

류마티스 관절염 환자의 말초혈액 단핵세포에서 Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Akt와 Nuclear Factor KappaB (NF-κB) 신호전달을 통한 IL-17 생성조절

가톨릭대학교 의과대학 연구원 류마티스연구센터

김경운 · 조미라 · 이상헌 · 민소연 · 박미경 · 박성환 · 주대명 · 김호연

Regulation of Interleukin-17 Production in Patients with Rheumatoid Arthritis by Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt and Nuclear Factor KappaB (NF-κB) Dependent Signal Transduction Pathway

Kyoung-Woon Kim, Mi-La Cho, Sang-Heon Lee, So-Youn Min, Mi Kyung Park, Sung-Hwan Park, Dae-Myung Jue and Ho-Youn Kim

Rheumatism Research Center, Catholic Research Institute of Medical Science, Catholic University of Korea, Seoul, Korea

ABSTRACT

Inflammatory mediators has been recognized as an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). IL-17 is increasingly recognized as an important regulator of immune and inflammatory responses, including induction of proinflammatory cytokines and osteoclastic bone resorption. Evidence of the expression and proinflammatory activity of IL-17 has been demonstrated in RA synovium and in animal models of RA. However, the signaling pathways that regulate IL-17 production remain unknown. In the present study, we investigated the role of the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)-Akt pathway in the regulation of IL-17 production in RA. PBMC were separated from RA (n=24) patients, and stimulated with various agents (anti CD3, anti CD28, PHA, ConA, IL-15). IL-17 levels were determined by sandwich ELISA and RT-PCR. The production of IL-17 was significantly increased in cells treated with anti-CD3 antibody, PHA, IL-15 or MCP-1 ($P < 0.05$). ConA also strongly induced IL-17 production ($P < 0.001$), whereas TNF-alpha, IL-1beta, IL-18 or TGF-beta did not. IL-17 was detected in the PBMC of patients with osteoarthritis (OA) but their expression levels were much lower than those of RA PBMC. Anti-CD3 antibody activated the PI3K-Akt pathway and activation of the PI3K-Akt pathway resulted in a pronounced augmentation of nuclear factor kappaB (NF-κB). IL-17 production by activated PBMC in RA is completely or partially blocked in the presence of NF-κB inhibitor PDTC and PI3K-Akt inhibitor, wortmannin and LY294002, respectively. Whereas the inhibition of AP-1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 did not affect IL-17 production. These results provide new insight into that PI3K/Akt and NF-κB dependent signal transduction pathway could be involved in the overproduction of key inflammatory cytokine, IL-17 in rheumatoid arthritis. (**Immune Network 2002;3(4):310-319**)

Key Words: Interleukin-17, rheumatoid arthritis, PI3K/Akt pathway, NF-κB, PBMC

책임저자 : 김호연, 가톨릭대학교 의과대학 의과대학 연구원 류마티스 연구센터, ☎ 137-701, 서울 서초구 반포동 505번지

Tel: +82-2-590-2533, Fax: +82-2-537-4673, E-mail: ho@cmc.cuk.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터연구(R11-2002-098-01001-0) 지원으로 수행되었음.

서 론

류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis)은 관절 내 대식세포 및 T세포 등 염증세포의 침윤 및 활막의 이상증식(hyperplasia)을 특징으로 하며, 분비되는 염증성 사이토카인들이 관절 파괴에 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있다(1). 특히 류마티스 관절염에서 IL-1, TNF α 에 대한 항사이토카인 치료가 임상에서 성공을 거두면서 사이토카인의 중요성이 더욱 대두되고 있고, 핵심적인 사이토카인의 봉쇄가 향후 류마티스 관절염의 치료제 개발에서 중요한 이슈로 대두되고 있다.

류마티스 관절염 관절의 염증유발에 주된 역할을 할 것으로 주목이 된 사이토카인은 림프구들의 광범위한 활성화 물질로 알려진 IL-2, IFN γ , TNF α , IL-1과 같은 사이토카인들이었다. 그러나 TNF α , IL-1과 달리 IL-2, IFN γ 와 같은 T세포 의존적 사이토카인의 농도가 류마티스 관절 조직 내에서는 높지 않다는 것이 밝혀져 T세포의 역할에 대해 의문이 제기되어왔다(2). 그러나 저자들의 이전 연구에서 항원 특이 T세포 증식을 밝힌 바 있고, Th1 사이토카인 편중성을 확인한 바 있어 T세포의 역할에 대해 새로운 각도에서 연구의 필요성이 요구된다(3). 류마티스 관절염에서 T세포와 대식세포 및 단핵구를 따로 분리시켜 생각하기는 힘들고 이들 세포의 상호작용에 의해 염증 반응이 증폭될 것으로 여겨진다.

대식세포에서 분비되는 IL-15는 류마티스 관절 조직 내에서 T세포를 활성화시킨다는 것이 알려졌고(4,5), 사이토카인 또는 항원과의 결합으로 자극이 된 T세포로부터 분비되어 염증 반응의 증폭에 기여하는 사이토카인의 생성과 조절기전에 대한 연구도 꾸준히 진행되어 오고 있다. IL-17는 주로 CD4+T세포에서 분비하는 염증성 사이토카인으로 알려져 있으며 류마티스 관절염에서도 관절염증 반응에 관여하는 것으로 많이 알려진 TNF α , IL-1과 같은 사이토카인처럼 관절파괴와 염증유발 과정에 기여할 것으로 생각되는 사이토카인으로 최근 새롭게 주목받고 있다. 최근까지 연구 결과에 의해 IL-17은 RANKL receptor를 통한 골흡수세포(osteoclast)를 활성화시켜 연골조직을 파괴시키는 데 관여하는 사이토카인으로 알려져 있다(6). 또한 활막세포에서는 IL-6와 leukemia inhibitory factor (LIF) 생성을 유도하고 연골세포에서는 prostaglandin $_2$ (PGE $_2$)와 nitric oxide (NO)의 생성을 유도하며 수지상 세포에서는 세포의 분화와 활성을 촉진시킬 수 있는 다양한 기능이 있는 물질로 알려져 있다(7-9). IL-17은 골관절염 환자와 비교했을 때 류마티스 관절염 환자의 활액과 혈액에서 더 많이 생성이 되는 것을 확인할 수 있었고(10), CD4+T세포가 주된 공급원 역할을 하는 것으로 증명이 되고 있다(11). 앞선 연구

결과로 류마티스 관절염에서 IL-17의 역할이 확인되고 있으나, IL-17 생성에 관련된 세포 내 신호 전달 기전에 대해서는 아직 알려진 것이 많지 않다. 이러한 IL-17의 생성과 조절 기전에 대한 연구는 류마티스 관절염의 발병 기전에 대한 이해와 새로운 치료적 접근을 가능케 할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 류마티스 관절염 환자의 말초혈액 단핵구에서 다양한 자극을 통한 IL-17의 생성능을 조사하고 이러한 생성을 조절하는 세포내 신호 전달 기전을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

대상. 강남성모병원에 내원하여 진단된 한국인 류마티스 관절염 환자 24명을 대상으로 하였으며 대조군으로 골관절염 환자 14명 정상대조군으로는 질환이 없는 건강한 성인 14명을 대상으로 하였다. 각 군의 대상자의 성별은 여성이 80%이며, 나이는 류마티스 관절염군과 골관절염군은 50 \pm 8세이며 정상대조군은 30 \pm 6세이다.

