KISEP Original Articles
臨床耳鼻：第10卷 第2號 1999
J Clinical Otolaryngol 1999;10:202-210

Mitogen 및 *Mycoplasma* 항원 자극시 사람 비강 섬유아세포에서 Nitric Oxide와 Interleukin-1의 생성에 미치는 효과

고신대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 미생물학교실[2]
이한국[1] · 김광혁[2] · 유태현[1] · 이강대[1] · 이봉희[1] · 이윤우[1] · 장명웅[2]

Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1 Produced by Human Nasal Fibroblast Stimulated by Mitogens and Mycoplasma Antigens

Han Kook Lee, MD[1], Kwang Hyuk Kim, PhD[2], Tai Hyun Yu, MD[1], Kang Dae Lee, MD[1], Bong Hee Lee, MD[1], Woon-Woo Lee, MD[1] and Myung Woong Chang, PhD[2]

[1]Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, [2]Microbiology, College of Medicine, Kosin University, Pusan, Korea

－ ABSTRACT －

Backround and Objectives：Excessive cytokine expression and nitric oxide (NO) induced by stimuli such as microbial products may be one aspect of the inflammatory response associated with bacteremia. We evaluated effects of mitogens and *Mycoplasma* antigens on the biological activity of human nasal fibroblast. **Materials and Methods**：We have undertaken a study of the kinetics of NO and interleukin-1 (IL-1) production in human nasal fibroblast culture exposed with lipopolysaccharide (LPS) of gram negative bacteria, Staphylococcus enterotoxin B (SEB), or *Mycoplasma* lysates. This study was designed to evaluate NO and IL-1 in the fibroblast culture supernatant by assays of nitrite ion concentration and mouse thymocyte cultivation. **Results**：1) The NO production was increased by 0.01 μg/ml of LPS, all doses of SEB (0.001 -1.0 μg/ml), or all kinds of *Mycoplasma* lysates (*M. pneumoniae, M. fermentans, M. hominis*), but decreased by 0.001, 0.1, and 1.0 μg/ml of LPS. 2) The IL-1 production was significantly increased by all doses of LPS (0.001 -1.0 μg/ml), SEB (0.001 -1.0 μg/ml), or *Mycoplasma* lysates. 3) In the culture supernatants of the fibroblast exposed to double stimuli, LPS plus SEB, LPS plus *Mycoplasma* lysates, the NO concentrations were higher than in those exposed to LPS alone. 4) The fibroblast responded differently to double exposure with stimuli in the production of IL-1. The IL-1 concentration increased or decreased according to doses and kinds of stimuli as compared with those exposed to LPS alone. Especially, the group exposured with LPS (0.01 μg/ml) plus *Mycoplasma* lysates showed highly significant increase of IL-1 as compared with the group exposed to LPS (0.01 μg/ml) alone. **Conclusion**：It is therefore believed that NO and IL-1 production in human nasal fibroblast incresed mostly by not only LPS, but also SEB. Moreover, its increase by *Mycoplasma* lysates was remarkable. Excessive NO and IL-1 production elicited by double exposure with stimuli *in vivo* may effect on the inflammatory reactions and cytokines production. **(J Clinical Otolaryngol 1999;10:202-210)**

KEY WORDS：Human fibroblast culture · Lipopolysaccharide · *Staphylococcus* enterotoxin B · *Mycoplasma* lysates · Nitric oxide · Interleukin-1.

논문접수일 : 1999년 3월 10일
심사완료일 : 1999년 4월 30일
교신저자 : 이한국, 602 - 702 부산광역시 서구 암남동 34 고신대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (051) 240 - 6277 · 전송 : (051) 245 - 8539
E - mail : hklee@ns.kosinmed.or.kr

서 론

Nitric oxide(NO)는 사이토카인이나 미생물의 영향을 받아 대식세포, 호중구, 혈관내피세포, 활막표층세포, 활막섬유아세포, 연골세포 등에서 생성된다. 생성된 NO는 생체내에서 혈관이완물질, 신경전달물질, 면역기능조절물질로서 작용할 뿐만 아니라 면역염증반응을 통해 항미생물작용과 항암작용을 일으키는 것으로 알려져 있다.[1)2)] 이러한 독작용은 미토콘드리아 기능 억제, FeS 함유 효소기능저하, DNA 손상 등의 작용에 의해서 나타나기 때문에 과량의 NO 생성시 정상조직에 손상을 주게 된다. 또한 패혈증 환자에서 저혈압과 쇽을 일으키는 주요인자로 생각되고 있다.[3)]

