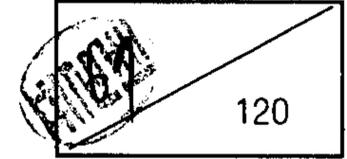


GOVP1199813652

BSHS1630-98023-5



제3차년도
최종보고서

신기능생물소재기술개발사업
Studies on Development of Novel Functional Biological
Molecules

염증유발cytokine의 작용기작 및 조절물질 탐색
Investigation of Mechanism of Actions and Regulatory Molecules
of inflammatory Cytokines

생명공학연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “염증유발cytokine의 작용기작 및 조절물질 탐색에 관한 연구”과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1998 . 7 .

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 최 인 표

연 구 원 : 양 영

“ : 윤 석 란

“ : 강 형 식

“ : 조 대 호

“ : 전 은 성

“ : 김 용 만

“ : 주 향 란

“ : 길 민 찬

“ : 송 현 근

“ : 이 상 철

“ : 이 민 주

협.공동연구기관명 : 제일약품 (주)

삼아약품 (주)

협 · 공동연구책임자 : 한 승 수

허 계 성

여 백

요 약 문

I. 제 목

염증유발cytokine의 작용기작 및 조절물질 탐색에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Proinflammatory cytokine들의 작용기작을 탐색하고 이들의 기능 및 생산을 조절할 수 있는 조절물질을 탐색하고 이를 응용하는 실용화기술개발을 목표로 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1차년도	<ul style="list-style-type: none">• Cytokine에 의한 면역세포 신호전달 체계• Cytokine 항체 생산• IL-6 mutant 생산기반 구축• Cytokine 생산억제물질
2차년도	<ul style="list-style-type: none">• Cytokine 항체응용 기술 탐색• IL-6 mutant 생산 및 기능 연구• Cytokine 생산 억제물질의 작용기작 연구• NK/LAK adhesion molecule의 동정 및 신호전달기작 탐색
3차년도	<ul style="list-style-type: none">• Cytokine의 작용기작 및 신호전달기작• Cytokine 및 cell adhesion molecule에 의한 면역세포 활성화• Cytokine 항체 생산 (제일약품 공동연구)• Cytokine 생산 억제물질 탐색

IV. 연구개발결과

염증유발cytokine인 IL-6의 작용기작을 규명하기위해 B cell에서의 신호전달 기작을 연구하여 CAM kinase가 IL-6신호전달과 B cell 증식에 관련하는 것을 밝혔고, 증식에 관련하는 IL-6 신호전달과정에서 protein phosphatase가 중요한 역할을 담당하는 것을 알 수 있었다. 이와같이 본연구를 통해 염증유발 cytokine의 작용기작을 여러 염증의 경우에서 살펴보고 이러한 기초연구 결과를 바탕으로 염증 및 면역질환 진단과 치료방법으로 염증유발 cytokine을 활용하는 연구를 하였다. 염증, 면역질환에 관련하는 염증유발 cytokine의 과다생산을 억제하기위해 약용식물로부터 유용한 성분을 검색하였는데, 분방기의 추출물을 얻어 인체 대식세포가 분비하는 IL-6생산에 미치는 영향을 측정 한 결과, IL-6 생산억제를 함을 관찰하였다. 이 물질은 IL-6의 유전자 발현도 역시 억제하였고, 여러세포를 대상으로 실험하여 역시 유사한 억제 효과 관찰 하였다. 또한 염증을 동반하는 동물 규폐증, 간경변 모델에서도 억제효과가 뚜렷하여, 염증치료제로 개발될 가능성이 높다. 한편 acanthoic acid는 우리나라에서 자생하는 섬오갈피에서 분리정제한 물질인데 인체 대식세포에서 염증유발 cytokine인 IL-1/TNF생산을 억제하는 효과가 관찰되었고 특히 규폐증, 간경변 동물 염증모델에서 억제 효과가 있었다. 여러 염증 및 면역질환을 조절, 진단하는 방법으로 염증유발 cytokine의 항체를 개발하였고자 IL-6의 단일클론항체를 생산하였다. 대장균에서 생산된 IL-6를 항원으로 하여 단일클론 항체를 얻어 특성을 분석하였는데 native및 재조합 IL-6를 공히 인식하였고 (100 - 1000 pg/ml), 다른 여러가지 유사한 인체 cytokine들 (IL-1, IL-2, IL-4)은 인식하지 않아 특이성을 검정할 수 있었다. 이를 여러 IL-6가 관련 하는 환자 sample에서 IL-6의 농도를 측정한바 bioassay와 매우 유사한 결과가 나와 실제로 여러 염증 및 면역질환환자에서 IL-6를 검색할 수 있었고, 이

를 이용하여 IL-6 ELISA 및 진단용 kit를 만들었다. 이를 활용하여 IL-6 생산과 밀접한 관계가 있는 조산, 염증, 면역질환을 조기에 진단하는 진단용 kit로의 활용하고자 한다.

V. 연구개발결과의 활용계획

염증에 의한 여러 질환을 효과적으로 진단하고 치료하기 위해서는 이에 대한 기초적인 원인 및 작용기작을 이해하는 것이 필요하다. 염증은 여러 가지 외부 병원체 및 항원에 의해 염증유발 cytokine들이 발현되고, 이에 의해 여러 염증 관련 세포와 세포의 생성물에 의해 진행된다.

본 과제에서는 염증유발 cytokine들인 IL-6, IL-1, TNF의 작용기작에 대한 기초적인 연구를 수행하였고 이를 응용하는 기술개발로, 염증에 의한 조산환자 등에서 IL-6 검사를 통한 염증 질병진단에 응용하고자 IL-6 ELISA kit를 개발하였고 이를 이용하여 조산 등의 염증질환 진단법으로 활용하고자 한다. 또한 염증에서 과다하게 분비되는 염증cytokine의 생산억제물을 탐색하여 식물체로부터 두 종류의 염증cytokine 억제물질들을 분리하였다. 이들은 IL-6, IL-1 및 TNF 생산을 효과적으로 억제하였고 동물실험을 통해 이 물질들이 섬유화, 간경변 등의 질환을 억제하는 항 염증, 섬유화 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이 물질을 앞으로 효과적인 면역질환 치료제로 활용하고자 한다.

여 백

S U M M A R Y

IL-6 has been reported to affect many kinds of target cells in the immune, hematopoietic, and inflammatory systems. It is involved in B cell differentiation, T cell activation, and several immune diseases. In the liver, IL-6 induces the broad range of acute phase proteins. To learn the mechanisms of action of proinflammatory cytokine, IL-6, we studied the signaling pathway of IL-6 in B cell. We found that PP2A is involved in IL-6 signal and growth of B cells. Interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) are major proinflammatory cytokines inducing the synthesis and release of many inflammatory mediators. They are involved in immune regulation, autoimmune diseases, and inflammation. Acanthoic acid, (-)-pimara-9(11), 15-dien-19-oic acid, is a pimaradiene diterpene isolated from the Korean medicinal plant, *Acanthopanax koreanum*. When human monocytes/ macrophages stimulated with silica were treated with 0.1-10 ug/ml acanthoic acid, the production of IL-1 and TNF- α was inhibited up to 90%, but the production of IL-6 was not inhibited at all. At these concentrations, it had no cytotoxic effect on human monocytes/macrophages. It also suppressed the production of TNF- α by alveolar macrophages and lymphocytes stimulated with silica. In addition, acanthoic acid inhibited the release of superoxide anion and hydrogen peroxide from human monocytes/macrophages and neutrophils. To know the anti-fibrotic effects of acanthoic acid, its effects on fibroblast proliferation and collagen synthesis were tested. The proliferation of NIH3T3 cells was inhibited almost completely by the addition of the

culture supernatants of human monocytes/ macrophages treated with acanthoic acid, but not by the addition of acanthoic acid only. *In vitro* and *in vivo* treatment with acanthoic acid reduced collagen production by rat lung fibroblasts and lung tissue. Furthermore, acanthoic acid suppressed granuloma formation and fibrosis in the experimental silicosis. Acanthoic acid reduced serum GOT and GPT in the rats with cirrhosis induced by CCl₄, and it was effective in reducing hepatic fibrosis and nodular formation. Taken together, these data indicate that acanthoic acid has a potent anti-inflammatory and anti-fibrosis effect by reducing IL-1 and TNF- α production. Also, to identify IL-6 in the sera and fluids, we made IL-6 ELISA kit. It detected 100-1000 ph/ml IL-6 in fluids. We are going to use this kit for diagnose the inflammatory diseases.

C O N T E N T S

1. Introduction
2. Present research status in foreign and our country
3. Contents and results
 - (1) Materials and Methods
 - (2) Results
 - 1) Mechanisms of action and signaling of cytokines
 - 2) Investigation and application of immune modulators
 - 3) Functions and application of modulators of cytokine production
 - 4) Production and application of anti-IL-6 antibodies
 - 5) Roles of IL-6 in preterm labor
4. Accomplishment of research proposal
5. Application of results
6. References

여 백

목 차

제 1 장 서론	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	19
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
가. 실험방법 및 재료	21
나. 실험결과	36
1. Cytokine의 작용기작 및 신호전달	36
2. 면역세포 활성물질탐색 및 응용	40
3. Cytokine 생산 조절물질 기능연구 및 응용기술개발	42
4. IL-6 항체 생산 및 응용 기술개발	68
5. 조산 발생에서 IL-6의 역할 규명	72
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	78
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	79
제 6 장 참고문헌	81

여 백

제 1 장 서 론

Inflammation(염증)은 세포 및 조직의 손상이나 감염에 대한 local 혹은 systemic 방어기작으로 주로 면역계를 이루고 있는 수많은 soluble humoral mediator가 직접 반응하거나 local 혹은 systemic 한 effector system 을 자극하여 연쇄적인 생체반응을 유도한다.

염증반응의 유도는 크게 4가지 단계로 나누어 진행되는데 우선 바이러스, 대장균, 기생충, toxin, chemical 등이 체내에 들어와 monocyte/macrophage등과 같은 면역세포를 자극하는 단계로 표적세포의 활성화 및 phagocytosis 나 pinocytosis를 유도한다. 다음 단계로 초기의 host 반응을 나타내어 proximal mediator 를 생산, 분비하는데 complement나 IL-1, IL-6, TNF, IFN등의 proinflammatory cytokine(염증유발 cytokine)등을 분비한다. 이러한 mediator는 다시 조직에 따라 각기 다른 2차 표적세포를 자극하여 PLA₂나 PGE₂와 같은 중간 mediator 의 생산을 유도하여 마지막 단계로 distal effector 들인 protease, PAF, reactive oxygen species 등을 분비하여 조직이나 세포에 손상을 입힌다. 이러한 염증반응에 관련하는 cellular effector system은 주로 PMN, CTL, NK, macrophage등의 면역세포와 soluble한 proinflammatory mediator, cytokine등이 복잡한 network을 이루고 있다. 염증질환은 이러한 soluble mediator 특히 proinflammatory cytokine의 불균형과 effector cell의 상호작용으로 야기되는 바 proinflammatory cytokine의 작용기작을 이해하고 이들의 조절물질을 탐색하고 응용하는 연구가 염증 및 나아가 전체 면역기능을 이해하는데 절실히 필요하다.

면역체는 외부자극에 대한 생명체가 갖는 자체 방어 system으로서 innate immunity와 adaptive immunity로 구분될 수 있는데 각기 여러종류의 면역세포들의 활성화 및 분화 단계에 따라 다양한 반응을 나타내고 있다. 성장과 조직·발육 및 cytokine을 면역기능의 항상성(homeostasis)유지에 중요한

인자로서 주로 면역세포에서 분비되어 면역세포간의 상호communication과 조절에 관련한다. 이들은 여러 조혈세포 및 lymphocyte의 성장 및 분화에 관련하고, 여러 병원균의 침입 및 조직손상에 대한 면역 및 염증 반응을 유도하고 매개하는 전체 면역기능의 조절 기능을 갖는다.

현재까지 약 20여종에 이르는 면역계 관련cytokine이 발견되어 그 유전자의 염기서열 및 일차구조와 기능이 밝혀져 있다. 이들은 대부분 골수기조세포, progenitor세포, T세포, B세포 등의 활성화 조절인자로서 각각 고유의 수용체를 통하여 면역세포의 성장과 분화의 complex network에서 다양한 기능을 나타내며 이들 기능이 유연하게 연계된 network interaction으로 생체의 발육, 성장 및 방어기작을 지배하는 면역계의 근간을 이루고 있다. 이 cytokine들의 분비 및 생성은 면역세포의 성장 및 분화과정에서 세포내의 유전자발현 programming과 세포외부로부터의 자극에 의해 결정되어지는데 이들의 작용의 특징은 기능의 다양성(pleiotropy), 표적세포의 중복성(target cell redundancy) 및 상호 cytokine의 작용을 조절하므로써(co-regulation/counter-regulation)나타내는 network interaction으로 요약될 수 있다. 생체의 성장과 발육을 통해 전반적으로 이루어지는 면역기능의 조절과정은 여러종류의 활성화인자 및 cytokine들이 함께 작용하는 것으로 보이는데 현재까지 밝혀진 조절인자의 기능 및 작용만으로는 그 고도로 complex한 network control mechanism의 이해가 매우 부족한 상태이다. Cytokine은 그 기능 및 구조에 따라 조혈작용에 관련하는 hematopoietins, interferons, TNF family, immunoglobulin super family, chemokine등으로 나누어진다. 이들 중 T helper cell 에서 생산되는 cytokine은 그 기능에 따라 다시 Th₁ 및 Th₂ type의 cytokine 으로 구분된다. Th₁에 속하는 IL-2, IFN₂, 그리고 TNF β 는 대식세포의 immunity에 관련하고, Th₂에 속하는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13등은 B세포가 antibody를 생산하는 plasma cell로 성장·분화하는데 관

련하거나 조직손상으로 인한 염증반응 및 자가면역질환등에 관련한다. Th₁/Th₂ phenotype은 전반적인 면역 체계의 항상성을 유지하는데 매우 중요하며 antigen-presenting cell, 면역세포 adhesion molecule 혹은 다른 종류의 cytokine등에 의해 그 phenotype이 변화될 수 있다.

이들 중 염증반응에 관련하는 Th₂ type의 cytokine인 1L-6는 다양한 (pleiotropic)기능을 가지는 cytokine으로 T, B 세포뿐 아니라 monocyte, fibroblast, keratinocyte등 다양한 세포로부터 분비되는데 그 작용기작은 크게 3가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째 세포 분화 증강작용으로 B세포 항체 생산, 간세포의 acute phase protein 생산, 조혈세포의 활성화 기작이고, 둘째 세포성장 증식 작용으로 myeloma세포, T세포, mesangial 세포 증식기작이고, 셋째 세포증식억제 작용으로 myeloid leukemia세포, breast cacinoma세포 증식 억제 등이 이 범주에 속한다. 또한 1L-6의 생산조절의 이상으로 여러가지 염증질환 및 면역질환이 야기되는데 B세포 이상으로 생기는 rheumatoid arthritis, cardiac myxoma등의 자가면역질환, keratinocyte의 과다 증식으로 생기는 psoriasis, 또한 multiple myeloma, lymphoma와 leukemia등의 종양에도 관련한다. 인체 1L-6의 구조는 184개의 아미노산으로 구성되어 있고 2개의 disulfide본드 (Cys45-51, Cys 74-84)와 O-linked(Thr 139)및 N-linked(Asn 46) glycosylation이 있다. 아직 tertiary구조는 안 알려져 있지만 4개의 antiparallel α -helix 구조(A, B, C, D)를 가지고 있으며 1L-6 receptor에 site I 부분 (Ser 178 - Met 184)이 결합하는 것으로 알려져 있으며 site II 부분 (Glu 160 - Thr 163)이 1L-6 activity에 관련하는 것으로 추측되고 있다. 1L-6 receptor는 다른 cytokine receptor와 같이 두개의 α, β subunit로 구성되어 있는데 1L-6가 α subunit인 gp80에 결합하면 β subunit인 gp130가 dimer형태로 결합하여 receptor complex를 이루어 세포내에 신호전달을 하는 것으로 알려져 있다. 신호전달에는 gp130와 결합되어 있는 Jak

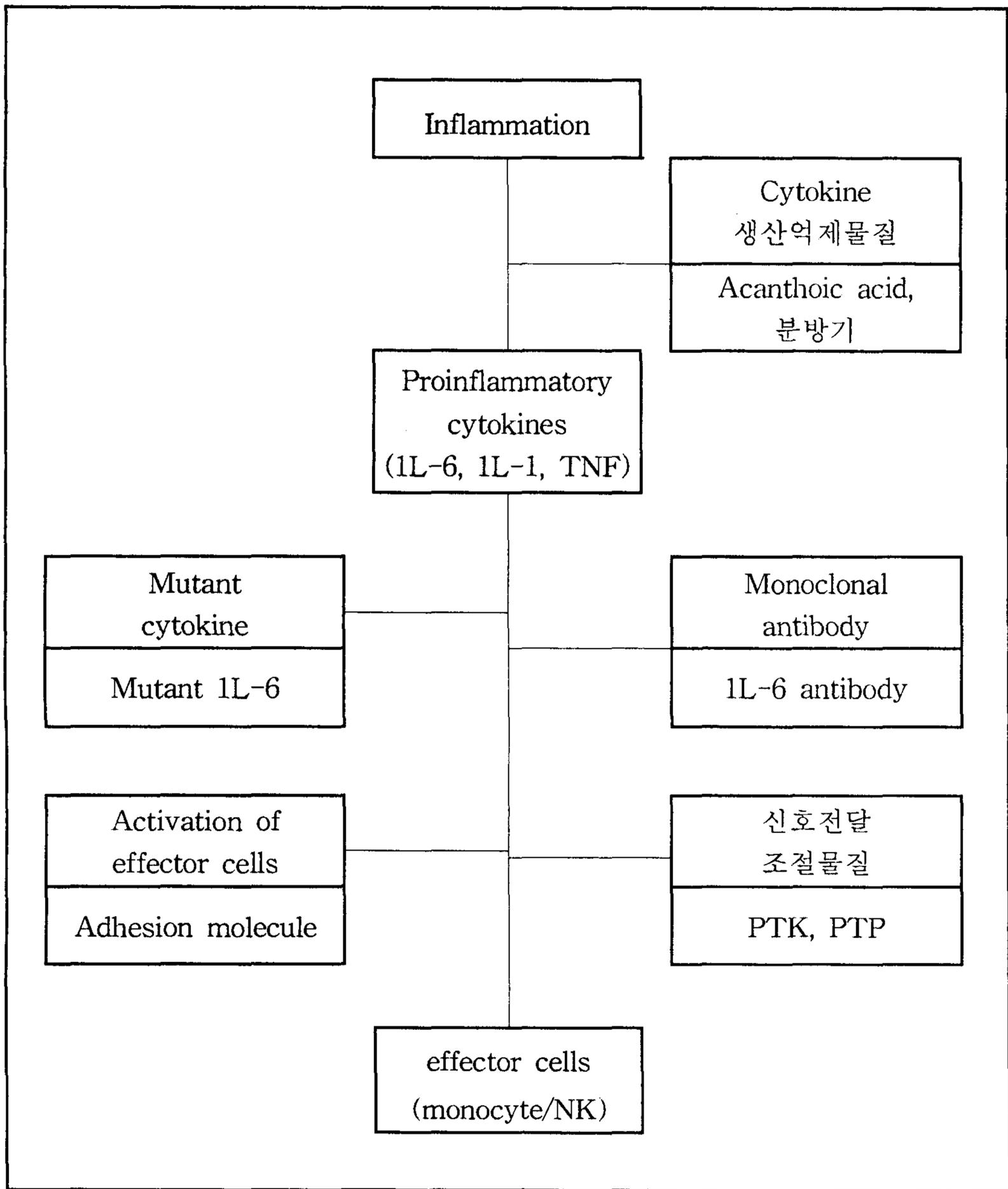
Kinase(Jak₁, Jak₂)와 STAT을 통한 pathway와 Grb₂/SOS 및 MAP kinase cascade를 통한 pathway가 합쳐져 있다.

이러한 inflammation과 면역반응의 매개체를 중요한 cytokine을 조절하는 방법은 크게 둘로 나누어 볼 수 있는데 우선 proinflammatory cytokine이 외부자극에 의해 분비되는것을 억제하는 방법과 cytokine이 대상세포를 자극하는 것을 조절하는 방법을 들 수 있다. Proinflammatory cytokine생산을 억제하는 방법으로는 IL-1, TNF- α 등의 생산억제제들이 미생물·유용 식물로부터 탐색되어 왔는데 SK&F 86002, IL-1 β converting enzyme inhibitor인 WIN 67694등이 알려져 있다. 따라서, 유용식물의 small molecule들은 탐색하고 유효 fraction을 찾아 이를 토대로 cytokine specific한 생산 억제 물질을 동정하고 구조 및 작용기작을 밝히는 일이 조절제 탐색에 근본이 된다. Cytokine 작용조절제로는 monoclonal antibody, mutant cytokine, cytokine신호전달 조절물질 등을 대상으로 탐색하고자 한다. Monoclonal antibody는 cytokine의 activity를 neutralizing하는 것을 주기능으로 생각할 수 있고 한편 최초의 보고에 의하면 *in vivo*에서는 antibody가 저항체로뿐만아니라 activity를 오래 유지하는 carrier로도 agonistic한 기능도 보인다고 알려져 여러 기능을 갖는 보다 다양한 monoclonal antibody의 개발이 시급하다. 또한 작용조절제로 mutant cytokine의 개발이 중요한데 우선 cytokine structure와 biological design을 통해 cytokine을 redesign하는 기술의 개발이 필요하다. 이러한 cytokine engineering을 통해 새로운 기능과 성질을 갖는 mutant를 만들어 우선 receptor에 binding하나 activity 가 없는 저해제로서의 mutant 혹은 실제로 cytokine을 생체조절물질로 사용할 때 유발하는 side effect를 최소화하는 안정한 cytokine개발을 할 수 있는 연구가 필요하다. 한편 cytokine이 대상세포에 자극하여 일어나는 세포내 신호전달기작연구와 이를 조절하는 신호전달물질 즉 receptor, protein kinase와 phosphatase및 기타 조절물질에

대한 분자생물·생화학적 연구가 필요하며, 염증 반응에 관련하는 effector cell인 monocyte 및 NK cell의 활성화, 신호전달기작에 미치는 proinflammatory cytokine의 역할, adhesion molecule과의 상호작용 및 조절물질 탐색연구가 필요하다. 이와같이 보다 체계적이고 총체적인 관점에서 inflammation과 proinflammatory cytokine의 기능 및 역할을 이해하고 나아가 기능 조절물질을 탐색하는 연구체제가 절실히 요구되며, 이와같은 연구는 선도기술개발사업과 같은 중장기 대형과제에서 가능하며 본 연구팀은 1단계 3년간의 연구경험과 결과를 바탕으로하여 앞으로 2단계 3년의 연구를 체계적으로 수행코자 하며 궁극적으로 면역체계의 이해에 일력을 담당코자 한다.

이러한 관점에서 본 연구팀은 선도기술개발 1단계(92-95)에서 얻은 1L-6를 중심으로한 proinflammatory cytokine의 작용연구와 조절물질탐색에 대한 연구결과를 토대로 하여 이들의 작용기작과 조절방법에 대한 이해를 더욱 깊게 하기 위해 다음과 같은 네가지의 specific aim을 2단계 연구에서 수행하였다.

즉, 첫째 proinflammatory cytokine의 세포내 신호전달물질탐색 및 작용기작, 둘째 1L-6등 proinflammatory cytokine의 생산억제물질탐색 및 염증반응에 응용, 셋째 1L-6 항체와 mutant 1L-6 생산을 통한 1L-6 작용조절 및 in vivo model에 응용, 그리고 넷째 이들 proinflammatory cytokine이 inflammation effector cell인 monocyte와 NK/LAK의 활성화 기작 및 조절물질 탐색의 4가지 specific aim을 가지고 2단계 연구를 진행하였다.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

Cytokine 작용억제제에 대한 연구는 미국·일본등이 중심이 되어 1L-1 receptor antagonist인 1L-1 ra, soluble TNF- α receptor, cytokine항체등이 개발되어 왔다. Chugai(일본)은 1L-6 receptor의 항체 생산 및 인간화 항체 생산을 통해 자가면역치료제로 개발하고 있다. cytokine의 생산억제제로는 1L-1, TNF- α 생산억제제인 SK & F 86002가 연구되었고 bisbenzplisoguinoline alkaloid인 tetradrine, WIN 67694가 보고되었고 이들의 IC₅₀은 1-2 μ M이다. 현재까지의 cytokine연구에서 protein engineering을 이용한 mutant를 사용한 연구내용들은 대부분 구조적인 관점에서 그 작용 mechanism을 규명하고자 하는 것이었다. IL-6의 예를 보면 아직 3차구조가 밝혀지지 않은 관계로 유사한 receptor family인 growth hormone(GH)의 구조를 model로 하여 연구를 진행하고 있다. GH의 구조로 부터 예상되는 receptor binding domain들에 대해 mutagenesis를 통해 amino acid 치환 mutant를 만들고, 그것들의 biological activity와 receptor binding site의 결정을 통하여 regulatory domain을 밝히는 것과 receptor작용 mechanism연구등의 최근까지의 연구방향이다. 이러한 연구들은 주로 1L-6의 receptor antagonist의 개발과 receptor의 signalling mode에 대해 관심이 집중되어 있다. 최근 보고된 연구 결과는 receptor에 binding하지만 activity가 없는 antagonist 성질을 갖는 mutant 1L-6들이 만들어 졌고, signalling mode와 관련하여 receptor가 hexameric formation을 갖는 것으로 제시되었다. 본 연구 방향 처럼 1L-6의 안정성과 기능에 대한 연구는 최근에 국내 한효 과학기술원에서 TNF에 대해 유사한 연구를 시도하고 있으며, 그밖의 cytokine등에서는 이와 관련연구는 국내외에서 현재 보고된바가 없다. 신호전달체계에 대한 연구는 주로 단백질 인산화 조절에 관한 연구가 활발히 진행되어 신호전달 단백질간의 결합을 유도하는 SH, PH domain에 대한 연구가 많이 진행되어지고 있다.

신호단백질 인산화 조절에 관여하는 protein kinase, protein phosphatase들의 경우 이에 많은수의 유전자들이 cloning되어 졌고, 그 대부분은 최근에 세포 내 신호전달체제에서의 생물학적 기능이 잘 알려지고 있고, 또한 이미 상당 부분은 규명되어 있다. 하지만 세포내의 복잡한 생리 반응에 근거하여 아직 알려진 protein kinase, protein phosphatase들보다 알려져 있지 않은 kinase 와 phosphatase들이 상당수 존재함을 초초의 보고는 제시하고 있다. 구체적으로로는 인간의 경우, 약 2000개 까지의 protein kinase가 존재할 것이라 추정되고 있으며, 이런 사실들은 또한 protein phosphatase들도 마찬가지로, C. elegans에서만도 약 230개의 phosphatase들이 존재함을 보여주고 있다. 인간의 경우 약 5배 정도의 genome크기를 생각하면 phosphatase의 경우 역시 약 1000개 정도 까지 존재할 것이라 보고되어 있다. 따라서 각각의 이런 kinase와 phosphatase가 생물학적기능에서, 상당수는 총합성을 가지나, 대부분은 각 target단백질에 대한 고유한 기능을 가지는 점과 궁극적인 질환의 진단 및 치료제로써의 이용가능케함을 위하여, 아직 밝혀져 있지 않은 신규 kinase 및 phosphatase유전자 또는 단백질의 탐색 및 동정, 그 생리학적 기능의 분석은 아직도 발병원인이 밝혀지지 않은 암 또는 염증을 비롯한 각종 면역질환등에 효과적인 의약품개발로도 응용에 필수적인 학문적·기술적 기초 기반을 제공할 것이다. Monocyte 및 NK/LAK에 대한 연구는 주로 IL-2나 IFN- γ 등에 의해 유도되는 tumor cytotoxicity에 관한 연구가 주를 이루고 있으나 최근 IL-6, TNF- α 가 이들과 더불어 NK/LAK activation에 관련한다고 보고되고 있다. 또한 NK/LAK은 inflammation의 effector cell로 여러 mediator나 기능을 담당하는 것으로 알려지고 있다. 또한 adhesion molecule의 연구도 활발하며 세포표면에 있는 NK-TR등 새로운 molecular등이 cloning되고 기능이 밝혀지고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

가. 실험방법 및 재료

(1) 사람의 단핵구, 대식세포 및 호중구의 분리

사람의 단핵구, 대식세포 및 호중구를 얻기 위해서는 헤파린 처리한 정상인의 말초혈액을 헵크 염수용액(Hank's balanced salt solution: HBSS: Mg^{++} 및 Ca^{++} free)으로 2배 희석하여, 밀도 1.077의 피콜-하이파크(Ficoll-Hypaque)를 밀도 1.119의 피콜-하이파크 위에 중층한 후 실온에서 700g, 30분동안 원심분리하여 단핵세포(mononuclear cell, MNC, 밀도 1.077과 혈장사이의 층)와 호중구(밀도 1.077과 1.119 사이의 층)를 분리하였다. 분리된 세포를 4℃ HBSS(Ca^{++} , Mg^{++} free)로 2회 세척하고 10% 소태아혈청(FBS, Hyclone, Logan, Utah)을 함유한 RPMI 1640(Gibco, Grand Island, NY)배지에 부유하여 37℃ 에서 2시간동안 24-웰 배양 플레이트(Costar, Cambridge, MA)에 부착시켜 단핵구 및 대식세포를 얻었다.

(2) 섬유 아세포의 분리

흰쥐로부터 섬유아세포의 분리는 흰쥐를 에테르로 마취한 후 복부를 절개하고 폐장을 적출하여 무균 작업대 내에서 불필요한 조직을 제거하고 2~4mm 크기로 잘게 자른 후 콜라게나제와 0.5% 트립신이 함유된 인산염 완충액(PBS)에 부유시켜 37℃에서 약 2시간 동안 조직을 소화시킨 후 멸균된 거즈에 여과하여 소화되지 않은 조직 등을 제거하였다. 이렇게 분리된 세포들은 PBS로 2~3회 세척하여 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에 1~2일 동안 37℃, 5%

CO₂ 배양기(Lunaire Environ, Inc., Pennsylvania, USA)에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하고 새로운 배지를 가하여 세포가 빈틈없이 찰(confluent)때까지 배양하였다. 이들 세포는 계대배양 5회 이내의 세포를 실험에 사용하였다. 또한 NIH3T3 섬유아세포도 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에서 같은 조건으로 배양하였다.

