KISEP Original Articles
臨床耳鼻：第10卷 第2號 1999
J Clinical Otolaryngol 1999;10:224-230

집먼지 진드기 항원으로 자극한 사람 섬유아세포의 Cytokine mRNA 발현

고신대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 기생충학교실,[2] 미생물학교실[3]
유태현[1] · 이봉희[1] · 최창용[1] · 주호범[1] · 옥미선[2] · 김광혁[3]

Messenger RNA Expression of the Cytokine Gene Cluster in Human Fibroblast Activated with House Bust Mite Antigen

Tai Hyun Yu, MD[1], Bong Hee Lee, MD[1], Chang Yong Choi, MD[1], Ho Bum Ju, MD[1], Mee Sun Ock, PhD[2] and Kwang Hyuk Kim, PhD[3]

[1]Department of Otolaryngology and [2]Parasitology, [3]Microbiology, Kosin University, College of Medicine, Pusan, Korea

－ ABSTRACT －

Background and Objectives：It is well known that normal fibroblast can secrete a group of cytokines, namely IL-1 α, IL-1 β, IL-6, IL-7, IL-8 and GM-CSF. The fibroblast is a major component of connective tissue in the airway and has many immunologic roles. In case of allergic rhinitis, neutrophils, macrophages and lymphocytes are infiltrated in nasal mucosa and these cells secrete several kinds of cytokines. These reactions cause the activation of fibroblast growth abnormally and result in fibrosis. Secreted cytokines also cause inflammatory reaction of connective tissue in nasal mucosa. To identify the role of cytokines of fibrosis in allergic rhinitis, we tried to find the differences of cytokine secretion patterns and amounts between the normal and allergic rhinitis patient's fibroblast which was originated from inferior turbinate of nasal cavity and primarily cultured in vitro. **Materials and Methods**：Cultured human nasal fibroblast was activated with saline, lipopolysaccharide (LPS,5 μg/ml) and house dust mite antigen (100 μg/ml) for 4 hours. **Results**：When normal fibroblast was treated with saline, mRNA expression of IL-1 β, IL-6 and GM-CSF was confirmed. But the mRNA band of IL-6 was not found in the patient group. Although it was identified that mRNA expression of IL-1 β, IL-8 and GM-CSF in both groups, IL-8 mRNA expression was distinct in patient fibroblast activated with LPS. When the normal fibroblast was activated with mite antigen, the expression of IL-1 β, IL-6, IL-8 and GM-CSF expression was identified. But IL-8 expression was suppressed in the patient fibroblast. **Conclusion**：These results suggest that IL-1 β, IL-6 and IL-8 could play as the triggering factors of inflammation and fibrosis in allergic rhinitis. **(J Clinical Otolaryngol 1999;10:224-230)**

KEY WORDS：House dust mite · Allergic rhinitis · Fibroblast · Cytokine · m RNA.

논문접수일 : 1999년 6월 15일
심사완료일 : 1999년 7월 20일
교신저자 : 유태현, 602 - 792 부산광역시 서구 암남동 34
고신대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (051) 240 - 6247 · 전송 : (051) 245 - 8539
E - mail : cauent@netsgo.com.