시약. 사용한 자극제로는 purified anti-human CD3 (BD Biosciences Pharmingen, USA), purified anti-human CD28 (BD Biosciences Pharmingen, USA), PHA (SIGMA, USA), ConA (SIGMA, USA)를 사용하였고 사이토카인으로는 IL-15 10 ng/ml (R&D, USA), IL-1 β 10 ng/ml (endogen, USA), TNF α 10 ng/ml (Peprotech, ENGLAND), IL-18 10 ng/ml (R&D, USA), TGF β 10 ng/ml (R&D, USA)을 사용하였다. 케모카인으로는 MCP-1 10 ng/ml (R&D, USA), MIP-1 α 10 ng/ml (R&D, USA), MIP-1 β 10 ng/ml (R&D, USA), IL-6 10 ng/ml (R&D, USA), IL-8 10 ng/ml (R&D, USA)을 사용하였다.

Inhibitor들로는 PDTC (NF- κ B inhibitor), DEX (NF- κ B pathway blocker), Curcumin (AP-1 inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor), wortmannin (PI3K inhibitor), CsA, FK506 (calcineurin pathway blocker, NF-AT), Rapamycin (prevent IL-2 dependent lymphocyte activation), SB203580 (MAPK P38 inhibitor), PD98059 (MAPK P42/44 inhibitor) 등을 사용하였다.

류마티스 관절염 환자의 말초 혈액 단핵세포 분리과 배양

류마티스 관절염 환자로부터 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)는 heparin으로 처리한 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 Ficoll-PaqueTM (Amersham Biosciences, SWEDEN)를 이용하여 centrifuge gradient법으로 분리하였다(12). 실험에 사용된 세포들은 56°C에서 1시간 동안 불활성화된 10% 우태아 혈청, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 ug/ml)이 포함된 세포 배양액(RPMI 1,640, Gibco BRL, USA)을 첨가하여 배양하였다. 혈액을 PBS (Phosphate-Buffered Saline)와 1:1로 섞어 Ficoll과 혈액+PBS을 1:4의 비율로 Ficoll층이 흐트러지지 않게 50 ml tube에 천천히 떠운 다

음 혈액을 2,000 rpm, 30분간 원심 분리하였다. Buffy coat층만을 따서 새 tube에 담은 후 PBS로 세척하고 세포 수를 세어 5×10^5 개씩을 48 well plate (NUNC™, Denmark)에 넣어주고 anti-CD3, anti-CD28, PHA, ConA, 그밖의 여러 사이토카인(IL-15, IL-1beta, TNFalpha, IL-18, TGFbeta)과 케모카인(MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IL-6, IL-8)으로 자극하여 24시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 위와 같은 방법으로 inhibitor들을 1시간 전처리 후 anti-CD3로 자극하였다.

Sandwich ELISA. Sandwich ELISA용 96 well plate (NUNC, Denmark)에 capture monoclonal IL-17 Ab (R&D, USA) 4 ug/ml로 50 ul/well씩 넣고 4°C, 밤새 반응시킨 다음 차단용액(1%BSA/PBST)을 200 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨다. Standard로는 recombinant human IL-17 (R&D, USA)을 이용하여 10 ng/ml~15.6 pg/ml 농도를 사용하였다. Standard와 함께 측정할 세포 배양 상층액을 50 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. well을 세척용액(0.05% Tween20/Phosphate-Buffered Saline)으로 4번 세척하고 Biotinylated goat-anti-human IL-17 Ab (R&D, USA)를 100 ng/ml로 희석하여 50 ul/well씩 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 세척용액으로 4번 세척하였다. 마지막으로는 ExtraAvidin-Alkaline Phosphatase conjugate (SIGMA, USA)를 1 : 2,000으로 희석하여 50 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시키고 세척 후 PNPP (Fluka, Phosphate Disodium Salt Hexahydrate)/DEA 용액(Diethanolamine 97 ml, NaN₃ 0.2 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.1 g, 1차 증류수 800 ml)을 1 mg/ml 농도로 녹여 50 ul/well씩 넣어 20~30분 후 0.2 N NaOH로 반응을 멈추고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(13,14).

RNA분리와 IL-17의 역전사 효소-PCR. 류마티스 관절염 환자로부터 말초혈액 단핵세포 1×10^6 개의 세포를 세포 배양액 1 ml에 넣어 24 well plate (costar, Cambridge, MA)에 부유한 후 anti-CD3로 자극하여 12시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 위와 같이 처리한 세포로부터 총 RNA를 RNA zol B (TELTEST, USA)를 이용하여 추출하였다.

추출한 총 RNA를 주형으로 cDNA를 만들었으며 Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) 증류수에 용해되어 있는 2 ug의 RNA에 Oligo (dT) (Invitrogen, USA) 1ul와 10 mM dNTP mixture (TakaRa, JAPAN) 1ul를 가하고, 65°C의 수조에 5분간 방치한 후 바로 얼음에 담가 급냉시켰다. 4 ul의 5× first strand (TakaRa, JAPAN), 2ul 0.1 M DTT (TakaRa, JAPAN), 1ul Ribonuclease Inhibitor (TakaRa, JAPAN)와 혼합하고, 총 반응액이 20ul가 되도록 증류수를 가하였다. 37°C로 2분간 반응시킨 후 1ul M-MLV Reverse Transcriptase⁹⁹ (TakaRa, JAPAN)를 더하고 37°C 50분, 70°C 15분 반응시켜 cDNA를 얻었다. 이렇게 생성

된 cDNA 산물을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.

본 실험에 사용한 IL-17, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 시발체는 모두 Genotec Co (Korea)에서 구입하였고 염기 서열은 IL-17 (sense; ATG ACTCCTGGGAAGACCTCATTTG, antisense; TTAGGCC ACATGGTGGACAATCGG), GAPDH (sense; CGATGCT GGGCGTGAGTAC, antisense; CGTTCAGCTCAGGGAT GACC)을 사용하였다.

PCR 과정 중 각각 서로 다른 양으로 역전사된 cDNA와 PCR cycle 수를 변경하면서 PCR을 시행하여 대수적으로 증가하는 cDNA양과 PCR cycle 수를 결정하였다. PCR을 위한 반응 화합물은 총 25ul가 되도록 하였고 용액의 조성은 2.5ul의 10×reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 15 mM MgCl₂; 50mM KCl; TakaRa, JAPAN), 0.5 mM의 dNTP (TakaRa, JAPAN), 최종 각각 1 M의 두 가지 시발체, 1.25 unit의 Taq DNA polymerase (TakaRa, JAPAN)를 함유한 용액 내에 1ul의 역전사된 cDNA를 첨가한 후 시행하였다. 증폭을 위해 Takara PCR Thermal Cycler (TakaRa, JAPAN)를 사용하였다. 변성을 위해서 94°C에서 1분간, annealing은 GAPDH에서 56°C에서 1분, IL-17에서도 56°C에서 1분간, 신장을 위해서 72°C에서 1분간의 과정을 GAPDH에서는 25회, IL-17에서는 30회씩 반복하였다. 음성 대조군으로 추출한 cDNA 대신 증류수를 사용하여 시행한 PCR 반응에서 GAPDHPCR 산물이 관찰되지 않도록 하여 PCR 오염이 없음을 확인하였다(15).