(3) 류마티스 관절염 환자의 활막세포의 분리

류마티스 관절염 환자의 활막세포를 얻기 위해 먼저 환자 조직을 차가운 PBS로 3회 세척한 후 멸균가위로 2mm 크기로 잘게 자르고 콜라게나제 A(5mg/ml, BM)와 DN아제(DNase) 타입 I(0.15mg/ml, Sigma)이 포함된 DMEM (Sigma, U.S.A.)에 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. 그 후 0.5% 트립신-0.2% EDTA를 가하여 30분간 더 배양하였다. 이렇게 용해시킨 조직을 PBS로 2회 세척하고 DMEM으로 1회 더 세척하여 분리된 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM(DMEM-10% FBS)에 부유시켜 1주일동안 배양하였다. 그후 활액 부착 세포(synovial adherent cell)를 트립신-EDTA로 분리하여 세척하고 DMEM-5% FBS에 ml당 10⁵ 세포로 부유시켜 24웰 배양 플레이트에 각각 1ml씩 가하여 24시간 배양액을 얻어 -20°C에 보관하면서 다음 실험에 사용하였고 일부는 계대하여 얼려서 액체질소 탱크에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(4) 분방기추출물 A, B C 및 D의 제조

건조된 분방기의 뿌리(약 4.0kg)를 가늘게 썰고 실온에서 메탄올 약 5ℓ 로 이틀씩 반복 3회 추출하여 메탄올 추출물(추출물 A) 약

224g을 얻었다(수율 5.6%). 이 추출물 A를 90% 메탄올(500ml)과 n-헥산(500ml)으로 분획하여 90% 메탄올층을 얻었고, 이것을 감압농축기에서 메탄올을 제거시키고 0.1M NH₄OH로 pH를 10으로 조절한 후 증류수(300ml)와 CH₂Cl₂(300ml)의 혼합용액으로 분획하여 CH₂Cl₂층 즉, 알칼로이드 분획(추출물 B) 25g을 얻었다(수율 0.6%). 한편, 분방기 증류수 추출물(추출물 C)은 건조된 분방기의 뿌리를 파쇄하여 분말로 만든 다음 가는 메쉬(60메쉬)를 이용하여 여과하고 멸균된 생리 식염수로 100mg/ml로 용해하여 100℃에서 12시간동안 증탕한 후 -20℃에서 보관하면서 사용하였다. 혹은 간경변 모델에 투여시에는 방기 113.5g을 3,000ml round flask에 증류수 2,000ml과 함께 넣은 다음 냉각기를 부착시키고 2시간 동안 가열하여 여과한 약을 rotary vacuum evaporator (Buchi 451)에서 감압농축하고 이 round flask를 -84℃ Deep freezer (SANYO, Japan)에서 1시간동안 방치한 후 freezer dryer (EYELA, Japan)로 4시간 동안 동결건조하여 56.55g의 분말을 얻었다. 또한 추출물 D는 잘 건조된 분방기의 뿌리 (약 500g)를 실온에서 에탄올 약 1,500ml로 이틀씩 반복 3회 추출하여 에탄올 추출물 약 13g을 얻었다(수율 2.6%).

(5) 분방기 추출물을 사용한 세포처리 방법

이상의 세포들로부터 분방기를 처리한 세포배양액을 얻기 위하여 이들 세포에 각기 다른 농도(0.1, 1, 10 μ g/ml)의 분방기 추출물들을 가하고 1시간동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 전배양한 후 실리카 (silica) 100 μ g/ml을 가하고 RPMI 1640 배지에 FBS의 최종농도가 2% 되도록 하여 각각 1ml씩 가하고 같은 조건으로 48시간 동안 배양한 후 상층액을 회수하였다. 이 상층액을 다시 1,500rpm으로 10분

간 원심분리하여 세포 및 실리카 등을 제거한 후 투석(dialysis)하고 0.2 μ m 여과 주사기로 여과하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 우선 분방기 추출물 B를 처리하기 하루 전 활막세포를 1.5 x 10⁶ 세포/웰(6웰)에 도말하고, 분방기를 각각 1 μ g/ml 및 10 μ g/ml 농도로 처리한 후에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건으로 3일간 배양하였다. 3일 후에 상층액을 제거하고 PBS로 1회 세척한 후에 변성 용액(4M 구아니디늄 티오시아네이트, 25mM 소듐 시트레이트 pH 7.0, 0.1M 2-머캅토에탄올 0.5%, 사르코실) 500 μ l를 각 웰에 넣고 부드럽게 피펫팅하여 세포를 깨고 튜브로 그 용액을 옮겼다. 각 튜브에 50 μ l의 2M 소듐 시트레이트, pH 4.0을 넣고 섞은 후 500 μ l의 물로 포화시킨 페놀을 가하여 다시 잘 섞었다. 그후 200% 부피의 클로로포름을 넣고 잘 섞은 후 얼음에서 10분간 방치하고 12,000rpm으로 원심분리한 후 상층액을 취하고 상층액에 1ml의 이소프로필 알콜을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 방치하였다. 12,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 펠렛을 70% 메탄올로 세척하고 펠렛을 건조시킨 후에 0.1% 디에틸 피로카보네이트(diethyl pyrocarbonate)-물을 20 μ l 넣고 잘 녹였다(최종농도 10 μ g/ml).

(6) RT-PCR

RNA로부터 외가닥 cDNA 합성을 위해 M-MLV 역전사효소(Promega, U.S.A)를 사용하여 역전사 반응을 수행하였다. 그 반응 혼합물은 다음과 같다.

5 x 반응 완충용액	5 μ l
dNTP(dATP, dCTP, dGTP, TTP 각 5 μ M)	2 μ l
프라이머(Not I-dT)	1 μ l (0.2 μ g)
증류수	1 μ l
총 세포 RNA	10 μ l
역전사 효소	1 μ l (200U)

20 μ l

이 혼합물을 42°C에서 30분간 반응시킨 후 90°C에서 5분간 반응을 정지시켰다. 이렇게 얻은 반응물에 다음과 같은 시료를 섞어 PCR 반응을 수행하였다.

위의 반응물	20 μ l
PCR 10 x 완충용액	8 μ l
5' 프라이머	1 μ l (20pmol)
3' 프라이머	1 μ l (20pmol)
증류수	69 μ l
Taq 중합효소	1 μ l (2.5U)

100 μ l

위의 반응물을 95°C에서 5분간 방치하여 어떤 다른 효소활성을 저해시킨 후에 95°C에서 1분 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초를 반복하는 사이클을 30회 수행하고 마지막으로 95°C에서 1분 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 5분간 반응을 수행하였다. 이렇게 얻

은 반응물중에서 $10\mu\text{l}$ 을 취하여 1.0% 아가로스 겔에서 30분간 100V에서 전기영동하였다.

(7) 아칸토산의 제조

잘 건조된 섬오갈피의 근피(약 1.7kg)를 잘게 자르고 실온에서 메탄올 10 l 로 3 회 반복 추출하여 메탄올 추출물 200g 을 얻고 이 메탄올 추출물을 증류수와 디에틸에테르로 분획한 후 디에틸에테르 층을 얻고 이를 감압농축하여 디에틸에테르 추출물 110g 을 얻었다. 이 디에틸에테르 추출물을 헥산:에틸 아세테이트 (20:1→5:1)의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 아칸토산 30g 을 얻었다(수율 1.76%).

(8) 아칸토산을 사용한 세포처리 방법

세포들로부터 아칸토산을 처리한 세포 배양액을 얻기 위하여 이들 세포에 각기 다른 농도(0.1, 1, $10\mu\text{g}/\text{ml}$)의 아칸토산을 가하고 1 시간동안 37°C , 5% CO_2 배양기에서 전배양한 후 실리카(silica) $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 가하고 RPMI 1640 배지에 FBS 의 최종농도가 2% 가 되도록 하여 각각 1ml 씩 가하고 같은 조건으로 48 시간동안 배양한 후 상층액을 회수하였다. 이 상층액을 다시 1,500rpm으로 10분간 원심분리하여 세포 및 실리카 등을 제거한 후 투석(dialysis)하고 $0.2\mu\text{m}$ 여과 주사기로 여과하여 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(9) 아칸토산의 세포독성 검정

이들 세포 배양액에 대한 아칸토산의 독성실험을 실시하였다. 즉, 참조예 1 에서와 같은 방법으로 얻은 단핵구 및 대식세포에 아

칸토산을 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 참조예 1 의 (4)의 방법에 따라 처리하고 배양 종료후 배양액을 회수하고, 앨리(Alley) 등의 방법(Alley, M. C. et al., Cancer Res. 48, 589(1988)) 에 따라 3-4,5-디메틸티아졸-2,5-디메틸 테트라졸리움 브로마이드(MTT, Sigma)를 0.5 mg/웰씩 가하여 4 시간동안 배양하였다. 그 후 원심 분리하여 산층액은 버리고 생존한 세포로부터 형성된 포르마잔(formazan)을 산성화시킨 이소프로필 알콜(이소프로판올중의 0.04N NCl)을 100 μl 씩 각 웰에 가하여 용출시킨 뒤 ELISA 리더(Titertek multiskan Mcc/340)로 540nm 에서 광학밀도(O.D) 값을 측정하여 분석하였다(제 1 도). 아칸토산은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지는 배지만으로 처리한 대조군과 아무런 차이가 없으므로 적어도 이 농도까지는 세포독성이 없는 것을 확인할 수 있었으며 모든 실험은 이 농도 범위 안에서 수행하였다.

(10) 항 인체 인터루킨-6 단일클론 항체의 생산

정제된 인체 인터루킨-6에 대한 항혈청과 잡종세포 생산을 위해 최초의 면역화는 재조합 인체 인터루킨-6를 비장에 직접 주사하였다. 즉 나이트로셀룰로스 종이를 1 X 1 cm로 잘라 30분간 자외선에 노출시킨후 10ug의 재조합 인체인터루킨-6를 점적하고 말린다. 완전히 건조된 나이트로셀룰로스 종이를 1 X 1 mm정도로 잘게 자른후 15ml 튜브에 넣고 200ul 식염수를 가한후 얼음 위에서 분쇄한다. 주사는 먼저 생쥐 비장부분의 복부를 열고 위에서 준비된 200ul의 분쇄물을 비장에 주사한후 다시 복부를 봉합하였다. 2주 후 처음 주사때와 동일한 양의 재조합 인체 인터루킨-6를 Freund's incomplete adjuvant (FIA)와 혼합하여 양쪽 대퇴부의 근육에 주사

하고 3일 후 눈에서 소량의 혈액을 채혈하여 항체 생성여부를 엘라 이자 방법으로 측정하고 항체의 역가가 높을때까지 반복하였다. 마지막 주사는 직전의 재주사로 부터 1주일 후에 FIA와 섞지 않은 인터루킨-6를 이전의 주사때와 동일한 양으로 꼬리정맥에 주사하였다. Hypoxanthine phosphoribosyl transferase(HPRT ; EC 2.4.2.8)는 aminopterin, azaserine등에 의하여 purine nucleotide의 합성경로가 저해되는 신생합성경로(de novo pathway)에 의하지 않고 도 hypoxanthine이나 guanine 염기를 각각 inosine-5'-monophosphate (IMP)나 Guanine-5'-monophosphate(GMP)로 전환 시키는 재생경로(salvage pathway)에 관여하는 효소인데, 이 HPRT 가 결핍된 것으로 알려진 SP2/0-Ag14(ATCC, CRT 1581) 골수종 세포주의 특성을 세포융합전에 확인한 결과, 이 세포주는 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, GIBCO, Grand Island, NY)과 10% Fatal Bovine Serum(FBS, Hyclone, Logan, Utah)을 포함한 배지에 Guanine analog인 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 6-thioguanine 을 첨가한 배양액에서는 잘 자라는 반면에 hypoxanthine-aminopterin-thymidine(HAT, $5\times 10^{-3}\text{M}$ hypoxanthine, $4\times 10^{-5}\text{M}$ aminopterin, $8\times 10^{-4}\text{M}$ thymidine) 선택배지에서 이 세포주는 2-3일 후 모두 죽는 것으로 나타나 세포융합에 적합한 세포주임을 확인하였다. 세포융합은 먼저, 100mm diameter petri dish에 인체 인터루킨-6로 면역된 생쥐의 비장(spleen)을 꺼내 무혈청 DMEM 배지에서 핀셋, 가위, mesh 등을 이용하여 세포를 적출해낸 다음 50ml 원심분리관(conical tube, falcon Co.)로 옮겨 탁상용 원심분리기(table top centrifuge, Beckman, Somerset, NJ)에서 1,200rpm, 5분동안 원심분리하고 0.17M NH_4Cl 를 37°C 에서 5분동안 처리하여 적혈구 세포를

용출시킨 후 찬 DMEM배지로 2회 세척하였다. 이 비장세포를 현미경하에서 세포계산판(hemocytometer)를 이용, 세포수를 측정하여 SP2/0-Ag14 세포주와 5:1의 비율로 10ml씩 섞은 다음 원심분리하였다. 원심분리된 pellet을 손가락으로 가볍게 두드려서 분산시키고 37°C에서 1분간 방치한 뒤 37°C 항온수조(water bath)에서 미리 데워진 50% polyethylene glycol(PEG 4,000, Indianapolis, IN) 1ml를 30초동안에 걸쳐 천천히 처리하고 무혈청 DMEM 배지 9ml을 넣어 섞어준 후 다시 50ml이 될 때까지 DMEM을 서서히 가해 주었다. 이것을 1,200rpm에서 5분동안 원심분리한 후 cell pellet을 10% FBS가 포함된 HAT 배지에 $1\sim 2\times 10^6/\text{ml}$ 정도로 섞어 96 웰 배양플레이트(96 well flat bottomed plate)에 웰당 두 방울씩 가하고 37°C humidified CO₂ incubator에서 배양하면서 잡종세포를 선별하였다.

잡종세포클론에서 인체 인터루킨-6에 대한 항체의 생성 유무는 세포융합 후 약 1~2주 경과시 잡종세포클론이 형성된 웰(약 10~25% confluence)의 배양상청액을 취하여 간접 엘라이자 방법으로 측정하였다. 즉, 인체 인터루킨-6를 코팅 완충액 (0.05M carbonate buffer, PH9.6)으로 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 희석하여 96웰 microtitration 플레이트(Dynatech, Immulon II)에 $100\mu\text{l}$ 씩 가하고 4°C에서 하룻밤 동안 결합시킨 후 세척 완충액(PBST; 0.05% Tween-20 in PBS, PH 7.4)로 3회 세척 후 1% bovine serum albumin(BSA in PBS, Sigma)으로 상온에서 2시간동안 코팅되지 않은 부분을 차단(blocking)하고 다시 3회 세척후 희석 완충액(diluent buffer; 0.05M Tris-HCl, 1mM Mgcl₂·6H₂O, 0.15M NaCl, 0.92% NaN₃, 1%BSA, 0.05% Tween20, PH 8.1)으로 희석한 잡종세포의 배양상청액 $100\mu\text{l}$ 를 각 웰에 가하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 3회 세척하고

1:1,000으로 희석된 goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase (Sigma)를 100 μ l씩 가한 후 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 다시 3회 세척 후 기질 완충액(substrate buffer; 0.05M NaHCO₃, 10mM MgCl₂·6H₂O, PH9.8)에 1mg/ml로 녹인 p-nitrophenyl phosphate를 100 μ l씩 각 웰에 가하고 엘라이자 판독기(Titertek Multiskan MCC/340, Finland)를 사용하여 495nm에서 흡광도(optical density)를 측정하여 항체를 생성하는 클론들을 24웰 배양 플레이트로 옮겨서 배양하고 다시 조직 배양용 플라스크(Falcon)로 옮겨가면서 잡종세포의 수를 증식시켰다. 그 다음 인체 인터루킨-6에 대하여 특이적인 항체만을 생성하는 잡종세포를 선별하여 단일클론을 얻기 위해 limiting dilution에 의한 single cell cloning을 수행하였다. 즉, 선별된 잡종세포 클론을 10% FBS가 포함된 HAT 배지하에서 0.5cell/100 μ l/well로 희석하여 96-웰 배양플레이트에 100 μ l씩 가하고 cloning efficiency를 높이기 위해 면역시키지 않은 발브씨 생쥐의 비장세포를 분리하여 feeder cell로써 이용하였는데, 세포수를 1~2 \times 10⁵/ml로 조정하여 각 웰에 100 μ l씩 가해주었다. 약 1주 후 잘 자란 클론들의 배양상청액을 ultrafiltration kit(Amicon)로 10배 농축시켜 Ouchterlony double immunodiffusion방법으로 각각의 단일클론 항체의 class와 subclass를 결정하였다. 즉, 0.01M PBS에 1% agarose를 넣어 녹인 후 유리판(8 \times 8 \times 0.15cm)에 1.5mm gel 두께로 부은 다음 직경 4.0mm로 구멍을 뚫고 이들 배양상청액과 표준항체(Sigma, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3)를 20 μ l씩 각 웰에 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 반응시켰다. 염색은 0.5% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma)으로 1-2분동안 하였고 50% methanol/10% acetic acid로 탈색하였다. Limiting dilution에 의해 클로닝된 단일클론으

로 부터 항체를 얻기 위해서 배양상청액들을 얻는 한편, 단일클론 항체의 대량생산을 위해 약 10주경의 발브씨 생쥐에 0.5ml FIA를 복강주사하여 priming시키고 10일후 각각의 단일클론들을 PBS 0.5 ml로 5×10^6 으로 현탁시켜 복강내로 주사하였다. 약 1주 후 복강이 부풀은 생쥐에서 18 gauge needle을 사용하여 복수를 채취하고 4°C 에서 1시간동안 방치하여 침전물과 부유물들을 제거한 후 5,000×g 에서 20분간 원심분리하여 세포와 상층의 지방질을 제거하였다. 이 복수로 부터 단일클론 항체의 정제는 복수와 phosphate buffered saline(PBS)를 1대1로 혼합한 후에 PBS로 equilibration된 protein G column(Pharmacia)에 loading하였다. 그 후 column 부피의 열배양 인 PBS로 column을 세척한 후에 0.1M glycine, PH2.6으로 결합된 단일클론 항체를 용출시켜 분획당 900 μ l의 용출물을 모으고 각 분획마다 100 μ l의 1M Tris PH 8.0을 즉시 가해주어 용출물의 PH를 중화시켰다. 그 후 280nm에서 흡광도를 측정하여 항체를 함유한 분획들을 모았다. 이를 각 1 μ g씩 10% SDS-PAGE gel에 걸어 그 정제 순수도를 측정하였는데 대조군인 생쥐 IgG1, 1 μ g과 비교하여 거의 95% 이상 순수한 항체를 정제하였다.

(11) 항 인체 인터루킨-6 다클론 항체의 생산

정제된 인체 인터루킨-6를 250 μ g/ml의 농도로 FCA, 1ml과 동량으로 3-way stopcock을 사용하여 잘 섞은 후 균일한 유탁액이 되었을 때 토끼에 피하와 근육의 여러 부위에 나누어 주사하였다. 3주 후 처음 주사때와 동일한 양의 인체 인터루킨-6를 FIA와 혼합하여 같은 방법으로 주사하고 1주일 후 귀 정맥으로 부터 소량의 혈액을 채취하여 항체 생성여부를 엘라이자방법으로 측정하고 항체의 역가

가 높을 때까지 2주 간격으로 면역화를 반복하였다. 마지막 주사는 직전의 추가접종으로 부터 1주일 후 FIA와 섞지않은 인체 인터루킨-6를 10 μ g/0.2ml로 PBS에 녹여 귀정맥에 주사하였다. 다시 1주일후 토끼의 심장으로 부터 혈액을 얻어 상온에서 3~4시간 방치한 다음 탁상용 원심분리기로 3,000rpm, 30분동안 원심분리시켜 혈청을 분리하였다. 또한 항체의 역가와 활성도는 간접 엘라이자와 B9 Bioassay로 각각 측정하였다. 항체의 biotylation을 위해서 다클론 항체 농도를 1mg/ml로 조정하고 그용액 1ml를 100 mM NaHCO₃, pH8.0 buffer에 천배 투석시켰다. D-Biotin-N-hydroxy-succinmicle ester (Biotin-NHS, Pierce)를 DMSO에 0.6mg/ml의 농도로 녹인 후 40 μ l를 취하여 단일클론항체 용액에 넣고 상온에서 4시간동안 반응을 시키었다. 항체에 붙지않은 Biotin-NHS를 제거하기 위하여 4 $^{\circ}$ C에서 PBS에 만배 투석시키었다. 그후 침전물을 제거하기 위해 8000 \times g에서 10분간 원심분리를 하였다.

(12) 인체 인터루킨검정법 (인터루킨-6 엘라이자)

생산된 IL-6 단일클론항체를 코팅 완충액(0.1M NaHCO₃, PH 9.6)으로 1 μ g/ml이 되도록 희석하여 96웰 microtitration 플레이트에 100 μ l씩 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 결합시킨 후 세척 완충액으로 3회 세척한 후 1% BSA로 상온에서 2시간 동안 코팅되지 않은 부분을 차단하고 다시 3회 세척한다. 이후 인체 인터루킨-6를 희석 완충액으로 1ng/ml ~ 0까지 2배 또는 5배 연속희석하여 100 μ l씩 각각의 웰에 가하고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 세척 완충액으로 3회 세척 후 다클론항체를 1/500로 희석하여 100 μ l씩 가한 후 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 이후 세척 완충액으로 3회 세

척하고 1:1,000으로 희석된 goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase(Sigma)를 100 μ l씩 가한 후 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 다시 3회 세척 후 기질 완충액(0.05 M NaHCO₃, 10mM MgCl₂·6H₂O, PH9.8)에 1mg/ml로 녹인 p-nitrophenyl phosphate를 100 μ l씩 각 웰에 가하고 엘라이자 판독기(Titertek Multiskan MCC/340, Finland)를 사용하여 495nm에서 흡광도를 측정하였다.

(13) 인터루킨-6 웨스턴 블랏(Western blot)

여러 사이토카인을 Bradford 단백질 정량방법에 의해 단백질양을 정량하여 동일한 양의 단백질(1 μ g/lane)을 SDS 시료 완충액(sample buffer)을 가하여 끓인 다음 15% SDS-PAGE를 실행하였다. SDS-PAGE gel(15%)에 인체 인터루킨-6를 loading하고서 20mA에서 1시간 30분동안 전기영동한 후 웨스턴 전이 완충액(transfer buffer)에서 30분간 gel을 방치한 후 0.2A에서 1시간 30분동안 nitrocellulose membrane(NCM)으로 단백질의 전이를 행하였다. 전이후에 NCM을 비닐백에 넣고 blocking 용액(2% Skim milk in PBS) 5ml 넣은 후 실온에서 1시간 반응시켰다. NCM을 작은 배양수조(small incubation tray, Bio-Rad)에 넣은 후 각 웰에 다른 단일클론항체를 넣어 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 그 후 세척 완충액(TBST ; 50mM Tris, PH 7.4, 150mM Nacl, 0.05% Tween-20)으로 세척한 후 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG를 500:1 희석하여 넣고 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 위와 같이 세척을 다시한 후에 100 μ l의 발색용액 (66ml NBT, 33 μ l BCIP)을 넣고 5분간 발색시킨 후 증류수로 세척하였다.

(14) Northern Blot

RNA의 추출은 Sambrook 등(1989)의 Molecular Cloning의 방법을 약간 변형시켜 total RNA를 수거하거나 RNazol을 이용하여 세포막을 터트린 후 total RNA를 추출하는 방법을 택한다. RAW264.7 세포주나 다른 세포주들에서의 NOS, TNF- α 및 internal control로 β -actin 유전자의 발현을 알아보기 위해 각각의 유전자에 관한 RT-PCR 산물을 pBluescripts에 클로닝하였다. 이들 클로닝 벡터를 대량 배양하여 ultracentrifugation하여 Northern blot에 사용할 probe를 준비하였다.

약 10 μ g의 total RNA를 centrifugal vaporizer에서 원심 건조시키고 여기에 증류수와 premix solution (5 μ l 10X MOPS running buffer/8.75 μ l 37% formaldehyde/25 μ l formamide)을 가하고 65°C에서 15분간 가열한다. 여기에 EtBr (0.5 μ g/ml)이 포함된 loading dye를 2 μ l의 가하여 섞은 후, 0.8% agarose gel에 부하한다. 전기 영동은 cm당 5V의 일정한 전압 하에서 실시한다. Nylon membrane에 전이할 젤부분을 잘라내어 증류수와 10 X SSC (1.5 M NaCl/ 0.15 M Na₂ citrate-2H₂O)로 세척한다. 세척된 gel은 20 X SSC가 든 용기에 올려 놓고 1장의 nylon membrane 필터와 2장의 크로마토그래피 종이, 종이 타월을 순서대로 올리고 하룻밤 동안 전이시킨다. 이 때 gel이나 전이시킨 membrane은 자외선 하에서 사진을 찍고 RNA가 전이된 nylon membrane 필터를 UV cross-linker를 이용하여 cross-linking 시키거나 진공 오븐을 이용하여 80°C, 2시간 동안 구운 후 hybridization을 실시하였다.

Hybridization에 사용할 클론으로부터 probe DNA를 잘라내어 random priming법을 이용하여 [α -³²P] dCTP와 Klenow 효소로 fill-up 시켜 labelling 하거나 nick translation방법을 이용하여 [γ -³²P] ATP와 T4 polynucleotide kinase로 labelling 한 후 Sephadex-G50 column을 통과시켜 labelled 되지 않은 free isotope을 제거하고 약 5 분간 boiling하여 변성시킨 후 hybridization

에 사용하였다. Hybridization은 구운 필터를 플라스틱 백에 넣고 적당량의 hybridization buffer (6X SSC/5X Denhardt's solution/0.5% SDS/salmon DNA (20 μ g/ml))를 가하고 42°C에서 2-4 시간 방치한 후, 변성시킨 hot probe를 섞고 42°C에서 하룻밤 동안 hybridization을 실시하였다. 다음날 필터를 약 250ml의 세척액 (2 X SSC)으로 실온에서 20 분간, 68°C에서 5-10 분간 세척한 후 이를 말린 다음, X-ray 필름에 감광시켜 그 결과를 분석하였다.

(15) IL-6 transfection

인체 IL-6 CDNA는 SmaI restriction site를 가지고 있는 primer를 이용하여 PCR로 증폭시켜 SmaI으로 cutting하고 BamHI linker로 ligation한 후 IL-6 CDNA를 PNeoSRaII expression vector의 BamHI site로 subclone했다. 한편 10% FBS가 포함된 DMEM으로 배양된 normal mouse liver cell line인 TIB73(BNL.CL2)과 chemically-transformed mouse liver cell line인 TIB75(BNL 1ME A.7R.1) cell에 IL-6 expression plasmid 또는 control plasmid로 lipofectin(Gibco)을 이용하여 transfection 하였다. 즉, 1×10^5 cell을 4ml의 10% FBS가 포함된 DMEM에 현탁시켜 60mm tissue culture dish에 seeding한 후 18-24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 에서 배양 한 후 2 μ g DNA와 10 μ l의 lipofectin reagent를 각각 2ml의 무혈청배지에 넣고 잘 섞어 실온에서 10-15분간 방치한다. 그 후 dish를 무혈청 배지로 세척하고 lipofectin reagent-DNA complex를 cell에 가하고 37°C, 5% CO₂ 에서 24시간 동안 배양 한다. 배양종료 후, 4ml의 10% FBS가 포함된 DMEM으로 배양액을 교체한 다음 37°C, 5% CO₂ 에서 48시간 동안 배양 한 다음 0.75mg/ml G418이 들어 있는 DMEM 배지하에서 14일동안 selection하고 limiting dilution방법으로 single cell cloning하였다. 이들 single clone으로 부터 증식된 cell들을 10% FBS가 포함된 DMEM 배지하에서 24시간동안 배양하고 그 배양액을 회수하

여 IL-6활성도를 측정하였다.

(16) 실험동물의 tumor volume 측정과 병리 조직검사

TIB73, 75 cell, TIB73, 75-Vec, TIB73, 75-IL-6 transfectant를 각각 5마리씩의 6-8주령 BALB/c 생쥐에 마리당 2×10^7 cell을 0.2ml의 PBS로 현탁시켜 피하주사 하였다. 주사후 tumor growth를 2-3일 간격으로 2 perpendicular axes로 측정하고 tumor volume을 $4/3\pi r^3$ 공식을 이용하여 spherical growth를 계산하였다. 약 7-8주 후 tumor를 적출한 후 10 % 중성 포르마린에 고정하여 약 4mm 간격으로 시상(矢狀 : sagittal) 절개를한 후 통상의 방법으로 파라핀 포매를 하였다. 포매된 조직들은 5mm 두께로 박절하여 Hematoxylin eosin 염색, Masson's trichrome 염색, Reticulin 염색들을 시행한후 광학 현미경하에서 관찰하였다.

나. 실험결과

1. Cytokine의 작용기작 및 신호전달

(1) IL-6의 신호전달에서 PP2A의 역할규명

전년도 연구의 더욱진행하여 IL-6의 신호전달에서 관련하는 PP2A의 역할규명하였다. Hep3B cell을 IL-6로 처리하였을 때 p140 phosphorylation이 일어나는데 PP2A의 저해제인 okadaic acid를 동시에 주었을 때 더욱 p140 phosphorylation이 증가함을 알수있었다. 이러한 p140의 phosphorylation은 1분에서 가장 높았다. 그러나 다른 cytokine들은 각기다른 효과를 나타내었고 이p140은 IL-6신호전달에 관련하는 gp130와는 다른 단백질이었다. IL-6는 간세포의 여러 가지 acute phase protein을 합성하는데 이중 IRF-1이 잘 알려져 있다. IL-6는 IRF-1의 promoter activity를 증가하였고 okadaic acid를 처리

한 경우 더욱 IRF-1의 활성을 증가시켰다. 또한 PP2A의 antisense를 동시에 세포에 넣었을 때 IL-6에 의한 IRF-1의 활성증가를 더욱 증가시킴으로 PP2A가 IL-6의 신호전달과정에 관련함을 알수 있었다.

한편 IL-6와 PP2A의 직접적인 관계를 더욱 규명하기위해 IL-6에 의한 PP2A phosphorylation을 측정하였는데 IL-6가 PP2A의 phosphorylation을 유도하였고, PP2A activity를 증가시켰다. 그러나 다른 cytokine은 이러한 효과를 보여주지 못하였다. 이상의 결과로 보아 IL-6의 신호전달과정에 PP2A가 관련함을 알수있었다(Fig. 1).

(2) IFN에 의한 NO 및 NOS 조절

염증에 관련하는 또하나의 중요한 factor인 NO의 생산을 조절하는 cytokine을 연구하기위해 IFN에 의한 NO 생산과정을 살펴보고 이에 관련하는 신호전달물질과 NOS gene 발현기작을 살펴보았다. 간세포에서의 NO생산은 다른 cytokine의 효과는 거의 미미하였고 IFN와 LPS를 동시에 주었을 때 가장 생산이 높음을 알 수 있었고(Fig. 2, 3) 또한, Tyrphostin-23 (TP-23)라는 tyrosine specific kinase inhibitor에 의해 dramatic하게 NO 합성이 저해됨을 관찰한 바, 이의 억제현상도 밝혔다. 한편 NO에 의한 iNOS gene의 feed back regulation에 대한 연구를 하였다. 우선 IFN-r가 iNOS의 gene expression을 시간에 따라 증가시켜 12시간 정도에 최대를 나타내며 이러한 iNOS의 증가는 NO에 의해 농도에 따라 감소함을 알수있었다. 한편 NO의 처리시간에 따라 iNOS의 발현이 감소하였고 여러 가지 다른 NO의 source에 따라 동일한 효과를 나타내어 NO가 iNOS gene expression을 감소함을 알수 있었다. 이러한 NO의 효과는 H₂O₂에 의해서는 일어나지 않았고 같은 cell에서 NO가 IL-6의 경우 아무런 효과가 없었으나 TNF- α 의 경우 역시 감소시킴을 알수 있었다. 한편 NO는 iNOS의 발현은 억제하였으나 JunB의 발현은 감소시키지 않았다.