Interleukin - 1(IL - 1)은 세균, 내독소(lipopolysaccaride, LPS), muramylpeptide, phobolester, 보체결합면역복합체, 보체성분(C3a,C5a), IFN, TNF, colony stimulating factor(CSF), transforming growth factor - β(TGF - β), 바이러스 등의 자극으로 단구, 대식세포 혹은 이들과 비슷한 기능을 가진 유사세포(Langerhans′ cell, microglial cell) 등에서 생성된다. IL - 1은 주로 T세포활성 부수자극인자로 관여하며 TCR을 통한 특이자극과 IL - 1R를 통한 보조자극으로 T 림프구에서 IL - 2, IL - 3 등의 다양한 사이토카인을 유도된다. B전구세포의 성숙과 항원자극을 받은 B세포증식을 유도하며 세포독성 T세포와 NK세포의 세포독성을 항진시킨다. 이외에도 면역, 염증, 조혈, 내분비, 뇌신경, homeostasis 등 생체반응에 중요한 역할을 맡고 있다. 급성염증반응시에는 IL - 1을 포함하는 다량의 사이토카인이 방출되어 전신적인 반응이 일어나지만 때론 국소적이면서 지속적으로 IL - 1이 생성되어 혈류학적 쇽(hemodynamic shock), 치명적인 폐혈증, 관절염, 사구체신염, 확장성심근증, 등의 만성염증성질환을 유도한다.[4 - 6)]

본 실험에서는 정상인의 비강내 하비갑개로부터 분리한 섬유아세포를 초대배양(primary culture)하였다. 이들 섬유아세포에 그람음성균의 세포벽성분인 LPS, 그람 양성균인 황색포도상구균의 *Staphylococcus* enterotoxin B(SEB), 그리고 *Mycoplasma* 항원과 같은 독소에 단독 혹은 중복으로 노출시켰을 때 나타나는 염증관련 물질로서의 NO 및 IL - 1의 생성능을 보고자 하였으며 사람 비강내에서 이러한 균에 감염시 나타날 수 있는 염증반응 양상의 정도를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

섬유아세포의 배양

정상인의 하비갑개로 부터 무균 나이프를 이용하여 조직절편 2 5 mm^3를 생검하여 1 mm^3 크기로 절편하였다. 조직을 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)이 10% 포함된 Eagle′s minimum essential medium(EM - EM, Gibco, Grand Island, USA) 2 ml을 60 mm 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, USA)에 적하하였다. 절편한 조직을 미리 준비한 배양용 접시에 정치하고 멸균된 cover slip으로 고정한 뒤 37℃, 5% CO_2 배양기에 넣었다. 3 4일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 약 3주 후에 배지를 흡입하여 버리고 배양용 접시 전체에 단층으로 형성된 섬유아세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 1회 세척한 후 0.25% trypsin 0.3 ml을 첨가한 후 배양기에서 5분 동안 방치하였다. 박리된 세포들은 10% FCS EMEM으로 재부유시켜 NO와 IL - 1 생성 세포로 사용하였다.

Mycoplsma 항원, LPS 및 SEB 의 준비

Deep freezer에 보관중인 *Mycoplasma* 균주들 중 *M. pneumoniae*(Mp), *M. fermentans*(Mf), *M. hominis*(Mh)를 각각 Chanock 증균배지 5 ml에 접종하여 5 7일간 배양하였다. 배양된 균액을 증균용배지 100 ml, 1000 ml, 4000 ml 순으로 증균시켜 이를 20,000 g에서 1시간 원침하였다. 상층액을 제거한 후 균체들 만을 다시 PBS로 3회 씻은 다음 20 ml의 PBS로 부유시켰다. 균부유액을 100 watt에서 10분간 sonication한 후 단백질농도를 측정하였다. LPS와 SEB는 Sigma사(Sigma, St. Louis, USA)에서 구입하였다.

섬유아세포 배양상층액의 준비

부유시킨 섬유아세포(2.5×10^5/ml) 1 ml씩을 24 wells 배양용 plate(Corning, NY, USA)에 분주한 후 단

독노출의 경우에는 ml당 LPS 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 μg, SEB 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 μg, *Mycoplasma* 항원(Mp, Mf, Mh) 1 μg을 각각 작용시켰다. 중복노출의 경우에는 먼저 LPS 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 μg을 노출시킨 후에 SEB 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 μg을 각각 추가 작용시키거나 LPS 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 μg을 작용시킨 후에 *Mycoplasma* 항원(Mp, Mf, Mh) 1 μg을 각각을 추가 노출시켰다. 이들을 37℃, 5% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하여 배양상층액을 수거하였다. 용량별 시험 well은 triplicate로 시행하였다. 수거된 배양상층액은 300 g에서 30분간 원침시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70℃에 보관하면서 NO 및 IL-1 생성 효과 측정에 사용하였다.

NO 정량분석

NO는 공기중에서 수 초내에 nitrite로 산화되기 때문에 실제로는 nitrite의 농도를 측정하였다. Nitrite의 측정은 Ding 등[7]의 microplate 검사법에 준하여 시행하였다. 단독 혹은 중복으로 노출시켜 준비한 배양상층액 0.1 ml 씩을 96 wells microplate(Corning, NY, U.S.A.)로 옮긴 다음 Griess 시약[1% sulfanilamide(Sigma, St. Louis, USA)/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride(Sigma, St. Louis, USA)/2.5% phosphoric acid(Junsei, Osaka, Japan)] 0.1 ml 씩을 작용시킨 후 실온에서 10분 동안 방치하였다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite(Hayashi, Tokyo, Japan)로 작성하였다.