서 론

집먼지 진드기는 알레르기 질환을 유발하는 가장 흔한 원인중의 하나로서 전세계적으로 분포하고 있으며,[1] 우리나라에는 지역에 따른 분포비율의 차이는 있으나 북아메리카 집먼지진드기(Dermatophagoides farinae) 및 유럽 집먼지진드기(D. pteronyssinus)의 두 종이 우점종으로 알려져 있다.[2] 이러한 집먼지 진드기에 의한 질환으로는 통년성 알레르기성 비염, 기관지 천식 등이 주로 나타나고 있으며 그 중 가장 흔히 볼 수 있는 알레르기성 비염의 경우, 호중구, 림프구, 대식세포 등이 점막내로 출현하여 여러 종의 cytokine을 분비함으로써 비강 점막을 구성하는 세포들로부터 재차 cytokine의 분비를 초래하는 것으로 밝혀지고 있다.[3][4] 이러한 과정은 비염이 만성화될수록 비강내 고유층의 결합조직을 구성하는 섬유아세포의 증식을 보이게 된다. 최근 섬유아세포의 이형질(heterogeneity)의 개념이 확립되면서 서로 다른 조직이나 질환 뿐만 아니라 같은 장소에서 유래한 섬유아세포라도 배양시 형태, 세포 표면항원 발현능력, 대사능 및 cytokine의 생산능력에 차이가 있음이 밝혀졌다.[5-7] 이러한 결과는 조직내에 존재하는 섬유아세포의 이형질로 인하여 결합조직이 만성 염증반응으로 진행하는데 중요한 역할을 할 것으로 추정되는 근거가 되고있다.[8][9] 또 섬유아세포에서 분비되는 cytokine은 결합조직의 염증반응에 관여하기도 하고, 결합조직내 섬유아세포의 성장을 촉진함으로써 조직의 섬유화를 유발하는 것으로도 잘 알려져 있다.[10] 정상 섬유아세포에서는 일반적으로 IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-7, IL-8, GM-CSF 등이 분비되는 것으로 알려져 있으나, 집먼지 진드기 항원의 자극으로 인한 알레르기성 비염 환자의 경우에는 정상인과는 다른 cytokine 분비 양상을 보일 것으로 추정하여 본 실험에서는 알레르기 비염 환자와 정상인의 하비갑개에서 유래한 배양섬유아세포를 집먼지 진드기항원으로 자극하여 이들로부터 분비되는 cytokine을 mRNA level에서 분비양상 및 분비정도를 비교함으로써 알레르기성 비염의 섬유화과정에 관여하는 일부 cytokine의 역할을 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

섬유아세포의 초대배양

정상인 및 알레르기성 비염환자의 하비갑개로부터 조직절편 2 5 mm^3를 무균적으로 생검하여 1 mm^3크기로 자른 후 조직에 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, BM, Germany)을 10% 추가하여 만든 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco, USA) 2 ml를 떨어뜨린 후 60 mm 조직 배양용 접시(Costtar, Cambridge, MA, USA)에 정치하고 멸균된 cover slip으로 고정한 뒤 37℃, 5% CO_2배양기에 넣어 3 4일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 약 3주 후에 배양용 접시 전체에 단층(monolayer)으로 형성된 섬유아세포로 부터 배지를 흡입하여 버리고 PBS로 1회 세척한 후 0.25% trypsin 0.3 ml를 첨가한 후 배양기에서 5분 동안 방치하였다. 박리된 세포들은 10% FCS EMEM으로 재부유 시켜 실험에 사용하였다.

집먼지 진드기의 사육 및 조항원 준비

옥내에서 흔히 발견되는 두 종의 집먼지 진드기인 유럽집먼지진드기(*Dermatophagoides pteronyssinus*)와 북아메리카집먼지 진드기(*D. farinae*)를 특정하게 고안된 두 종류의 프라스틱 용기내에 넣어 27℃ 및 24℃내에서 배양하였다.[11] 적절한 농도로 배양되면 포화식염수로 배양분말과 진드기를 분리한 후, 12시간 동결건조시켜 -20℃에 보관하였다. 실험에 사용하기 위하여 PBS 완충액에 적당량의 집먼지 진드기를 넣어 초음파 분쇄기로 분쇄한 후 24시간 end-point titration으로 단백질을 추출하여 15,000 rpm으로 1시간 원심분리한 상층액을 조항원으로 사용하였으며 단백질 정량은 Lowry 방법[12]으로 시행하였다.

집먼지 진드기 항원으로 섬유아세포의 자극

정상인과 알레르기성 비염환자의 배양섬유아세포(1×10^8)에 두 종의 집먼지 진드기항원을 동량으로 혼합하여 (100 μg/ml) 4시간동안 배양하고, 양성 대조군으로는 lipopolysaccharide(LPS, 5 μg/ml)를, 음성 대조군으로 saline을 첨가하여 같은시간동안 배양하였다.