Electrophoresis mobility shift assay (EMSA). 류마티스 관절염 환자로부터 말초혈액 단핵세포에서 핵 추출물 (nuclear extract)를 얻었으며 NF-κB 활성화를 유도하기 위해 류마티스 관절염 환자로부터 말초혈액 단핵세포에 anti-CD3 (10 ug/ml)와 anti-CD28 (1 ug/ml), ConA (10 ug/ml), PHA (5 ug/ml)로 1시간 동안 자극하였다. Human IL-17전구체에 존재하는 double stranded oligonucleotide probe는 IL-17 (NF-κB) sense: 5'-ATG ACC TGG AAA TAC CCA AAA TTC-3', IL-17 (NF-κB) antisense: 5'-GAA TTT TGG GTA TTT CCA GGT CAT-3'; IL-17 (AP-1) sense: 5'-CTC ATT GGT GTC ACT GCT AC-3', IL-17 (AP-1) antisense: 5'-GTA GCA GTG ACA CCA ATG AG-3'을 사용하였다. [³²P]dATP를 T4 polynucleotide kinase (TakaRa, Japan)와 purified using NucTrap columns (Stratagene, USA)를 사용해 5'-end에 ³²P를 Label시켰다. NF-κB binding 반응은 2 ug의 핵 추출물과 400,000 cpm 정도로 label 된 oligonucleotide를 binding buffer들과 총 10ul로 맞춰 실온에서 30분간 반응시켰다. DNA-protein complex는 5% polyacrylamide gel에 전기영동하였으며 전기영동 후 gel은 건조시켜 X-ray film (AGFA, Belgium)으로 -70°C, 12시간 동안 감광시켰다(16).

Supershift assay. Supershift assay는 specific antibodies (p65, p50, 그리고 c-Rel)를 사용하여 확인하였다. p65, p50, c-Rel (Santa Cruz Laboratory, USA)를 protein과 probe를 더하기 전에 미리 1μl로 실온에서 20분 동안 반응시켰다(16).

Western blot. 전기영동은 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)을 사용하였고 전기영동시 한 lane에 가하는 시료는 세포 수 1×10^7 으로 부터 추출된 양이 되게 조절하였다.

전기영동 후 젤은 nitrocellulose 흡착지(Amersham Pharmacia Biotech, Germany)를 사용하여 4°C, 100 volt, 150 mA로 2시간 동안 단백을 이동시켰다. 전기영동을 끝낸 후 흡착지를 분리해 내어 차단용액(5% fat free skim milk in Tris-Buffered Saline)에 담가 실온에서 1시간 반응시켰다. 차단용액을 버리고 세척용액(0.01% Tween20/Tris-Buffered Saline)으로 차단용액을 세척하였다. 흡착지를 꺼내어 1 : 1,000으로 희석한 항Akt 항체(cell signaling, USA) 또는 항Phospho-Akt 항체(cell signaling, USA)로 4°C, 밤새 반응시키고 흡착지를 꺼내어 세척용액으로 3회 세척하였다. 항체 희석액으로 HRP (horseradish peroxidase)가 부착된 goat anti-rabbit IgG (PIERCE, USA)로 1 : 1,000으로 희석한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 흡착지를 꺼내어 세척용액으로 4번 세척하고 Supersignal west Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, USA)의 용액 1, 2를 1 : 1로 섞어서 흡착지에 반응시키고 X-ray film (AGFA, Belgium)에 노출시켜 항체 결합 신호를 확인하였다(17).

T cell 증식반응. 96 well microtiter plate에 류마티스 관절염 환자로부터 말초혈액 단핵세포를 각각 2×10^5 개씩 넣고 PHA, ConA, IL-15, anti-CD3를 10 ug/ml로 자극하여 24시간 배양한다. 배양 종료 16시간 전에 ^3H -thymidine (NEN, Boston MA)을 0.5 uCi씩 넣어 주었다가 세포를 수집한 후 beta counter (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL)로 동위원소 양을 측정한다. T 림프구 증식반응의 결과를 나타내는 자극지수(stimulation index, S. I.)는 자극한 세포의 동위 원소량을 자극하지 않은 세포의 동위 원소량으로 나눈 값이며, S. I. 값이 2 이상인 경우를 양성 증식반응(positive proliferative response)으로 간주하였다(18).

통계적 유의성의 검증. 실험 결과는 평균표준오차로 표현하였으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(version 10.0)을 사용하여 student's t-test를 실시하였고 P값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

류마티스 관절염(RA), 골관절염(OA), 정상인(Normal)의 말초혈액 단핵세포에서의 IL-17생성능 조사. RA,

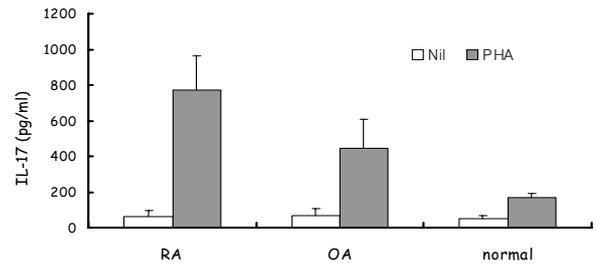


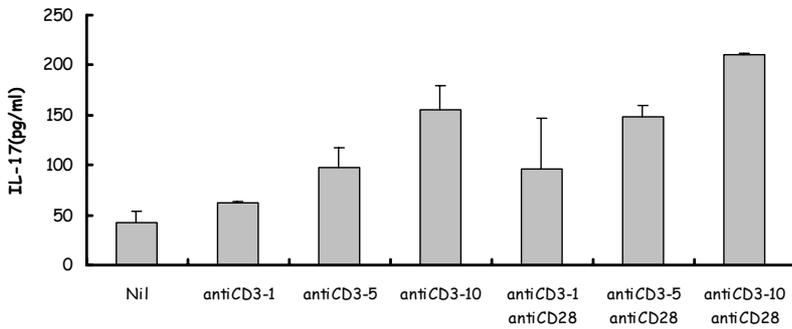
Figure 1. Levels of IL-17 in PBMCs from RA, OA patients and Normal. EachPBMCs were stimulated for 24 h with or without PHA (5 ug/ml). The levels of IL-17 were measured in culture supernatants by ELISA. Data are expressed as the means±SEM. One representative result of five independent experiments is shown. The student's t test was used for statistical evaluation of the results.