IL-1의 측정

IL-1 활성측정은 다음과 같이 측정하였다.[8-11] 마우스로부터 가슴샘을 절제하여 만든 가슴샘 세포 부유액(1×10^7 cells/ml) 0.1 ml 씩을 96 wells microplate에 분주하고 concanavalin A액(4 μg/ml) 50 μl와 시료 50 μl 씩을 중첩 분주하였다. 각 plate는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양결과의 판독은 각 well에 tetrazolium salt MTT 액[3-(4,5-dimethylthiazol-2ys)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 5 mg/ml in PBS] 10 μl 씩을 가하여 4시간 30분 동안 추가 배양한 다음 다시 각 well에 sodium dodecyl sulfate(10% w/v SDS in 0.02M HCl)액 25 μl 씩을 작용시킨 후 실온 암실 조건에서 하루 방치하였다. Optical density는 microplate reader(Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, U.S.A.)를 이용하여 540nm에서 측정하였다. 표준곡선은 standard interleukin-1β(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)로 작성하였다.

통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 평균±표준편차로 나타냈으며 각 군간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하였고 p값이 0.05 이하일 때 의의있는 차이로 간주하였다.

결 과

초대배양한 섬유아세포에 LPS, SEB, 혹은 *Mycoplasma* 항원을 단독노출시키거나, LPS 자극과 함께 SEB 혹은 *Mycoplasma* 항원을 중복노출 시켰을 때 세포로부터 유출되어 나타나는 NO와 IL-1을 정량 분석하였다.

LPS, SEB, *Mycoplasma* 항원에 단독노출시 NO 생성능

섬유아세포에 LPS를 용량 별로 작용시켜 얻은 배양상층액의 NO 농도는 Table 1과 같다. LPS 용량이 0.001 1.0 μg/ml일때 대조군에 비하여 유의성있는 증감은 나타나지 않았다. SEB를 0.001 1.0 μg/ml 농

Table 1. NO release in cultures of human nasal fibroblast with LPS

	Nitrite conc. (μM/L)
LPS(g/ml)	
0.001	6.87±0.20
0.01	7.15±0.19
0.1	6.64±0.26
1.0	6.01±0.39
Control	7.06±0.19

Human nasal fibroblasts were cultivated with LPS for 24 hrs. Nitrite was measured in the culture supernatant. Datas are mean±SDM

도로 작용시켰을 때 LPS 단독작용과는 다르게 모든 용량에서 증가하였으며 1.0 μg/ml에서 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$, Table 2). *Mycoplasma* 항원을 작용시켰을 때 LPS와 SEB 보다 큰 폭으로 증가를 하였다. Mp와 Mh는 유의성있게 증가하였다($p<0.05$, Table 3).

LPS, SEB, *Mycoplasma* 항원에 단독노출시 IL-1 생성능

섬유아세포에 LPS를 0.001 1.0 μg/ml 농도로 작용시켜 얻은 배양상층액의 IL - 1농도는 Table 4에 나타난 바와 같다. NO 생성과는 다르게 모든 용량에서 대조군에 비교해서 매우 유의성 있게 상승하였으며 특히 LPS 1.0 μg/ml에서는 4배 정도 촉진되었다($p<0.01$). SEB를 처리했을 때도 유의성있게 상승하였으며, 그 효과는 농도에 비례하였다($p<0.01$, Table 5). 세포에 *Mycoplasma* 항원을 1 μg/ml 농도로 작용시켰을때 IL - 1 생성은 현저하게 증가하였다($p<0.01$). 그 효과는 Mf(대조군의 7배), Mh(대조군의 3배), Mp(대조군의 1.7배)의 순으로 나타났다(Table 6).

LPS, SEB, *Mycoplasma* 항원에 중복노출시 NO 생성능

0.001 μg/ml의 LPS를 작용시킨 후 SEB를 0.001 1.0 μg/ml 농도로 추가 작용시켰을 때, LPS만을 작용시켰을 때와 비교해서 SEB 0.01 μg/ml과 0.1 μg/ml에서 NO 생성이 유의하게 증가되었다($p<0.05$). 0.01 μg/ml의 LPS를 작용시킨 후 SEB를 0.001 1.0 μg/ml 농도로 작용시켰을 때, LPS 0.01 μg/ml로 단독작용 시킨 군과 비교해서 모든 용량의 SEB군에서 미소한 증가를 보였으며 SEB 0.01 μg/ml에서 유의한 증가를

Table 2. NO release in cultures of human nasal fibroblast with SEB

	Nitrite conc. (M/L)
SEB(μg/ml)	
0.001	7.42±0.19
0.01	7.10±0.52
0.1	7.24±0.32
1.0	7.87±0.20*
Control	7.06±0.19

Human nasal fibroblasts were cultivated with SEB for 24 hrs. Nitrite was measured in the culture supernatant. Datas are mean±SDM, *p<0.05 versus the control

Table 3. NO release in cultures of human nasal fibroblast with *Mycoplasma* lysates

	Nitrite conc.(M/L)
Lysates (1μg/ml)	
M. pneumoniae	8.86±0.43*
M. fermentans	7.55±0.13
M. hominis	8.69±0.33*
Control	7.06±0.19

Human nasal fibroblasts were cultivated with Mycoplasma lysates for 24 hrs. Nitrite was measured in the culture supernatant. Datas are mean±SDM. *p<0.05 versus the control