Primers

Glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase(GAPDH), IL - 1α, IL - 1β, IL - 6, IL - 7, IL - 8, granulocyte - macrophage colony - stimulating factor(GM - CSF)의 primer쌍을 사용하였다. 사용된 polynucleotide의 특징은 Table 1과 같다.

총RNA 분리 및 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

총RNA를 분리하기 위하여 섬유아세포를 PBS로 2회 세척한 후 RNAsol B(Tel - Test B)를 가한 다음 phenol/chloroform method를 시행하였다.[13] cDNA를 합성하기 위하여 Primix - Top(Bioneer, Korea)에 분리된 총RNA 1 μg을 첨가한 후 20 pmol primer쌍을 각 1 μl씩 혼합하고 증류수(DEPC - treated) 17 μl를 가하여 Reverse transcription(57℃ 10 min, 42℃ 1hr, 94℃ 5min)을시행하였으며 PCR(Thermojet, USA. 95℃ 3 min 1 cycle, 95℃ 30 sec, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 cycle, 72℃ 5 min 1 cycle)로 증폭시킨 PCR product는 3% agarose gel electrophoresis로 확인하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers for PCR

Cytokine	Polynucleotide sequences	Product size(bp)
GAPDH	5' ATCTA CCGCA TTGAC CACCT	254
	3' CCAC AGAAG ACATC CAGGA TGAG	
IL-1 α	CTCACGGCTGCTGCATTACA	365
	ACCTACGCCTGGTTTTCCAG	
IL-1 β	TGCCCGTCTTCCTGGGAGGG	288
	GGCTGGGGATTGGCCCTGAA	
IL-6	TAGCCGCCCCACACAGACAG	408
	GGCTGGCATTTGTGGTTGGG	
IL-7	TTTTA TTCCG TGCTG CTCGC	429
	GCCCT AATCC GTTTT GACCA	
IL-8	GGGTCTGTTGTAGGGTTGCC	289
	TGTGGATCCTGGCTAGCAGA	
GM-CSF	CTCGC CCAGC CCCAG CACGC	411
	GCAGC TCCCC GGCTT GGCCA	

통계처리

IL - 1b, IL - 6, IL - 8 및 GM - CSF의 PCR산물에 대한 정상인군과 환자군의 차이를 양적으로 비교하기 위하여 전기영동한 PCR 산물의 흡광도를 양으로 측정하고(Bio ID), Student's t - test로 처리하였다.

결 과

정상인과 알레르기성 비염환자의 하비갑개에서 유래한 섬유아세포를 초대배양한 후 집먼지 진드기 항원으로 자극하였을 때 IL - 1α, IL - 1β, IL - 6, IL - 7, IL - 8, GM - CSF의 분비 양상과 분비정도를 mRNA level에서 조사하였다. 먼저 정상인의 섬유아세포를 생리식염수로 자극하였을 때 IL - 1β, IL - 6, GM - CSF 등의 mRNA발현을 볼 수 있었으나(Fig. 1a), 환자의 섬유아세포를 생리식염수로 자극한 경우에는 IL - 1β 및 GM - CSF만이 많은 양의 mRNA를 생성하는 것으로 나타났다(Fig. 1b).

또 정상 섬유아세포를 LPS로 자극한 경우에는 IL - 1β, IL - 8, GM - CSF의 발현이 확인되었으나(Fig. 2a) 환자 섬유아세포군의 경우에는 정상 섬유아세포군에 비해 IL - 1β의 반응은 약해졌으나, IL - 8은 특징적으로 강한 반응을 보였으며, GM - CSF의 mRNA발현은 여전