OA, Normal로부터 말초혈액 단핵세포를 분리하여 in vitro상에서 T세포를 자극한 뒤 IL-17생성의 차이를 ELISA로 조사하였다. 이 때 T세포의 자극제로 PHA (5 ug/ml)를 사용하였다(Fig. 1). 자극을 하지 않은 말초혈액 세포에서는 RA (62 pg/ml±31), OA (43 pg/ml±19), normal (43 pg/ml±10)에서 IL-17의 생성의 차이가 통계적으로 의미가 없었으나 PHA로 자극 후 IL-17의 생성은 RA에서 자극 전후로 비교하여(62 pg/ml±31 vs. 768 pg/ml±295, $P < 0.001$) 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 동일한 자극 후 OA (463 pg/ml±211 vs. 768 pg/ml±295, $P < 0.05$)와 normal (241 pg/ml±29 vs. 768 pg/ml±295, $P < 0.05$)에 비하여 RA에서 IL-17의 생성능이 증가되어있는 것을 확인하였다.

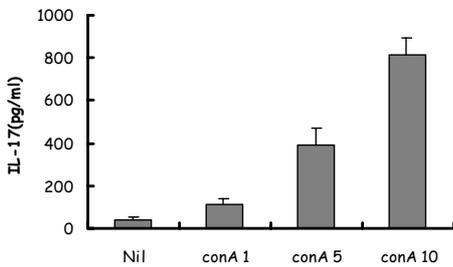
류마티스 관절염 환자 말초혈액 단핵세포를 mitogen 이나 T세포 수용체를 통하여 자극한 후 IL-17 생성효과. Mitogen과 TCR자극에 의한 류마티스 관절염 환자 말초혈액 단핵세포에서의 IL-17의 생성을 비교해 보고 anti-CD3와 anti-CD28, ConA 또는 PHA로 자극하여 IL-17생성을 ELISA로 알아보았다. TCR을 자극하는 anti-CD3의 자극 농도로는 1, 5, 10 ug/ml을 사용하였으며 그 결과 농도 의존적으로 IL-17 (62 pg/ml±4, 98 pg/ml±19, 155 pg/ml±24)의 생성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 보조자극 인자로 알려진 anti-CD28을 anti-CD3와 함께 자극하였을 때 anti-CD3 단독으로 자극했을 때보다 IL-17 (96 pg/ml±51, 149 pg/ml±10, 211 pg/ml±6)의 생성이 부가적으로 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 이 때 농도 의존적인 경향은 anti-CD3 단독으로 처리하였을 때와 비슷하였다(Fig. 2A). 일반적으로 알려진 자극 농도 anti-CD3 (10 ug/ml)와 anti-CD28 (1 ug/ml)에서는 자극 전과 비교하여 IL-17생성이(211 pg/ml±6 vs. 42 pg/ml±11, $P < 0.05$) 의미있게 증가됨을 확인하였다.

T세포 mitogen으로 알려진 ConA, PHA로 자극하였을

A



B



C

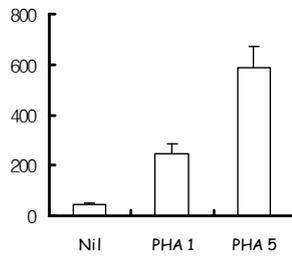
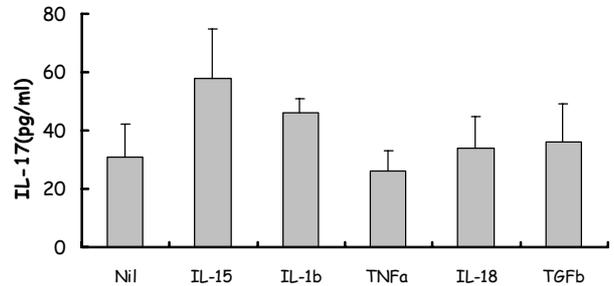


Figure 2. Mitogen stimulation of IL-17 protein. This plot represents the mean levels of IL-17 protein in response to mitogens. AntiCD3 (1, 5, 10 ug/ml) plus antiCD28 Ab (1 ug/ml) (A); ConA (1, 5, 10 ug/ml) (B); PHA (1, 5 ug/ml) (C); Nil, unstimulated PBMCs. The levels of IL-17 were measured in culture supernatants by ELISA.

때 IL-17의 생성을 살펴보면 anti-CD3와 anti-CD28로 자극했을 때와 비교하여(825 pg/ml±76 vs. 211 pg/ml±6, $P < 0.05$) (599 pg/ml±111 vs. 211 pg/ml±6, $P < 0.05$) 2~4.5배 가량 더욱 증가하였다(Fig. 2B, C).

류마티스 관절염 말초혈액 단핵세포에서 사이토카인, 케모카인 자극을 통한 IL-17 생성효과. 말초혈액단핵세포에서 염증성 사이토카인이나 케모카인들에 의해 IL-17 생성이 변화하는지 알아보려고 하였다. 자극하지 않은 세포에 비하여 IL-15 (10 ng/ml)으로 자극한 후에는 (31 pg/ml±11 vs. 58 pg/ml±17 $P < 0.05$) IL-17의 생성이 증가되었으나, IL-1beta (10 ng/ml)로 자극한 군(46 pg/ml±5)이나 TNFalpha (10 ng/ml), IL-18 (10 ng/ml), TGFbeta (10 ng/ml)로 자극한 군(26 pg/ml±7, 34 pg/ml±11, 36 pg/ml±13)에서는 IL-17의 생성이 자극을 통하여 증가하지 않은 것을 확인하였다(Fig. 3A). 10 ng/ml의 MCP-1을 처리하였을 때 자극 전과 비교하여(62 pg/ml±42 vs. 31 pg/ml±11 $P < 0.05$) IL-17의 생성이 의미있게 증가되었으며, IL-6 (10 ng/ml)로 자극하였을 때에도 자극 전과 비교하여(50 pg/ml±10 vs. 31 pg/ml±11 $P < 0.05$) IL-17의 생성이 증가되었다. 반면에 IL-8 (10 ng/ml), MIP-1alpha (10 ng/ml), MIP-1beta (10 ng/ml)로 자극한 경우에는 33 pg/ml±7, 27 pg/ml±12, 31 pg/ml±8로 자극에 의한 효과가 거의 나타나지 않았다(Fig. 3B). 다음은 IL-15, IL-1beta, MCP-1과 같은 사이토카인이나 케모카인을 T세포

A



B

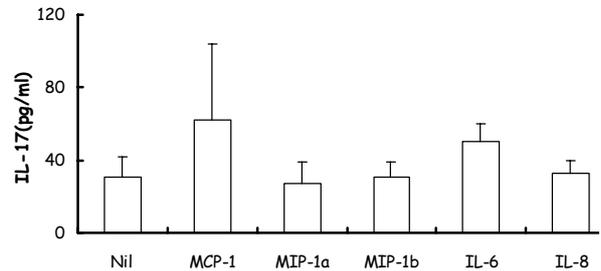


Figure 3. Production of IL-17 by PBMCs from RA patients. A. Production of IL-17 by cytokine induction. PBMCs from RA patients were stimulated for 24 h with IL-15 (10 ng/ml), IL-1beta (10 ng/ml), TNFalpha (10 ng/ml), IL-18 (10 ng/ml), and TGFbeta (10 ng/ml). The levels of IL-17 were measured in culture supernatants by ELISA. Each value represents the mean ±SEM of three independent experiments. B. Production of IL-17 by chemokine induction. PBMCs were cultured in the presence of MCP-1 (10 ng/ml), MIP-1alpha (10 ng/ml), MIP-1beta (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), and IL-8 (10 ng/ml).

