

Macrophage Inflammatory Protein-1 α 의 造血幹細胞 억제 작용에 관한 실험적 연구

전북대학교 치의학과 구강악안면외과학교실

서기항 · 고승오 · 신호근 · 김오환

IN VITRO STEM CELL SUPPRESSION OF MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN-1 α

Ki-Hang Suh, D. D. S., Seung-O Ko, D. D. S., Hyo-Keun Shin, D. D. S.,
Oh-Whan Kim, D. D. S.

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Chonbuk National University

The proliferation of bone marrow stem cell compartment is thought to be under both positive and negative controls by cytokines and colony stimulating factors. Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) has been assessed for its potential to protect hematopoietic stem cells from cytotoxic effects of a cycle-specific antineoplastic agents. We have tested the ability of MIP-1 α to suppress the proliferation of stem cell line Du.528.101 in variety of active status by using [3 H]-thymidine incorporation test.

The results were as follows.

- 1. The effect of MIP-1 α on steady-state Du.528.101 cells represented the cell growth suppression at the concentration of 10, 50, 100nM of MIP-1 α ($P < 0.01$).*
- 2. MIP-1 α stimulated the proliferation of Du.528.101 cells previously treated with IL-1 at the concentration of 5, 50nM of MIP-1 α ($P < 0.01$).*
- 3. The suppression effect of MIP-1 on Du.528.101 cells at the concentration of 5, 50nM was shown when cells were treated with MIP-1 α before activating with IL-1 β ($P < 0.01$).*
- 4. The growth rate of synchronized cells were slower than that of non-synchronized ones, and MIP-1 α represented the similar suppression effect on both synchronized and non-synchronized cells.*

I. 서 론

Macrophage inflammatory protein(MIP)은 염증과 성장의 조절기능을 하는 활성유도 cytokine으로서 새롭게 인식되는 "chemokine"들이다.^{1,2,3)} MIP-1 α 는 최초로 내독성으로 자극된

대식세포의 조절된 배지 (conditioned media)에서 분리되었다.⁵⁾ 이 MIP-1 α 는 낮은 분자량의 heparin 결합의 단백질 이종 구조물로서 두개의 Peptide 즉 MIP-1 α 와 MIP-1 β 로 구성되어있다.^{4,6,7)} MIP-1 α 의 지금까지 보고된 생물학적인 활동을 본다면, 局所的인 염증반응에 관여하며,

또한 prostaglandin과는 무관한 발열 반응을 나타내며, 창상치유에 중요한 역할을하고, 그리고 骨髓幹細胞(stem cell)와 미성숙 전구세포(progenitor cell)의 성장억제 작용을 한다고 생각되었다.^{8, 10, 11)}

造血系는 분화단계에 따라 가장 초기의 multipotent 幹세포, 중간단계의 전구세포, 그리고 성숙한 세포의 세가지로 이루어져 있다.¹⁴⁾ 정상적인 steady-state조건에서는 骨髓로부터 성숙한 혈액세포의 방출은 幹세포와 전구세포의 분화와 성장에 의하여 조절되며 각종 cytokines과 colony stimulating factors(CSFs)가 이에 영향을 준다. 보통 골수내의 幹세포들은 90% 이상이 세포주기가 G₀/G₁ 단계, 즉 정지된 상태를 유지하고 있다가 stress를 받거나, 화학물질 및 방사선등에 의해 혈액세포가 손상을 받게되면 이를 補充하기 위해 幹細胞가 활동성의 세포주기로 triggering되었다가, 정상으로 회복되면 다시 G₀/G₁ 단계로 돌아온다.

抗癌劑에 의한 세포독성은 비특이적으로 나타나지만, 특히 세포성장이나 전환이 빠른 세포에 대하여 그 손상정도가 크게 나타난다. 따라서 끊임없이 혈액세포를 供給하고 있는 骨髓와 같은 組織은 중요한 목표물이 되어, 골수기능저하는 抗癌劑의 가장 심각한 부작용으로 여겨져 왔다. 게다가 幹세포는 손상받은 혈액세포를 供給하기 위하여 분화와 성장이 매우 빠르게 일어나게 되어 抗癌劑의 幹세포에 대한 세포 독성은 더욱 커지게 됨으로써, 회복 불가능한 骨髓 기능저하를 유발하게 된다. 抗癌劑의 특성상 광범위하고 지속적인 약물투여가 암세포 제거에 가장 효과적인 방법임에도 불구하고 이러한 骨髓기능의 저하는 약물의 효과적인 투여를 어렵게 하였다. 이런 문제를 해결키 위한 여러방법들이 모색되어 왔는데 간헐적인 약물투여방법, granulocytemacrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)등의 cytokine의 투여로 인한 중성자구의 생성촉진등이 그 방법들이나 아직 骨髓기능저하를 보충할 만한 효과적인 방법이 개발되지 못하였다. 幹세포의 G₀/G₁ 단계에서 방출되는 것은 骨髓内の negative 및 positive regulator들에

의해 조절된다는 실험적 結果들이 있어 왔고, 최근 MIP-1 α 가 이중 negative 조절인자로서의 역할을 함으로써 幹세포가 정지된 상태로 유지하는데 기여한다고 보여진다.