Table 4. IL-1 levels in cultures of human nasal fibroblast with LPS

	IL-1 conc.(units/ml)
LPS (μg/ml)	
0.001	65.81±2.38*
0.01	71.81±1.55*
0.1	84.55±1.18*
1.0	128.40±5.61*
Control	33.71±1.91

Human nasal fibroblasts were cultivated with LPS for 24 hrs. IL-1 was measured in the culture supernatant. Datas are mean±SDM. *p<0.01 versus the control

Table 5. IL-1 levels in cultures of human nasal fibroblast with SEB

	IL-1 conc.(units/ml)
SEB (μg/ml)	
0.001	52.16±2.67*
0.01	58.04±1.92**
0.1	69.35±2.62**
1.0	86.42±7.64**
Control	33.71±1.91

Human nasal fibroblasts were cultivated with SEB for 24 hrs. IL-1 was measured in the culture supernatant. Datas are mean±SDM. *p<0.05 versus the control, **p<0.01 versus the control

Table 6. IL-1 levels in cultures of human nasal fibroblast with *Mycoplasma* lysates

	IL-1 conc.(units/ml)
Lysates(1μg/ml)	
M. pneumoniae	55.83±1.20*
M. fermentans	222.43±6.42*
M. hominis	102.20±4.02*
Control	33.71±191

Human nasal fibroblasts were cultivated with Mycoplasma lysates for 24 hrs. IL-1 was measured in the culture super-natant. Datas are mean±SDM. *p<0.01 versus the control

보였다($p<0.05$). LPS를 0.1 μg/ml 농도로 작용시킨 후 SEB를 0.001 1.0 μg/ml로 작용시켰을 때, LPS 단독처리 군보다 모든 군에서 유의하게 NO생성이 증가하였다($p<0.05$). LPS를 1.0 μg/ml 농도로 작용시킨 후 SEB를 0.001 1.0 μg/ml 농도로 작용시켰을 때, SEB 0.01 μg/ml과 0.1 μg/ml에서만 유의하게 증가되었다($p<0.05$, Fig.1).

0.001 μg/ml의 LPS를 작용시킨 후 *Mycoplasma* 항원 즉, Mp, Mf, Mh를 각각 1 μg/ml 씩을 추가로 작용시켰을 때, LPS 0.001 μg/ml 농도로 단독 자극시킨 군과 비교해서 Mp의 경우에는 유의한 증가를 보이지 않았으나 Mf나 Mh의 경우는 유의한 증가를 보였다($p<0.05$). 0.01 μg/ml의 LPS를 작용시킨 후 *Mycoplasma* 항원을 종류별로 추가작용시켰을 때, LPS 0.001 μg/ml 농도로 단독자극 시킨 군과 비교해서 NO 생성이 촉진되었으며 Mf나 Mh군에서 유의하게 상승하였다($p<0.05$). LPS를 0.1 μg/ml 농도로 작용시킨 후 Mycoplasma 항원을 작용시켰을 때, LPS 단독처리 군보다 유의하게 증가하였다($p<0.05$). LPS를 1.0 μg/ml 농도로 작용시킨 후 *Mycoplasma* 항원을 작용시켰을 때, LPS 단독처리 군보다 Mp, Mf, Mh의 경우 모두에서 큰 폭으로 NO 생성이 촉진되었다($p<0.05$, Fig.2).

LPS, SEB, *Mycoplasma* 항원에 중복노출시 IL-1 생성능

IL-1의 생성변화는 LPS를 0.001 μg/ml 작용시킨 후 SEB를 0.001 1.0 μg/ml로 작용시켰을 때, LPS

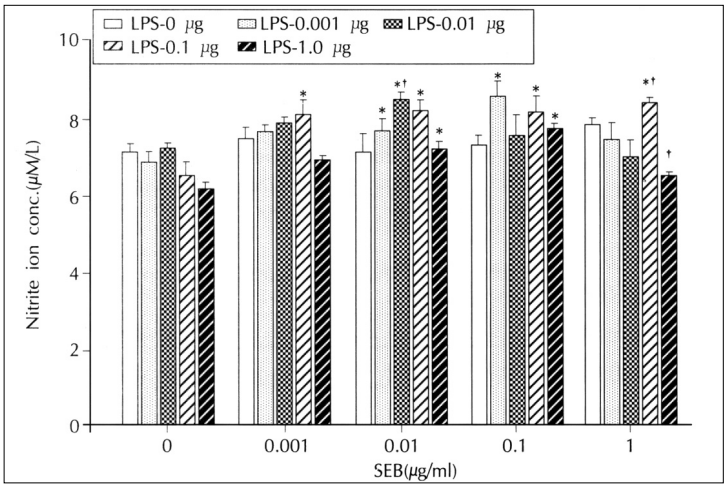

Fig. 1. NO release in the cultures of human nasal fibroblast exposed to LPS and SEB. Supernatants were collected after 24 hrs. Cultures were exposed to LPS (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 g/ml) plus SEB (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 g/ml) during the entire culture period. Datas are mean±SDM.
*Significantly different from the corresponding control value (SEB-free group, $p<0.05$). †Significantly different from the LPS-free group at the same SEB concentration ($p<0.05$).