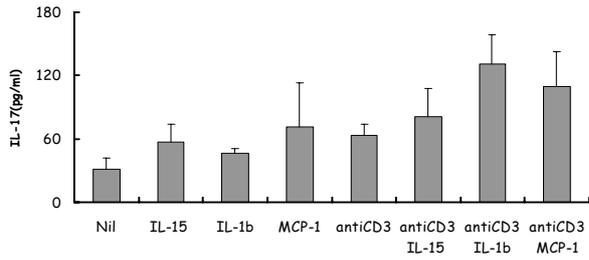


Figure 4. Combined effects of antiCD3 (1 ug/ml) plus IL-15 (10 ng/ml), IL-1beta (10 ng/ml) or MCP-1 (10 ng/ml) on the expression of IL-17 protein. RA PBMCs were cultured for 24 h in the presence of cytokines (IL-15, IL-1beta) or chemokine (MCP-1), and the concentrations of IL-17 in culture supernatants were determined. Measurements were made on PBMCs from four different patients.

수용체를 통한 자극과 함께 자극하였을 때 IL-17의 생성에 미치는 부가적인 효과를 조사하였다(Fig. 4).

Anti-CD3 (1 ug/ml) 단독으로 T세포 수용체를 자극한 것과 비교해 anti-CD3 (1 ug/ml)에 IL-1beta (10 ng/ml)을 동시에 처리했을 때는(63 pg/ml±11 vs. 131 pg/ml±28 $P < 0.05$)으로 IL-17의 생성이 의미있게 증가하였다. MCP-1이나 IL-15의 경우에도 단독으로 자극한 경우에 비하여 anti-CD3와 동시에 자극하였을 때(71 pg/ml±42 vs. 110 pg/ml±33, $P < 0.05$), (57 pg/ml±17 vs. 81 pg/ml±27, $P < 0.05$) 증가하는 것을 각각 확인할 수 있었다. 따라서 IL-1beta의 경우에는 단독으로 자극한 경우에는 자극하지 않은 경우와 비교하여(31 pg/ml±13 vs. 46 pg/ml±5) IL-17의 생성이 증가되는 것을 확인할 수 없었으나 T세포 수용체를 통한 자극과 IL-1beta를 동시에 자극하였을 경우 단독으로 자극하였을 때와 비교하면(131 pg/ml±28 vs. 46 pg/ml±5, $P < 0.005$) 의미 있게 증가됨을 확인할 수 있었다.

류마티스 관절염 말초혈액 단핵세포에서 신호전달 기작에 관련된 저해제들에 의한 IL-17 생성 억제 효과. IL-17의 생성이 미치는 세포에 신호전달 기작에 대한 연구는 NF-κB와 MAPK에 관련하여 보고되고 있으나, IL-17이 어떤 신호전달 기작을 통해 생성이 조절되는 지에 대해서는 보고된 바가 없다. 따라서 다양한 세포 신호전달 기작에 관련된 저해제들을 처리하여 IL-17의 생성을 ELISA로 조사하였다(Fig. 5). 말초혈액 단핵세포에 anti-CD3 (5 ug/ml)와 NF-κB inhibitor로 알려진 PDTc나 DEX를 처리할 경우 anti-CD3 단독으로 처리한 경우에 비하여 각각(38 pg/ml±5 vs. 98 pg/ml±19 $P < 0.005$), (54 pg/ml±11 vs. 98 pg/ml±19 $P < 0.05$)으로 감소되는 것을 확인하였고, PI3K inhibitor인 LY294002와 wortmannin의 경우에도 anti-CD3 단독으로 처리한 경우에 비하여 각각 (38 pg/ml±10 vs. 98 pg/ml±19 $P < 0.005$), (48 pg/ml±4

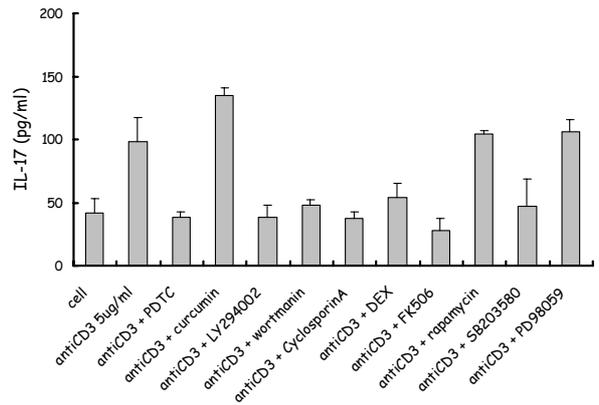


Figure 5. Effects of protein kinase inhibitors and antirheumatic drug on anti CD3-triggered IL-17 production by PBMCs from RA patients. PBMCs pretreated for 1h with PDTc, curcumin, LY294002, wortmannin, CsA, Dex, FK506, rapamycin, SB203580, PD98059 in combination with antiCD3 Ab (5 ug/ml). Culture supernatant were assayed for IL-17 amounts as described in Material and methods.

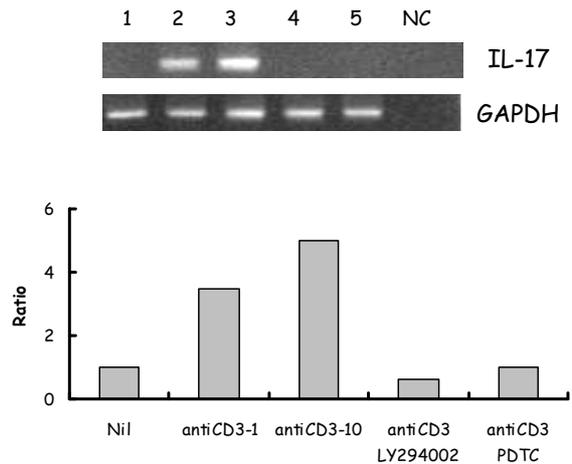


Figure 6. Effects of LY294002 or PDTc on an anti CD3 antibody-triggered IL-17 mRNA expression by PBMCs from RA patients. PBMCs were cultured with unstimulated (lane 1), antiCD3 Ab (1 ug/ml) (lane 2), antiCD3 Ab (10 ug/ml) (lane 3) plus LY294002 (20uM) (lane 4) or PDTc (lane 5) for 12h. Total RNA (2ug) was used for cDNA synthesis in a volume of 20ul; 1ul of the synthesized cDNA was used for RT-PCR as described. 25 ul PCR reaction product was separated on an agarose gel containing ethidium bromide. The relative intensities of the bands were visualized in UV light.

vs. 98 pg/ml±19 $P < 0.05$)으로 IL-17의 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 그밖에 calcineurin inhibitor로 알려진 CsA와 FK506을 사용하였을 때도 T세포수용체 자극을 통한 IL-17의 생성을 감소시켰으며 MAPK P38 inhibitor인 SB203580 역시(47 pg/ml±22 vs. 98 pg/ml±19 $P <$