이러한 NO의 감소효과는 iNOS의 promoter에 역시 감소효과를 보여 NO의 iNOS 발현억제는 promoter를 통하여 일어남을 알수 있었다.

(3) Malignant B cell에서 IL-6의 작용기작

B cell malignancy에서 IL-6의 역할을 규명하기 위해 multiple myeloma 환자로 부터 malignant한 B cell (myeloma cells)을 분리하여 IL-6에 의한 세포 증식효과 및 세포내의 신호전달을 살펴보았는데 우선 IL-6에 의한 myeloma cell 증식효과를 관찰하였고, 증식에 관련하는 신호전달 기작을 알아보기위해 여러가지 신호전달물질 저해제의 효과를 측정하였는데 이중 protein phosphatase 1/2A의 저해제인 okadaic acid가 세포 증식을 억제하는 것으로 보아 protein phosphatase가 IL-6가 myeloma 세포증식에 관련하는 것을 알 수 있었다. 한편, IL-6가 myeloma cell의 성장뿐 아니라, survival factor로 apoptosis를 방지하는 효과가 보고되어 IL-6와 apoptosis와의 관계에도 연관을 지어 연구를 수행하여, IL-6가 Fas에 의한 cell apoptosis를 저해하는 survival factor임을 밝혀 이에 대한 연구를 진행하고 있다.

(4) *in vivo*에서 IL-6의 anti-tumor effect

최근의 보고에 의하면 IL-6가 간섬유화에 관련하는 것과 별개로 간의 재생에도 중요한 인자임을 발표하였고, IL-6가 tumor의 regression을 유도하는 효과도 보고되어 실제로 IL-6의 항암효과를 동물모델에서 살펴보았다. *In vitro*와 *in vivo*에서 TIB73/75 cell 또는 생쥐의 liver에서 IL-6의 effect를 알아보기 위해 IL-6 cDNA를 expression vector 즉, PNeoSTaII로 insert된 plasmid construct를 TIB73/75 cell에 transfection하였다. 이 transfectant를 G418하에서 selection하고 cloning한 후 IL-6 mRNA expression을 RT-PCR로 분석한 결과, IL-6가 transfect된 cell들(TIB73-/75-IL-6)에서 IL-6 mRNA

expression은 아무것도 transfect되지 않은 normal에 비해 증가된 것으로 관찰되었으나 vector로 transfect된 cell들(Vec)에서는 그 expression이 관찰되지 않았다. 또한 이들 transfectant로부터 IL-6의 생성을 bioassay로 측정한 결과, normal과 vector control cell에서 IL-6생성이 basal level인 반면에 TIB73과 TIB75 IL-6 transfectant들에서 IL-6생성은 각각 54.6 U/ml과 74.3 U/ml의 많은 양이 분비되고 있는 것으로 나타났다.

IL-6가 TIB 73/75 cell의 injection으로 발생하는 tumor growth에 미치는 effect를 알아보기 위해 TIB73, TIB75와 vector나 IL-6 transfectant를 각각 2×10^7 cell을 syngenic mouse에 피하주사하였다. 그 결과, 주사후 약 10일 경과후 각 mouse에서 tumor가 관찰되었으며 약 4주-10주 사이에 급격한 tumor growth가 나타났다. 그러나 IL-6 transfectant cell을 주사한 group에서는 injection후 초기부터 tumor volume이 감소하여 tumor가 관찰되지 않았다(Fig. 4). Injection후 약 7-8주 경과시, mouse의 spleen으로부터 cell을 분리하여 cytolytic(CTL) activity를 측정한 결과 group간의 IL-6 transfectant 또는 group간의 CTL activity는 차이가 없어 IL-6 transfectant cell에서 IL-6에 의한 CTL activity로 이러한 anti-tumor effect가 나타나는 것으로 보여지는 않는다. 병리조직학적인 소견으로는 간, lung등의 조직은 커다란 변화는 감지되지 않았으나, thymus의 경우, 정상혹은 vector control에서는 tumor가 관찰되었으나, IL-6 transfectant에서 tumor가 관찰되지 않았고 역시 이식한 tumor도 자라지않았다. 한편 B cell tumor에서도 동일한 실험을 수행하였는데 IL-6를 발현하는 cell (B9.G7)을 쥐에 이식하여 tumor의 성장억제효과를 측정하였는데 이경우에 방사선을 처리한 쥐에서는 이러한 효과가 없어져 방사선민감한 면역세포들이 항암효과를 보이는 것으로 여겨지며 조직검사에서도 IL-6에 의해 infiltration이 생기는 세포들을 관찰할 수있었다(Fig. 5).

Table I. 간암동물모델의 병리학적인 관찰

	liver	lung	thymus	tumor
Normal 73	congestion	congestion	tumor	tumor
Noram 75	congestion	congestion	tumor	tumor
vector 73	dysplasia	edema	tumor	tumor
vector 75	dysplasia	edema	tumor	tumor
IL-6 73	dysplasia	edema	no change	none
IL-6 75	dysplasia	edema	no change	none

2. 면역세포 활성물질탐색 및 응용

(1) 새로운 cell adhesion molecule 탐색 및 동정

면역세포 활성화에는 cytokine과 adhesion molecule이 주요한 factor로 관련하는데 새로운 adhesion molecule의 동정과 이들과 cytokine과의 관계 규명 및 면역세포 활성화에 미치는 영향을 탐색하기 위해, 우선 새로운 cell adhesion molecule을 탐색하였다.

(가) Myeloma cell항체 (1H8)의 생산과 IL-6 생산조절 및 면역세포 조절

Primary bone marrow stromal cell 을 분리하여 intact한 cell을 immunize 하여 여러 monoclonal antibody를 만들었다. 그중 1H8 clone이 stromal cell 증식에 관련이 있고 IL-6 receptor 발현에도 관련이 있어 이 monoclonal antibody의 특성을 더욱 규명하였는데, 1H8을 자극하였을 때 myeloma cell의 IL-6의 유전자 발현이 증가하고 culture sup에서도 IL-6의 생산에 증가함을

알수있었고, 더욱이 antioxidant인 PAG의 유전자 발현도 증가시켜 1H8항체가 myeloma세포의 성장 및 apoptosis조절에 관련할 가능성에 대해 연구를 진행하고 있고 항체가 인식하는 단백질을 동정하고자 하는 실험을 추진 중에 있다.

(나) NK/LAK cell 활성화에 관련하는 항체생산 (4A60) 및 기능분석

NK cell의 활성화에 관여하는 새로운 surface molecule을 탐색, 동정하고자 NK susceptible target인 K562를 immunize하여 monoclonal 항체를 생산하고 이를 여러 세포에 staining하여FACSscan으로 분석하여 single clone들을 선택하였다. 이들의 상등액으로 western blotting을 행한결과, 4A10-60 clone에서 K562세포의 약 53kD protein을 강하게 인식하는것을 볼 수 있었다. 또한 단일 클론들의 상등액을 처리하고 , NK cell의 cytolytic assay행하여 3D6-32와 4A60 clone이 NK cytolytic activity를 유의성있게 neutralize시킴을 알 수 있었다. 위의 결과로 4A60 clone를 택하여 항체를 다량생산하고 정제하여 NK proliferation에 미치는 영향을 알아 보았다. 그결과, IL-2에 의해 유도되는 NK proliferation이 이 단일 클론 항체에 의해 효과적으로 억제되었고 그 억제 효과는 F(ab)₂ fragment에서 더 현저하게 나타났다(Fig. 6). 그리고 항체를 전처리한 경우와 같이 처리한 경우 모두에서 유사한 경향을 보였다. 또한 이 항체가 NK활성, 즉 cytolytic activity에 미치는 영향을 알아보기 위해 항체를 표적세포인 K562에 처리하여 ⁵¹Cr release assay를 행하였다. Proliferation처럼 현저하진 않지만 IL-2에 의해 증가된 NK의 cytolytic activity가 항체 처리에 의해 유의적으로 감소됨을 볼 수 있었고, IL-1 2에 의한 cytolytic activity도 약간 억제되었다. 이런 작용을 가진 항체는 K562의 surface에 있는 약 53kD의 molecule을 강하게 인지함을 western blotting으로 확인하였고, 비슷한 size의 IgG에서 나타나는 band는 second antibody (anti mouse IgG-AP)에 의

한 것으로 나타났다 (Fig. 7).

(2) L-6 mutant 생산기반구축

Alanine mutant IL-6의 분석을 토대로 2차 site-directed mutagenesis에 의해 18개의 mutant를 얻었으며, 발현되고 정제할 수 있었던 mutant들이 11개로서, Ala54, Ala69, Glu70, Lys80, Leu80, Lys95, Lys96, Thr96, Glu77, Ala99 등이었다. 이들 각각을 대량 배양하여 단백질을 정제하고 TUG gel을 사용하여 안정도를 분석하였다. Glu70 mutant이 wild type 보다 높은 농도에서 transition이 나타난 것은 안정도가 증가되었음을 의미한다. 또한 전하의 변화에 따라 gel상에서의 mobility 속도가 wild type 보다 크게 증가됨을 볼 수 있다. 그밖에 TUG gel 상에서 안정도가 약간 증가된 것으로 보이는 것은 Lys80 mutant이며, 안정도가 감소된 것으로 나타난 것들은 Ala69, Lys95, Glu97, Ala99 등의 mutant이었다. 한편 urea 농도에 따라 변성되는 wild type IL-6과 Glu70 mutant 단백질의 형광도 변이를 비교하였다. Urea-induced equilibrium unfolding transition data에 의해 wild type과 Glu70 mutant의 C_m 값을 계산한 결과 각각 5.8 M 과 6.6 M 으로서 안정도가 크게 향상된 mutant를 얻었다. 정확한 비교 data는 없으나, 안정도에 따라 정제효율이 일치하는 경향을 보였다. 각 mutant IL-6의 생물학적 활성을 측정된 결과 대부분의 mutant이 wild type과 유사한 활성을 보였으나, Ala99 mutant의 경우 활성이 약간 감소됨이 나타났다.

3. Cytokine 생산 조절물질 기능연구 및 응용기술개발

Cytokine의 과다분비로 인한 효과는 인체의 면역체계의 항상성을 파괴하여 여러 질환을 유도하는데, 염증에 경우 injury나 infection에 의해 macrophage등

이 활성화 되고 이에따라 여러가지 염증유발 cytokine들이 분비되고 이에따라 secondary 염증 세포들이 다시 활성화되어 여러 염증 mediator를 분비하여 염증으로 진전되는데 이를 근본적으로 억제하기 위해 염증 유발 cytokine의 생산 억제물질을 screen 하였다.

(1) Acanthoic acid의 IL-1/TNF 생산 억제 효과

(참여기업: 삼아약품)

섬오갈피(*Acanthopanax koreanum*)의 근피로부터 추출한 (-)-피마라-9(11),15-디엔-19-오산(아칸토산(acanthoic acid)) 및 이를 이용하여 인체의 면역체계를 조절하는 중요한 인자인 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1)과 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α)의 생산을 조절함으로써, IL-1 과 TNF- α 의 생산량과 관련이 있는 콜라겐 생산, 반응성 산소 생산 및 섬유아세포 증식을 억제하여 이로 인한 질병을 치료하고 실험동물의 궤양을 효과적으로 억제하는 방법에 관한 것이다. 두릅나무과에 속하는 섬오갈피 나무는 제주도에 자생하는 한국 특산식물이며 민간약으로 신경통, 중풍, 요통등에 사용되어 왔고, 이로부터 여러가지 성분들이 근피와 수피로부터 분리되었다(Kim, Y.H. and Chung, B.S., J. Nat. Pro. 51, 1080(1988)). 분리된 성분중 아칸토산의 여러 약리작용이 알려졌는데, 마우스에 투여시 그 최소치사량(minimum lethal dose, MLD)이 적어도 1000mg/kg 이상으로 독성이 매우 미약하고 실험적으로 진통 억제효과가 있었으며 백혈구 유주와 PGE₂ 생성을 억제하는 등 소염작용이 있는 것으로 보고되었다(이영순, 1990, 섬오갈피 나무의 성분, (-)피마라-9(11), 15-디엔-19-오산의 약리학적 연구, 서울대학교 박사학위 논문).

인터루킨-1은 인체 면역체계를 이루는 중요한 조절인자로서 감염으로 인한 염증, 면역기작, 그리고 상처등에 대한 넓은 범위의 인체방어 기작에 관련한다(Dinarello, D.A., FASEB J. 2, 108(1988)). 인터루킨-1은 원래 활성화된 대식세포에 의해 생산되는 인자로 알려졌으나 그후 섬유아세포, 각질 형성 세포, T세포, B세포 및 뇌의 성상세포(astrocytes) 등 많은 세포에서 분비되며 그의 기능도 많은 다른 세포에 대해 다양한 것으로 알려지고 있다. 즉, 인터루킨-1의 기능은, (1) CD4⁺T 세포의 증식효과(Mizel, S.B., Immunol. Rev. 63, 51(1982)), (2) 흉선세포의 TCR 을 통한 세포살상(McConkey, D.J. et al., J. Biol. Chem. 265, 3009(1990)), (3) 염증기작에 관련하는 여러물질, 즉 PGE₂, PLA₂, 콜라게나제 등의 생산 유도(Dejana, E. et al., Bolid 69, 695-699(1987)), (4) 간의 급성단계(acute-phase) 단백질의 생산유도(Andus, T. et al., Eur. J. Immunol. 123, 2928(1988)), (5) 혈관계의 고혈압 유도(Okusawa, S., et al., J. Clin. Invest. 81, 1162(1988)), (6) IL-6, TNF 등 다른 사이토카인(cytokine)의 생산 유도(Dinarello, C.A. et al., J. Immunol. 139, 1902(1987))등 여러 가지 다양한 기능을 가지고 있으며, IL-1이 관련되는 질병도 류마티스 관절염(Nouri, A.M. et al., Clin. Exp. Immunol. 58, 402(1984)), 콩팥이식 수술의 거부반응(Mauri and Teppo, Transplantation 45, 143(1988)), 패혈증 (Cannon, J.G. et al., Lymphokine Res. 7, 457(1988)) 등이 있으며 특히 높은 양의 IL-1을 인체에 투여하면 열과 통증을 유도(Smith. J. et al., Am. Soc. Clin. Oncol. 9, 710(1990)) 하는 등 여러 면역질환에 관련하는 것으로 알려져 있다. TNF- α 는 처음 BCG 나 LPS 로 처리된 동물의 혈청에서 발견되었고(Carswell, E.A. et al., PNAS 72, 3666(1975)), 활

성화된 대식세포, 섬유아세포등 여러가지 세포에서 생산되며 많은 기능을 가지고 있는데, 대표적인 기능은 (1) 섬유육종 (fibrosarcoma)L929 세포에 대한 세포살상 기능(Espevik and Nissen-Meyer, J. Immunol. Methods 95, 99(1986)), (2) 섬유아세포에 대한 세포증식효과 (Sugarman, B.J. et al., Science 230, 943(1985)), (3) 염증에 관련하는 PGE₂, 아라키돈산 등의 생산유도 (Suttys, et al. Eur. J. Biochem. 195, 465(1991)), (5) 다른 성장 인자나 IL-6의 생산유도(Van Hinsbergh, et al., Blood 72, 1467(1988)) 등이다. TNF- α 도 많은 면역 질환에 관련하는 것으로 알려져 있는데 트리파노조마, 말라리아 원충등 전염성 질환(Cerami, A. et al. Immunol. Today 9, 28(1988)), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)나 관절염과 같은 자가면역질환(Fiers, W., FEBS 285, 199(1991)), 에이즈(Mintz, M. et al., Am. J. Dis. Child. 143, 771(1989)), 패혈증(Tracey, K.J. et al. Curr. Opin. Immunol. 1, 454(1989)), 감염(Balkwill, F. R. 1989, Cytokines in Cancer Therapy, Oxford University Press) 등에 직·간접으로 관련하는 것으로 알려져 있다.

이와 같이 인체 여러 기관에서 중요한 역할을 담당하고 있는 인터루킨-1과 TNF- α 의 기능 및 생산조절은 인체내의 면역체계의 항상성 유지와 질병 치료 및 예방에도 매우 중요하다. 이와 유사한 인자인 인터루킨이나 성장 호르몬을 효과적으로 조절하기 위해 여러가지 방법이 시도되어 왔다. 인터루킨-1의 경우에는 자연적으로 생겨나는 인터루킨-1 수용체 저해제(IL-1 Ra)를 이용하여 인터루킨-1이 인터루킨-1 수용체에 결합하는 것을 막음으로써 동물 모델에서 패혈증, 관절염, 염증 등을 감소시킬 수 있고(Dinarello,

C.A. and Thompson, R.C., Immunol. Today 12, 404(1991)), 또한 각기 특이한 항체를 이용하여 인터루킨 작용을 억제하는 방법을 사용하여 왔다. 인터루킨-6의 경우에는 인터루킨-6 항체나 인터루킨-6 수용체의 항체를 이용하여 인터루킨-6을 과다분비하여 생기는 골수종 환자의 골수종 세포증식을 억제하였다(Suzuki, H. Eur. J. Immuno. 22, 1989(1992)).

그러나 이러한 인터루킨이나 성장 호르몬의 생산을 특이하게 조절하는 물질이나 방법에 대해서는 연구가 미흡한 상태인바, 본 발명은 기존의 인체에 사용되고 있던 식물체로부터 분리된 아칸토산을 이용하여 인터루킨-1과 TNF- α 생산 억제효과를 측정하였고, 이를 응용하여 콜라겐 합성억제, 항염증효과, 항섬유화 효과, 규폐증 억제효과를 생체외(*in vitro*)와 생체내(*in vivo*)에서 측정하여 인터루킨-1 및 TNF- α 생산 저해제로 활용하고 이러한 여러 면역 질환의 치료제로 응용 활용코자 한다.

(1) 아칸토산에 의한 사람 단핵구/대식세포의 인터루킨-1 생산억제

정상인의 말초혈액을 밀도 1.077의 피콜-하이파크 위에 중층한 후 원심분리하고 다시 2시간동안 24-웰 배양 플레이트에 부착시켜 단핵구/대식세포를 얻었다. 이들 세포를 0.1~10 μ g/ml의 아칸토산과 함께 1시간동안 배양한 후 100 μ g/ml의 실리카로 48시간동안 처리하여 배양액을 원심분리로 얻었다. 이 배양액을 다시 PBS로 투석하여 인터루킨-1의 생산 정도를 측정하였다. 실리카와 아칸토산을 처리한 단핵구/대식세포의 배양액내에서 인터루킨-1의 활성도는 게리(Gery) 등의 방법을 참조하여 C3H/HeJ 마우스 흉선세포(1 x 10⁷ 세포/ml)에 식물성 적혈구 응집소(phytohemagglutinin)

(PHA, Burroughs wellcome, Research Triangle Park, NC, U.S.)를 $1\mu\text{g/ml}$ 로 하여 각 웰에 $100\mu\text{l}$ 씩 가하였다. 그리고 이들 배양액을 $50\mu\text{l}$ 씩 96- 웰 배양 플레이트(Costar, 편평바닥)에 가하고 RPMI 1640 배지에 FBS 의 최종농도가 10% 되게 하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 72 시간동안 배양하였다. 배양종료 16 시간 전에 ^3H -티미딘을 $0.5\mu\text{Ci/웰}$ 로 가하고, 배양종료후 세포를 유리섬유 여과지에 회수하여 액체 신틸레이션 계수기(Liquid Scintillation Counter, Beckman)로 ^3H -티미딘의 함입량을 측정하였다. 사람 단핵구/대식세포에서의 인터루킨-1 의 생산은 아칸토산에 의해 농도의존성으로 저해되었다 (Fig. 8).

(2) 아칸토산에 의한 사람 단핵구/대식세포의 $\text{TNF-}\alpha$ 생산억제

사람 단핵구/대식세포에서의 $\text{TNF-}\alpha$ 생산에 미치는 효과를 측정하였다. $\text{TNF-}\alpha$ 활성도의 측정은, 세포 용해 검정법(cell lytic assay)으로 아가월(Aggarwal)등의 방법을 참조하여 실시하였다. 즉, $\text{TNF-}\alpha$ 민감성 L929 섬유아세포주를 5% FBS 가 함유된 RPMI 1640 배지에 현탁시켜 96 웰 배양 플레이트 3×10^4 세포/ 웰씩 가하고 37°C , 5% CO_2 에서 24시간 배양하여 부착시켰다. 그후 배지를 제거하고 액티노마이신 D (Sigma) $1\mu\text{g/ml}$ 와 이들 배양액을 $50\mu\text{l/웰}$ 씩 가하고 FBS의 최종농도가 5% 되게 하여 37°C , 5% CO_2 에서 24 시간 배양한 후 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다. 염색은 먼저 배지를 제거하고 PBS 로 2회 세척한 후 20% 메탄올 용액에 용해한 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 5분간 실시하였다. 염색후 PBS로 3회 세척하여 건조시키고, 다시 33% 아세트산을 웰당 $100\mu\text{l}$ 씩 가하여 색소를 용출시킨 후 ELISA 리더를 사용하여 570nm 의

판독필터 (reading filter)와 405nm의 참조필터(reference filter)로 O.D.값을 읽은 후 rHu TNF- α (Genzyme)로 얻은 표준곡선을 이용하여 정량하였다. 아칸토산은 5 μ g/ml 이상의 농도에서 90% 이상의 TNF- α 생산저해 효과를 나타내었다(Fig. 9).

(3) 아칸토산에 의한 흰쥐 폐 대식세포와 림프구의 TNF- α 생산억제

이러한 효과들을 동물 대식세포에서 측정하기 위하여 흰쥐를 케타민으로 마취한 후 기관지에 멸균된 가는 튜브를 꽂아 넣고 30ml 주사기를 이용하여 RPMI 1640 배지로 10ml 씩 3 회 주입과 흡입을 반복하여 세포를 얻어내고 이들 세포들을 400xg 에서 5 분동안 원심분리하여 10% FBS 가 들어 있는 RPMI 1640 배지로 현탁시켜 37 $^{\circ}$ C 에서 2 시간동안 배양하여 부착시킨 후 폐 대식세포와 림프구를 각각 얻고 각각의 2x10⁵ 세포를 10 μ g/ml 실리카로 3 일간 처리하고 그 배양액을 투석한 후 TNF- α 의존성인 L929 세포주(ATCC CCL1)를 이용하여 TNF- α 활성도를 측정하였다(Fig. 10). 그 결과 흰쥐 폐 대식 세포에서 분비되는 TNF- α 도 아칸토산에 의해 억제됨을 관측할 수 있었다. 한편 TNF- α 의 저해는 promoter의 activity로 감소하여 일남을 알 수 있었다 (Fig. 11).

(4) 아칸토산을 이용한 반응성 산소의 생산억제

염증반응은 여러가지 자극원들에 의해 면역 세포들이 인터루킨-1 등 여러가지 사이토카인을 분비하고 이들이 다시 다른 염증 세포들을 자극하여 포스포리파제 A₂, 라이소좀 효소, 반응성 산소 등을 분비케 함으로써 조직손상을 일으키는 것으로 알려져 있다

(Pruzanski, W. and Vadas, P., Immunol. Today 12, 143(1991)). 아칸토산이 이러한 경로를 차단할 수 있는가를 단핵구/대식세포와 호중구에서의 반응성 산소인 H_2O_2 및 O_2^- 생산억제 효과를 측정함으로써 조사하였다. H_2O_2 의 측정은 96-웰 평판을 이용한 미량검정법으로 측정하였다. 즉, 각각의 웰에 단핵구/대식세포와 호중구를 각각 5×10^5 세포로 가하고 양고추냉이 과산화효소 ($500 \mu\text{g/ml}$; type II, Sigma) $25 \mu\text{l}$ 와 페놀레드 (1mg/ml) $75 \mu\text{l}$ 를 가하였다. 그리고 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (phorbol myristate acetate; PMA 10^{-7}M)를 자극원으로 하여 단핵구/대식세포 배양액 또는 이들 천연 추출물들을 직접 가하여 37°C 에서 60분 동안 반응시켰다. 배양후 3M NaOH 용액을 $25 \mu\text{l}$ 씩 가하여 반응을 정지시키고 620nm에서 ELISA 리더(Dynatech Lab. Inc.)로 O.D. 값을 구하여 페놀의 산화 정도에 의한 색의 변화를 측정하였으며, H_2O_2 의 정량은 신선한 H_2O_2 (Sigma)를 희석하여 얻은 표준곡선을 이용하여 정량하였다. O_2^- 의 측정은 단핵구/대식세포와 호중구를 각각 1×10^6 세포/ $800 \mu\text{l}$ 현탁시켜 24-웰 평판에 가하고 빈 웰에는 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 (SOD, 3mg/ml , sigma)를 $100 \mu\text{l}$ 첨가하여 37°C 에서 2분간 반응시킨 후, 각 웰에 사이토크롬 C(3mg/ml , Sigma) $100 \mu\text{l}$ 와 PMA 10^{-7}M 을 자극원으로 하여 단핵구/대식세포의 배양액 또는 이들 천연 추출물들을 직접 가하여 37°C 에서 20분간 반응시켰다. 이 반응은 1mM N-에틸말레이미드(Sigma)를 첨가하여 정지시킨 후 $1,600 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻어 UV-가시광선 분광광도계(Kontron Instrument, Milano, Italy)를 이용하여 550nm에서 사이토크롬 C의 환원에 의한 색의 변화를 측정하였다. 그 결과 생성된 O_2^- 의 양은 사이토크롬 C의 흡광계수($E_{550\text{nm}}=1.83 \times 10^4$

$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 사용하여 20분당 1×10^6 세포당 사이토크롬 C의 환원을 억제할 수 있는 SOD의 nM로 표현하였다. 아칸토산을 5×10^5 의 사람 단핵구/대식세포에 1 시간동안 처리한 후 다시 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실리카로 자극시킨 후 생성되는 H_2O_2 와 O_2^- 의 양을 측정하였는데, 이의 생산량은 아칸토산에 의해 현저히 감소되었고(제 5 도), 같은 방법으로 호중구에서의 효과를 측정한 결과 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아칸토산이 H_2O_2 생산을 약 85%, O_2^- 생산을 약 72% 정도 억제시킴을 알 수 있어 아칸토산이 염증 반응에도 억제 효과가 뚜렷함을 알 수 있었다(Fig. 12).

(5) 아칸토산에 의한 섬유아세포의 증식 억제

섬유화 현상은 크게 섬유아세포의 증식과 콜라겐의 합성으로 인한 것으로 나눌 수 있는데 아칸토산이 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보기 위해 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아칸토산으로 처리된 단핵구/대식세포의 배양 상층액을 PBS 용액에서 투석한 후 NIH3T3 섬유아세포에 가하고 37°C 에서 5% CO_2 하에 5일동안 배양하였다. 그 결과, 아칸토산이 실리카만 처리한 대조군에 비해 현저히 섬유아세포 증식을 억제함을 확인하였다(Fig. 13). 이 현상은 아칸토산이 섬유화를 일으키는 인터루킨 혹은 그밖의 다른 섬유화 성장인자의 생성을 감소시키거나 섬유화 억제 인자를 유발시키기 때문인 것으로 추측된다.