Broxmeyer,³⁾ Dunlop,²⁰⁾ Cooper²⁵⁾ 등은 in vivo, in vitro에서 MIP-1 α 의 骨髓억제 또는 骨髓방어 효과에 대하여 보고하였다. 즉, MIP-1 α 는 造血 幹세포의 강력한 성장억제능력을 갖고 있다 하겠다.^{15, 16, 17, 18, 19, 26)} 따라서 抗癌劑 세포독성에 의한 혈액세포의 손상과 이에 다른 幹세포의 활성화 및 회복 불가능한 骨髓기능저하를 막기 위하여 幹세포를 G₀/G₁ 단계에 묶어둘 수 있는 cytokin인 MIP-1 α 를 이용한다면 효율적인 抗癌劑 투여를 위한 보조치료요법으로서 응용이 가능하다고 사료된다.

본 연구에서는 골수 간세포주인 Du. 528. 101 cell을 이용하여 활성화 상태에 따른 MIP-1 α 의 骨髓억제효과를 관찰하였으며, 抗癌劑의 보조약물로서 응용코저 임상전단계적 실험으로서 ³H]-thymidine test를 시행하였다. 또한 幹세포의 증식상태에 따라 MIP-1 α 의 성장억제 효과에 어떠한 변화가 있는지를 아울러 실험함으로써 MIP-1 α 의 투여시기에 따른 骨髓방어 효과의 정도를 관찰하고자 하여 다음과 같은 실험적 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포배양

골수 간세포주인 Du. 528. 101 세포를 10%의 fetal calf serum(FCS, Hyclone), 100ug/ml의 penicillin과 100ug/ml의 streptomycin (Gibco, U. S. A)가 포함된 RPMI 1640 media(Gibco, U. S. A)에서 5%의 CO₂, 100%의 습도하에 37 °C로 배양하였다.

2. Recombinant (r) MIP-1 α 의 제조 (Fig. 1)

유전자 재조합에 의한 construct의 제작과 animal cell transformation 및 rMIP-1 α 의 순수 분리과정은 미국 Indiana의대의 Dr. Kwon's lab과 전북치대 약리학교실에서 공동시행하였