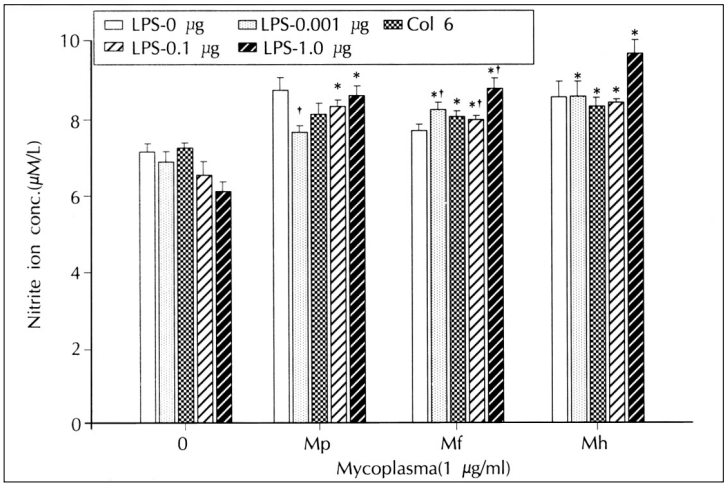

Fig. 2. NO release in the cultures of human nasal fibroblast exposed to LPS and *Mycoplasma* lysates. Supernatants were collected after 24hrs. Cultures were exposed to LPS (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 g/ml) plus *Mycoplasma* lysates (M. *pneumoniae* (Mp), M. *fermentans* (Mf), M. *hominis* (Mh), 1.0 g/ml each) during the entire culture period. Datas are mean ±SDM.
*Significantly different from the corresponding control value (*Mycoplasma*-free group, $p<0.05$). †Significantly different from the LPS-free group at the same *Mycoplasma* ($p<0.05$).

0.001 μg/ml 농도로 단독처리 군보다 SEB 0.001 μg/ml의 경우에는 오히려 유의하게 감소한 반면($p<0.05$) SEB 0.01, 0.1, 1.0, 1.0 μg/ml에서는 유의하게 증가되었다($p<0.05$). 특히 SEB 0.01 μg/ml에서 가장 현저하였다. LPS 0.01 μg/ml을 작용시킨 후 SEB를 용량 별로 작용시켰을 때 IL - 1의 생성은 모든 SEB군에서 LPS 0.01 μg/ml 농도로 단독처리 시킨 군보다 유의하게 감소하였다($p<0.01$). LPS 0.1 μg/ml을 작용시킨 후 SEB를 용량 별로 작용시켰을 때 모든 SEB군에서 LPS 단독처리 군보다 감소하였으며 그 효과는 SEB 1.0 μg/ml에서 가장 컸다($p<0.01$). LPS 1.0 μg/ml을 작용시킨 후 SEB를 용량 별로 작용시켰을 때, 모든 SEB군에서 LPS 단독 처리군보다 감소하였으며 그 효과는 1.0 μg/ml에서 가장 컸다($p<0.01$, Fig.3).

LPS 0.001 μg/ml을 작용시킨 후 *Mycoplasma* 항원을 종류별로 작용시켰을 때, 생성되는 IL - 1의 양은 LPS만 작용시켰을 때보다 폭발적으로 증가하였는데 그 효과는 Mp, Mh, Mf의 순이였다($p<0.01$). LPS 0.01 μg/ml을 작용시킨 후 *Mycoplasma* 항원을 종류별로 추가작용 시켰을 때, 모든 종류의 *Mycoplasma* 항원 처리군에서 LPS 단독 처리시보다 IL - 1생성이 유의하게 증가되었다($p<0.01$). LPS 0.1 μg/ml을 작용시킨 후 *Mycoplasma* 항원을 종류별로 작용시켰을 때, Mf와 Mh 추가군에서는 LPS 단독 처리시보다 증가되었으나 Mp 군에서는 오히려 감소되었다. LPS 1.0 μg/ml을 작용시킨 후 *Mycoplasma* 항원을 종류별로 작용시켰을 때, *My* -

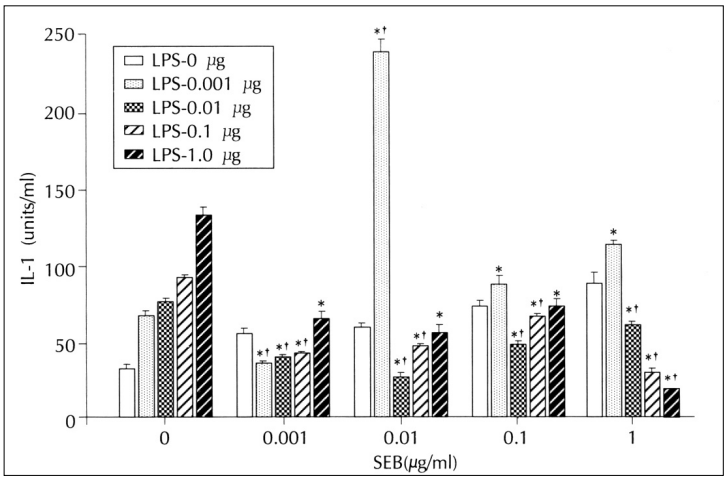

Fig. 3. IL-1 production in the cultures of human nasal fibroblast exposed to LPS and SEB. Supernatants were collected after 24hrs. Cultures were exposed to LPS (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 g/ml) plus SEB (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 g/ml) during the entire culture period. Datas are mean±SDM.
*Significantly different from the corresponding control value (SEB-free group, $p<0.05$). †Significantly different from the LPS-free group at the same SEB concentration ($p<0.05$).