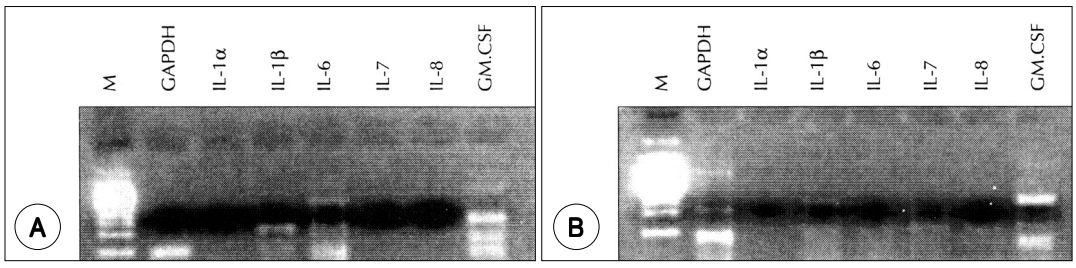

Fig. 1. Electrophoresis pattern of PCR products from cultured normal human nasal fibroblast(α) and allergic rhinitis patient fibroblast(β) activated with saline. It was confirmed that mRNA of IL-1b, IL-6 and GM-CSF was expressed in constitutive level of the normal fibroblast, but only IL-1b and GM-CSF were expressed in the patient fibroblast.

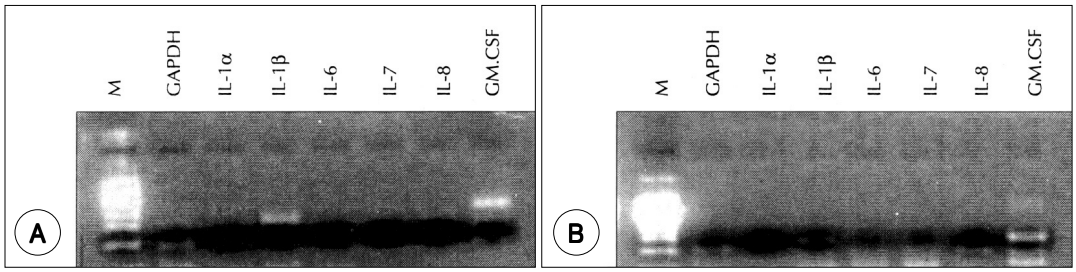

Fig. 2. Electrophoresis pattern of PCR products from cultured human normal nasal fibroblast(α) and allergic rhinitis patient fibroblast(β) activated with LPS. The mRNA expression of IL-1 β, IL-8 and GM-CSF was found in the both groups, but IL-8 mRNA expression was distinct in the patient fibroblast activated with LPS.

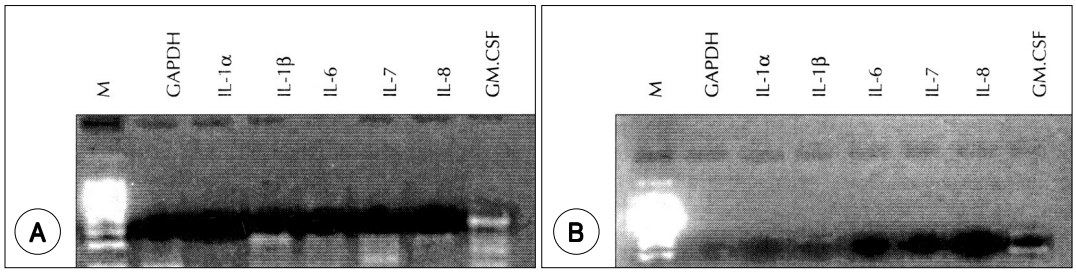

Fig. 3. Electrophoresis pattern of PCR products from cultured human normal nasal fibroblast(α) and allergic rhinitis patient fibroblast(β) activated with house dust mite antigen. When the normal fibroblast was activated with mite antigen, IL-1 β, IL-6, IL-8 and GM-CSF expression were identified. But IL-8 expression was suppressed in the patient fibroblast.

히 지속되었다(Fig. 2b).