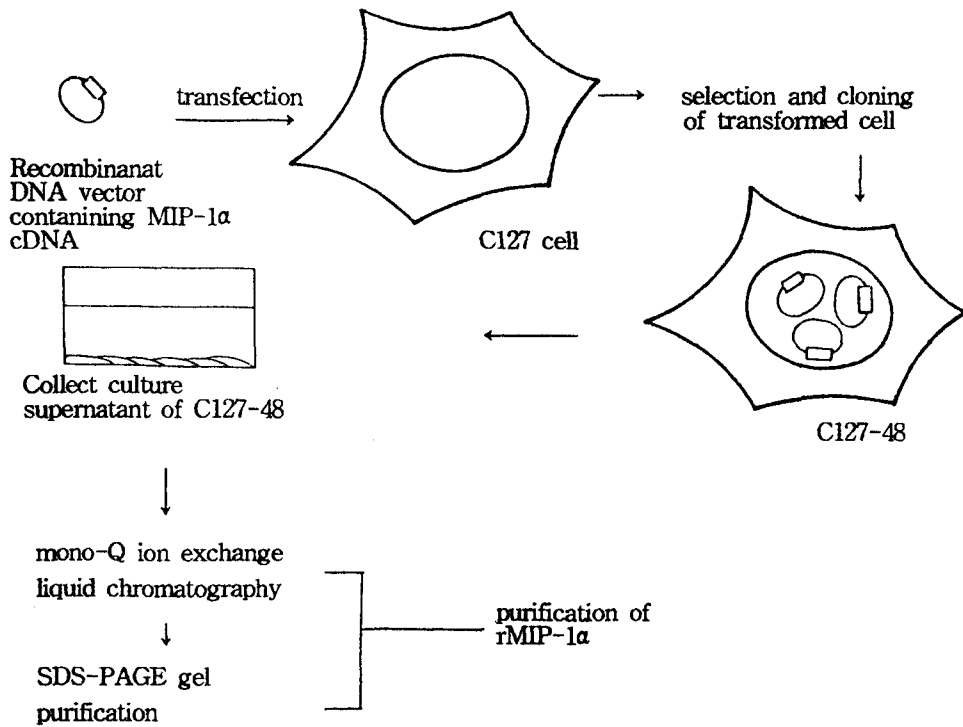


Fig. 1. Scheme of preparation of recombinant MIP-1α

다. 즉, metallothionein promotor가 포함된 bovine papilloma viral vector(pBMT3X)의 Xho I Cloning site에 MIP-1α cDNA를 삽입하고, 이 construct를 mouse fibroblast cell line인 C127 cell에 dimethylsulfoxide(Sigma) shock를 주어 calcium phosphate coprecipitation 방법으로⁵⁴⁾ transformation 시켰다. cadmium chloride에서 배양하면서 stable transformant인 C127-48 cell을 cloning하여, 배양상청액으로부터 rMIP-1α를 ion exchange liquid chromatography 및 SDS-PAGE gel purification 과정을 거쳐 순수한 rMIP-1α를 얻었다.^{23,24)}

3. $\pm^3\text{H}$ -thymidine incorporation test

96 microwell plate에 $1-6 \times 10^5$ cell/well씩 분주하여 MIP-1α 및 그 외의 다른 필요한 처리를 한 다음, $\pm^3\text{H}$ -thymidine(New England

Nuclear. U. S. A) $1\mu\text{Ci/well}$ 을 첨가하여 12시간 작용하였다. 반응이 끝난후, glass fiber filter를 이용하여 cell harvester로 harvest 한 다음 세포내로 편입된 $\pm^3\text{H}$ -thymidine을 liquid scintillation counter로 측정하였다.

4. Steady-state의 Du. 528.101 세포성장에 대한 MIP-1α의 작용

96 microwell plate에 10^5 cell/well씩 분주하여, 12시간 동안 CO_2 incubator stabilize시킨 후, MIP-1α를 0, 1, 10, 50, 100nM의 농도로 첨가한 다음 $\pm^3\text{H}$ -thymidine incorporation test를 시행하였다.

5. Interleukin(IL-1β)로 활성화된 DU. 528.101 세포의 성장에 미치는 MIP-1α의 작용

(1) IL-1 β (Genzyme)10nM을 세포배양액에 첨가하여 72시간자극 시킨 후, MIP-1 α 0, 0.5, 5, 50nM을 더 첨가하여 3시간동안 반응시킨 다음 $\pm^3\text{H}$]-thymidine incorporation test를 시행함으로써, 이미 활성화된 Du.528.101에 대한 MIP-1 α 의 영향을 관찰하였다.

(2) MIP-1 α 의 작용후 세포활성을 일으켰을 때의 작용을 관찰하기 위하여, MIP-1 α 0, 0.5, 5, 50nM로 1시간 반응시킨 다음, IL-1 β 를 10 nM 첨가하여 3시간동안 세포를 자극시켜 $\pm^3\text{H}$]-thymidine incorporation test를 시행하였다.

6. Cell cycle를 synchronize시킨 Du.528.101의 성장에 대한 MIP-1 α 의 작용

FCS 없는 RPMI 1640 media에 Du.528.101 세포를 24시간 배양하여 세포 성장을 멈추게 한 후, 10% FCS와 MIP-1 α 0, 0.5, 5, 50nM 농도가 포함된 배양액으로 바꾸고, 6시간 후 $\pm^3\text{H}$]-thymidine incorporation test를 시행하였다.

III. 성 적

Mouse MIP-1 α cDNA를 fibroblast C127 cell에 transfection 시켜 cloning한 C127-48 cell의 배양상청액으로부터 rMIP-1 α 를 골수 간세포주인 Du.528.101에 steady-state에서 작용시켰을때, MIP-1 α 의 각 농도 (10, 50, 100

nM)에서 $\pm^3\text{H}$]-thymidine incorporation test를 시행한 결과 Du.528.101 cell의 성장 억제 효과를 보였다. ($P<0.01$)(Table 1) (Fig. 2)

IL-1 β 10nM을 세포 배양액에 첨가하여 72 시간 자극 시킨후, MIP-1 α 각 농도를 3시간 반응 시키고 $\pm^3\text{H}$]-thymidine incorporation test를 시행한 결과 0.5 nM에서는 통계적으로 유의성이 없었으나, 5, 50nM에서 세포의 성장 효과가 관찰되었다. ($P<0.01$)(Table 2) (Fig.3)