(6) 아칸토산에 의한 콜라겐 합성 억제

IL-1과 TNF는 섬유화를 일으키는 사이토카인으로 알려져 있으며 흰쥐 섬유아세포에서 콜라겐 합성을 유도한다(Kang, H.S. et al.,

Korean J. Immunol. 14, 193(1992)). 따라서 아칸토산이 이러한 IL-1과 TNF 의 작용을 억제할 수 있는가를 알아보기 위해, 흰쥐 폐 섬유아세포에서 분비되는 콜라겐의 합성 및 폐조직의 콜라겐 합성 저해 효과를 측정하였다. 흰쥐 폐 섬유아세포에서 분비되는 콜라겐 합성은 먼저 내부 표준물질로써 콜라겐(Sigma, Type I)을 1mg/ml 의 펩신이 포함된 1M 아세트산에 완전히 용해시킨 다음 피복 완충액(0.05M 카보네이트 완충액, pH 9.6)로 1 μ g-16pg까지 5배 연속희석하여 편평 바닥 미세역가판(Dynatech, Immulon 2)에 100 μ l 씩 가하고, 미량원심분리 튜브에 들어 있는 각각의 배양액을 스피드백 건조기(speed vac dryer, Savant)로 10~20배 농축시킨 다음, 피복 완충액 (0.1M NaHCO₃ 0.02% NaN₃, Na₂CO₃로 pH를 0.6으로 조정) 100 μ l 를 가하여 완전히 녹이고 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 피복하였다. 그 후 세척 완충액 PBS, 0.05% 트윈 20, pH 7.4)로 3회 세척한 다음 1% 소 혈청 알부민(BSA, Sigma)으로 상온에서 2시간 동안 피복 되지 않은 부분을 차단하였다. 이를 다시 4회 세척한 후 희석 완충액 (0.05M Tris-HCl, 1mM MgCl₂ · 6H₂O, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃, 1% BSA, 0.05% 트윈 20, pH 8.1)로 1,000배 희석된 알칼라인 포스파타제가 결합된 토끼 항-염소 IgG(Cappel)를 100 μ l 씩 각 웰에 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시켰다. 이를 다시 3회 세척 후 기질 완충액(0.05M NaHCO₃, 10mM MgCl₂ · 6H₂O, pH 9.8)에 1mg/ml 로 녹인 p-니트로페닐 포스페이트를 100 μ l 씩 가하고 ELISA 리더를 사용하여 405 nm에서 O.D.를 측정하였으며, 이 배양액내의 콜라겐 합성을 내부 표준 물질로부터 비교하여 정량하였다. 아칸토산을 처리한 흰쥐 폐 섬유아세포 배양액에서 콜라겐 분비가 현저히 감소됨을 관측할 수 있었다(Fig. 14). 또한 아칸토산을 처리

한 실험동물의 폐 조직에서 콜라겐 합성을 측정하기 위해서 하이드록시 프롤린의 양을 측정하였는데 실험동물에서 떼어낸 폐조직 0.1~0.2g 파이렉스 튜브(Corning)에 PBS 1mg 과 섞어 마쇄한 다음 이 조직의 추출물을 초음파 분쇄기(Heat system, W-380)로 분쇄한 후 하이드록로닉산(hydrochloric acid)원액 1ml 를 가하고 120°C 건조 오븐에서 하룻밤동안 건조시켰다. 그 후 이를 냉동기에서 충분히 얼리고 동결건조기(Labconco)로 동결건조시킨 다음 증류수 1ml 를 가하여 완전용해시키고 그중 50 μ l 를 미량원심분리 튜브에 가하고 다시 50 μ l 의 증류수로 혼합 희석하였다. 이때 내부 표준물질로써 트랜스- γ -하이드록시-L-프롤린(Sigma)을 20 μ g ~ 150pg까지 2배로 연속희석하여 같은 방법으로 가하였다. 다음으로 클로라민-T (나트륨 N-클로로-P-톨루엔 설펜아미드) 1.41g 을 10ml 의 n-프로판올과 10ml 의 증류수로 녹여 만든 용액 0.9ml 을 가하고 실온에서 20분동안 방치한다. 그 후 62ml의 동일용액을 천천히 가하여 총 부피를 100ml 로 만든 알데히드/과염소산 용액 1ml 을 가하여 잘 섞었다. 그 후 65°C 항온수조에 15 분 동안 넣어두어 발색시키고 650 nm 에서 O.D. 를 측정하여 내부 표준물질의 O.D.로부터 하이드록시 프롤린을 정량 하였다. 아칸토산을 투여한 흰쥐의 폐조직에서 콜라겐 생산이 약 50% 감소되었고(Fig. 15) 위의 결과로부터 아칸토산이 항섬유화 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

(7) 아칸토산에 의한 실험 규폐증의 억제

아칸토산의 생체내 항섬유화 효과를 측정하기 위해 실험 규폐증을 유발하고 이에 대한 아칸토산의 투여 효과를 측정하였다. 실험에 사용된 동물은 생후 7주~8주된 웅성 스프라그 다울리

(Sprague-Dawley) 흰쥐 및 생후 5 주된 음성 ICR 주 생쥐였다. 실리카(Sigma, Saint Louis, MO; 입자크기 = 5 μm , 80% 이상 함유)는 루가노(Lugano) 등의 방법(Lugano, E. M. et al., Am. J. Pathol. 109, 27-36(1982))에 따라 Fe_2O_3 와 같은 오염물질을 제거하기 위하여 실리카 분말을 1N HCl 에 넣고 끓인 후 증류수로 세척하고 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 시간동안 건열멸균하여 실험에 사용하였다. 케타민 클로라이드를 2~5mg 씩 상기 흰쥐 및 생쥐의 복강에 주사하여 전신 마취 한 후 기관지를 노출시켜 흰쥐에는 실리카 50mg 을 0.5ml 의 멸균된 생리식염수에, 생쥐에는 실리카 2 mg 을 0.1ml 의 멸균된 생리식염수에 용해하여 1ml 주사기로 기관지내로 주입하였다. 실리카를 주입하고 1일 후부터 1 주에 2 회씩 12 주에서 18 주동안 구강으로 10mg 의 아칸토산을 투여하였다. 그후 각 실험동물의 폐를 적출한 후 10% 중성 포르말린에 고정하여 약 4mm 간격으로 시상 절개를 한 후 통상의 방법으로 파라핀 포매를 하였다. 포매된 조직들은 5mm 두께로 박절하여 헤마톡실린 에오신(Hematoxylin eosin) 염색, 매슨 트리크롬 (Masson's trichrome) 염색, 레티쿨린(Reticulin) 염색들을 시행한 후 광학 현미경하에서 관찰하였다(Fig. 16).

실리카와 용매 DMSO 를 투여한 폐에서는 고도의 섬유화와 결체조직 형성을 보이는 수 많은 융합성 육아종, 고도의 단핵구 침윤과 섬유화 및 교원질화를 볼 수 있었으나(A), 아칸토산을 동시에 투여한 군에서는 전체적으로 융합하지 않은 작은 크기의 육아종과 경미한 섬유화 현상만 관찰되어(B) 아칸토산이 실험 규폐증을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다.

(8) 아칸토산에 의한 실험 간경변의 억제

간경변 (간경화)는 간전체의 섬유화와 섬유성 증격에 의한 간실질의 완전한 파괴, 그리고 재생성 결절들을 특징으로 하는 질환이다. 만성감염이나 알코올에서 주로 간경변이 시작되는 경우가 많은데 아직 이에대한 정확한 원인은 밝혀져 있지 않다. 현상적으로 간경변에서 TNF- α 등 염증 및 섬유화에 관련하는 사이토카인이 많이 증가되어 있어 분방기 추출물을 이용하여 간경변 유발의 억제효과를 측정하였다. 우선 실험 간경변을 유발하기 위해 생후 4주된 웅성 스프라그 다울리 (Sprague-Dawley) 흰쥐에 CCl₄를 1회에 0.1 ml (50% CCl₄ + 50% corn oil)/100g body weight씩 1주일에 2회씩 복강내 주사하였으며 (Nakatsukasa, H. et al., J. Clin. Invest. 85, 1833-1843 (1990)) 실험군에 따라 섬오갈피 메탄을 추출물이나 아칸토산 0.2ml씩 구강을 통해 1주일에 2회씩 CCl₄와 동시에 투여하였다. 실험 13주가 된후 각 실험동물은 either 마취하에 심장으로 부터 혈액을 채취하여 serum glutamic oxalacetic transferase (sGOT)와 serum glutamic pyruvic transferase (sGPT)를 측정하였다. sGOT는 섬오갈피 메탄을 추출물에 의해 약 20%정도 감소가 되었으며 (CCl₄ + DMSO + PBS를 대조군으로 하여) 아칸토산에 의해 약 30%가 감소됨을 알 수 있었고 sGPT의 경우는 아칸토산에 의해 약 40% 이상 감소됨을 알 수 있었다. 또한 간의 병리조직학적 검사를 위해 간을 적출하여 10% 중성 포르마린 수용액에 고정하여 4mm의 두께로 절개한 후 파라핀 포배를 하였다. 포배된 조직들은 5mm 두께로 박절하여 hematoxylin eosin과 Masson's trichrome 염색을 시행한 후 광학현미경으로 관찰하였다. CCl₄를 단독 투여한 간 (B-D)에서는 비교적 비후된 섬유성 band에 의한 간소엽의 결절

화가 정산간(A)에 비해 뚜렷하였으며 섬오갈피 메탄올 추출물 (E)에서는 간경변의 소견을 보였으나 간소엽의 결절을 둘러싸고 있는 섬유성 band가 CCl₄ 단독 투여군에 비해 얇고 불완전한 결절 형성이 많았고 간세포의 재생성 변화도 CCl₄ 단독 투여군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 아칸토산에서는 이에 비해 효과가 적었다 (F).

(2) 분방기에 의한 IL-6 생산 저해

(참여기업: 삼아약품)

방기과에 속하는 천금동(*Stephania japonica* Miers), 한방기(*Sinomenium acutum* Rehd, et Wils)등은 우리나라의 남부지방과 제주도 등지에 서식하며 과거로부터 진통제, 항염증제로 사용되어 왔으나 분방기(*Stephania Tetrandra* S. Moore)는 우리나라에 서식하지 않고 주로 중국 등지에서 신경통, 관절염 등의 치료에 사용되어 왔고 특히 알칼로이드(alkaloid)인 테트란드린(tetrandrine)은 항염증제, 항 고혈압제등으로 사용되어 왔다. 또한, 항 파고사이틱(anti-phagocytic), 항 옥시단트(anti-oxidant) 효과를 갖고 있으며 (Seow, W.K, et al., Int. Archs Allergy Appl. Immun, 85, 404(1988), 임상 및 실험 규폐증 모델에서도 치료효과를 보였고(Li, Q. et al., Chinese J. Tuberc. Resp. Dis. 4, 321(1981); Xu, X. et al., Ecotoxicol. Environ. Safety 7, 306(1983); Liu B. et al., Ecotoxicol. Environ. Safety 7, 323(1983)), 사람의 단핵세포로부터 분비되는 인터루킨-1 (interleukin-1)과 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor- α)의 생산도 억제시키는 것으로 알려져 왔다(Seow, W.K., et al., Clin. Exp. Immunol. 75, 47(1989); Ferrante, A., et al.,

Clin. Exp. Immunol. 80, 232(1990)). 한편 테트라드린 혹은 이의 유도체를 포함한 물질들도 뇌기능을 증진시키고 말라리아 치료제, 머리카락 성장제등으로 개발되어 보고되었다.

인터루킨-6는 인체 면역체계를 이루는 여러 세포간의 성장, 분화, 활성화에 관여하는 조절인자로서 여러가지 다양한 세포에서 생산되어 인체의 방어기작에 중요한 역할을 하는 인자이다(Hirano, T., et al., Immunol. Today 11, 443(1990)). 원래 인터루킨-6는 단핵세포의 배양액에서 발견된 인자로서 B 세포의 항체 생산을 유도하는 기능이 있음이 보고되었고(Muraguchi, A., et al., J. Immunol. 127, 412(1981)), 1986년 인체 인터루킨-6의 cDNA가 클로닝되었다(Hirano, T., et al., Nature 324, 73(1986)). 그후 밝혀진 인터루킨-6의 기능은, (1) B 세포 하이브리도마(hybridoma)와 플라즈마 사이토마(plasmacytoma)의 성장인자(Snick, V.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 9679(1986)), (2) T세포 활성화와 성장효과(Lotz, M., et al., J. Exp. Med. 167, 1253(1988)), (3) 간세포의 급성 단계 반응(acute phase response)을 유도하는 기능(Geiger, T., et al., Eur. J. Immunol. 18, 717(1988)), (4) 조혈 작용(hemotopoiesis)에 관여하는 인자(Koike, K., et al., J. Exp. Med. 168, 879(1988)), (5) 신경계통의 세포들의 분화효과(Satoh, T., Mol. Cell. Biol. 8, 3546(1988)), (6) 각질형성세포(keratinocyte)의 성장효과, (7) 뼈의 신진대사(metabolism)의 조절작용, (8) 콩팥 사구체간질(mesangial) 세포들의 성장 효과, (9) 악성흑색종(melanoma)과 유방암 세포의 성장을 저해하는 효과 등이 있다.

이렇게 인체의 여러 기능을 조절하는 인터루킨-6는 다양한 기관의 여러 세포들로 부터 분비되고 있는데 특히 이들 생산이 잘못 조

절되면 여러가지 질병을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이러한 질병으로는 류마티스 관절염(Hirano, T., et al., Eur. J. Immunol. 18, 1797(1988)), 간경변(Devriere, J., et al., Clin. Exp. Immunol. 77, 221(1989)), 건선 피부병(Grossman, R.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 6367(1989)), 다발성 골수종(Bataille, R., et al., J. Clin. Invest. 84, 2008(1989)), 카디악 므소마(cardiac myxoma), 에이즈(Miles, S.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4068(1990)) 및 기타 여러 자가면역 질환들이 알려져 있다.

이와 같이 인체 여러 기관에서 중요한 역할을 담당하고 있는 인터루킨-6의 기능 및 생산조절은 인체내의 면역체계의 항상성 유지와 질병치료 및 예방에도 매우 중요하다. 이와 유사한 인자인 인터루킨이나 성장 호르몬을 효과적으로 조절하기 위해 여러가지 방법의 접근이 시도되어 왔다. 예를 들면, 인터루킨-6 항체나 인터루킨-6 수용체의 항체를 이용하여 인터루킨-6가 과다분비하여 생기는 골수종 환자의 골수종 세포증식을 억제하였다(Suzuki, H., Eur. J. Immunol. 22, 1989(1992)).

그러나, 인터루킨-6의 생산 자체를 특이하게 억제할 수 있는 물질이나 방법은 아직 밝혀진 것이 없는 바, 본 발명은 기존의 인체에 사용되고 있던 식물체로부터 인터루킨-6 생산을 억제하는 물질을 찾아 이를 다시 여러 분획으로 나누어 인터루킨-6 생산억제 효과를 측정하였고 나아가 항염증효과, 항섬유화 효과등을 측정하여 인터루킨-6 생산 저해제로 활용하고 이러한 여러 면역질환의 치료제로 응용 활용코자 한다.

(1) 분방기 추출물의 세포독성 검정

이들 세포 배양액에 대한 분방기 추출액의 독성실험을 실시하였다. 단핵구 및 대식세포에 천연 추출물 A 및 B 를 각각 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 참조예 1의(4)의 방법에 따라 처리하고 배양 종료후 배양액을 회수하고, 앨리(Alley)등의 방법(Alley, M.C. et al., Cancer Res. 48, 589(1988))에 따라 3-4,5-디메틸 티아졸-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드(MTT, Sigma)를 $0.5\text{mg}/\text{well}$ 가하여 4시간 동안 배양하였다. 그후 원심분리하여 상층액은 버리고 생존한 세포로부터 형성된 포르마잔(formazan)을 산성화시킨 이소프로필 알콜(이소프로판올 중의 0.04N NCl)을 $100\mu\text{l}$ 씩 각 웰에 가하여 용출시킨 뒤 ELISA 리더(Titertek multiskan Mcc/340)로 540nm 에서 광학 밀도(O.D.) 값을 측정하여 분석하였다. 추출물 A의 경우 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 배지만으로 처리한 대조군과 아무런 차이가 없어 적어도 이 농도까지는 세포독성이 없는 것을 확인할 수 있었고 추출물 B의 경우도 유사한 결과를 얻을 수 있어 모든 실험을 이 농도 범위안에서 수행하였다. $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 A, B 모두 세포 독성을 나타내었다.

한편, 추출물 C는 흰쥐를 이용한 동물실험에 의해 세포독성을 조사하였는데, 동물에 대한 독성(사망, 체중감소등)은 나타나지 않았다.

(2) 분방기 추출물에 의한 사람 단핵구/대식세포의 인터루킨-6 생산 억제

정상인의 말초혈액을 밀도 1.077 의 피콜-하이파크 위에 중층한 후 원심분리하고 다시 2시간 동안 24웰 배양 플레이트에 부착시켜 단핵구/대식세포를 얻었다. 이들 세포를 $0.1\sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ 방기 추출물 A 혹은 B와 1시간 동안 배양한 후 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실리카로 48시간 처

리하여 배양액을 원심분리로 얻었다. 이 배양액을 다시 PBS로 투석하여 인터루킨-6 의존성인 B9 하이브리도마 세포주를 이용하여 인터루킨-6 활성도를 측정하였다. 즉, 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지와 2U/ml의 재조합 인체 인터루킨-6로 배양한 B9 세포주 (Dr. Kishimoto, T., Osaka 대학, 일본)를 무혈청 배지로 3회 세척하고 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지로 5×10^4 세포/ml로 현탁하여 96 웰 배양 플레이트에 웰당 $100\mu\text{l}$ 씩 넣고 이들 배양액을 $100\mu\text{l}$ 씩 가하여 37°C , 5% CO_2 에서 68시간 동안 배양하였다. 그 다음 $0.5\mu\text{Ci}$ 의 ^3H -티미딘을 $50\mu\text{l}$ 씩 각 웰에 가하고 4시간 더 배양한 후 다중 세포수확기(multiple cell harvester; Inotech)로 유리 섬유 여과지에 회수하여 액체 신틸레이션 계수기(liquid scintillation counter; Beckman)로 ^3H -티미딘의 함유량을 측정하였다. 이때, 재조합 인터루킨-6를 모든 분석에 내부 대조구로 사용하였으며 최대치의 50% 증식을 일으키는 농도를 1U로 정의하였다. 단핵구/대식세포로부터 분리되는 인터루킨-6는 농도의존적으로 분방기 추출물 A와 B에 의해 저해되고 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 50% 이상 생산이 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 17).

(3) 분방기 추출물에 의한 흰쥐 폐 대식세포의 인터루킨-6 생산억제

이러한 효과들을 동물 대식세포에서 측정하기 위하여 흰쥐를 케타민으로 마취한 후 기관지에 멸균된 가는 튜브를 꽂아 넣고 300ml 주사기를 이용하여 RPMI 1640 배지로 10ml 씩 3회 주입과 흡입을 반복하여 세포를 얻어내고 이들 세포들을 $400\times\text{g}$ 에서 5분 동안 원심 분리하여 10% FBS가 들어있는 RPMI 1640 배지로 현탁시켜 37°C 에서 2시간 동안 배양하여 부착시킨 후 폐 대식세포를 얻고 2×10^5

세포를 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 실리카로 3일간 처리하고 그 배양액을 투석한 후 인터루킨-6 의존성인 B9 하이브리도마 세포주를 이용하여 인터루킨-6 활성도를 측정하였다. 그 결과 흰쥐 폐 대식세포에서 분비되는 인터루킨-6도 분방기 추출물 A에 의해 억제됨을 관측할 수 있었다.

(4) 분방기 추출물에 의한 실험동물의 인터루킨-6 생산억제

이러한 억제효과를 다시 동물 모델에서 살펴보기 위해 처리군당 각각 흰쥐(Sprague-Dawley, 약 150g) 5마리의 기관지를 노출시킨 후 실리카 500mg을 0.5ml의 멸균된 생리식염수에 녹여 기관지내로 주입시켜 실험규폐증 모델을 만든 후 40mg 분방기 추출물 C를 구강으로 매주 2회 17주간 투여한 후 인터루킨-6의 활성도를 혈청에서와 폐 섬유아세포의 배양액에서 살펴 보았는데, 각 경우 모두 추출물 C에 의해 인터루킨-6의 활성도가 저해되어 동물모델에서도 그 효과를 측정할 수 있었다.

(5) 분방기 추출물에 의한 인터루킨-6 유전자 발현 억제

분방기 추출물이 실제로 인터루킨-6 유전자 발현을 억제하는가를 알아보기 위해 인터루킨-6가 과다분비되어 일어나는 질환인 류마티스 관절염(Hirano, T. et al., Eur. J. Immunol. 18, 1797(1988))의 중요한 세포인 활막세포에 대한 처리효과를 측정하였다. 우선 분방기 추출물 B를 처리하기 하루 전 활막세포를 1.5×10^6 세포/웰(6웰)에 도달하고, 분방기를 각각 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 후에 37°C , 5% CO_2 조건으로 3일간 배양하였다. 3일 후에 상층액을 제거하고 PBS로 1회 세척한 후에 변성 용액(4M 구아니디늄 티오시아네이트, 25mM 소듐 시트레이트 pH 7.0, 0.1M 2-머캅토에탄올

0.5%, 사르코실) 500 μ l를 각 웰에 넣고 부드럽게 피펫팅하여 세포를 깨고 튜브로 그 용액을 옮겼다. 각 튜브에 50 μ l의 2M 소듐 시트레이트, pH 4.0을 넣고 섞은 후 500 μ l의 물로 포화시킨 페놀을 가하여 다시 잘 섞었다. 그 후 200% 부피의 클로로포름을 넣고 잘 섞은 후 얼음에서 10분간 방치하고 12,000rpm으로 원심분리한 후 상층액을 취하고 상층액에 1ml의 이소프로필 알콜을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 방치하였다. 12,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 펠렛을 70% 메탄올로 세척하고 펠렛을 건조시킨 후에 0.1% 디에틸 피로카보네이트(diethyl pyrocarbonate)-물을 20 μ l 넣고 잘 녹였다(최종농도 10 μ g/ml).

전기영동된 겔을 EtBr 용액에서 10분간 염색하고 증류수로 세척한 후에 사진을 찍었다. 대조군으로 일정한 양의 RNA가 발현되는 아데닌 포스포리보실 전이효소(adenine phosphoribosyl transferase, APRT)의 RNA경우 분방기 추출물에 의해 변화가 없었으나 인터루킨-6의 경우 10 μ g/ml에서 현저히 RNA 발현이 억제됨을 알 수 있어 분방기 추출물이 인터루킨-6 유전자 발현을 저해함을 알 수 있었다 (Fig. 18).

(6) 분방기 추출물에 의한 관절염 활막세포 증식 억제

분방기 추출물에 의한 관절염 활막세포의 증식억제 효과를 다음과 같이 측정하였다. 분방기 추출물 A를 여러 농도로 사람의 단핵구/대식세포에 처리한 후 그 배양액을 다시 PBS로 투석하여 1×10^4 의 활막세포에 넣고 5일 동안 배양시켰다. 이후 3 H-티미딘으로 4시간 동안 배양하고 세포에 함유된 양을 측정하였다. 분방기 추출물은 10 μ g/ml의 농도에서 활막세포의 증식을 현저히 억제하였

다.

(7) 분방기 추출물에 의한 콜라겐 합성 억제

인터루킨-6는 섬유화를 일으키는 사이토카인으로 알려져 있으며 흰쥐 섬유아세포에서 콜라겐 합성을 유도한다(Kang, H. S. et al., Korean. J. Immunol. 14, 193(1992)). 따라서, 분방기 추출물이 이러한 인터루킨-6의 작용을 억제할 수 있는가를 알아보기 위해, 흰쥐 폐 섬유아세포에서 분비되는 콜라겐 합성 및 폐 조직의 콜라겐 합성 저해효과를 측정하였다. 흰쥐 폐 섬유아세포에서 분비되는 콜라겐 합성은 먼저 내부 대조구로서 콜라겐(Sigma, Type I)을 1mg/ml의 펩신이 포함된 1M 초산에 완전히 용해시킨 다음 코팅 완충용액(0.05M 카보네이트 완충용액, pH 9.6)로 1 μ g-16pg까지 5배 연속희석하여 바닥이 평평한 미세역가판(Dynatech, Immulon 2)에 100 μ l씩 가하고 마이크로 원심분리 관에 들어 있는 각각의 배양액을 속도 진공 건조기(speed vac dryer; Savant)로 약 10~20배 농축시킨 다음, 코팅 완충용액(0.1M NaHCO₃, 0.02% NaN₃, Na₂CO₃로 pH를 0.6으로 조정) 100 μ l를 가하여 완전히 녹이고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 코팅시켰다. 그 후 세척 완충용액(PBS, 0.05% 트윈 20, pH 7.4)로 3회 세척한 다음 1% 소혈청 알부민(BSA, Sigma)으로 상온에서 2시간 동안 코팅되지 않은 부분을 차단하였다. 이를 다시 4회 세척한 후 희석 완충용액(0.05M Tris-HCl, 1mM MgCl₂ · 6H₂O, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃, 1% BSA, 0.05% 트윈 20, pH 8.1)로 1,000배 희석된 알칼리 포스파타제가 결합된 토끼 항-염소 IgG(Cappel)를 100 μ l씩 각 웰에 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이를 다시 3회 세척후 기질 완충용액(0.05M NaHCO₃, 10mM MgCl₂ · 6H₂O, pH 9.8)에 1mg/ml로

녹인 p-니트로페닐 포스페이트를 100 μ l 씩 가하고 ELISA 리더를 사용하여 405nm 에서 O.D.를 측정하였으며, 이 배양액내의 콜라겐 합성을 내부 대조구로 부터 비교하여 정량하였다. 분방기 추출물 A를 처리한 흰쥐 폐 섬유 아세포 배양액에서 콜라겐 분비가 현저히 감소됨을 관측할 수 있었다. 또한 분방기 추출물 C를 처리한 실험동물의 폐 조직에서 콜라겐 합성을 측정하기 위해서 하이드록시 프롤린의 양을 측정하였는데 실험동물에서 떼어낸 폐조직 0.1~0.2g을 파이렉스관(Corning)에 PBS 1mg과 섞어 파쇄한 다음 이 조직의 추출물을 초음파 파쇄기(Heat system, W-380)로 파쇄한 후 하이드로 크론산(hydrochloric acid) 원액 1ml을 가하고 120 $^{\circ}$ C 건조 오븐에 밤새둔다. 그 후 이를 냉동기에서 충분히 얼리고 냉동 건조기(Labconco)로 동결건조시킨 다음 증류수 1ml을 가하여 완전용해시키고 그중 50 μ l를 마이크로 원심분리관에 가하고 다시 50 μ l의 증류수로 혼합 희석한다. 이때 내부 대조군으로써 트랜스- γ -하이드록시-L-프롤린(Sigma)을 20 μ g ~ 150pg 까지 2배로 연속 희석하여 같은 방법으로 가한다. 다음으로 클로라민-T(sodium N-chloro-P-toluene sulfonamide) 1.41g을 10ml의 n-프로판올과 10ml의 증류수로 녹여 만든 용액 0.9ml을 가하고 실온에서 20분동안 방치한다. 그후 62ml의 동일 용액을 천천히 가하여 총 부피가 100ml가 되게 만든 알데히드/과염소산(aldehyde/perchloric acid) 용액 1ml을 가하여 잘 섞는다. 그 후 65 $^{\circ}$ C 항온수조에서 15분동안 넣어두어 발색시키고 650nm에서 O.D를 측정하여 내부 대조구로 부터 하이드록시 프롤린을 정량하였다. 분방기 추출물 C를 투여한 흰쥐의 폐조직에서 콜라겐 생산이 약 50% 감소되었고, 위의 결과로부터 분방기 추출물이 항섬유화 효과가 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 19).

(8) 분방기 추출물을 이용한 반응성 산소의 생산 억제

염증반응은 여러가지 자극원들에 의해 면역 세포들이 인터루킨-6 등 여러가지 사이토카인을 분비하고 이들이 다시 다른 염증 세포들을 자극하여 포스포리파제 A₂, 리소솜 효소, 반응성 산소 등을 분비케함으로써 조직손상을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Pruzanski, W. and Vadas, P., Immunol. Today 12, 143(1991)). 분방기 추출물이 이러한 경로를 차단할 수 있는가를 단핵구/대식세포와 호중구에서의 반응성 산소인 H₂O₂ 및 O₂⁻ 생산 억제 효과를 측정함으로써 조사하였다. H₂O₂의 측정은 96-웰 플레이트를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 각각의 웰에 단핵구/대식세포와 호중구를 각각 5 x 10⁵ 세포로 가하고 양고추냉이 퍼옥시다제 (500µg/ml; type II, Sigma) 25µl와 페놀레드 (1mg/ml) 75µl를 가하였다. 그리고 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (phorbol myristate acetate; PMA, 10⁻⁷M)를 자극원으로 하여 단핵구/대식세포 배양액 또는 이들 천연 추출물들을 직접 가하여 37°C에서 60분동안 반응시켰다. 배양후 3M NaOH 용액을 25µl씩 가하여 반응을 정지시키고 620nm에서 ELISA 리더 (Dynatech Lab. Inc.)로 O.D. 값을 구하여 페놀의 산화 정도에 의한 색의 변화를 측정하였으며, H₂O₂의 정량은 신선한 H₂O₂ (Sigma)를 희석하여 얻은 표준곡선을 이용하여 정량하였다. O₂⁻의 측정은 단핵구/대식세포와 호중구를 각각 1 x 10⁶ 세포/800µl로 현탁시켜 24웰 플레이트에 가하고 빈 웰에는 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 (SOD, 3mg/ml, Sigma)를 100µl 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시킨 후, 각 웰에 사이토크롬 C (3mg/µl, Sigma) 100µl와 PMA, 10⁻⁷M를 자극원으로 하여 단핵구/대식세포의 배양액 또는 이들 천연 추출물들을 직접 가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 이 반응

은 1mM N-에틸말레이미드(Sigma)를 첨가하여 정지시킨 후 1.600xg에서 10분간 원심분리하여 상청액을 얻어 UV-가시광선 스펙트로포토미터(Kontron Instrument, Milano, Italy)를 이용하여 550nm에서 사이토크롬 C의 환원에 의한 색의 변화를 측정하였다. 그 결과 생성된 O_2^- 의 양은 사이토크롬 C의 흡광 계수($E_{550nm}=1.83 \times 10^4 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 사용하여 20분당 1×10^6 세포당 사이토크롬 C의 환원을 억제할 수 있는 SOD의 nM로 표현하였다. 분방기 추출물 A를 5×10^5 의 사람 단핵구/대식세포에 1시간 동안 처리한 후 다시 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실리카로 자극시킨 후 생성되는 H_2O_2 와 O_2^- 를 측정하였는데 분방기 추출물 A에 의해 현저히 감소되었고(Fig. 20), 같은 방법으로 호중구에서의 효과를 측정한 결과 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 추출물 A가 H_2O_2 생산을 약 50% 그리고 O_2^- 생산을 약 25% 정도 억제시킴을 알 수 있어 이 분방기 추출물이 염증 반응에도 억제 효과가 뚜렷함을 알 수 있었다.

(9) 분방기 추출물을 이용한 실험 간경변의 억제

간경변 (간경화)는 간전체의 섬유화와 섬유성 중격에 의한 간실질의 완전한 파괴, 그리고 재생성 결절들을 특징으로 하는 질환이다. 만성감염이나 알코올에서 주로 간경변이 시작되는 경우가 많은데 아직 이에 대한 정확한 원인은 밝혀져 있지 않다. 현상적으로 간경변에서 인터루킨-6등 염증 및 섬유화에 관련하는 사이토카인이 많이 증가되어 있어 분방기 추출물을 이용하여 간경변 유발의 억제 효과를 측정하였다. 우선 실험간경변을 유발하기 위해 생후 4주된 웅성 스프라그 라울리 (Sprague-Dawley) 흰쥐에 CCl_4 를 1회에 1.0 ml (50% CCl_4 + 50% corn oil)/100g body weight씩 1주일에 2회씩

복강내 주사하였으며 (Nakatsukasa, H. et al., J. Clin. Invest. 85, 1833-1843 (1990)) 실험에 따라 여러가지 분방기 추출물을 0.2ml씩 구강을 통해 1주일 2회씩 CCl₄와 동시에 투여하였다. 실험 13주가 된 후 각 실험동물은 either 마취하에 심장으로 부터 혈액을 채취하여 serum glutamic oxaloacetic transferase (sGOT)와 serum glutamic pyruvic transferase (sGPT)를 측정하였다 (Fig. 21). sGOT는 추출물 A나 C에 의해 억제되지 않았으나 추출물 D에 의해 약 20% 정도 감소가 되었으며 (CCl₄ + DMSO + PBS를 대조군으로 하여) 특히 추출물 B에 의해 40% 이상 감소됨을 알 수 있었고 sGPT의 경우는 추출물 B에 의해 약 60% 이상 감소됨을 알 수 있었다. 또한 간의 병리조직학적 검사를 위해 간을 적출하여 10% 중성 포르마린 수용액에 고정하여 4mm의 두께로 전개한 후 파라핀 포배를 하였다. 포배된 조직들은 5mm 두께로 박절하여 hematoxylin eosin과 Masson's trichrome 염색을 시행한 후 광학현미경으로 관찰하였다. CCl₄를 단독 투여한 간(B)에서는 비교적 비후된 섬유성 band에 의한 간소엽의 결절화가 정상간 (A)에 비해 뚜렷하였으며 추출물 B(F), 추출물 C(E), 추출물 D(D)에서는 간경변의 소견을 보였으나 간소엽의 결절을 둘러싸고 있는 섬유성 band가 CCl₄ 단독 투여군에 비해 얇고 불완전한 결절 형성이 많았고 간세포의 재생성 변화도 CCl₄ 단독 투여군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 추출물 A는 이들에 비해 효과가 적었다 (C).