정상인의 섬유아세포를 집먼지 진드기 항원으로 자극하였을 때 IL - 1β, IL - 6와 더불어 IL - 8의 mRNA발현이 더욱 뚜렷해 졌으며 GM - CSF의 발현도 동시에 확인할 수 있었다(Fig. 3a). 그러나 집먼지 진드기항원으로 자극한 환자의 섬유아세포가 보이는 반응양상은 IL - 8의 경우에 뚜렷한 차이를 확인할 수 있었다. 즉 LPS로 자극한 군에서 확인할 수 있었던 IL - 8은 집먼지 진드기 항원에 노출되면 오히려 mRNA의 발현이 억제되었다(Fig. 3b).

먼저 IL - 1β의 경우에는 정상인군에 비해 환자군에서 대체로 강한 반응을 보였다(Fig. 4). IL - 6는 정상세포군에서 주로 발현하였는데 집먼지 진드기 항원으로 자극하면 LPS로 자극한 경우보다 많은 양의 mRNA를 발현함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

IL - 8은 정상세포군 및 환자세포군의 각 대조군에서는 발현되지 않다가 LPS나 집먼지 진드기 항원으로 자극하면 발현되는 양상을 보였다. 특히 환자세포군을 LPS로 처리하면 많은 양의 mRNA발현을 볼 수 있었다(Fig. 6). GM - CSF는 실험한 어느군에서나 뚜렷이 관찰되었으나 그중 정상인 섬유아세포를 집먼지 진드기 항원으로 자극하였을 때의 반응이 가장 미약하였다(Fig. 7).

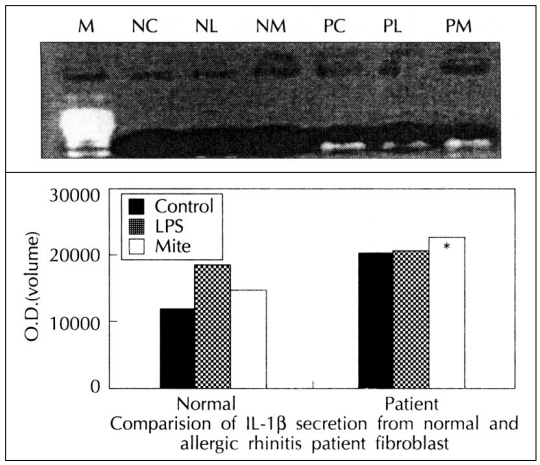

Fig. 4. Quantitative comparision of IL-1 β secretion from normal and allergic rhinitis patient nasal fibroblasts. Normal nasal fibroblast was activated with saline (NC), LPS (NL) and house dust mite antigen (NM). Nasal fibroblast of allergic rhinitis patient was also activated with the same way(PC, PL and PM). *$p < 0.05$.

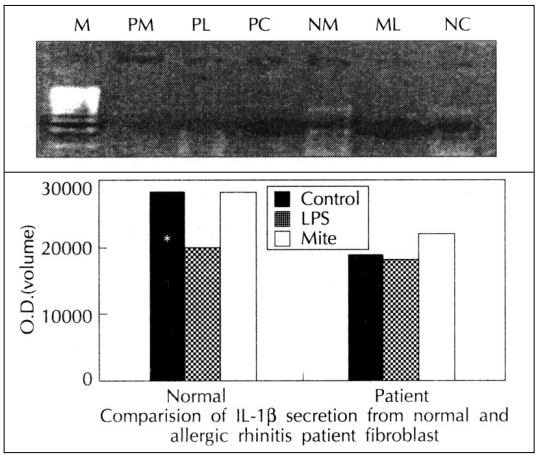

Fig. 5. Quantitative comparision of IL-6 secretion from normal and allergic rhinitis patient nasal fibroblasts. Normal fibroblast was activated with saline(NC), LPS(NL) and house dust mite antigen(NM). Nasal fibroblast of allergic rhinitis patient was also activated with the same way(PC, PL and PM). *p<0.05.