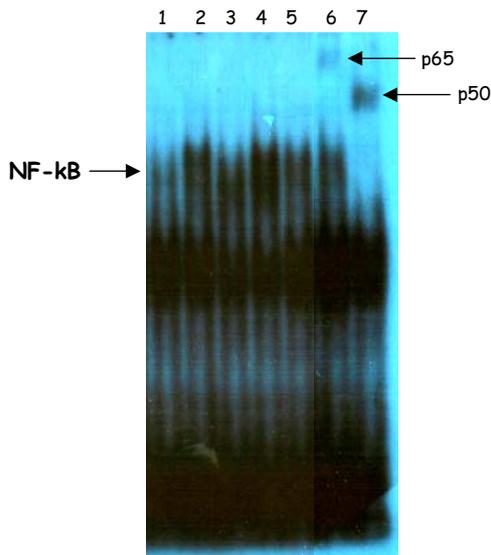


Figure 7. Effects of antiCD3 plus antiCD28, mitogen, or cytokine on NF-κB complex in nuclear extracts of RA PBMCs. NF-κB activity in the absence (lane 1) or presence antiCD3 Ab plus antiCD28 (lane 2), ConA 10 ug/ml (lane 3), PHA 5 ug/ml (lane 4), and IL-15 10 ng/ml (lane 5). Supershift assay of NF-κB site using antibodies against p65 (lane 6), p50 (lane 7). Cells using supershift assay were pre-stimulated with antiCD3 plus antiCD28. Arrows denote labeled oligonucleotide band shifted upon NF-κB binding.

0.05) IL-17의 생성을 감소시킨다는 사실을 아울러 확인할 수 있었다. 그러나 IL-2에 반응하는 T세포의 증식을 억제하는 면역억제제인 rapamycin, MEK-1 억제제인 PD98059를 사용할 경우(104 pg/ml±3 vs. 98 pg/ml±19 $P < 0.05$), (106 pg/ml±12 vs. 98 pg/ml±19 $P < 0.05$) IL-17 생성에는 거의 영향을 미치지 못하는 것을 확인할 수 있었다. 우리가 사용한 저해제들에 의한 세포의 독성 효과는 없었다(data not shown).

류마티스 관절염 말초혈액 단핵세포에서 IL-17 mRNA 발현. 지금까지 IL-17생성을 ELISA로 단백질 수준에서 조사하였으나 다음은 mRNA 수준에서도 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 조사하였다(Fig. 6). 그 결과 anti-CD3에 의한 IL-17 mRNA의 생성은 농도 의존적으로 증가하였으며, anti-CD3와 PI3K inhibitor인 LY294002 혹은 NF-κB inhibitor인 PDTC로 같이 처리하였을 때는 자극하지 않은 군만큼 IL-17의 mRNA 생성이 감소된 것으로 나타났다.

IL-17 전구체에 존재하는 NF-κB, AP-1 활성화 효과. IL-17 생성 효과를 보인 유도제를 사용하여 생성된 IL-17이 NF-κB나 AP-1 경로에 의존적인지 확인하기 위하여 EMSA를 시행하였다. Anti-CD3와 anti-CD28, ConA, PHA나 IL-15으로 자극하여 IL-17 전구체에 존재하는 NF-κB를 활성화시켰다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 anti-CD3와

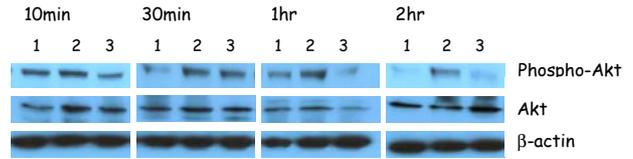


Figure 8. Phosphorylated Akt activation in response to IL-17 inducer. PBMCs were cultured with unstimulated (lane 1), antiCD3 Ab (10 ug/ml) (lane 2) or antiCD3 Ab (10 ug/ml) plus LY294002 (20 uM) (lane 3) for 10 to 120 minutes. Cell lysates were analyzed for Akt activation by western blot analysis of total and Ser⁴⁷³-phosphorylated Akt (P-Akt) using specific antibodies. P-Akt level was compared with each time point, after normalization to Akt and beta actin in same sample. A representative of 3 separate experiments is shown.

anti-CD28 (lane 2), PHA (lane 4)로 자극한 군에서 IL-17에 대한 NF-κB 활성화는 자극하지 않은 군(lane 1)에 비해 증가하였으며, ConA (lane 3), IL-15 (lane 5) 또한 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 이 중 anti-CD3에 의한 자극이 NF-κB binding activity 중 특정 아형에 의한 증가로 이루어졌는가를 알아보기 위해 supershift assay를 시행하였다. 이 때 사용한 antibody로는 p65, p50, c-Rel Ab를 사용하여 시행하였고, 그 결과 p65, p50에서 shift된 band가 나타났다. 그러나 c-Rel은 전혀 shift되지 않았다(data not shown). 다른 Transcription factor인 AP-1을 통해서도 활성화되는지 확인한 결과 anti-CD3와 anti-CD28, ConA, PHA, IL-15으로 자극하여도 IL-17에 의한 AP-1 활성화에는 아무런 변화가 없었다(data not shown).

자극을 통한 IL-17 생성에 미치는 PI3K/Akt 신호전달 경로 활성화 효과. 신호전달 경로에 관련된 억제제들을 처리하여 IL-17을 측정할 결과 PI3K/Akt 전달 경로 저해제들(LY294002, wortmannin)에 의해 IL-17 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 ELISA 결과를 토대로 자극을 통한 IL-17 생성이 PI3K 경로에 관여되어 있는지 알아보기 위해서 PI3K downstream에 존재하는 Akt와 인산화된 Akt의 변화를 시간별로 western blot으로 조사하여 보았다(Fig. 8).

이 모든 변화는 자극하지 않은 조건과 anti-CD3로 자극한 조건 그리고 anti-CD3와 LY294002를 같이 처리한 조건에서 조사되었다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 10분간 처리한 조건에서는 자극하지 않은 조건이나 anti-CD3에 의한 자극조건이나 anti-CD3에 LY294002를 처리한 조건에서 인산화된 Akt band의 차이를 보이지 않았지만, 30분 이후부터는 anti-CD3에 의한 자극 효과가 나타나기 시작하여 1시간째에서는 anti-CD3에 의한 자극효과뿐만 아니라 LY294002에 의한 억제 효과가 가장 큰 것으로 보였으며 그 후 2시간, 4시간에서도 LY294002에 의한 억제 효과가 지속된다는 사실을 확인할 수 있었다. 이때 변화를 보인 인산화된 Akt band와는 달리 대조군으로 사

용된 Akt와 beta actin band는 변화가 없는 것을 확인하였다. 가장 효과를 보인 1시간째에서는 anti-CD3 이외에도 PHA나 ConA, IL-15과 같은 자극 조건에서도 인산화된 Akt band가 증가되었으며, 이러한 Akt의 활성화는 LY294002뿐만 아니라 wortmannin과 PDTC와 같은 억제제를 사용했을 때 억제효과를 보인 것을 아울러 확인할 수 있었다(data not shown).