표 II. 분방기 추출물 A에 의한 사람 호중구의 반응성 산소 생산의 억제(사람 호중구(5×10^5 세포)를 분방기 추출물 A로 30분 처리후 다시 1nM PMA(phorbol myristate acetate)로 처리한 후 H_2O_2 와 O_2^- 양을 측정함)

분방기 추출물 A 농도	반응성 산소 생산(대조구에 대한 %)	
	H_2O_2 (nM/60분)	O_2^- (nM/20분)
배지만 있을 때	11.5 (11.1)	2.0 (12.9)
PMA	103.6 (100%)	15.5 (100%)
PMA + 추출물 A		
10 $\mu g/ml$	90.6 (87.4)	12.7 (81.9)
20 $\mu g/ml$	58.6 (56.6)	12.4 (80.0)
50 $\mu g/ml$	50.6 (48.8)	11.5 (74.2)

4. IL-6 항체 생산 및 응용 기술개발

(공동연구기관: 제일약품)

인터루킨-6는 인체 면역체계를 이루는 여러 세포간의 성장, 분화, 활성화에 관여하는 조절인자로서 여러가지 다양한 세포에서 생산되어 인체의 방어기작에 중요한 역할을 하는 인자이다(Hirano, T., et al., Immunol. Today 11, 443(1990)). 원래 인터루킨-6는 단핵세포의 배양액에서 발견된 인자로서 B세포의 항체생산을 유도하는 기능이 있음이 보고 되었고(Muraguchi, A., et al., J. Immunol. 127, 412(1981)), 1986년 인체 인터루킨-6의 cDNA가 클로닝되었다(Hirano, T., et al., Nature 324, 73 (1986)). 그 후 밝혀진 인터루킨-6의 기능은, (1) B세포 잡종세포(hybridoma)와 형질세포종(plasmacytoma)의 성장인자(Snick, V. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 9679 (1986)), (2) T세포 활성화와 성장효과(Lotz, M., et al., J. Exp. Med. 167, 1253 (1988)), (3) 간세포의 급성기 반응(acute phase response)을 유도하는 기능(Geiger, T., et al., Eur. J. Immunol. 18, 717 (1988)), (4) 조혈작용(hematopoiesis)에 관여하는 인자(Koike, K., et al., J. Exp. Med. 168, 879 (1988)), (5) 신경계통의 세포들의 분화효과(Satoh, T., Mol. Cell. Biol. 8, 3546 (1988)), (6) 각질형성세포(keratinocyte)의 성장효과, (7) 뼈의 신진대사(metabolism)의 조혈작용, (8) 콩팥 사구체간질(mesangial) 세포들의 성장효과, (9) 악성흑색종(melanoma)과 유방암 세포의 성장을 저해하는 효과등이 있다.

이렇게 인체의 여러 기능을 조절하는 인터루킨-6는 다양한 기관의 여러 세포들로 부터 분비되고 있는데 특히 이들 생산이 잘못 조절되면 여러가지 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 질병으로는 류마티스 관절염(Hirano, T., et al., Eur. J. Immunol. 18,

1797 (1988)), 간경변 (Devriere, J., et al., Clin. Exp. Immunol. 77, 221 (1989)), 건선 피부병 (Grossman, R.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 6367 (1989)), 다발성 골수종 (Bataille, R., et al., J. Clin. Invest. 84, 2008 (1989)), 심장점액종 (cardiac myxoma), 에이즈 (Miles, S.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4068(1990)) 및 기타 여러가지 자가면역 질환들이 알려져 있다.

이와 같이 인체 여러 기관에서 중요한 역할을 담당하고 있는 인터루킨-6의 기능 및 생산조절은 인체내의 면역체계의 항상성 유지와 질병치료 및 예방에도 매우 중요하다. 예를 들면, 인터루킨-6 항체나 인터루킨-6 수용체의 항체를 이용하여 인터루킨-6가 과다분비하여 생기는 골수종 환자의 골수종 세포증식을 억제하였다 (Suzuki, H., Eur. J. Immuno. 22, 1989 (1992)).

한편 조기분만 진통 산모와 조기양막파열 산모의 경우 양수에서 인터루킨-6가 높은 수준으로 검출되는데 (Romero, R., et al., J. Clin. Invest. 85, 1392(1990) ; Romero, R., et al., AJRI 30, 169(1993)) 이를 응용하여 인터루킨-6를 조산 진단용 지표로 활용할 수 있다. 따라서 인체 인터루킨-6를 특이적으로 선별할 수 있는 항체 생산과 이를 이용한 인체 인터루킨-6 검정법의 개발이 필요하며 이를 이용하여 인터루킨-6 과다분비가 원인이 되는 여러 질병의 예방, 진단 및 치료에 활용코자 한다.

(1) 항인터루킨-6 항체에 의한 재조합 및 자연 인터루킨-6의 검색

각기 다른 두개의 항 인터루킨-6 단일클론 항체 (YB3와 21B3)를 96웰 microtitration 플레이트에 웰당 0.1 μ g씩 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 결합시켰다. 파지티브 대조군으로 기존에 알려진 단일클론 항체 (Genzyme, 1618-01)와 네가티브 대조군으로 생쥐 면역항체 (MIgG₁)를 사용하였다. 각 단일클론 항체를 96웰 microtitration 플레이트에

결합시킨 후 여러농도의 대장균에서 생산한 재조합 인체 인터루킨-6를 상온에서 2시간 반응시켜 항체에 결합시켰다. 그후 세척완충액으로 3회 세척한 후 참조 예1에서와 같은 방법으로 인체 인터루킨-6를 검정하였다. 대조군인 MIgG₁은 전혀 인체 인터루킨-6를 인식하지 못했으며 항 인체 인터루킨-6 단일클론 항체 21B3는 인체 인터루킨-6를 인식하지 못했으나 YB3 항체는 100-1000pg/ml의 인체 인터루킨-6를 농도에 따라 일직선으로 잘 인식하였다. 같은 조건에서 기존에 알려진 항 인체 인터루킨-6 단일클론 항체인 Genzyme 항체와 비교하여 blank 대조군은 높으나 유사한 인식경향을 보였다 (Fig. 22). 다음 탄수화물이 있는 인체 인터루킨-6에 대한 항체 인식을 살펴보기 위해 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포에서 발현된 자연 인체 인터루킨-6를 이용한 항체인식도를 측정하였다. 대조군 MIgG₁과 21B3 항체는 유사하게 자연 인체 인터루킨-6를 인식하지 못하였으나 YB3 항체는 Genzyme 항체와 유사하게 100-1000 pg/ml 범위에서 농도에 따라 일직선으로 인터루킨-6를 인식함을 알 수 있었다. 같은 조건하에서 21B3 항체가 대장균 및 CHO 세포에서 유래된 인체 인터루킨-6를 인식하는 것을 측정하였는데 약 10-1000 pg/ml 범위에서 유사하게 두가지 형태의 인체 인터루킨-6를 인식하는 것으로 측정되었다 (Fig. 23).

(2) 항 인터루킨-6 단일클론항체의 특이성 검정

항 인터루킨-6 단일클론 항체의 특이성을 검정하기 위하여 인터루킨-6와 유사한 여러 싸이토카인을 대상으로 그 결합정도를 엘라이자 방법으로 측정하였다. 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2 (IL-2), 인터루킨-4 (IL-4), 인터루킨-6 (IL-6)를 각각 1 μ g씩을 각각 MIgG₁, YB3, 21B3, Genzyme 항 인체 인터루킨-6 단일클론 항체와 반응시켜 엘라이자를 수행한 결과 YB3와 대조군인 Genzyme 항체가 각각 인터

루킨-6에 특이하게 반응하고 다른 싸이토카인에는 전혀 반응하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 24). 이를 다시 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 수행하였는데 (Fig. 25), 항원으로 사용한 싸이토카인을 대장균 생산 재조합 인체 인터루킨-6 (lane 1), CHO 세포생산 인체 인터루킨-6 (lane 2), 인체 인터루킨-1 (lane 3), 인체 인터루킨-2 (lane 4), 인체 인터루킨-4 (lane 5)를 각각 10% SDS-PAGE gel에 걸고 이를 다시 Genzyme 인터루킨-6 항체(A), YB3(B), 생쥐 IgG(C)와 각각 배양한 결과 인터루킨-6만이 YB-3 항체와 결합하는 것으로 밝혀졌다. D는 각 싸이토카인을 silver로 염색한 그림이다. 따라서 엘라이자와 웨스턴 블랏에서 YB-3가 인체 인터루킨-6와만 결합하는 인터루킨-6 특이한 단일클론 항체임을 알 수 있었다.

(3) 세포배양액에서 인체 인터루킨-6의 검정

실제로 세포배양중에 생산하는 인터루킨-6의 양을 정량적으로 검정하기 위해 우선 인터루킨-6를 생산하는 세포주를 만들었다(Fig. 26). 이를 위하여 인터루킨-6 유전자를 SV40 프로모터를 포함한 유전자 발현 벡터에 넣은 후 (A), 이를 인체 B세포에 트랜스펙션(transfection)한 후 G418이 포함된 선택배지에서 배양하여 RT-PCR로 검정하였는데(B), 인터루킨-6로 트랜스펙션된 세포에서만 IL-6 유전자가 선택적으로 발현되는 것을 알 수 있었고, 또한 단백질 발현 정도를 인터루킨-6 웨스턴 블랏으로 확인한 결과 농도의존적으로 잘 발현됨을 알 수 있었다(C). 다음 이러한 세포 배양액(G7)에서 인체 인터루킨-6의 생산을 엘라이자로 측정하였는데 YB3 항체가 인터루킨-6를 인식하였고(G7, sup), 대조군인 배양액과 혈청의 혼합군을 인식하지 않고 혈청과 세포배양액(G7) 혼합군은 잘 인식하여 혈청내의 인터루킨-6도 인식할 수 있는 것으로 측정되었다(Fig. 27).

5. 조산 발생에서 IL-6의 역할 규명

(위탁과제:서울의대)

본 위탁연구과제의 연구 목표는 염증 등에 의하여 유발되는 조기 분만진통 (preterm labor), 즉 조산의 병인론적 측면에서 interleukin-6(IL-6)의 병태생리학적 역할을 규명하기 위하여 여러 조산 산모에서 양수천자(amniocentesis)를 시술하여 얻은 양수(amniotic fluid)를 대상으로 양수내 IL-6의 생성 정도, 즉 IL-6 농도를 주 연구과제에서 연구 개발된 IL-6 ELISA kit를 이용하여 측정함으로써 조산 발생에서 IL-6의 역할과 그 상관성을 추론하고, IL-6 ELISA kit의 임상적 효용성을 알아보는데 있다.

1. 연구개발 내용 및 범위

신생아의 주산기 사망율이 과거에 비하여 크게 감소하였음에도 불구하고 주산기 사망과 이환의 가장 큰 원인인 조기 분만의 발생율은 감소하지 않고 있다. 조기 분만은 총 분만 예의 약 10%를 차지하며(Cooper, 1993), 조기 분만진통, 조기 양막파열, 태아 혹은 모체의 합병증 등 3대 원인에서 주로 기인하는 것으로 알려져 있다.(Arias and Tomich, 1982). 이중 조기 분만진통과 조기 양막파열은 조기 분만의 원인 중 65%를 차지하고 있을 뿐만 아니라 (Arias and Tomich, 1982), 대부분의 경우에서 발생 원인과 기전이 명확하게 밝혀져 있지 않아 이의 예방과 치료는 주산기학 분야에서 가장 큰 과제가 되고 있다.

최근 자궁내 감염이 조기 분만진통과 조기 양막파열의 중요한 원인 인자임이 연구 발표되고 있다(Romero and Mazor, 1988; Gibbs et al, 1992). 더욱이 자궁내 감염이 진단된 예에서는 자궁내 감염이 없는 예에 비하여 자궁수축억제의 실패, 조기 분만, 임상적 용모양막염, 주산기 사망, 신생아 이환 등의

발생 위험도가 더욱 높은 것으로 규명되고 있어(Miller et al, 1980; Bobbit et al, 1981; Garite and Freeman, 1982; Wahbach et al, 1984; Hameed et al, 1984; Gravett et al, 1986; Duff and Kopelman, 1987; Romero et al, 1989; Watts et al, 1992; Verma et al, 1994), 자궁내 감염의 산전 진단은 조기 분만의 위험성이 있는 산모와 향후 출생할 신생아의 예후 및 치료 방침의 결정에 있어서 유익한 정보를 제공할 수 있다는 점에서 임상적으로 매우 중요한 의미를 지닌다고 하겠다.

자궁내 감염은 양수, 혹은 태반에서 미생물을 분리하거나, 태반에서 급성 염증성 병변을 관찰함으로써 진단할 수 있다. 태반의 급성 용모양막염은 자연적 조기 분만진통에 의하여 조기 분만된 태반에서 빈번하게 발견되는 자궁내 감염의 조직학적 소견이지만 (Russel, 1979; Chellum and Rushton, 1985; Romero and Mazor, 1988), 태반의 조직학적 검사는 분만이 이루어진 후에만 가능하므로 산전 진단이 불가능하다는 결정적인 제한점이 있다. 한편 양수내 미생물의 배양검사는 양수내 감염의 가장 정확한 진단 방법이지만 배양 결과를 얻는데 시간이 많이 소요되며, 배양 방법 등 실험실의 제반 조건이 많이 관여되고, 검사의 민감도가 낮다는 단점이 있다. 따라서 자궁내 감염의 신속한 산전 진단을 위하여 양수검사를 이용한 Gram 염색법(Romero et al, 1988a), limulus amebocyte lysate(Romero et al, 1987), leukocyte esterase(Romero et al, 1988b), leukoattractant(Cherouny et al, 1992), glucose 농도(Romero et al, 1990), 백혈구 수(Romero et al, 1991), IL-6(Greig et al, 1993; Romero et al, 1993; Yoon et al, 1995) 등의 측정 등 여러 진단 방법들이 제시되어 왔다. 그러나 이러한 검사 방법들도 양수천자라는 침습적인 처치를 시행하여야 한다는 제한점을 지니고 있다. 따라서 자궁내 감염의 진단에 있어서 비침습적이면서도 분만 전에 신속한 결과를 얻을 수 있는 검사 방법을 찾으려는 노력이 계속되고 있다.

이에 본 위탁연구과제에서는 조기 분만진통 산모, 특히 조산이 예측되는 산모를 대상으로 하여 신속하고도 정확한 자궁내 감염의 산전 진단 방법으로 서 양수천자로 얻어진 양수에서 IL-6 ELISA kit를 이용한 IL-6 농도 측정의 임상적 효용성을 규명하는 한편 신생아의 이환, 특히 감염성 이환의 예측에 있어서 양수내 IL-6 농도가 어느 정도의 관련성을 지니고 있는지 예측인자로서의 IL-6 농도 측정의 임상적 의의를 추론하고자 한다.

2. 연구개발 방법 및 결과

(1) 다양한 원인에 의한 조산 및 정상 분만 산모에서 양수 및 혈액 채취

특히 혈액의 경우 EDTA가 들어있는 tube에 넣어 원심분리한 후 혈청을 분리한다.

양수 및 혈청을 IL-6 농도 측정 전까지 -70°C 냉동고에 보관한다.

(2) 각 대상 검체에서 IL-6 ELISA kit를 이용한 IL-6 농도 측정

IL-6 농도 측정은 IL-6의 non-overlapping epitope에 결합하는 2개의 monoclonal antibody(7IL-6-H12, 5IL-6-H17)를 이용한 two-site ELISA 방법으로 측정한다. ELISA 검사 조건을 조절한 후 측정은 $25\mu\text{l}$ standard or sample volume과 half-area immunoassay/radioimmunoassay microplate(Costar, Cambridge, MA)를 이용한다. National Institute for Biological Standards and Control interim reference IL-6(88/514)를 immunoassay의 기준으로 설정한다. 이 ELISA는 free monomeric IL-6 뿐만 아니라 인체의 체액내에서 발견되는 IL-6 complex도 측정할 수 있다. ELISA format는 IL-6 standard를 사용하여 lower cut-off value를 0.1ng/ml 가 되도록 조절한다. Coefficient of variation(CV)은 20ng/ml 의 농도에서 5% 이하이다. 양수는 700g 에서 10분간 원심분리하여 가라앉는 물질을 제거하고

부유액을 2개로하여 측정한다. 20ng/ml 이상인 경우 희석하여 재측정한다. 양수의 경우 intrassay CV는 6.4%, interassay CV 은 7.9% 이다.

1. PBS, 0.05% thimerosal, 1% non-fat dry milk, 증류수를 사용하여 incubation buffer를 만든다.
2. IL-6 항원을 incubation buffer와 혼합하여 standard를 만든다.
3. PBS와 4IL6-H12 항체를 혼합하여 Corning Easy Wash (#25806-96)를 coating하여 4°C에서 plate를 막고 12시간 동안 배양한다.
4. PBS, thimerosal, BSA를 사용하여 ELISA wash buffer를 만든다.
5. Plate를 ELISA wash buffer로 2회 세척한다.
6. PBS, thimerosal, non-fat dry milk powder를 사용하여 blocking buffer를 만든다.
7. Blocking buffer로 non-specific binding site를 제거한다.
8. ELISA wash buffer로 plate를 3회 세척한다.
9. Incubation buffer에 희석된 biotinylated monoclonal antibody 5IL6-H17 (2 μ g/ml) 25 μ l에 25 μ l의 대상 검체 및 standard를 각각 혼합한다.
10. 흔들어주면서 상온에서 2시간 동안 배양한다.
11. ELISA wash buffer로 plate를 3회 세척한다.
12. BSA buffer에 1:3,000으로 희석된 peroxidase-streptavidin을 각 well 당 50 μ l씩 첨가한다.
13. 흔들어주면서 상온에서 1시간 동안 배양한다.
14. ELISA wash buffer로 plate를 4회 세척한다.
15. Citrate buffer, H₂O₂, o-phenylenediamine으로 OPD substrate 용액을 만든다.

16. Plate의 각 well당 50 μ l의 OPD 용액을 첨가한다.
17. 30분 동안 어두운 곳에서 plate를 배양한다.
18. plate를 450nm/650nm의 dual wavelength에서 측정한다.

전체 환자수중 IL-6의 농도별 positive 수를 계산하여보면 (>500 pg/ml 기준) TAF 경우 labor가 있을시 IL-6의 농도가 그렇지 않은 경우보다 상대적으로 높았고, PROM의 경우도 약 36%가 IL-6가 양성이었다. 한편 PAF 경우 PTL (조산)시 control에 비해 높았다 (표 I).

표 I. 조산과 양수내 IL-6 농도와의 상관성 분석

Patients	>100 pg/ml	>300 pg/ml	>500 pg/ml
TAF(labor)	6/7	4/7	3/7 (42.8%)
TAF(sample)	10/30	5/30	3/30 (10.0%)
PROM	23/30	15/30	11/30 (36.7%)
PAF(control)	16/28	7/28	2/28 (7.1%)
PAF(PTL)	20/29	17/29	15/29 (51.7%)

(TAF: Term pregnancy amniotic fluid, PROM: Premature Rupture of Membrane, PAF: Preterm Amniotic Fluid)

한편 환자별로 IL-6 농도에따른 진단 유효성을, PAF 경우 PTL (조산)과 control의 집단 (총 57면)에서 살펴보면, 0.5 ng/ml에서 약88%의 True positive, 약 35%의 False negative를, 1 ng/ml에서 100%의 True positive, 약 44%의 False negative임을 알 수 있었다(표 II).

아직 환자의 수가 적어 통계적으로 유의한 결론은 어렵지만, 이번년도 연구를 종합하면 조산의 경우에 대조군에 비해 IL-6농도가 높았고, 환자에 따른 True positivity는 유효성이 높았으나, False negative가 상대적으로 높아 이에 대한 연구가 계속되어야 할 것이며 앞으로 환자의 sampling 방법, IL-6 측정법의 개량 등이 해결해야 할 과제라고 여겨진다.

표 II. 조산환자의 IL-6의 진단 유효성

IL-6 농도기준	True positive	False positive	True negative	False negative
>1.0 ng/ml	7/7 (100%)	0/7 (0%)	28/50 (54.9%)	22/50 (44.0%)
>0.5 ng/ml	15/17 (88.2%)	2/17 (11.8%)	26/40 (65.0%)	14/40 (35.0%)

3. 기대성과 및 활용방안

- 조산의 병인론적 관점에서 IL-6 측정을 이용한 자궁내 감염의 신속 정확한 산전 진단
- 조산 산모의 예후 및 분만된 신생아의 예후를 예측하는데 있어서 IL-6 측정의 임상적 유용성 규명
- 조산의 위험성이 높은 임신 예에서의 예후 및 치료 방침의 결정에 있어서 신속하고도 유용한 임상 정보 제공
- 향후 조산뿐만 아니라 각종 원인의 고위험 임신(high risk pregnancy) 예에서 신속 정확한 산전 진단을 위한 양수 및 혈액내 IL-6 측정의 임상적 효용성 규명을 위한 연구에 있어서 기초적인 자료 제공

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

연구 목표	진 도	근 거	비 고
Cytokine의 작용기작 및 신호 전달	95%	<ul style="list-style-type: none"> - IL-6에 의한 PP2A 조절 - IFN-γ에 의한 NO/iNOS 조절 - IL-6의 host immunity 조절 및 in vivo 항암 효과 	<ul style="list-style-type: none"> - Hepatology 25, 913 - Immunol. Lett. (in press) - Biomed. Science 4:201 - Korean J. Immunol (in press)
면역세포 활성화 물질 탐색 및 응용	90%	<ul style="list-style-type: none"> - Novel cytokine 탐색 - Novel CAM 탐색 - Mutant IL-6 생산 	<ul style="list-style-type: none"> - Biotech. Lett. 19:885 - Immunol. Lett. (in press) - 국내특허97-25999 - 국내특허97-048856 - 국내특허97-048857
IL-6 항체 생산 및 응용 기술개발 (제일약품 공동연구/김성진)	95%	<ul style="list-style-type: none"> - IL-6 ELISA kit 완성 	<ul style="list-style-type: none"> - 환자 sample 검정중
Cytokine 생산 조절물질 기능 연구 및 응용기술개발	95%	<ul style="list-style-type: none"> - TNF-α 생산 억제제 (아칸토산) - IL-6생산억제제 (분방기) - 작용기작 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - 미국특허 출원중

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

염증에 의한 여러질환을 효과적으로 진단하고 치료하기 위해서는 이에 대한 기초적인 원인 및 작용기작을 이해하는 것이 필요하다. 염증은 여러 가지 외부 병원체 및 항원에 의해 염증유발 cytokine들이 발현되고, 이에 의해 여러 염증관련 세포와 세포의 생성물에 의해 진행된다.

본과제에서는 염증유발 cytokine들인 IL-6, IL-1, TNF의 작용기작에 대한 기초적인 연구를 수행하였고 이를 응용하는 기술개발로, 염증에 의한 조산환자 등에서 IL-6 검사를 통한 염증 질병진단에 응용하고자 IL-6 ELISA kit를 개발하였고 이를 이용하여 조산 등의 염증질환 진단법으로 활용하고자 한다. 또한 염증에서 과다하게 분비되는 염증cytokine의 생산억제물을 탐색하여 식물체로부터 두 종류의 염증cytokine 억제물질들을 분리하였다. 이들은 IL-6, IL-1 및 TNF 생산을 효과적으로 억제하였고 동물실험을 통해 이 물질들이 섬유화, 간경변 등의 질환을 억제하는 항 염증, 섬유화 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이 물질을 앞으로 효과적인 면역질환 치료제로 활용하고자 한다.

여 백

제 6 장 참고문헌

1. Colombo M P, Forni G. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? *Immunol. Today* 15: 48-51; 1994.
2. Gansbacher B, Zier K, Daniel B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells aborates tumorigenicity and induces protective immunity. *J. Exp. Med.* 172: 1217-1224; 1990.
3. Connor J, Bannerji R, Saito S, Heston W, Fair W, Gilboa E. Regression of bladder tumors in mice treated with interleukin 2 gene-modified tumor cells. *J. Exp. Med.* 177, 1127-1134; 1993.
4. Ley V, Langlade-Demoyen P, Kourlisky P, Larsson-Sciard E L. Interleukin 2-dependent activation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 21: 851-854; 1991.
5. Tepper R I, Pattengale P K, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity *in vivo*. *Cell* 57: 503-512; 1989.
6. Golumbek P T, Lazenby a J, Levitsky H I, Jaffee L M, Karasuyama H, Baker M, Pardoll D M. Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. *Science* 254, 713-716; 1991.
7. Esumi N, Hunt B, Itaya T, Frost P. Reduced tumorigenicity of murine tumor cells secreting γ -interferon is due to nonspecific host responses and is unrelated to class I major histocompatibility complex expression. *Cancer Res.* 51: 1185-1189; 1991.
8. Porgado a, Bannerji R, Watanaba Y, Feldman M, Gilboa E, Eisembach L. Antimetastatic vaccination of tumor-bearing mice with two types

- of IFN- γ gene-inserted tumor cells. *J. Immunol.* 150: 1458-1470; 1993.
9. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kishiwamura S, Najajima K, Koyama K, Iwamutsa A, Tsurawasa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-76; 1986.
 10. Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kishiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun K H, Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 5490-5494; 1987.
 11. Marinkovic S, Jahreis G P, Wong G, Baumann H. IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins *in vivo*. *J. Immunol.* 142: 808-812; 1989.
 12. Sato T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Kaziro Y. Induction of neuronal differentiation of PC12 cells by B cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3346-3349; 1988.
 13. Klein B, Zhang X G, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 73: 517; 1989.
 14. Kang H S, Lee B S, Yang Y, Park C W, Ha H J, Pyun K H, Choi I. Roles of protein phosphatase 1 and 2A in an IL-6-mediated autocrine growth loop of human myeloma cells. *Cell. Immunol.* 168: 174-183; 1996.

15. Miki S, Iswano M, Miki Y, Yamamoto M, Tang B, Yokokawa K, Sonoda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 functions as an *in vitro* autocrine growth factor in renal cell carcinomas. FEBS Lett. 250: 607-610; 1989.
16. Chen L, Mory Y, Xilberstein A, Revel M. Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interleukin- β 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 8037-8041; 1988.
17. Mule J J, McIntosh J K, Jablons D M, Rosenberg S A. Antitumor activity of recombinant interleukin 6 in mice. J. Exp. Med. 171: 629-636; 1990.
18. Sun W H, Kreisle R A, Phillips A W, Ershler W B. In vivo and in vitro characteristics of interleukin 6-transfected B16 melanoma cells. Cancer Res. 52: 5412-5415; 1992.
19. Takizawa H, Ohtishi T, Ohta K, Yamashita N, Hirohata S, Hirai K, Hiramatsu K, Ito K. Growth inhibition of human lung cancer cell lines by interleukin 6 *in vitro*: a possible roles in tumor growth via an autocrine mechanism. Cancer Res. 53: 4175-4181; 1993.
20. Mullen C A, Coale M M, Levy A T, Stetler-Stevenson W G, Liotta L A, Brandt S, Blaese R M, Fibrosarcoma cells transduced with the IL-6 gene exhibit reduced tumorigenicity, increased immunogenicity, and decreased metastatic potential. Cancer Res. 52: 6020-6024; 1992.
21. Lasdóczy P M, Aarden L A, Calafat J, Zeiljemaker W P. A growth-factor dependent B-Cell hybridoma. Curr. Topic. in Micro. Immunol. 132: 105-113; 1986.
22. Imanishi K, Yamaguchi K, Honda S. Transforming growth factor- α as

- a possible autocrine growth factor for human adenocarcinoma of the lung. In: Imura H, Shizyme K, Yoshida S. Eds Progress in Endocrinology, Amsterdam: Elsevier, 1363-1368; 1988.
23. Pelton R W, Moses H L. The beta-type transforming growth factor. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: S31-S35; 1990.
 24. Nakanishi Y, Mulshine J L, Kasprzyk P G, Natale R B, Maneckjee R, Avis I, Treston A M, Gazdar A F, Minna J D, Cuttitta F. Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer lines in vitro. *J. Clin. Invest.* 82: 354-359; 1988.
 25. Levy Y, Tsapis A, Brouet J C. Interleukin-6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. *J. Clin. Invest.* 88: 696-698; 1991.
 26. Lu C, Kerbel R S. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J. Cell Biol.* 120: 1281-1288; 1993.
 27. Fearon E R, Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767; 1990.

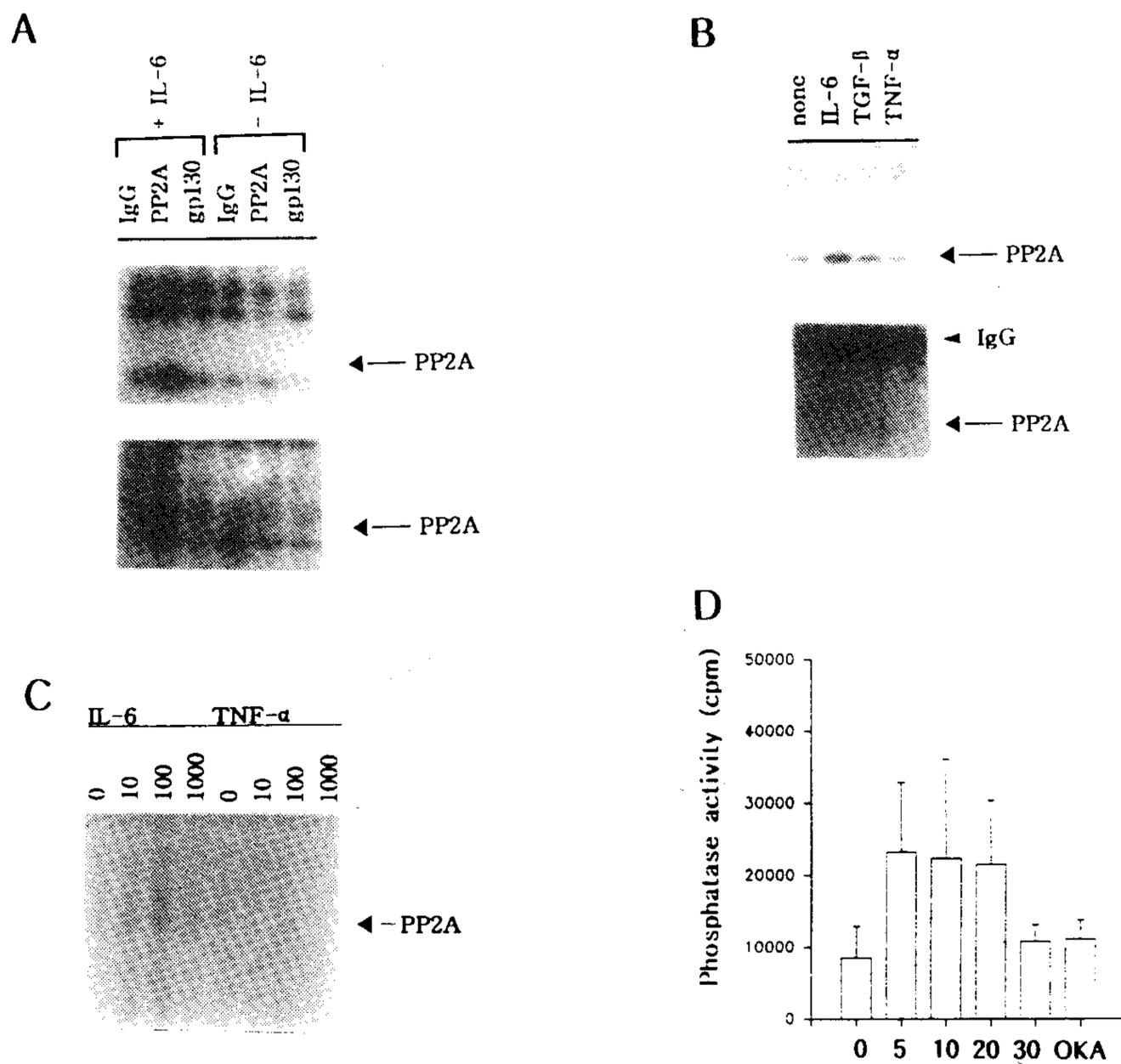


Fig. 1. IL-6 modulated PP2A phosphorylation and phosphatase activity. A. Hep3B cells (3×10^6 cells) were starved and treated with 100 U/ml IL-6 for 1 min as described above. Half of the cell lysates were immunoprecipitated with anti-PP2A antibody or control antibodies (top panel). The immune complex was assayed for *in vitro* kinase assay. The other half of cell lysates were immunoblotted with anti-PP2A to normalize the amount of PP2A (lower panel). B. Hep3B cells (3×10^6 cells) were treated with 100 U/ml cytokines and PP2A phosphorylation was assayed as described in A. C. Hep3B cells (3×10^6 cells) were treated with various concentrations of cytokines for 1 min. Then cell lysates were assayed for *in vitro* kinase assay. D. Hep3B cells (1×10^6 cells) were treated with 100 U/ml IL-6 for various times (min). Then cell lysate were assayed for phosphatase activity. OKA, 0.1 ng/ml okadaic acid plus 10 min IL-6 treatment.