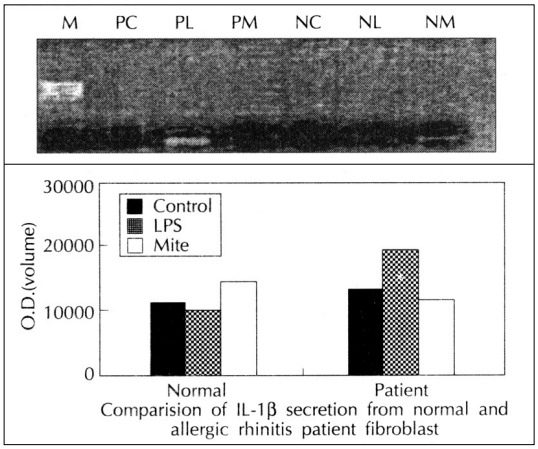

Fig. 6. Quantitative comparision of IL-8 secretion from normal and allergic rhinitis patient nasal fibroblasts. Normal fibroblast was activated with saline(NC), LPS(NL) and house dust mite antigen(NM). Nasal fibroblast of allergic rhinitis patient was also activated with the same way(PC, PL and PM). *p<0.05.

고 찰

알레르기성 비염에서 세포활성물질 분비는 일차적으로 면역담당 세포가 담당하고 있으나, 알레르기 염증반응이 만성화 될수록 상피하조직의 결체조직은 비후가 일

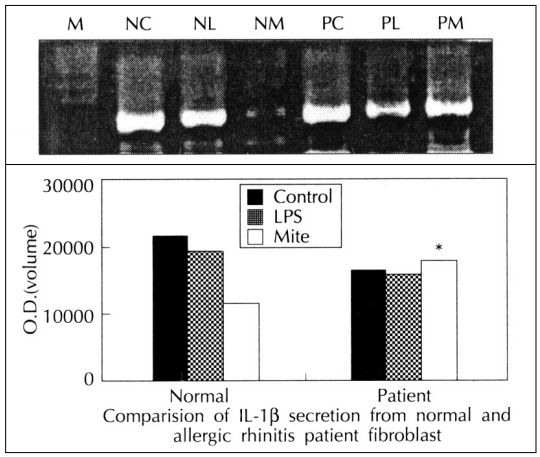

Fig. 7. Quantitative comparision of CM-CSF secretion from normal and allergic rhinitis patient nasal fibroblasts. Normal human nasal fibroblast was activated with saline (NC), LPS(NL) and house dust mite antigen(NM). Patient fibroblast was also activated with the same way(PC, PL and PM). *p<0.05.

어나게 되고 섬유아세포의 증식을 보이게 된다. 최근 염증반응의 만성화과정에 관여하는 섬유아세포가 정상적인 섬유아세포에 비해 성장능력 및 여러 가지 염증매개물질 분비능력에 차이를 보인다는 이형질에 관한 개념이 점차로 확립되어 가고 있다.[14] 그러나 이러한 섬유화에 대한 연구는 주로 폐포 섬유아세포, 구강내 섬유아세포 및 피부 섬유아세포를 중심으로 연구가 이루어지고 있다.[6)9)]

저자 등은 알레르기성 비염 환자의 비강내 섬유아세포에서 분비되는 cytokine 분비 양상은 정상인의 섬유아세포의 그것과는 차이를 보일것으로 가정하여 정상인 및 알레르기성 비염 환자의 하비갑개에서 유래한 섬유아세포를 시험관내에서 배양하여 섬유아세포에서 분비되는 것으로 알려진 IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-7, IL-8 및 GM-CSF mRNA발현 유무 및 그 정도를 알아보았다.

본 실험에서는 IL-1β, IL-6 및 IL-8 등이 각 실험군에 따라서 여러가지 반응을 보였다. 즉 실험대상으로 한 cytokine들 중 IL-1α는 전군에서 발현되지 않았다. Ohata 등[4]은 건선 환자의 세포에서 발현되는 cytokines들 중 IL-1α는 정상피부 및 건선피부 모두에서 발현되지 않으나, IL-6는 정상피부에서는 발현되지 않다가 건선으로 이행하면 mRNA가 발현되는 것으로

보고하였다. 그러나 Carty 등[15]은 TNF - α나 IL - 1α를 사람의 전박 섬유아세포에 연속적으로 수일간 처리하면 IL - 6의 분비가 단계적으로 감소하였으나 mRNA level에서는 변화가 없음을 확인하고 IL - 6의 분비량의 변화는 후전사 단계(post - transcriptional level)에서의 조절일 것으로 추정하였다.