고 찰

T세포에서 생성이 되는 것으로 알려진 IL-17은 Th1 유형의 사이토카인으로 염증반응을 촉진하는 인자들의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 하지만 이러한 IL-17 생성의 조절 기작에 대한 연구는 거의 보고된 내용이 없다. 그렇지만 최근까지도 다양한 세포에서 IL-17의 역할은 많이 조사되고 있다. 염증세포의 비정상적인 증식을 통한 염증 과반응이 초래되는 질환으로 류마티스 관절염은 특히나 관절 내에 자가항원을 인지하는 T세포의 과다증식을 통해 관절 내로 이러한 세포들이 침윤되는 것이 특징이다. 따라서 이러한 T세포들이 분비하는 염증성 사이토카인과 케모카인의 연구가 병인연구에 중요하다고 생각할 수 있다. 이러한 사이토카인 중 T세포에서만 특이적으로 유도되는 사이토카인의 생성이 오히려 높지 않은 것으로 밝혀지면서 T세포 특이적인 새로운 사이토카인의 연구가 필요 시되고 있다(2).

본 연구에서는 류마티스 관절염의 말초혈액세포를 분리하여 ConA나 PHA와 같은 자극제, 다양한 사이토카인이나 케모카인, 직접 T세포 수용체를 통한 자극 등으로 IL-17의 생성능을 조사하고 이러한 생성이 유도되는 과정에 관여하는 신호전달 기작을 알아보고자 하였다.

이전의 보고에서도 IL-17은 류마티스 관절염 환자군의 혈액과 활액에서 모두 골관절염 환자군에 비해서 증가되어 있다고 보고된 바 있다(10). 말초혈액에서 분리한 단핵세포에서 PHA와 같은 자극제로 자극시킬 경우 대조군에 비해서 의미있게 IL-17의 생성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). PHA나 ConA와 같은 여러 세포를 활성화시킬 수 있는 자극제뿐만 아니라 anti-CD3 antibody를 이용한 T세포 수용체를 직접 자극했을 때에도 농도 의존적으로 IL-17의 생성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 세포의 자극을 통한 IL-17의 생성은 세포수의 증가를 통한 것이 아니라 세포 자체의 활성이 증가되어 사이토카인 생성능이 증가된 것이라는 것을 세포증식반응으로 확인하였다(data not shown). IL-17의 생성은 아직까지는 T세포에서 특이적으로 생성이 되는 사이토카인으로 알려져 있다. 특히 T세포 중에서도 CD4+ T세포에서 생성이 되는 것으로 알려져 있으며 또한 이러한 CD4+ T세포의 활성화는 항원 특이적인 세포의 활성이 많이 일어나기 때문에 항원에 반응하는

T세포의 활성을 통해 생성이 된다는 보고도 있다(20). 본 연구팀에서도 관절염 마우스모델인 CIA 마우스에서 관절염 자가항원의 하나로 연구되고 있는 콜라겐으로 T세포를 자극할 경우 IL-17의 생성이 의미있게 증가되는 것을 확인할 수 있었다(24,25). 관절에서 T세포를 포함한 많은 세포들은 과다증식하며 많은 사이토카인과 케모카인을 생성하게 되는데 이렇게 생성된 것들이 분비되면 이들은 다시 다른 세포를 활성화시킬 수 있다. IL-15은 관절의 활액과 조직에서 많이 존재하며 T세포를 자극하여 IL-17을 증가시킨다는 보고가 있었다(4). 우리는 IL-15을 포함하여 류마티스 관절염군에서 증가되어있는 사이토카인과 케모카인을 처리하여 IL-17의 생성을 조사하였다. IL-15과 MCP-1은 직접 IL-17의 생성을 증가시켰으며(Fig. 3) T세포 수용체와 동시에 자극하였을 경우 IL-17의 생성이 더욱 증가하였다(Fig. 4). 반면에 TNF-alpha나 IL-1beta와 같이 염증 촉진인자로 알려진 사이토카인들은 IL-17의 생성을 직접 증가시키지는 못했다(Fig. 3). MCP-1은 T세포의 활성을 직접 증가시킨다는 보고는 없으나 단핵세포나 대식세포를 활성화시켜 간접적으로 T세포의 활성을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 염증성 신호 전달체로서의 IL-17의 역할에 대해서는 이미 다른 논문에서도 보고된 바가 있다. IL-17을 처리한 bovine chondrocyte는 NO의 생성을 증가시킬 뿐만 아니라 PKA, JNK, ERK 1/2 signal이 관련되어 있다고 보고하고 있다. 또한 TRAF 2와TRAF 6가 결핍된 마우스의 embryonic fibroblast를 사용한 동물 모델에서 TRAF 6는 NF-κB와 JNKcascade를 통한 IL-17 signal에 있어 중요한 매개자로 보고하였다(19). 따라서 IL-17에 의한 세포의 활성화에 NF-κB나 MAPK 신호전달 경로가 연구되고 있다(21). 관절염 환자의 활막세포를 IL-17으로 자극하면 NF-κB와 p38/MAPK 같은 신호전달 경로가 활성화되면서 IL-6나 IL-8 같은 사이토카인이 증가된다는 보고가 있다. 또한 MMP (Matrix Metallo Proteinase)를 활성화시켜 골조직과 괴에도 관여할 것으로 생각된다(23). 그렇지만 어떤 신호 전달 경로를 통하여 IL-17의 생성이 유도되는지에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다. 우리는 먼저 신호 전달을 억제할 수 있는 각 경로의 특이적인 억제제를 사용하여 IL-17의 생성을 조절해 보았다. 먼저 NF-κB와 PI3K의 신호전달 경로 억제제인 PDTC와 LY294002, wortmannin에 의해서 IL-17의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 5) 류마티스 관절염 환자의 치료에 사용하고 있는 calcineurin 억제제인 CsA도 IL-17의 생성을 억제시킬 수 있었다. 따라서 이러한 IL-17의 생성은 NF-κB와 PI3K 경로에 의존적인 것으로 생각된다. 직접 IL-17의 전구체에 존재하는 NF-κB 표지자를 찾아 EMSA를 시행한 결과 NF-κB의 활성이 직접 증가된다는 것을 확인할 수 있었다. Supershift assay를 통해 NF-κB의 유형으로