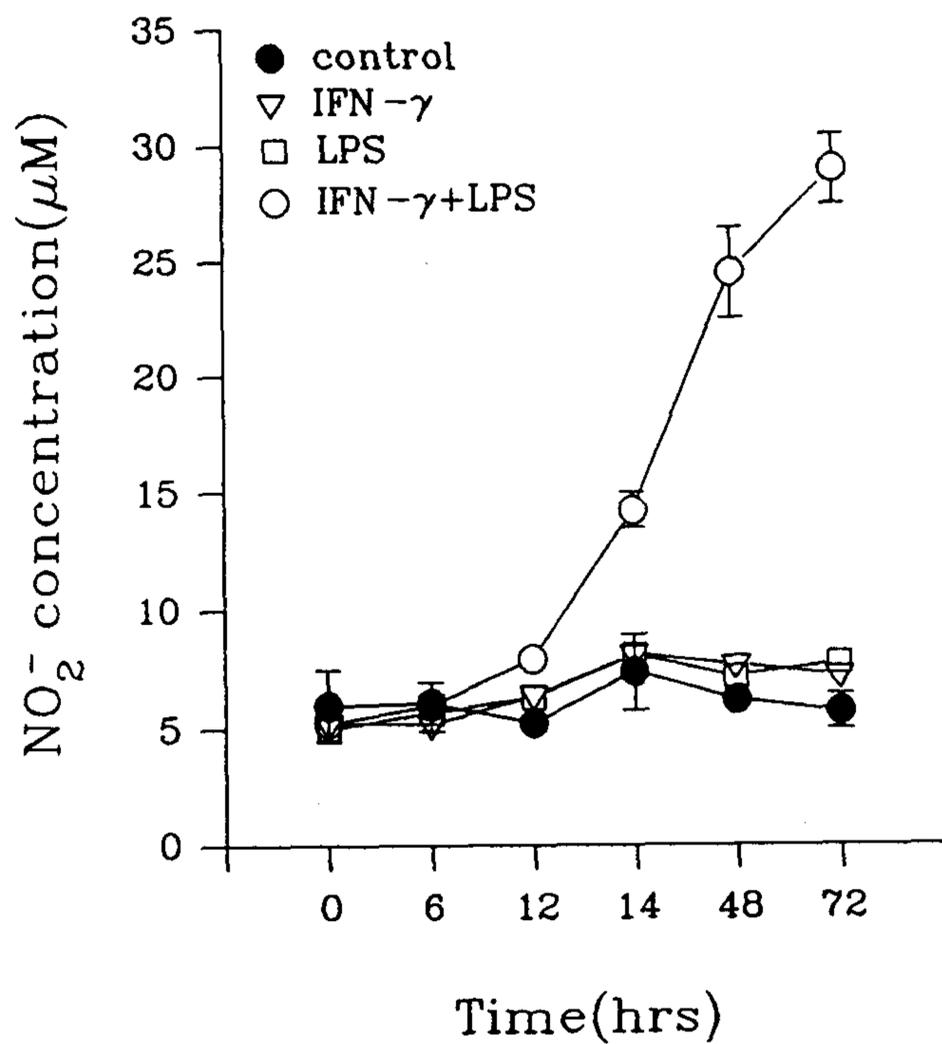


Fig.2. Kinetics of NO synthesis by IFN- γ and LPS in BNL CL.2 cells.

(A) BNL CL.2 cells were stimulated with IFN- γ and/or LPS for different time periods. NO₂⁻ concentration was determined as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicates.

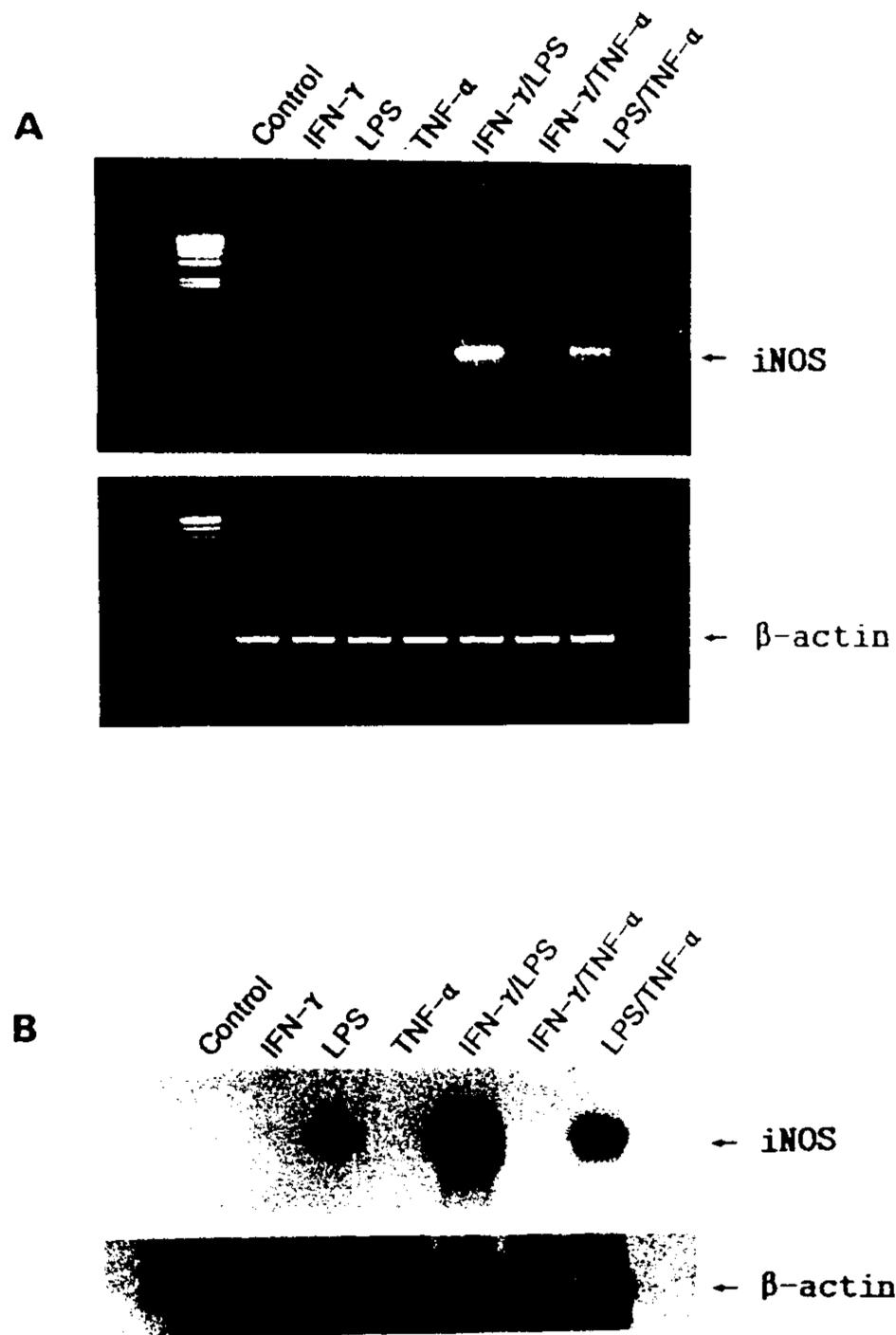


Fig.3. Effects of TNF- α and LPS on iNOS mRNA expression in BNL CL.2 cells.

BNL CL.2 cells were stimulated with various combinations of 10 U/ml INF- γ , 1 μ g/ml LPS, 100 U/ml mTNF- α for 6 hrs. RT-PCR was performed out using iNOS or β -actin primers. The PCR products were separated on an 1% agarose gel (A), transferred to the nylon membrane, and Southern hybridization (B) was performed using iNOS- or β -actin-specific labelled probe.

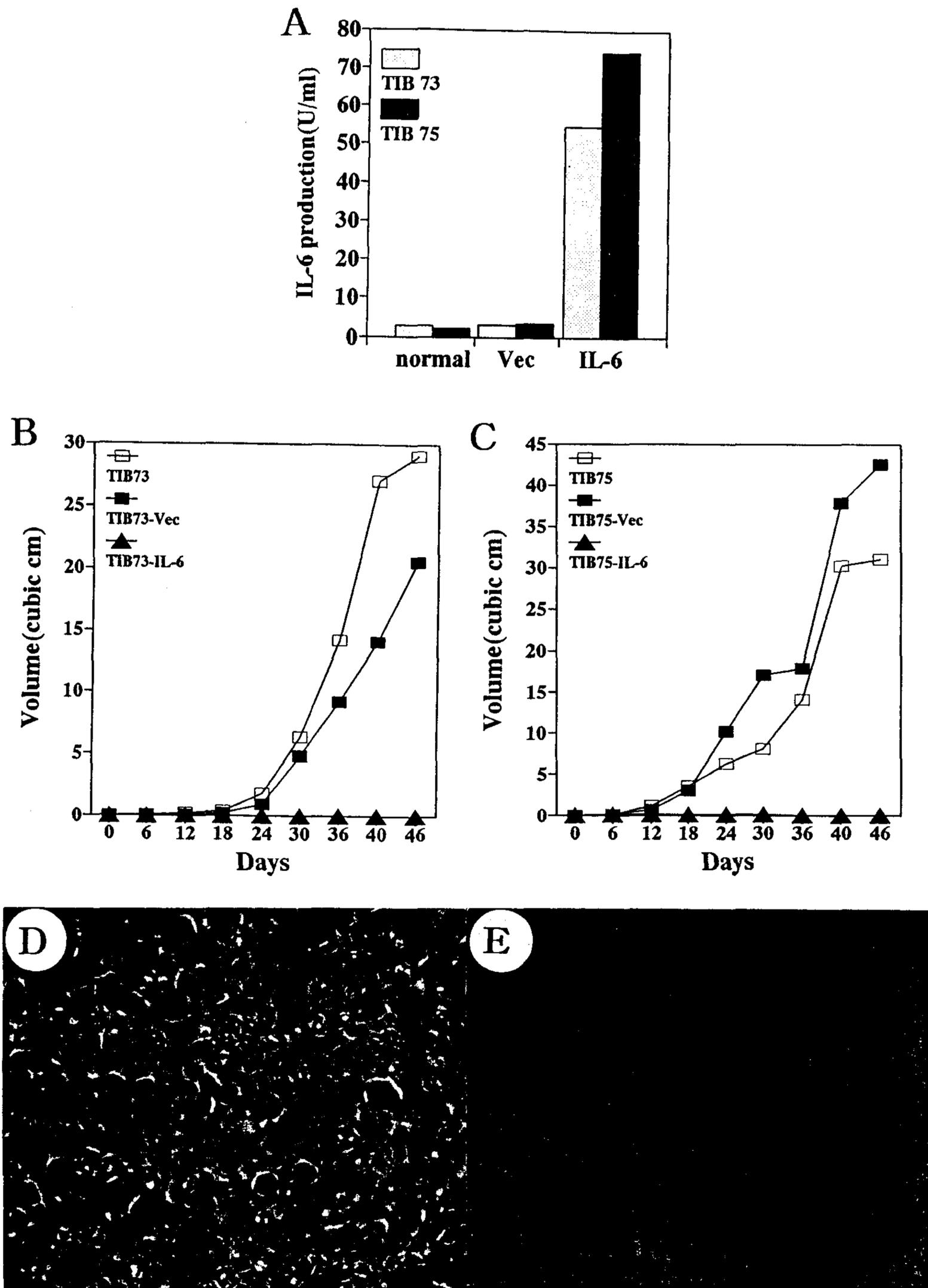


Fig.4. Anti-tumor effects of IL-6 on TIB cells. A. Constructed pNeoSRall containing IL-6 cDNA was transfected into TIB cells. After selecting with 0.75 mg/ml G418 for 14 days and single cell cloning, a stable tranfectant TIB was obtained. Expression of IL-6 was assayed by B9 bioassay. Five genic BALB/C mice were injected with 1×10^5 TIB 73 (B) or TIB 75 (C) cells. Palpable tumor growth was measured every day. Tumors growing subcutaneously were excised, fixed in formalin, stained with hematoxylin and eosin, and examined by light microscopy. (D) TIB vec tumor (x 400), (E). TIB-IL-6 tumor (x 400), necrotic and apoptotic cells were observed in tumor area.

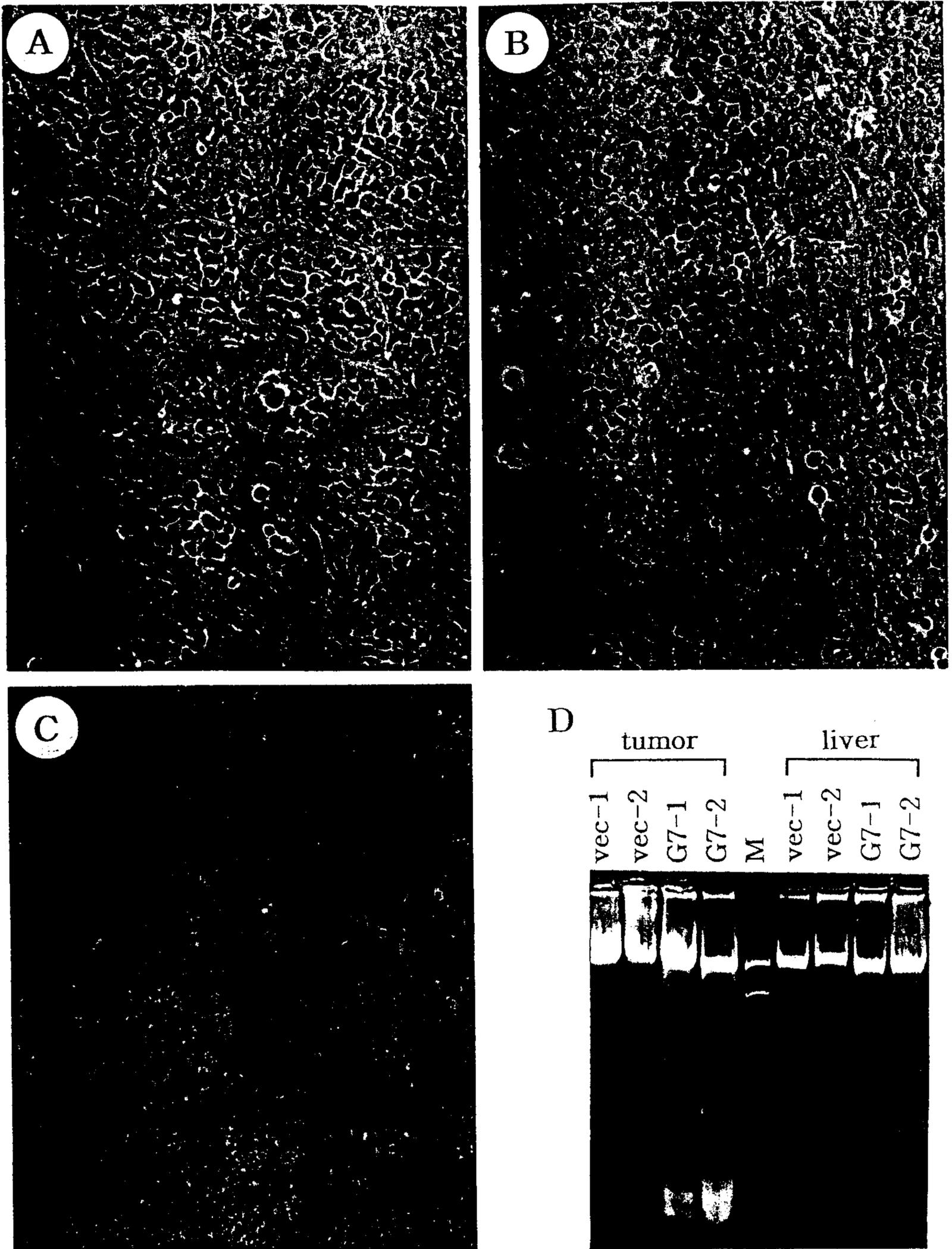


Fig. 5. Histological analysis of tumors Tumors growing subcutaneously were excised, fixed in formalin, stained with hematoxylin and eosin, and examined by light microscopy. A. B9.vec tumor (x 400), well-developed B cell lymphoma were observed. B. B9.G7 tumor (x 400), necrotic and apoptotic cells were observed in tumor area. C. B9.G7 tumor (x 100), Severe necrosis was observed and infiltrated cells appeared in the tumor area. D. DNA of tumor or liver from B9.vec and B9.G7-injected mice was isolated and separated on a 1.0% agarose gel electrophoresis. Ladders of fragmented DNA were observed in B9.G7 tumors (G7-1, G7-2).

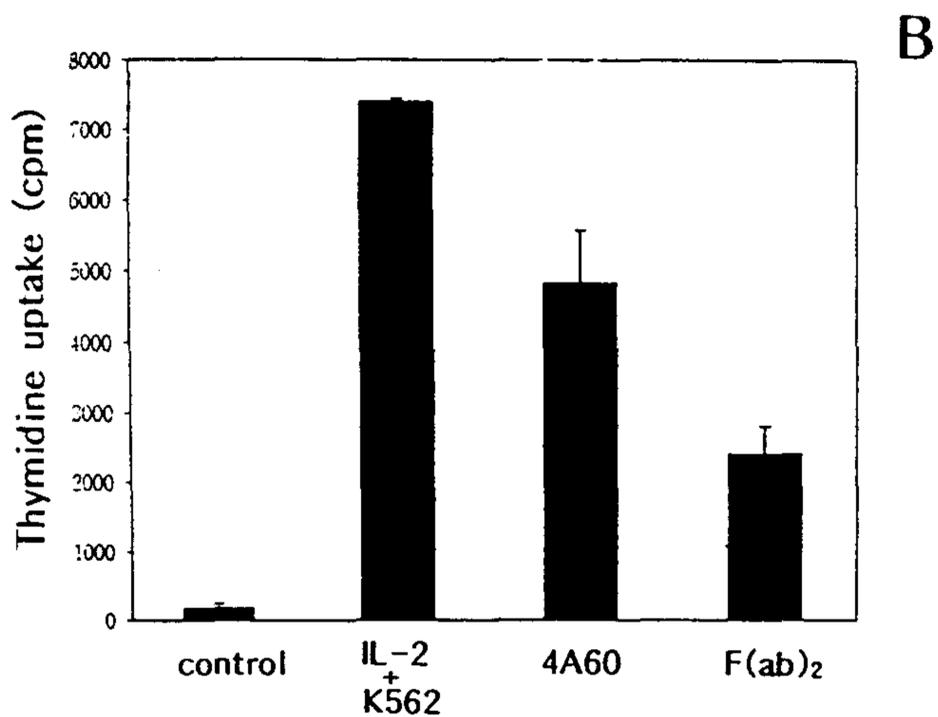
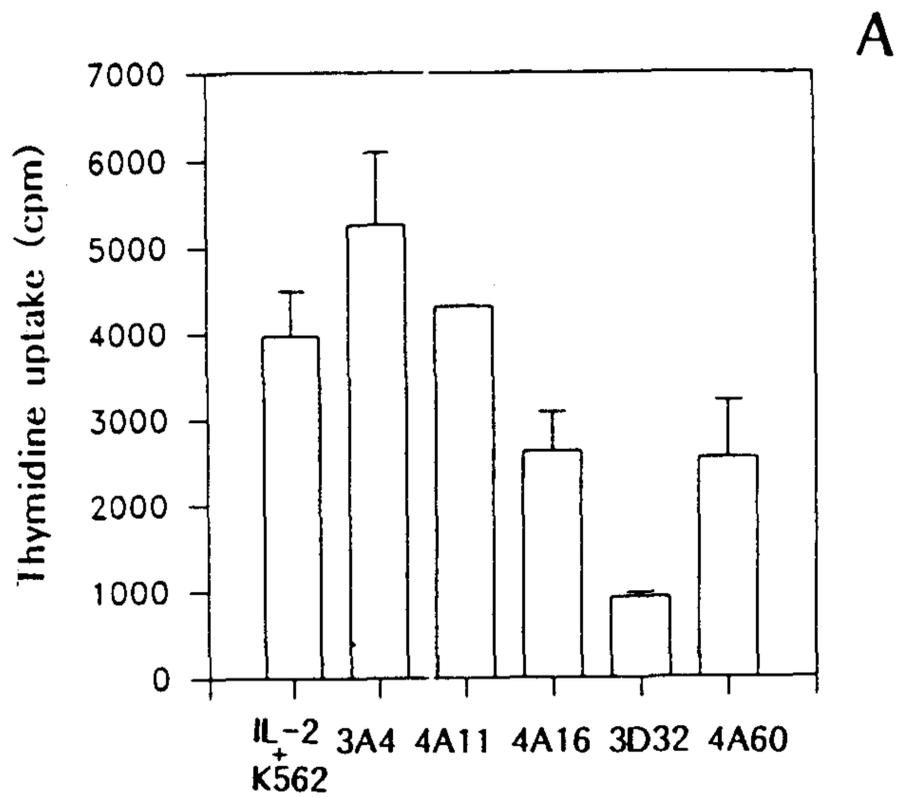


Fig. 6. Effect of mAb 4A60 on NK proliferation. NK cells (5×10^4 cells/well) were incubated with the mixture of 10 U/ml IL-2 and 10 μ g/ml K562 membrane for 5 days in the presence of hybridoma culture superatants (A, 20% (v/v)) or purified antibodies (B, 10 μ g/ml). After cells were pulsed with 0.5 μ ci/well of 3 H-thymidine for the last 16 hrs, they were harvested. Incorporated thymidine was measured with a liquid scintillation counter. Error bars represent the standard deviation of triplicate.

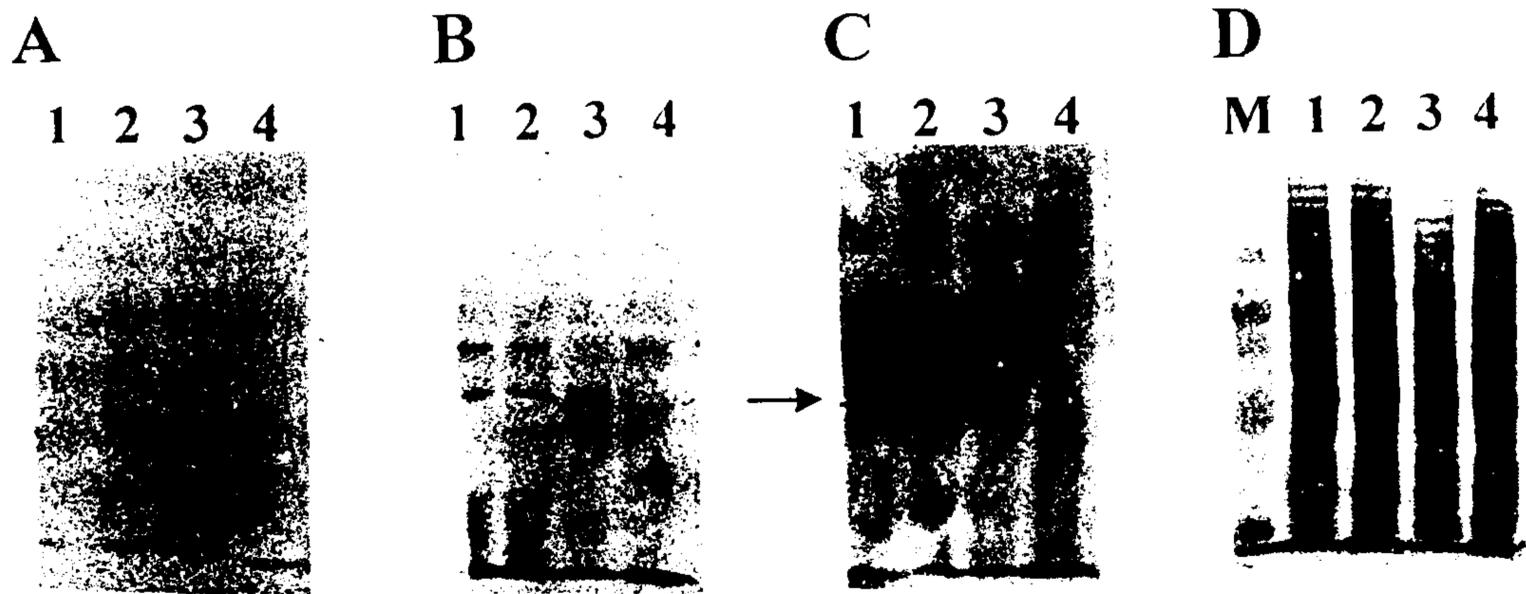


Fig.7. Recognition of 53 kD protein by mAb 4A60. Solubilized membrane fractions (10 μ g/lane) of various cells were loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. After blocking, the membrane was incubated with mAb 4A60 for 1 hr. The membrane was incubated with HRP-conjugated anti-mouse IgG and detected by an ECL kit as described in Materials and Methods. Arrow indicates 53 kD protein. A. normal IgG; B. 4A16; C. 4A60; D. Coomassie blue staining. 1. K562; 2. Daudi; 3. U937; 4. B9. M. molecular marker.

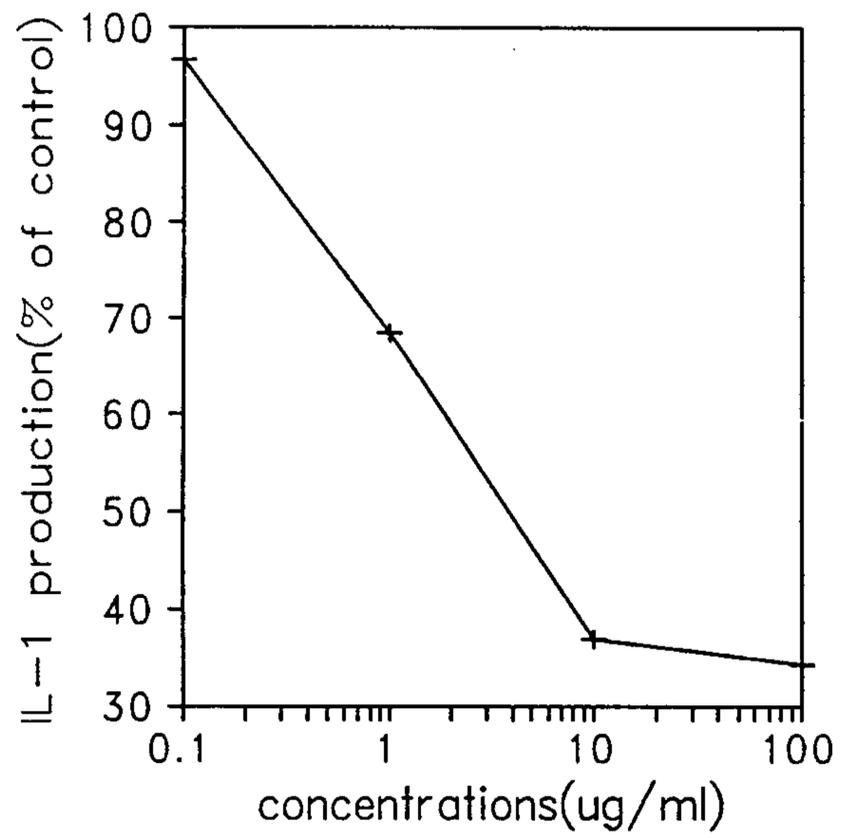


Fig. 8 Acanthoic acid에 의한 사람 단핵구/대식세포의 인터루킨-1 생산억제. 인터루킨-1 생산 억제 정도를 대조군 (100%)과 비교하여 나타냄.

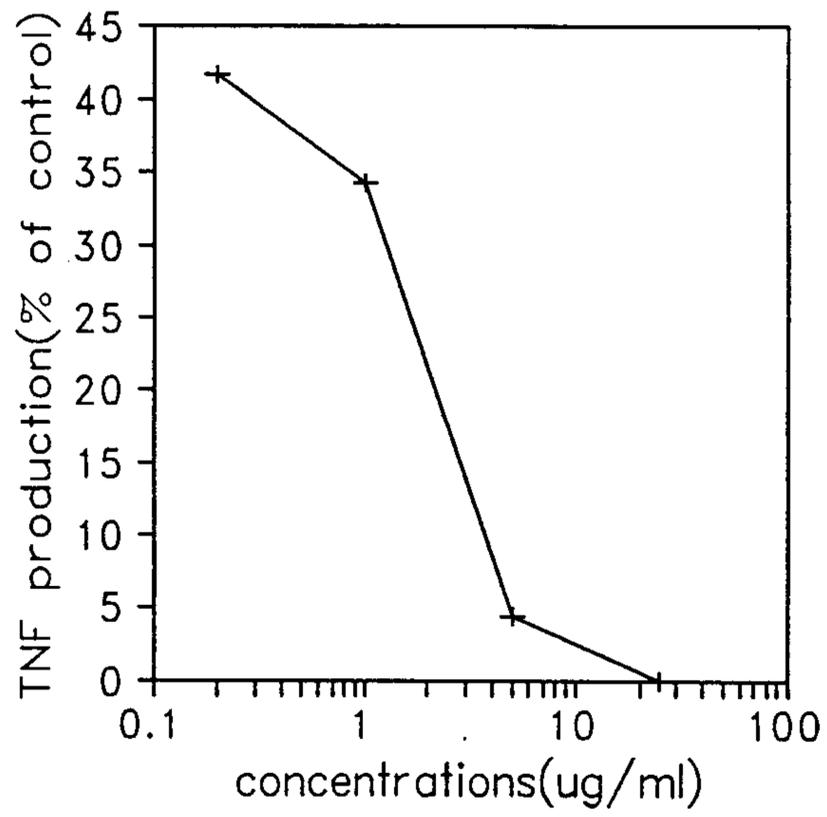


Fig. 9. Acanthoic acid에 의한 사람 단핵구/대식세포의 TNF- α 생산억제. TNF- α 생산억제 정도를 대조군 (100%)과 비교하여 나타냄.