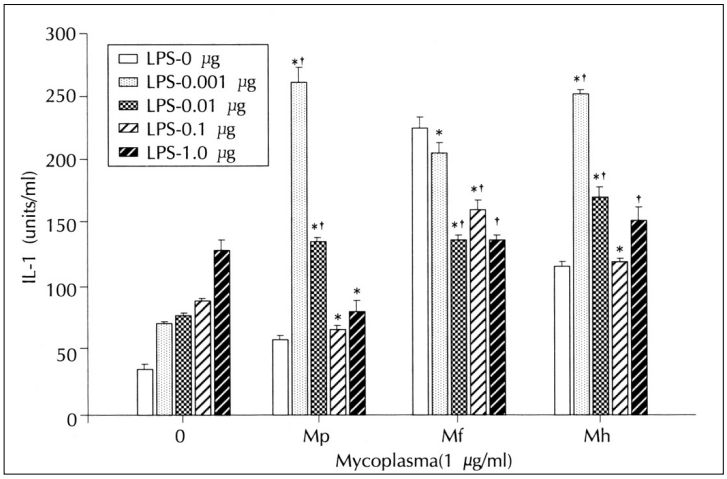

Fig. 4. IL-1 production in the cultures of human nasal fibroblast exposed to LPS and *Mycoplasma* lysates. Supernatants were collected after 24hrs. Cultures were exposed to LPS (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 g/ml) plus *Mycoplasma* lysates (M. *pneumoniae* (Mp), M. *fermentans* (Mf), M. *hominis* (Mh), 1.0 g/ml each) during the entire culture period. Datas are mean ±SDM.
*Significantly different from the corresponding control value (*Mycoplasma*-free group, $p<0.05$). †Significantly different from the LPS-free group at the same *Mycoplasma* ($p<0.05$).

coplasma 항원 종류에 따라 다른 결과를 보였다. 즉, Mf 및 Mh의 경우에는 LPS 단독처리시보다 IL-1생성이 증가되었으나 Mp의 경우에는 감소되었다(Fig. 4).

고 찰

NO는 혈관이완물질, 신경전달물질로서 작용할 뿐만 아니라 염증 면역반응에서 중요한 중개자가 되고 있다. NO는 활성화된 식균세포에서 발현되는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해서 주로 생성된다. 이러한 세포들에서 생성되는 NO는 항미생물작용과 항암작용을 일으킨다.[3] 식균세포가 생성하는 고농도의 NO에 의해서 표적세포가 파괴되는 것은 비특이적이여서 결국 NO의 과잉생성은 급성염증반응의 주요인자가 되고 있다. LPS에 의해서 활성화된 대식세포에서 생성된 NO와 TNF-α에 의해서 패혈증성 쇽을 일으키며,[12] Staphylococcal exotoxins toxic shock syndrome toxin 1(TSST-1)과 SEB에 의해서 자극된 대식세포에서 분비하는 NO에 의해서 항암작용과 패혈증성 쇽을 야기시킨다.[13-15] 이러한 기능 외에도 NO는 사이토카인이나 염증관련 중개자를 조절하는 기능을 가지고 있다.

IL-1은 T 세포활성, B 세포 성숙 및 증식, 면역 및 염증반응에 관계한다. 또한 열발생의 중요한 중개자가 되고 있으며 LPS의 생리적 효과와 많은 관련을 갖고 있다.[16] 또한 감염원에 대해서 면역반응을 증폭시킨다. IL-1은 분비형으로나 혹은 세포막관련 사이토카인(membrane-associated cytokine)으로 인지된다. TSST-1, SEB, *Mycoplasma* 등의 자극으로 IL-1은 대식세포를 비롯하여 비교적 다양한 세포들에서 생성되며,[17-20] 지속적인 IL-1의 생성은 폐혈증성 쇽(septic shock), 관절염, 사구체신염, 확정성심근 등의 만성 염증성질환을 유도한다.

본 실험에서는 초대배양한 사람의 비강 섬유아세포에 폐혈증성 쇽의 모델에 이용되는 LPS, SEB, *Mycoplasma*를 단독작용시키거나 LPS와 함께 SEB나 *Mycoplasma* 항원을 중복작용시켰을 때 세포에서 생성되는 NO와 IL-1의 양에 어떤 차이가 있는 지를 조사하였다.