Murakami 등[16]은 사람의 잇몸 섬유아세포를 림프계 세포와 함께 배양하면 IL - 1β mRNA의 생성을 볼 수 있었고, IL - 6 및 IL - 1α의 생성도 증가되었다고 보고한 바 있다. 이번 실험에서는 정상세포군에서 주로 IL - 1β의 발현이 확인되어 환자군에서 주로 발현되는 IL - 6와 IL - 1β의 역상관을 추정할 수 있을 것으로 생각되며 향후 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 실험의 정상세포군에서 주로 발현된 IL - 6는 표적세포의 상태에 따라 여러가지 기능을 하는 것으로 잘 알려져 있는데 쥐의 폐섬유아세포(Fib2 - T)에서는 autocrine growth factor인 것으로 밝혀졌다.[10] 그러나 NIH/3T3 쥐의 섬유아세포에서는 성장을 억제하는 것으로 나타나 IL - 6의 이중효과를 짐작하게 한다. 이러한 효과는 폐포 섬유아세포의 경우에는 이형성 아군(heterogeneous subpopulation)으로 구성되어 있기 때문으로 추정되기도 한다. Shahar 등[17]은 유육종증환자와 폐 미만성 간질성 섬유증환자의 폐포섬유아세포에서 IL - 6 분비정도를 비교하여, 폐 미만성 간질성 섬유증환자에 비해 유육아종 환자의 섬유아세포가 보다 많은 양의 IL - 6를 분비하며, 여기에 IL - 6의 단클론 항체를 처리하면 유육아종 환자의 경우에는 섬유아세포의 증식능력이 증가되는데 비해 폐 미만성 간질성 섬유증환자의 경우에는 억제되므로 섬유화과정에서 IL - 6가 주된 역할을 하는 것으로 추정하였다. 본 실험에서 IL - 6는 환자세포군에 비해 정상세포군에서 주로 mRNA발현을 볼 수 있어 섬유아세포가 정상적인 기능을 하는데 IL - 6가 관여함을 보여 주는 것으로 생각되었다.

Dongari 등[18]은 사람 구강 섬유아세포를 두 종의 박테리아로 자극하면 IL - 1β의 생성은 억제되고, 동시에 IL - 6 및 IL - 8의 생성은 증가하므로 구강내 염증반응 유발에 이 두 종의 cytokine이 관여하는 것으로 추측하고 있다. 또 김 등[19]도 대장상피세포주에 이질아메바를 노출시키면 감염초기부터 IL - 8의 mRNA의 발현이 유도되는 것으로 보아 IL - 8에 의해 염증반응이 유발될 가능성이 있는 것으로 보고하였다. 본 실험에서도 IL - 8은 정상세포군 및 환자세포군의 각 대조군에서는 발현되지 않다가 LPS나 집먼지 진드기 항원으로 자극하면 발현되는 양상을 보였다. 특히 환자세포군을 LPS로 처리하면 많은 양의 mRNA를 발현시키는 것으로 미루어 IL - 8이 IL - 6와 더불어 알레르기성 비염의 염증반응 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 사료되었다.

GM - CSF는 실험한 어느군에서나 뚜렷이 관찰되었으나 그 중 정상인 섬유아세포를 진드기 항원으로 자극하였을 때의 반응이 가장 미약하였다. 알레르기성 질환이나 염증성 질환에 대한 GM - CSF의 역할은 아직 밝혀져 있지 않으나, 본 실험에서는 전 실험군에 걸쳐 mRNA level에서 발현되는 것으로 볼 때 어떤 방식으로든 염증반응 및 섬유화과정에 관여할 것으로 추측된다.