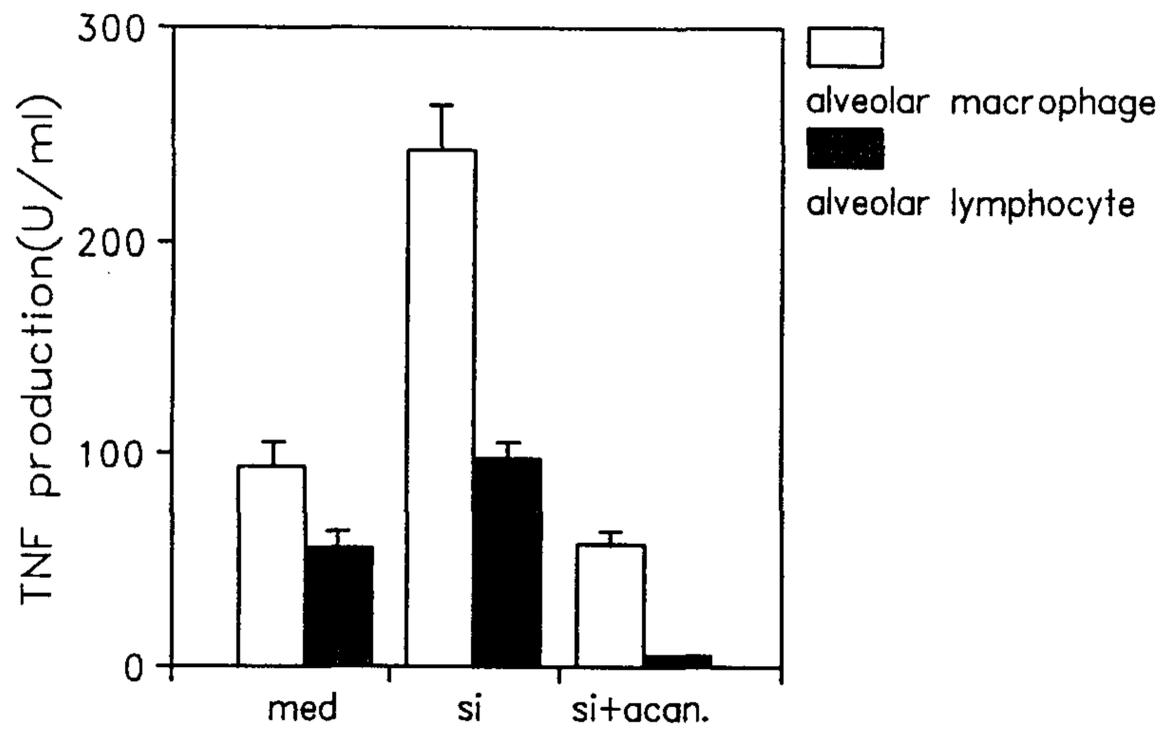


Fig. 10 Acanthoic acid에 의한 백서 폐 대식세포와 림프구의 TNF- α 생산억제. TNF- α 활성도 (U/ml)로 나타냄.

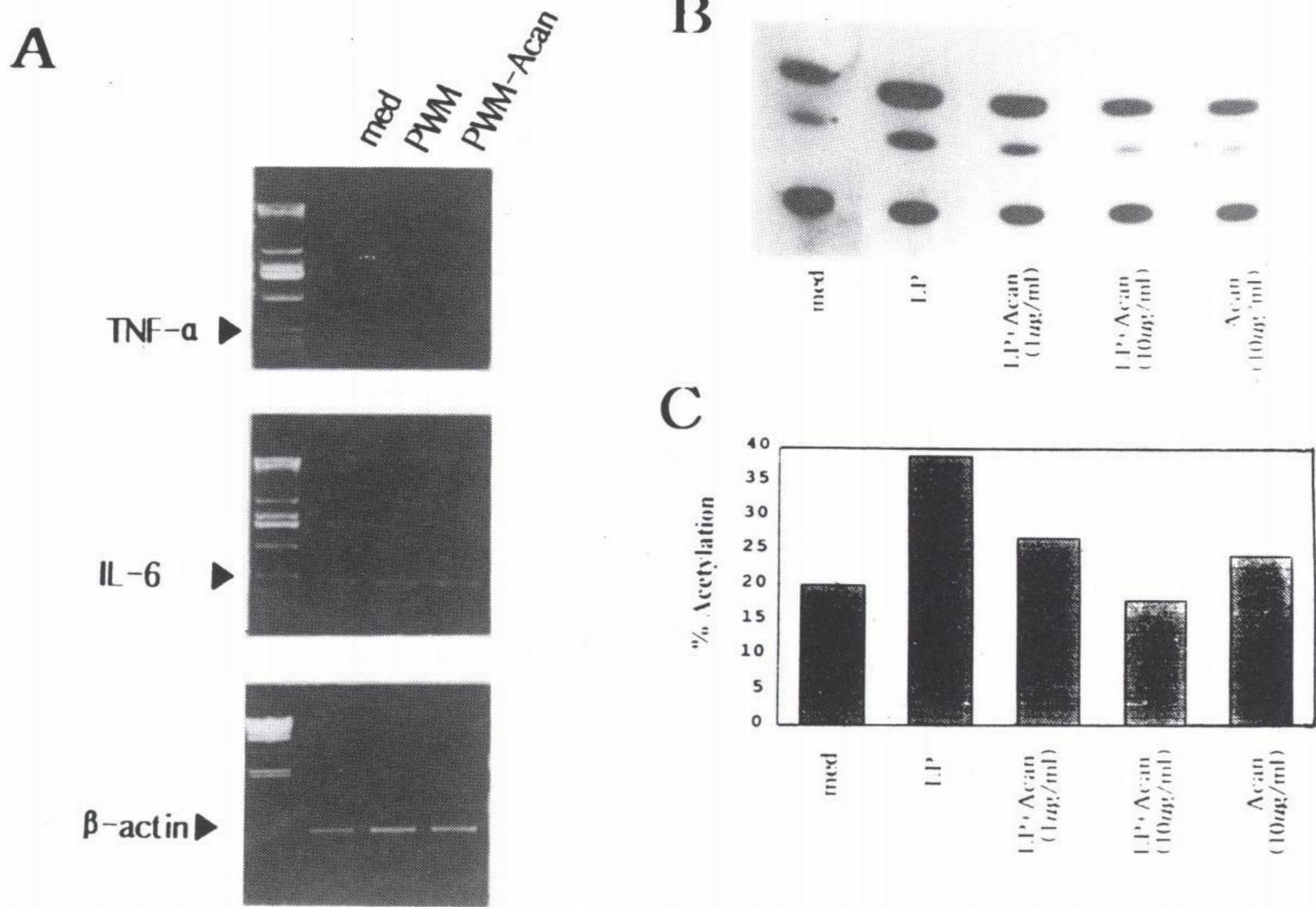


Fig. 11. Acanthoic acid inhibited TNF- gene expression. A. Human monocytes/macrophages (1×10^6 cells/well) were incubated with 10 ug/ml of acanthoic acid for 1 hr and stimulated with 100 ug/ml PWM. Then RT-PCR was performed using specific primers. B. HeLa cells (5×10^5 cells/sample) were transfected with 10 ug TNF- promoter-CAT reporter plasmid using calcium-phosphate method. After 16 hr incubation, cells were treated with 10 ug/ml LPS plus 100 ug/ml PMA for 48 hrs in the presence or absence of acanthoic acid. Then 10 mg of cell lysates were assayed for CAT activity. C. The CAT activity was calculated as follows: % Acetylation = (cpm in acetylated species/cpm in acetylated species + non-acetylated chloramphenicol) x 100.

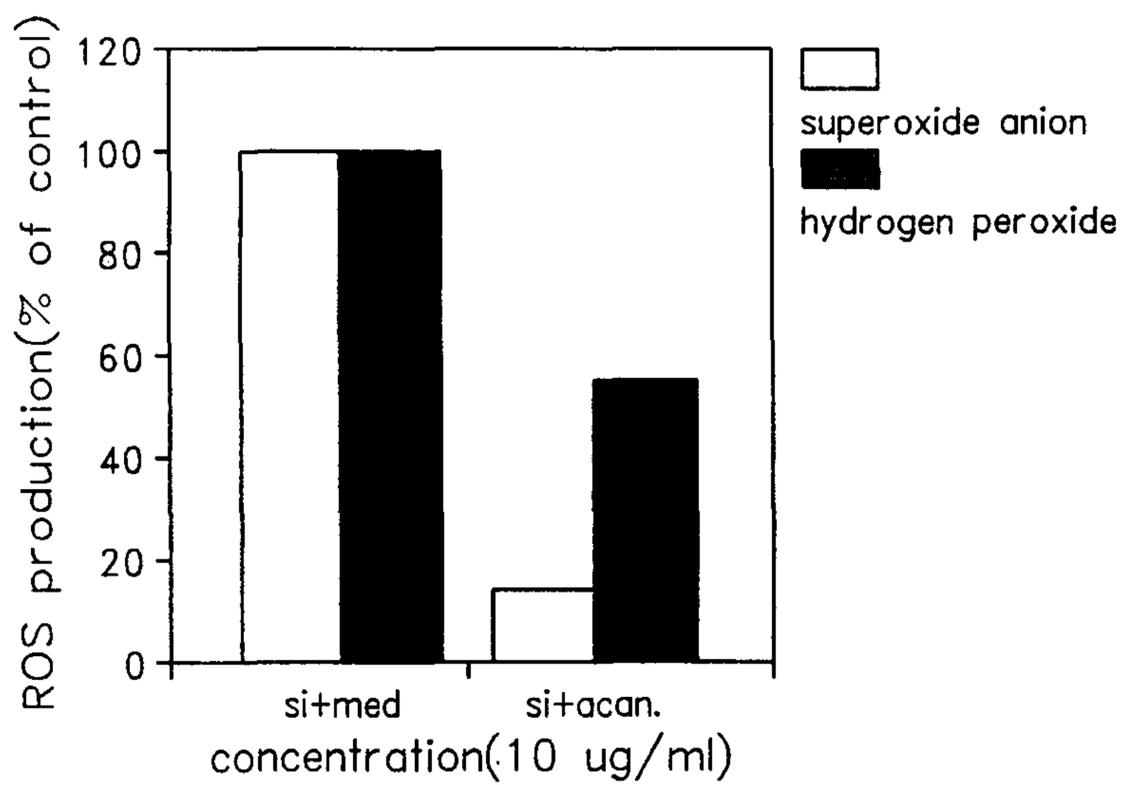


Fig. 12 Acanthoic acid에 의한 사람 단핵구/대식세포의 반응성 산소 생산억제. 사람 단핵구/대식세포를 Acanthoic acid로 1시간 처리후 다시 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ silica로 자극한 후 H_2O_2 와 O_2^- 양을 측정.

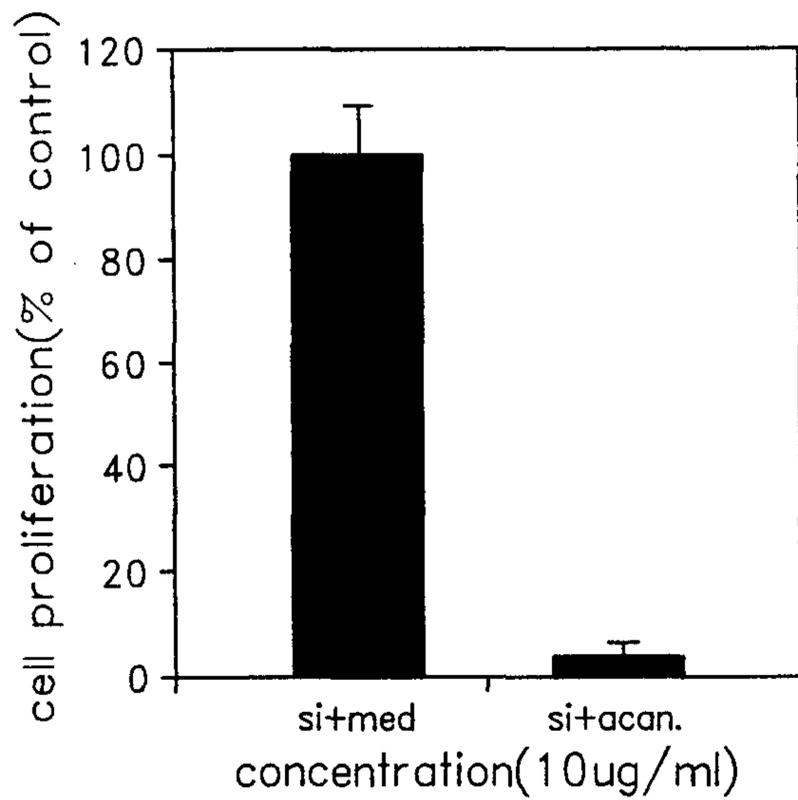


Fig. 13 Acanthoic acid에 의한 NIH3T3 섬유아세포의 증식 억제. $10\mu\text{g}/\text{ml}$ acanthoic acid를 처리한 사람 단핵구/대식세포의 배양 상청액을 NIH3T3 섬유아 세포에 넣어 5일간 배양하고 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ silica만 처리한 대조군 (100%)과 비교하여 나타냄.

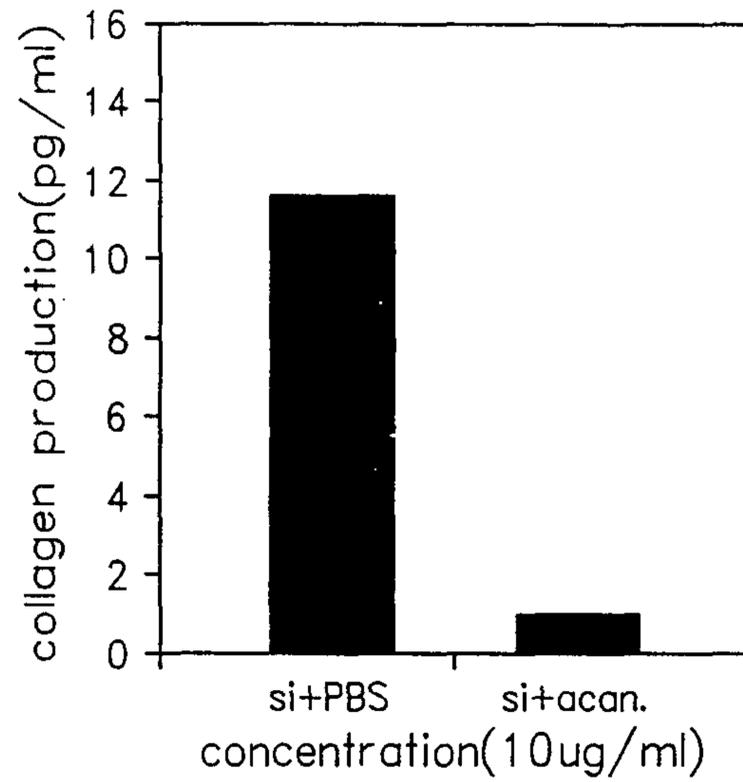


Fig. 14 Acanthoic acid에 의한 백서 폐 섬유아세포의 collagen 생산억제. 백서 폐 섬유아세포를 $10\mu\text{g/ml}$ acanthoic acid로 1시간 전처리한 후 다시 48시간 동안 $100\mu\text{g/ml}$ silica로 자극하여 배양액에서 collagen 합성을 ELISA로 측정함.

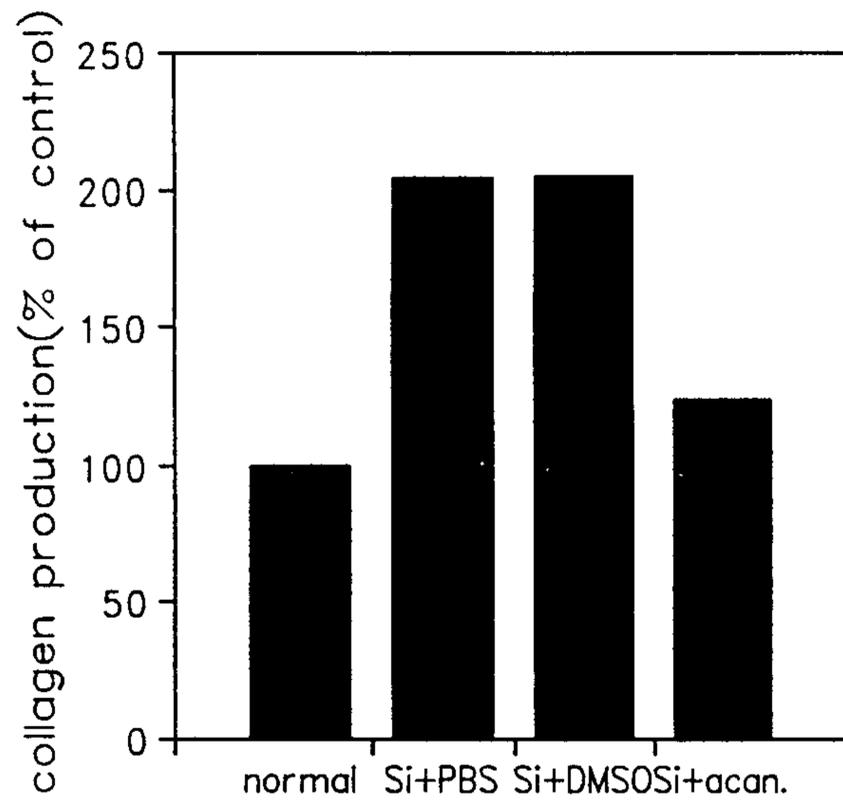


Fig. 15 Acanthoic acid에 의한 백서 폐조직에서의 collagen 생산억제. 백서를 Acanthoic acid로 처리한 후 폐조직에서 collagen 합성을 hydroxy proline량으로 측정함.

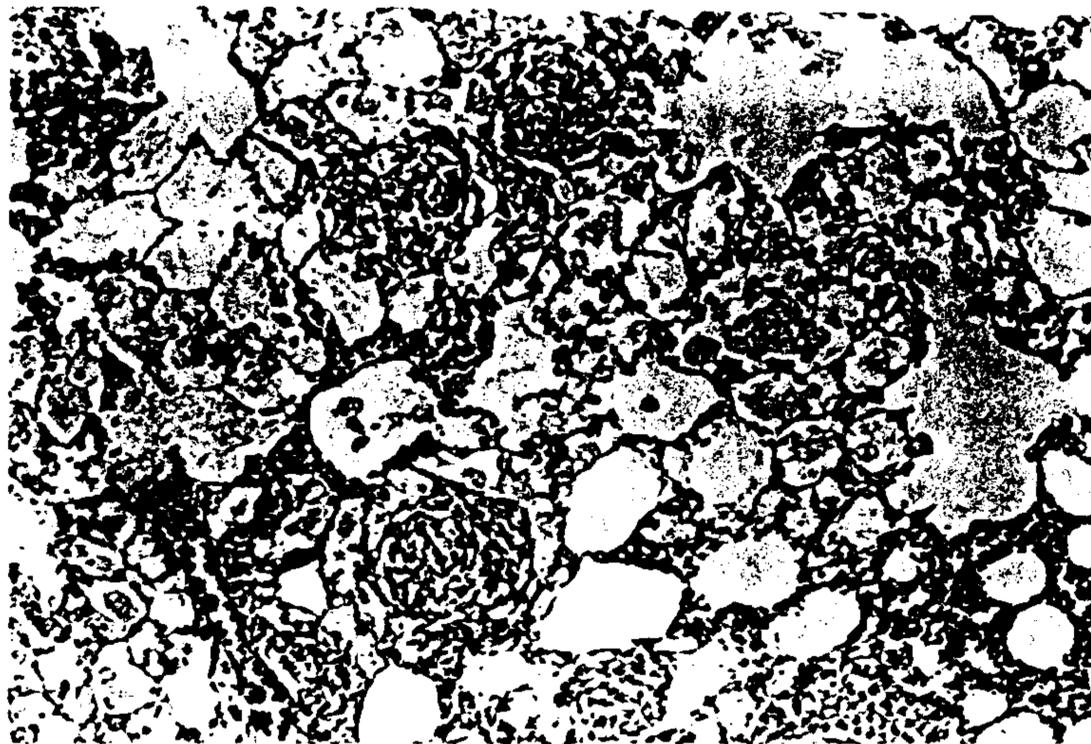


Fig. 16 Acanthoic acid에 의한 실험동물 규폐증의 억제. Silica로 유발시킨 백서 규폐증 모델의 폐조직 사진 (H & E staining). A, Silica and DMSO 처리군. 많은 커다란 융합된 육아종과 고도의 섬유화 현상 (x 40). B, Silica, DMSO, and acanthoic acid 처리군. 작은 크기의 융합되지 않은 육아종과 미약한 섬유화 현상 (x 100).

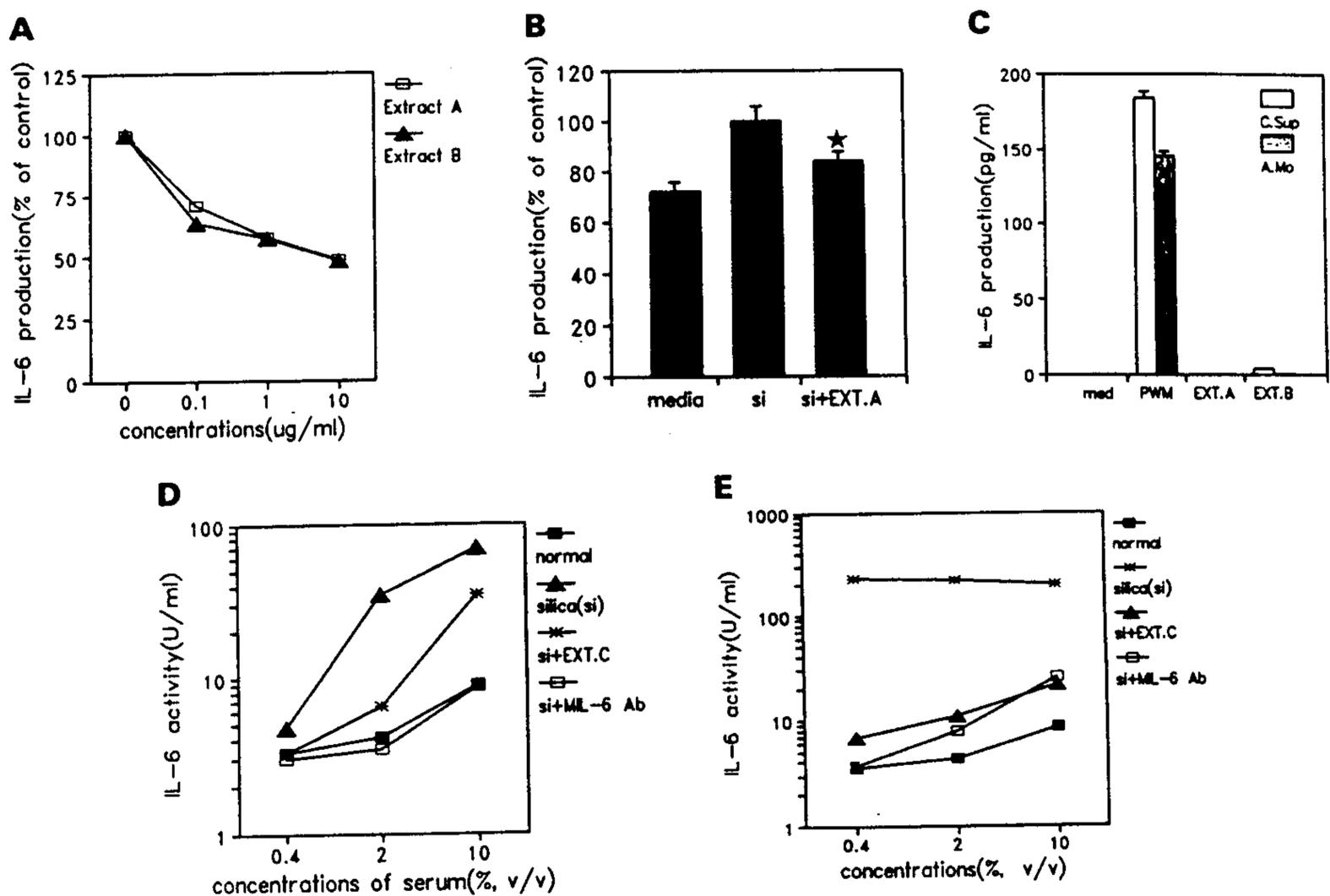


Fig.17. Inhibitory effects of extracts of *S. tetrandra* S. Moore on IL-6 production. A. Human monocytes/macrophages (1×10^6 /well) were incubated with various concentrations of *S. tetrandra* S. Moore for 1 hr and stimulated with 100ug/m silica. After 48 hr incubation, the culture supernatants were collected, centrifuged, dialyzed, and filtered to removed the extracts. IL-6 production was bioassayed as described in Materials and Methods (control, silica only; 32 U/ml IL-6). B. Rat alveolar macrophages (1×10^6 cells/well) were incubated with 10ug/ml *S. tetrandra* S. Moore for 1 hr, stimulated with silica, and assayed for IL-6 as described in Fig. 2-A (control, silica only; 28U/ml). Data show the mean \pm SD of three different determinants (, $p < 0.05$). C. The culture supernatants of human monocytes/macrophages (C. Sup) or of rat alveolar macrophages (A. Mo) treated with 10ug/ml PWM and 10ug/ml extracts were analysed for IL-6 concentration using IL-6 ELISA. D. The experimental silicosis was induced as described in Materials and Methods. Then, Extract C (40 mg/injection) was administered orally, or murine IL-6 polyclonal antibody (250ug/injection) was injected intravenously, into the silicosis rats twice per week for 17 weeks. IL-6 activities in the sera were determined as described in Materials and Methods. E. The culture supernatants of pulmonary fibroblasts isolated from silicosis rats (Fig. 2-D) were analysed for IL-6 activity.

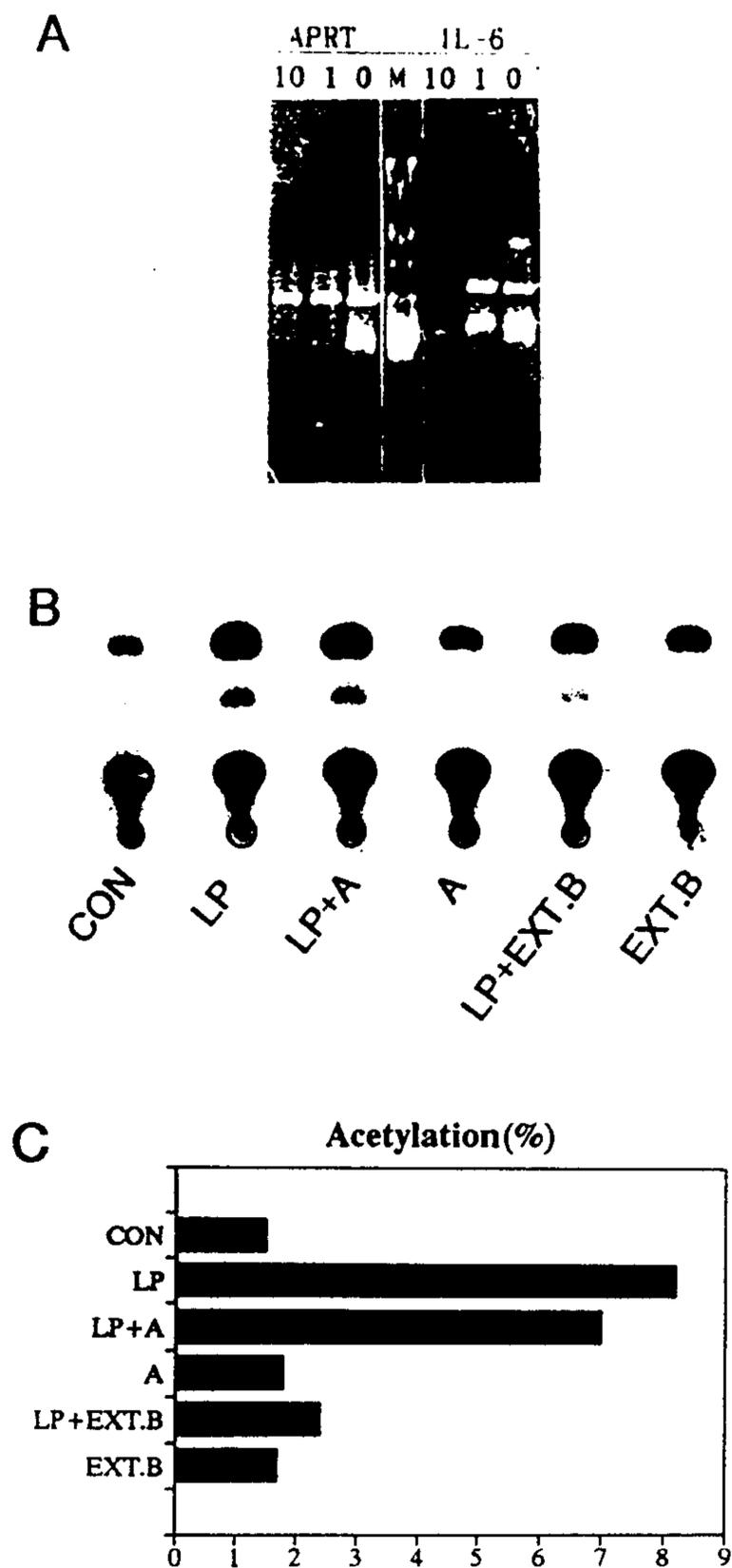


Fig. 18. Suppression of IL-6 gene expression by Extract B. (A) 1 μ g/m or 10 μ g/m of Extract B was added to the synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis (1.5×10^6 cells/well) and was incubated at 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ for 1 hr and treated with 100 μ g/m silica for 12 hrs. RNA were prepared, and IL-6 or APRT gene expression was measured by RT-PCR using specific primers as described in Materials and Methods. (B) 8 μ g of IL-6-CAT construct was transfected into HeLa cells by the calcium phosphate-DNA coprecipitation method. The cells were incubated in DMEM containing 1% FBS for 18 hrs. Cells were then treated with 10 μ g/m LPS plus 100ng/m PMA (LP), 10 μ g/m EXT.B, or 10 μ g/ml acanthoic acid (A) for 18 hrs. The CAT expression was measured as described in Materials and Methods. (C) The CAT activity was calculated as follows : percent acetylated = (cpm in acetylated species)/(cpm in acetylated species + cpm in nonacetylated chloramphenicol).

