4682–90.
  26. Kim JY, Lee S, Hwangbo B, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yoo CG. NF- $\kappa$ B

- activation is related to the resistance of lung cancer cells to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:140-6.
27. Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. NF- $\kappa$ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in Vitro. *J Biol Chem* 1999;274:4309-18.
  28. Nolan B, Collette H, Baker S, Duffy A, De M, Miller C, Bankey P. Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NF- $\kappa$ B dependent. *J Trauma* 2000;48:599-604.
  29. American College of Chest Physician/Society of Critical Care Medicine Consensus conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864.
  30. Ariga A, Namekawa JI, Matsumoto N, Inoue JI, Umezawa K. Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced nuclear translocation and activation of NF- $\kappa$ B by dehydroxymethyllepoxyquinomicin. *J Biol Chem* 2002;277:24625-30.
  31. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21(suppl 97):77-89.
  32. Yoo CG, Lee S, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I $\kappa$ B $\alpha$  through preventing I $\kappa$ B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol* 2000;164:5416-23.
  33. Whyte MK, Savill J, Meagher LC, Lee A, Haslett C. Coupling of neutrophil apoptosis to recognition by macrophages : coordinated acceleration by protein synthesis inhibitors. *J Leukoc Biol* 1997;62:195-202.
  34. Stringer RE, Hart CA, Edwards SW. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis : role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br J Haematol* 1996;92:169-75.
  35. Alkalay K, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Stimulation dependent I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation marks the NF- $\kappa$ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10599-603.
  36. Giuliano M, Lauricella M, Calvaruso G, Carabillo M, Emanuele S, Vento R, Tesoriere G. The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cells. *Cancer Res* 1999;59:5586-95.
  37. Sarma V, Lin Z, Clark L, Rust BM, Tewari M, Noelle RJ, Dixit VM. Activation of B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 1997;270:12343-6.
  38. Zong W-X, Edelman LC, Chen C, Bash J, Gelin C. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- $\kappa$ B that blocks TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:382-7.
  39. Wu MX, Ao Z, Prasad KV, Wu R, Schlossman SF. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF- $\kappa$ B-mediated cell survival. *Science* 1998;14:998-1001.
  40. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-

- suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239-52.
41. Kobayashi S, Yamashita K, Takeoka T, Ohtsuki T, Suzuki Y, Takahashi R, Yamamoto K, Kaufmann SH, Uchiyama T, Sasada M, Takahashi A. Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia. *J Biol Chem* 2002;277:33968-77.
42. Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* 1998;92:2495-502.
-