결 론

통년성 알레르기성 비염 환자와 정상인의 하비갑개에서 유래한 섬유아세포에서 발현되는 일부 cytokine의 분비양상 및 분비정도를 알아보기 위하여 IL - 1α, IL - 1β, IL - 6, IL - 7, IL - 8 및 GM - CSF의 mRNA를 RT - PCR로 실험한 결과, IL - 1β, IL - 6 및 IL - 8 등이 집먼지 진드기 항원으로 인한 알레르기성 비염의 염증반응 및 섬유화를 유발하는 매개인자로 작용할 것으로 생각되었다.

중심 단어 : 집먼지 진드기 · 알레르기성 비염 · 섬유아세포 · 사이토킨 · mRNA.

REFERENCES

1) Thomas AE, Platts-Mills, Alaine L de Weck. *Dust mite allergens and asthma-A worldwide problems. J Allergy Clin Immunol 1989;83:416-27.*
2) Ree HI, Jeon SH, Lee IY, Hong CS, Lee DK. *Fauna and geographical distribution of house dust mites in Korea. Korean J Parasitol 1997;35:9-17.*
3) Cooper KD, Hammerberg C, Baadsgaard O. *IL-1 activity is reduced in psoriatic skin. Decreased IL-1 α and increased nonfunctional IL-1 β J Immunol 1990;144:4593-603.*
4) Ohta Y, Katayama I, Funeto T. *In situ expression of mess-*

enger RNA of interleukin-1 and interleukin-6 in psoriasis. Arch Derm Res 1991;283:351-6.

5) Hakkinen L and Larajava H. *Characterization of fibroblast clones from periodontal granulation tissue in vitro. J Dent Res 1992;71:1901-7.*
6) Phipps RP, Penny DP, Keng P, *et al. Characterization of two major populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology anddiscor-dant display of Thy1 and class II MHC. Am. J Respir Cell Mol Biol 1989;1:65-74.*
7) Derdak S, Penny D, Keng P, Felch M, Brown D, Phipps RP. *Collagen and fibronectin production by Thy 1^{+} and Thy 1^{-} lung fibroblast subpopulations. Am J Phys 1992; 263:283-90.*
8) Korn JH, Torres D, Downie E. *Clonal heterogeneity in the fibroblast response to mononclear cell-derived mediators. Arthritis Rheum 1984;27:174-7.*
9) Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. *Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. overproduction of IL-6 by fibroblasts cultures from attacked skin sites of patients with scleroderma. J Rheum 1992;19:1207-11.*
10) Fries KM, Felch ME, Phipps RP. *IL-6 is a autocrine growth factor for murine fibroblast subset. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;11:552-60.*
11) Hashimoto T, Tanaka I, Kamimura K. *Effects of temperature and relative humidity on the prevalence pattern of the house dust mites. Dermatophagoides farinae and D. pteronyssinus. Jpn J Sanit Zool 1993;44:185-95.*
12) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AF, Randall RJ. *Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-75.*
13) Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. And biochem 1987;162:156-9.*
14) Fries KM, Blieden T, Looney RJ, *et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. Clin Immunol Immunopathol 1994;72: 283-92.*
15) Carty SE, Buresh CM, Norton JA. *Decreased IL-6 secretion by fibroblasts following repeated doses of TNF-α or IL-1 α post-transcriptional gene regulation. J Surg Res 1991;51:24-32.*
16) Murakami S, Okada H. *Lymphocyte-Fibroblast interactions. Crit. Rev Oral Biol Med 1997;8:40-50.*
17) Shahar I, Fireman E, Topilsky M, *et al. Effect of IL-6 on alveolar fibroblast proliferation in interstitial lung diseases. Clin Immunol Immunopathol 1996;79:244-51.*
18) Dongari-Bagtzoglou A, Ebersole JL. *Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblast following bacterial challenge. J Periodont Res 1996;31:90-8.*
19) Kim JM, Jung HC, Im K, Cho YJ, Kim CY. *Interleukin-8 gene expression in the human colon epithelial cell line, HT-29, exposed to Entamoeba histolytica. Korean J parasitol 1995;33:357-64.*