p50과 p65가 확인되었으며(Fig. 7), c-rel은 나타나지 않았다. AP-1은 전혀 활성화되지 않는 것을 확인하였다 (data not shown). 또한 PI3K/Akt 신호전달 경로를 직접 확인해 본 결과 1시간째 가장 유의하게 증가되며 2시간이 지나면서 서서히 활성유형이 사라지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 이 때 CsA에 의한 IL-17의 생성억제 효과에서도 역시 NF- κ B와 PI3K/Akt 신호전달 활성을 억제하는 것으로 확인되어, 이전에 보고되지 않은 새로운 결과로 해석된다. 따라서 현재 이 부분에 대해서는 연구를 진행하고 있다. NF- κ B의 경우 류마티스 관절염을 비롯한 수많은 질환에서 염증유발인자를 생성하고 촉진하는 전사인자로서 대표적으로 알려져 있다. 많은 질환 연구군에서 이러한 NF- κ B의 활성을 이해하고 조절하는 방법을 찾기 위해서 연구 중에 있다. 특히나 류마티스 관절염은 염증유발인자들의 과다 발현이 질환진행을 더욱 악화시키므로 이를 조절하는 것은 병인을 이해하고 치료하는데 큰 부분이 될 것이다. 최근 많은 논문들에서 PI3K/Akt 신호 전달에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. PI3K/Akt 역시 어느 특정 세포에서만 유도되는 것이 아니라 다양한 세포에서 활성이 일어나는 것으로 알려지고 있는데 아직까지 류마티스 관절염 환자군 연구에서는 그러한 보고가 미진한 상태이다. PI3K/Akt 통한 신호전달이 NF- κ B나 MAPK 같은 전사인자들의 활성을 촉진시킨다는 보고는 나오고 있다(22). 결론적으로 류마티스 관절염에서 IL-17은 혈액이나 활액에서 증가되어 있으며(4) 혈액에서 분리한 단핵세포에서는 세포의 자극 정도에 따라 IL-17의 생성능이 더욱 증가되는 것을 확인할 수 있었다. IL-17은 T세포에서 생성이 되는 사이토카인으로 우리는 T세포를 직접 자극하여 IL-17의 생성을 관찰하였고 뿐만 아니라 말초혈액에 있는 단핵세포 중 T세포 외에 다른 세포들까지 자극했을 경우 T세포 특이적인 자극에 비하여 10배 이상의 IL-17의 생성능을 확인할 수 있었다. 이는 류마티스 관절염에서 혈액이나 활액에 있는 많은 종류의 세포들이 서로 신호를 전달하고 자극하여 T세포에서 IL-17의 분비를 더욱 촉진시킬 수 있는 것으로 생각된다. 또한 이러한 T세포에서 IL-17의 생성은 PI3K/Akt 신호전달 경로를 통하여 NF- κ B 전사인자를 활성화시킴으로써 해서 생성이 되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 IL-17의 생성은 류마티스 관절염 환자의 활막 조직에서 다른 염증성 인자들의 발현을 유도하고 골조직 파괴 등을 유발하여 병의 진행을 도모하는 것으로 생각되는바 이 사이토카인의 생성 기전을 파악하고 억제할 수 있는 방안을 모색한다면 더욱 활발한 치료 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 자가항원에 특이적인 과반응을 동반하는 관절염 환자의 T세포의 활성기전을 이해하는 데 도움이 될 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구에 필요한 환자군을 모으는 데 도움을 주신 김선준 선생님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, Morand E: Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 48(1);103-109, 2003
- Aarvak T, Chabaud M, Kallberg E, Miossec P, Natvig JB: Change in the Th1/Th2 phenotype of memory T-cell clones from rheumatoid arthritis synovium. *Scand J Immunol* 50; 1-9, 1999
- Kim HY, Kim WU, Cho ML, Lee SK, Youn J, Kim SI, Yoo WH, Park JH, Min JK, Lee SH, Park SH, Cho CS: Enhanced T cell proliferative response to type II collagen and synthetic peptide CII (255-274) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42(10);2085-2093, 1999
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W: High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 164(5);2832-2838, 2000
- Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A: IL-17, Produced by Lymphocytes and Neutrophils, Is Necessary for Lipopolysaccharide-Induced Airway Neutrophilia: IL-15 as a Possible Trigger. *J Immunol* 170(4);2106-2112, 2003
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H: Protein expression and functional difference of modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biophys Res Commun* 275; 768-775, 2000
- LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F: Interleukin-1, tumor necrosis factor α , and Interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum* 44;2078-2083, 2001
- Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR: Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 40;1050-1053, 1997
- Cai L, Yin JP, Starovasnik MA, Hogue DA, Hillan KJ, Mort JS, Filvaroff EH: Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. *Cytokine* 16;10-21, 2001
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T: IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103;1345-1352, 1999
- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P: Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42(5);963-970, 1999
- Papageorgiou K, Isenberg DA, Latchman DS: Optimisation of herpes simplex virus-based vectors for delivery to human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 270(2);235-246, 2002
- Asturias JA, Arilla MC, Aguirre M, Gmez-Bayn N, Martinez A, Palacios R, Sanchez-Gascn F, Martinez J: Quantification of profilins by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J Immunol Methods* 229(1-2);61-71, 1999
- Das KC, White CW: Detection of thioredoxin in human

- serum and biological samples using a sensitive sandwich ELISA with digoxigenin-labeled antibody. *J Immunol Methods* 211(1-2);9-20, 1998
15. Dufour V, Arnauld C, Lantz O, Peguillet I, Morvilliers K, Emmanuel A, Jestin A: Quantification of porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for microplate detection. *J Immunol Methods* 229(1-2);49-60, 1999
 16. Han CW, Choi JH, Kim JM, Kim WY, Lee KY, Oh GT: Glucocorticoid-mediated repression of inflammatory cytokine production in fibroblast-like rheumatoid synoviocytes is independent of nuclear factor- κ B activation induced by tumour necrosis factor alpha. *Rheumatology* 40(3);267-273, 2001
 17. Flavio F. Alcantara, Dirk J. Iglehart, Robert L. Ochs: Heparin in plasma samples causes nonspecific binding to histones on Western blots. *J Immunol Methods* 226(1-2); 11-18, 1999
 18. Laurie J. Jones, Matthew Gray, Stephen T. Yue, Richard P. Haugland, Victoria L. Singer: Sensitive determination of cell number using the CyQUANTcell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254(1-2);85-98, 2001
 19. Wissam H. Faour, Arturo Mancini, Qing Wen He, John A: Di Battista, T-cell-derived Interleukin-17 Regulates the Level and Stability of Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through Restricted Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade: ROLE OF DISTAL SEQUENCES IN THE 3'-UNTRANSLATED REGION OF COX-2 mRNA. *J Biol Chem* 278;26897-26907, 2003
 20. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB: IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol* 162;1246-1251, 1999
 21. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M: Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B. *J Biol Chem* 273(42);27467-27473, 1998
 22. Tai YT, Podar K, Mitsiades N, Lin B, Mitsiades C, Gupta D, Akiyama M, Catley L, Hideshima T, Munshi NC, Treon SP, Anderson KC: CD40 induces human multiple myeloma cell migration via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/NF- κ B signaling. *Blood* 101(7);2762-2769, 2003
 23. Kontny E, Grabowska A, Kowalczewski J, Kurowska M, Janicka I, Marcinkiewicz J, Maslinski W: Taurine chloramine inhibition of cell proliferation and cytokine production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 42(12);2552-2560, 1999
 24. Lubberts E, Joosten LA, van de Loo FA, Schwarzenberger P, Kolls J, van den Berg WB: Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm Res* 51(2);102-104, 2002
 25. Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Schwarzenberger P, van de Loo FA, van den Berg WB: IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol* 167(2);1004-1013, 2001
-