비강 섬유아세포에서의 NO생성은 세포에 LPS를 0.001 1.0 μg/ml 농도로 작용시켰을 때 0.01 μg/ml 농도에서 만 경미한 증가를 보인 반면 SEB를 0.001 1.0 μg/ml 농도로 작용시켰을 때는 다소 촉진되는 경향을 보였다. 그러나 양 경우 모두 그 효과는 그리 크지 않았다. *Mycoplasma* 항원을 1.0 μg/ml 농도로 처리했을 때는 NO 생성이 다소 증가되었으나 그 효과는 작았다.

IL-1의 생성은 LPS, SEB, *Mycoplasma* 항원들의 처치에 의해 현저히 증가되었는데, 이들 작용은 NO 생성계보다 IL-1 생성계가 더 예민하게 반응하였다.

자극물의 중복 노출에 의한 NO 생성을 보면 LPS 0.001 μg/ml 노출후 SEB로 추가 자극한 경우 LPS 단독 처리군보다 SEB 0.01, 0.1 μg/ml 농도에서 유의하게 증가하였으며 *Mycoplasma* 항원으로 추가 자극한 경우 Mf, Mh에서 유의한 증가를 보였다. LPS 0.01 μg/ml 노출후 SEB로 추가 노출한 경우 LPS 단독 처리 때보다 SEB 0.01 μg/ml 농도에서 유의한 증가를 보였다. *Mycoplasma* 항원에서도 유사한 결과가 나타났는데 Mf와 Mh에서 유의한 상승을 보였다. LPS 0.1 μg/ml 노출후 SEB로 추가 자극한 경우 LPS 단독 처리 때보다 모든 군에서 유의한 증가를 보였으며 *Mycoplasma* 항원 중복 노출에서도 유사한 결과를 얻었다. LPS 1.0 μg/ml 노출후 SEB로 추가 노출한 경우 LPS 단독 처리 때보다 SEB를 중복 노출시켰을 때는 LPS 0.001 μg/ml 때와 유사한 결과를 얻었다. *Mycoplasma* 항원의 경우에는 LPS 0.1 μg/ml 때와 같이 모든 군에서 증가하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 미생물에 의한 중복 감염의 경우에는 단독감염 때와는 다르게 자극되어지는 독소의 양과 항원의 종류에 따라 비강내 섬유아세포에서 생성되는 NO의 양에 변화가 예상된다.

자극물의 중복 노출에 의한 IL-1 생성을 보면 LPS 0.001 μg/ml 노출후 SEB로 추가 자극한 경우 LPS 단독 처리군과 비교하여 자극되어지는 용량에 따라 IL-1의 생성에 상당한 변화를 보였다. SEB 0.001 μg/ml에서는 유의한 감소를 보였으며 0.01, 0.1, 1.0 μg/ml에서는 유의한 증가를 보였다. 특히 SEB 0.001 μg/ml에서는 유의한 증가를 보였다. 그러나 *Mycoplasma* 항원으로 추가자극한 경우 모든 군에서 유의하게 현저한 증가를 보였다. LPS 0.01 μg/ml 노출후 SEB로 추가 자극한 경우 LPS 단독 처리 때보다 모든 SEB군에서

유의한 감소를 보인다. 그러나 *Mycoplasma* 항원의 경우에는 이와 반대로 모든 군에서 유의하게 현저하게 증가하였다. LPS 0.1 μg/ml 노출후 SEB로 추가 자극한 경우 LPS 0.01 μg/ml에서처럼 감소를 보이며 특히 SEB 1.0 μg/ml에서 큰 폭의 감소를 보이게 된다. *Mycoplasma* 항원으로 추가자극한 경우 LPS 0.01 μg/ml과는 다른 양상을 보인다. 즉, Mp에서는 유의한 감소가 나타나고 있으며 Mf와 Mh의 경우에는 유의한 증가를 보인다. LPS 1.0 μg/ml 노출후 SEB로 중복 노출시킨 경우 모든 군에서 유의하게 감소하였다. 이러한 결과들을 놓고 볼 때 자극물의 종류에 따라 혹은 자극물의 용량에 의존하여 촉진 혹은 억제라는 상반된 결과를 보이게 된다. 이는 중복 감염시 생성되는 각각의 독소량에 따라 IL - 1의 생성에 변화를 주게 되며 그 다음에 생성되는 사이토카인의 생성이나 염증반응에 큰 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다. *Mycoplasma* 항원 경우에는 Mp, Mf, Mh 모두에서 나타난 바와 같이 LPS의 특정 용량들(0.001, 0.01 μg/ml)에서는 IL - 1의 생성을 폭발적으로 증폭시키고 있다. 이는 *Mycoplasma* 항원이 생체내에 존재하고 있을 때, LPS를 생성시킬 수 있는 그람 음성균의 중복감염에 의해서 염증과 관련된 IL - 1의 생성이 촉진될 것으로 예상된다.

결 론

본 연구는 초대배양시킨 사람섬유아세포에 세균독소인 LPS, SEB 및 *Mycoplasma* 항원을 작용시켰을 때 나타나는 염증관련물질로서의 NO와 IL - 1의 생성 및 그 양을 정량하였다.