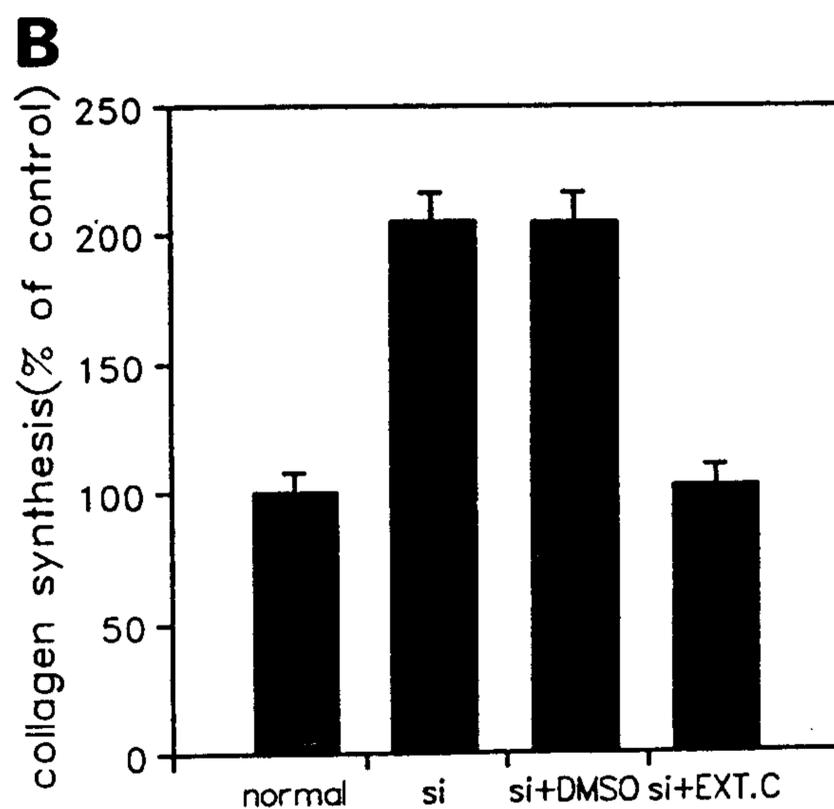
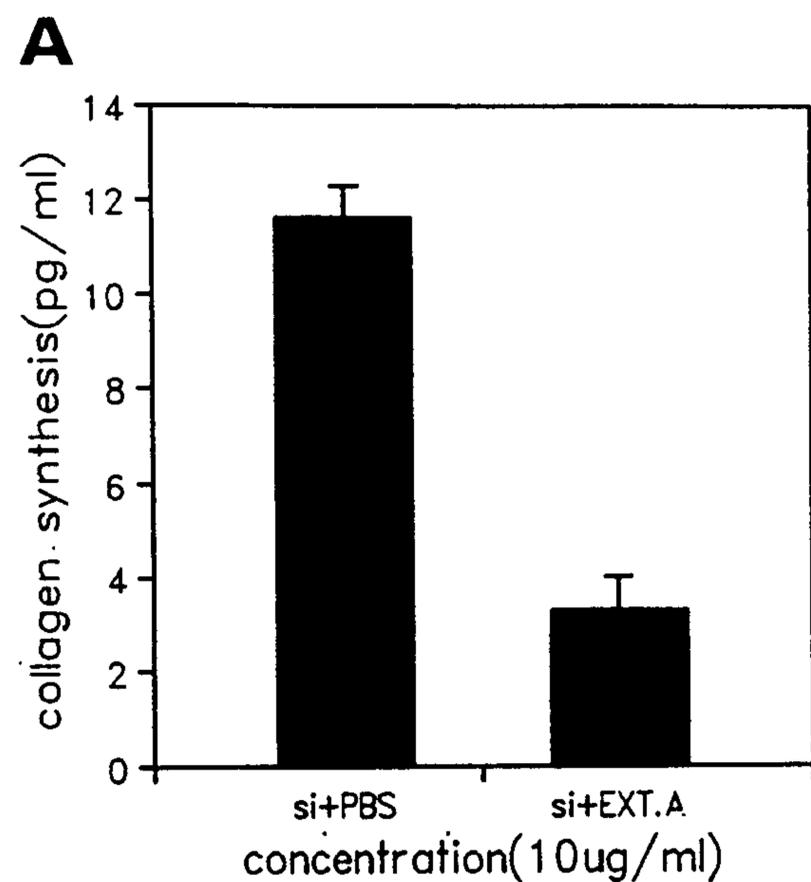


Fig. 19. Inhibition of collagen synthesis by extracts of *S. tetrandra* S. Moore. (A) Primary rat lung fibroblasts (5×10^6 cells/well) were preincubated with 10 μ g/ml Extract A for 1 hr and stimulated with 100 μ g/ml silica. After 48 hr incubation, the culture supernatants were assayed for collagen production by ELISA using anti-collagen type I antibody. (B) The experimental silicosis was induced as described in Materials and Methods. Then, Extract C (40 mg/injection) was orally injected into the silicosis rat twice per week for 17 weeks. The lung tissue (0.1 g) was hydrolyzed and assayed for collagen content by measuring hydroxy proline. Data represent the percentages of control (normal lung).

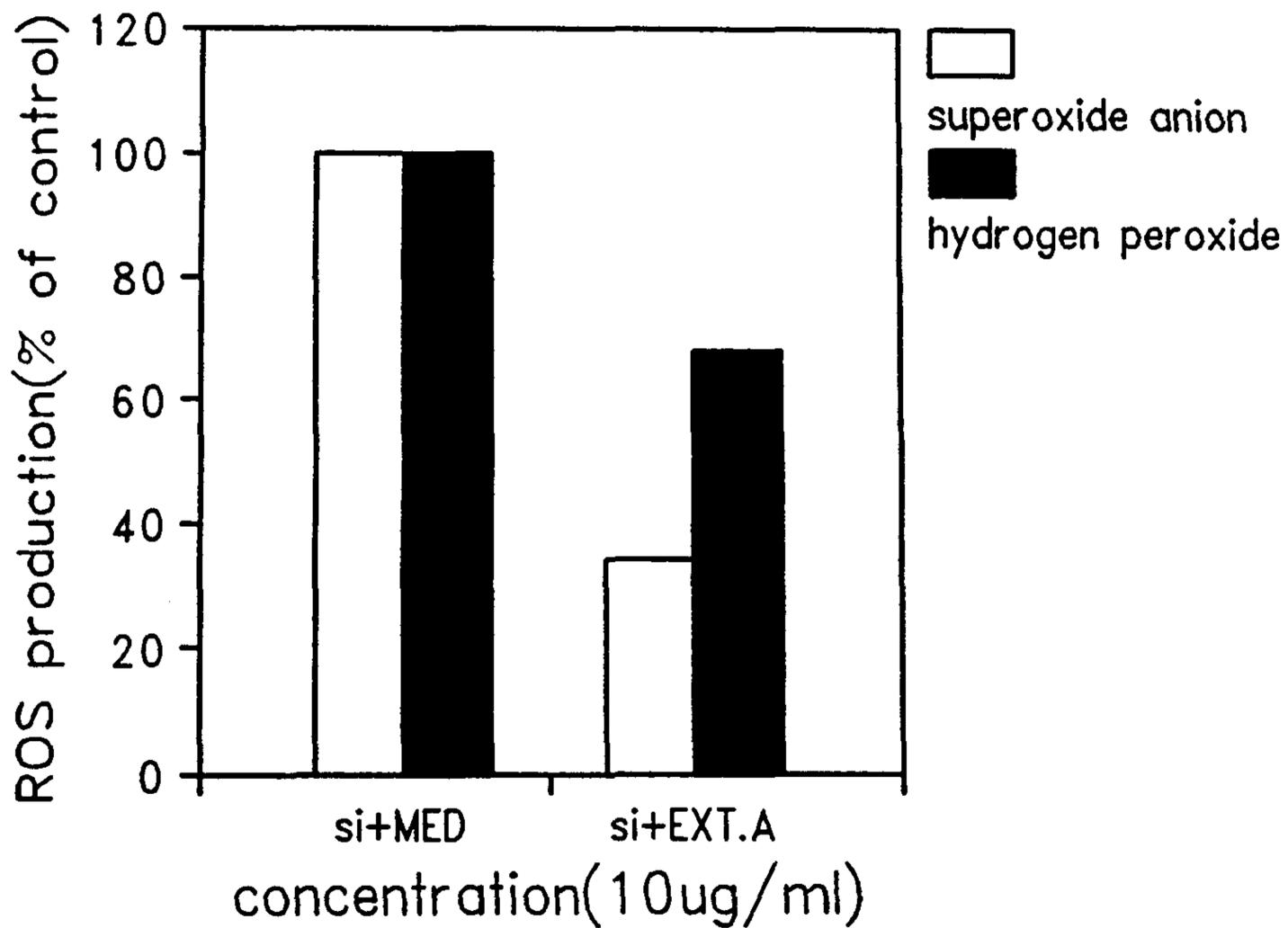


Fig. 20. Inhibition of production of reactive oxygens species by extract of *S. tetrandra* S. Moore. For hydrogen peroxide analysis, human monocytes/macrophages (5×10^5 cells/ml) pretreated with 10ug/ml Extract A for 1 hr were stimulated with 100ug/ml silica for 1 hr in the presence of horseradish peroxidase and phenol red. For superoxide anion analysis, human monocytes/macrophages (1×10^6 cells/800ul) pretreated with 10ug/ml Extract A were stimulated with 0.1uM PMA for 20 min in the presence of cytochrome C.

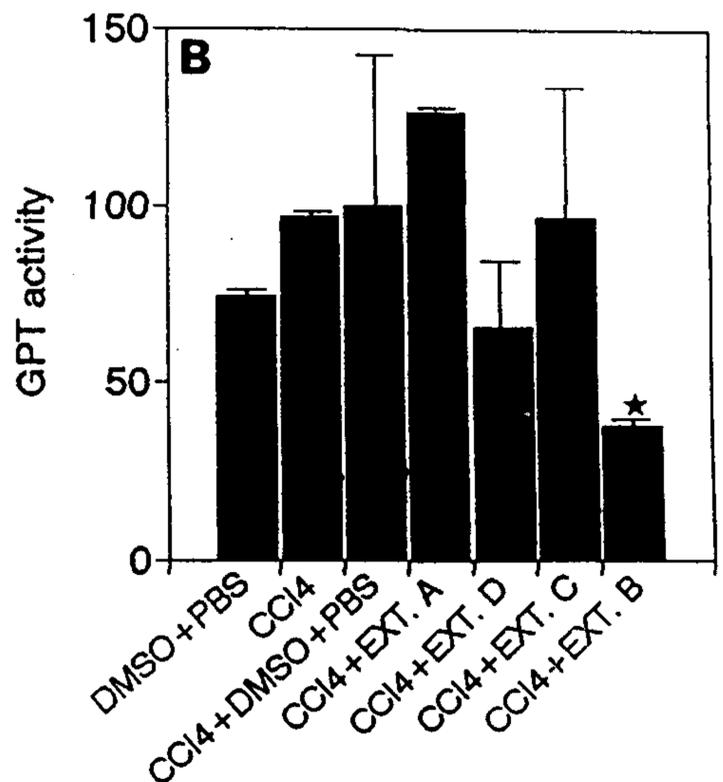
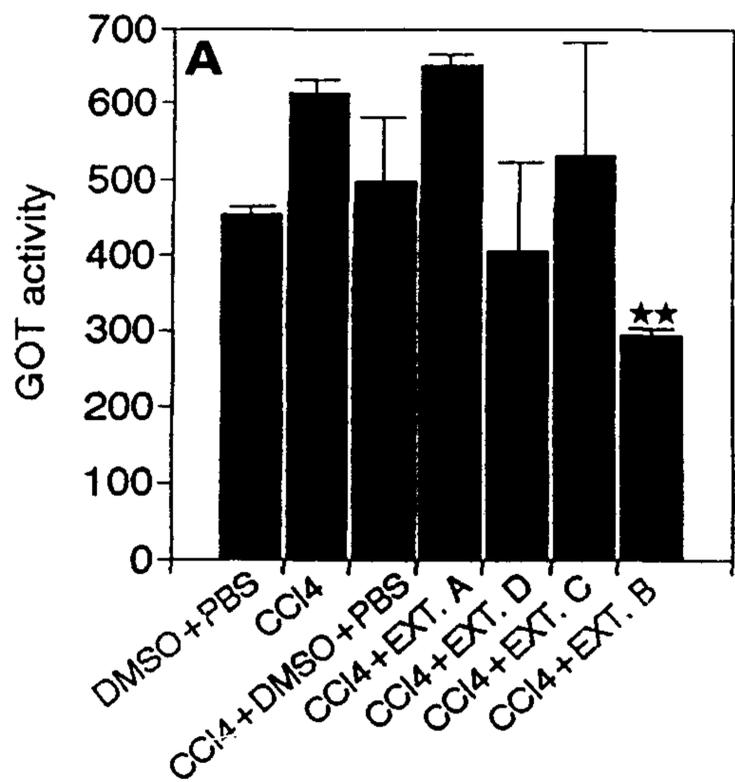


Fig. 21. Effects of Extracts of *S. tetrandra* S.Moore on serum GOT and GPT of cirrhotic rats. The experimental cirrhosis was induced by CCl₄ as described in Materials and Methods. Then, 40mg each of Extract A, B, C, D was orally injected into the cirrhotic rats for 13 weeks. The sera were obtained and analyzed for GOT and GPT (- , p<0.01; * , p<0.05).

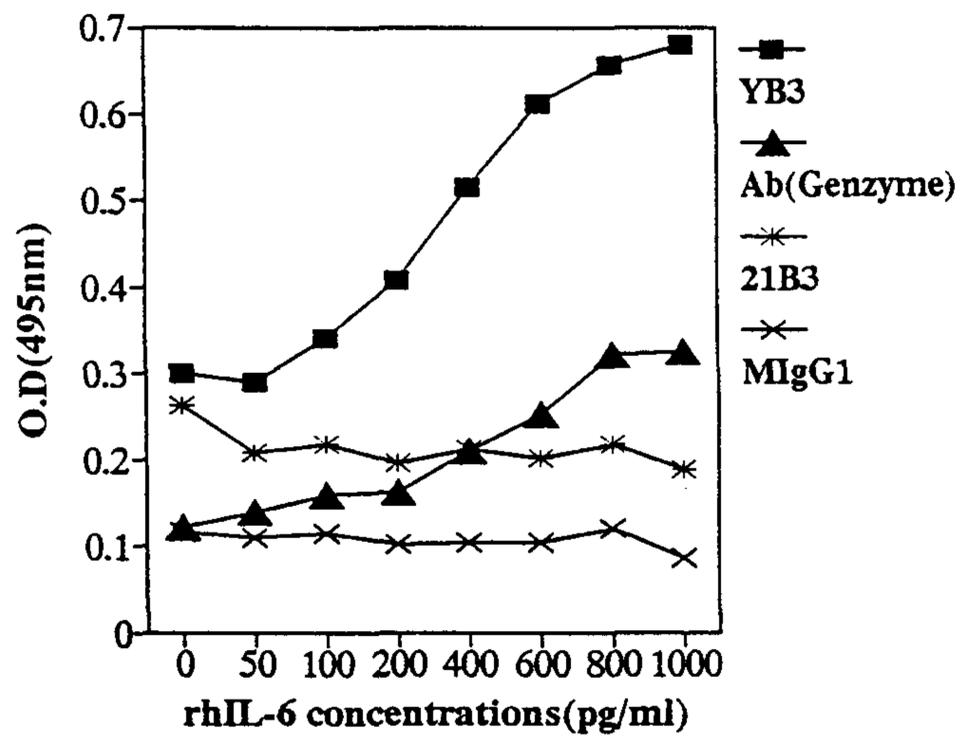


Fig. 22 항인터루킨-6 단일클론 항체를 이용한 대장균 생산 인체 인터루킨-6의 엘라이자.

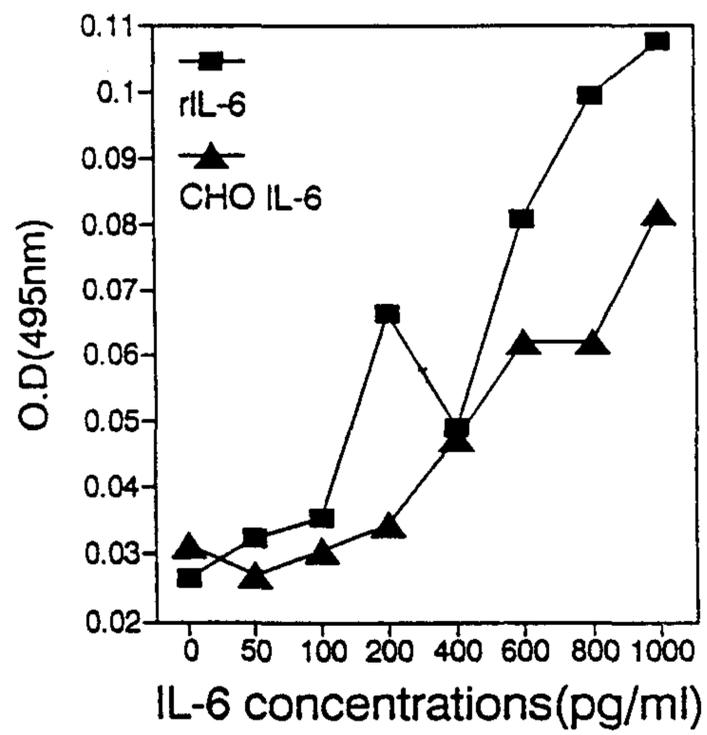


Fig. 23 항인체인터루킨-6 항체를 이용한 대장균 및 CHO 세포 생산 인체 인터루킨-6의 엘라이자.

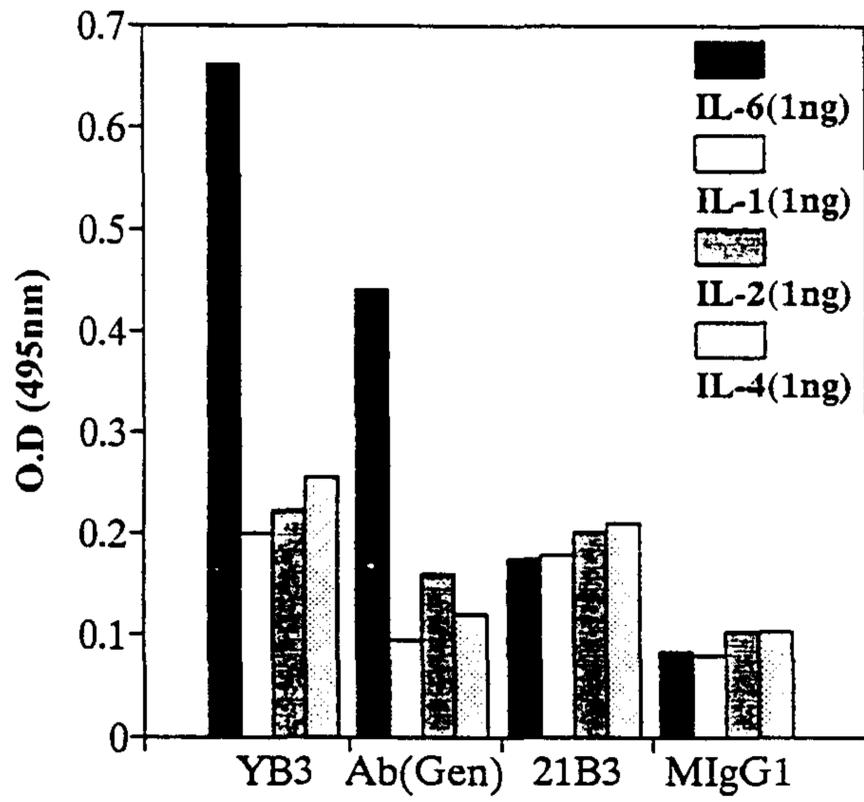


Fig. 24 항인터루킨-6 단일클론 항체의 다른 싸이토카인에 대한 특이성 검정 엘라이자.

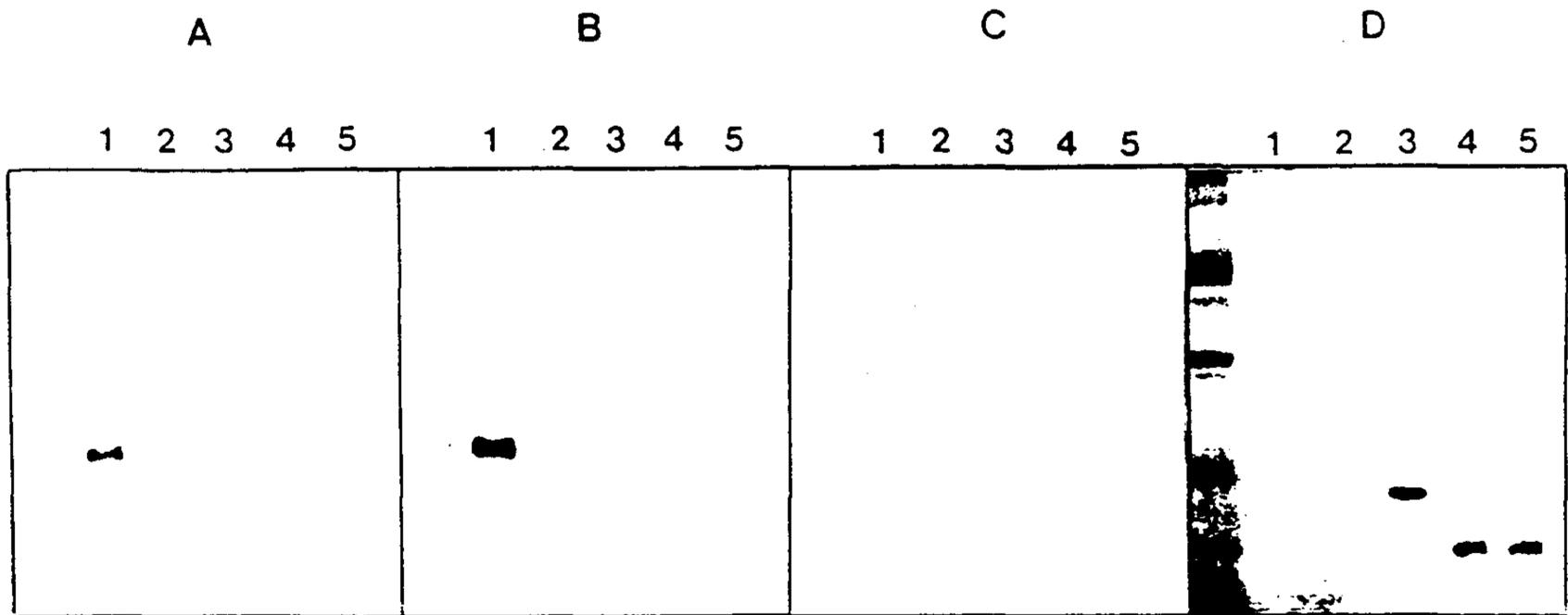


Fig. 25 항인체인터루킨-6 항체의 다른 유사 싸이토카인에 대한 특이성 검정 웨스턴 블랏. A, 항인터루킨-6 단일클론 항체 (Genzyme, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); B, 항인터루킨-6 단일클론 항체 (YB3, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); C, 정상 생쥐 IgG(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$); D, Silver 염색; (lane1, 대장균 생산 인터루킨-6; lane2, CHO 생산 인터루킨-6; lane3, 인터루킨-1; lane4, 인터루킨-2; lane5, 인터루킨-4).

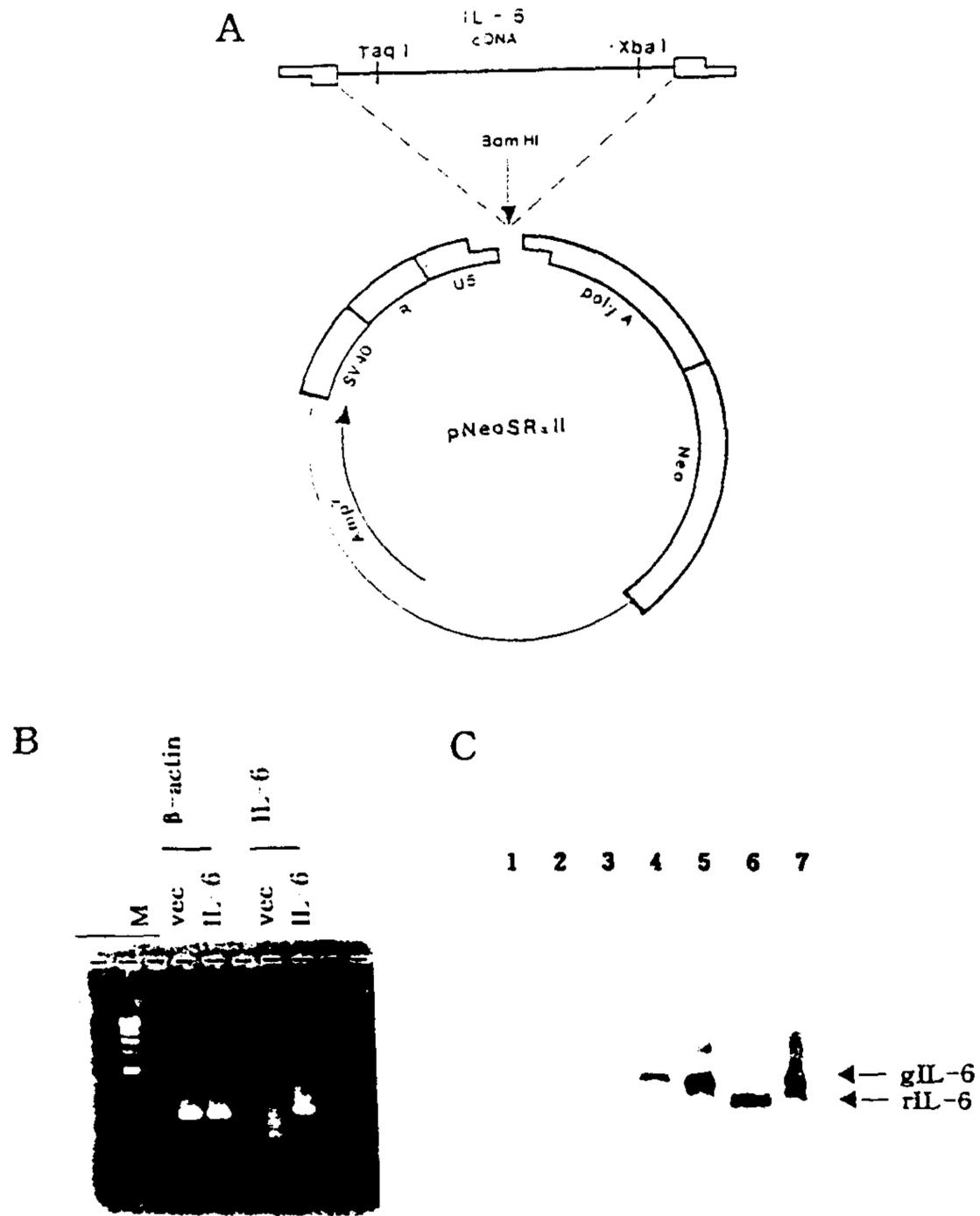


Fig. 26 B9-G7 세포주로부터 인체 인터루킨-6 생산.

A. 인터루킨-6 발현 벡터, B. B9-G7 세포주(IL-6)로부터 인터루킨-6의 RT-PCR, C. B9-G7 세포주 배양액의 인터루킨-6 웨스턴 블랏(lane 1, RPMI + 10 % FBS; lane 2, 벡터만의 배양액; lane 3, 10 μ l B9-G7 배양액; lane 4, 20 μ l; lane 5, 40 μ l; lane 6, 제조합 인터루킨-6; lane 7, 100 μ l B9-G7 배양액).

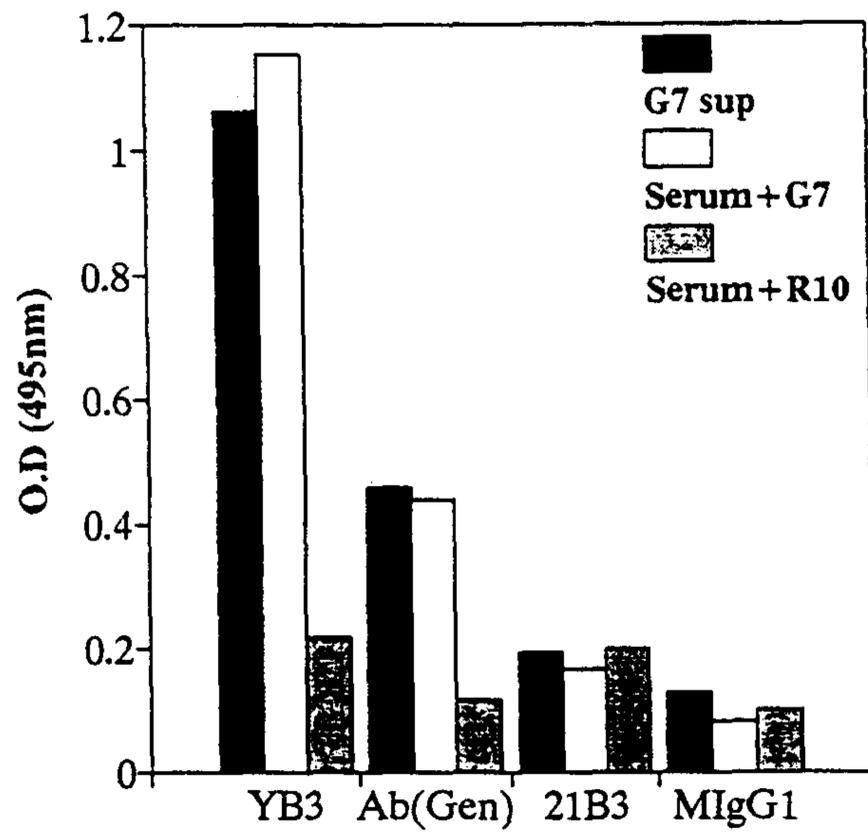


Fig. 27 항인터루킨-6 항체를 이용한 세포배양액으로 부터 인체 인터루킨-6의 검정. G7 sup; B9-G7 배양액; serum + G7, serum과 B9-G7 배양액의 1:1 혼합물; serum + R10; serum과 RPMI 1640 배지 + 10% FBS의 1:1 혼합물