LPS의 자극에 의한 섬유아세포의 NO생성은 특정농도(0.01 μg/ml)에서만 촉진되는 현상을 보였으나, IL - 1의 생성은 모든 농도(0.001 1.0 μg/ml)에서 유의한 촉진효과를 보였다. SEB로 자극시켰을 때는 NO와 IL - 1의 생성이 모든 농도에서 촉진되었다. *Mycoplasma* 항원에 의해서도 NO생성이 촉진되었으며, IL - 1 생성은 *Mycoplasma* 균종에 따라 촉진효과에 큰 차이를 나타냈다. Mf는 대조군에 비교하여 6배 이상의 촉진효과를 나타낸 반면 Mp는 1.5배의 촉진효과를 보였다.

자극물의 중복노출에 의한 효과로서 LPS 노출과 동시에 SEB나 *Mycoplasma* 항원을 노출시켰을 때 섬유아세포로 부터의 NO와 IL - 1의 생성은 자극물의 종류 및 양에 따라 증가 혹은 감소를 보였다.

따라서 단독감염시 섬유아세포에서 생성되는 염증관련 물질로서의 NO와 IL - 1은 그람음성균의 세포벽성분인 LPS 뿐만이 아니라 그람양성균인 황색포도상구균의 SEB에 의해서도 생성이 촉진될 것으로 생각된다. 특히 *Mycoplasma* 감염시 촉진효과는 뚜렸할 것이다. 또한 중복감염에 의해서 이들 자극물들이 섬유아세포에 작용되었을 때 자극물의 종류와 량에 따라 이들 물질이 폭발적인 증가할 것으로 생각되며 생체내에서 여러가지 사이토카인의 생성에 영향을 주고 염증반응에도 관여할 것으로 예상되었다.

중심 단어 : 섬유아세포 배양 · 산화질소 · Interleukin - 1.

REFERENCES

1) Lowenstein CJ, Snyder SH. *Nitric oxide, a novel biologic messenger. Cell 1992;70:705-7.*
2) Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. *Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or-independent mechanisms. Cancer Res 1994;54:2462-7.*
3) Maeda H, Akaike T, Yoshida M, Suga M. *Multiple functions of nitric oxide in pathophysiology and microbiology: analysis by a new nitric oxide scavenger. J Leukoc Biol 1994;56:588-92.*
4) Ogle CK, Wu JZ, Mao X, Szczur K, Alexander JW, Ogle JD. *Heterogeneity of Kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. Inflammation 1994;18:511-23.*
5) Natanson C, Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Peart KW, Banks SM, *et al. Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality: Escherichia coli and Staphylococcus aureus challenges in a canine model of human septic shock. J Clin Invest 1989;83:243-51.*
6) Dinarello CA. *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood 1991;77:1627-52.*
7) Ding AH, Nathan CF, Stuehr J. *Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. J Immunol 1988;141:2407-12.*
8) Gery I, Gershon RK, Waksman BH. *Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. J Exp Med 1972;136:128-42.*
9) Gilis S, Mizel SB. *T cell lymphoma model for the analysis of interleukin-1-mediated T-cell activation. Proc Natl Aca Sci USA 1981;78:1133-7.*
10) Gearing AJ, Bird CR, Bristow A, Poole S, Thorpe R. *A*

simple sensitive bioassay for interleukin-1 which is unresponsive to 103 units of interleukin-2. J Immunol Methods 1987;99:7-11.

11) Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.*
12) Lee HJ, Kim NY, Jang MK, Son HJ, Kim KM, Sohn DH, *et al. A sesquiterpene, dehydrocostus lactone, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha in LPS-activated macrophages. Planta Med 1999; 65:104-8.*
13) Fast DJ, Shannon BJ, Herriott MJ, Kennedy MJ, Rummage JA, Leu RW. *Staphylococcal exotoxins stimulate nitric oxide-dependent murine macrophage tumoricidal activity. Infect Immun 1991;59:2987-93.*
14) Cunha FQ, Moss DW, Leal LM, Moncada S, Liew FY. *Induction of macrophage parasiticidal activity by Staphylococcus aureus and exotoxins through the nitric oxide synthesis pathway. Immunol 1993;78:563-7.*
15) Zembowicz A, Vane JR. *Induction of nitric oxide synthase activity by toxic shock syndrome toxin 1 in a macrophage-monocyte cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89: 2051-5.*
16) Kozak W, Kluger MJ, Soszynski D, Conn CA, Rudolph K, Leon LR, *et al. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. Ann N Y Acad Sci 1998;856:33-47.*
17) Parsonnet J, Hickman RK, Eardley DD, Pier GB. *Induction of human interleukin-1 by toxic-shock-syndrome toxin-1. J Infect Dis 1985;151:514-22.*
18) Muhlradt P, Schade U. *MDHM, a macrophage-stimulatory product of Mycoplasma fermentans, leads to in vitro IL-1, IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. Infect Immun 1991;59:3969-74.*
19) Litton MJ, Sander B, Murphy E, O'Garra A, Abrams JS. *Early expression of cytokines in lymph nodes after treatment in vivo with Staphylococcus enterotoxin B. J Immunol Methods 1994;175:47-58.*
20) Ruetten H, Thiemermann C. *Combination immunotherapy which neutralises the effects of TNF alpha and IL-1 beta attenuates the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. J Physiol Pharmacol 1997;48:605-21.*