Table 3과 Fig.4는 MIP-1 α 의 각 농도를 Du.528.101 cell에 먼저 1시간 반응 시킨후, IL-1 β 를 10nM첨가하여 3시간동안 세포를 자극시켰을때는 5nM, 50nM에서 세포 성장에 대한 억제 효과가 관찰되었다. ($P<0.01$)

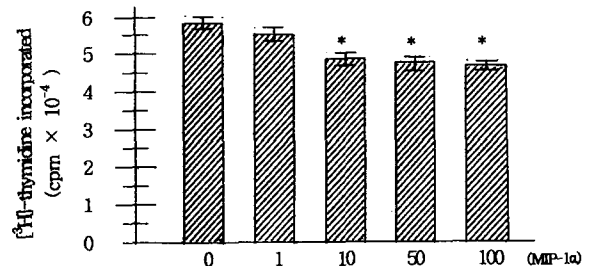


Fig. 2. Suppressive effect of MIP-1 α on the proliferation of steady-state Du.528.101 cells at the concentration of 10, 50, 100, nM(* $P<0.01$)

Table 1. Radioactivity incorporated into steady-state Du.528.101 cells.

MIP-1 α (nM)	[^3H]-thymidine incorporated (cpm $\times 10^{-4}$)
0	5.85 \pm 0.14
1	5.50 \pm 0.15
10	4.86 \pm 0.21*
50	4.75 \pm 0.12*
100	4.76 \pm 0.05*

Data was obtained by triplication.

* significantly different from control group

($P<0.01$, $F(4,10)=38.23$) by ANOVA and Scheffé test.

Table 2. Radioactivity incorporated into Du.528.101 cells which have been activated with IL-1 β for 72 hrs.

MIP-1 α (nM)	[³ H]-thymidine incorporated(cpm $\times 10^{-5}$)
0	3.82 \pm 0.02
0.5	3.81 \pm 0.18
5	4.75 \pm 0.11*
50	5.83 \pm 0.07*

Data was obtained by triplication.

* significantly different from control group
[P<0.01, F(3,8)=201.50] by ANOVA and Scheffé test.

Table 3. Radioactivity incorporated into Du.528.101 cells which have been preceded by treatment with various concentration of MIP-1 α .

MIP-1 α (nM)	[³ H]-thymidine incorporated(cpm $\times 10^{-5}$)
0	3.61 \pm 0.22
0.5	3.29 \pm 0.06
5	2.78 \pm 0.06*
50	2.22 \pm 0.21*

Data was obtained by triplication.

* significantly different from control group
[P<0.01, F(3,8)=42.51] by ANOVA and Scheffé test.

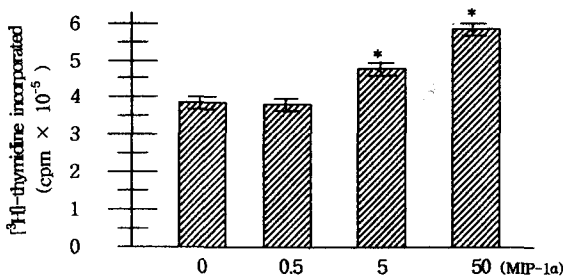


Fig. 3. Stimulating effect of MIP-1 α on the proliferation of Du.528.101 cells activated with IL-1 β for 72 hrs(*P<0.01)

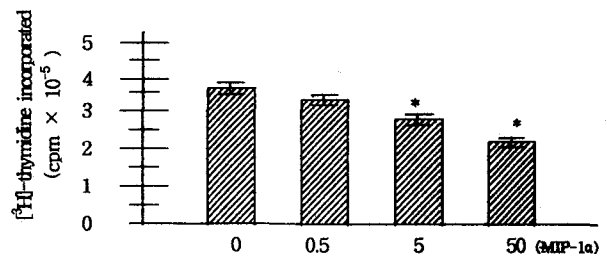


Fig. 4. Suppressive effect of MIP-1 α on the proliferation of Du.528.101 cells which have been treated before cell activation induced by IL-1 β (*P<0.01)

Table 4. Radioactivity incorporated into Du.528.101 cells of cell cycle-nonsynchronization and cell cycle-synchronization.

MIP-1 α (nM)	cpm $\times 10^{-5}$	
	(non-synchronized)	synchronized

Data was obtained by triplication.

- a, : significantly different from nonsynchronized control group ($P < 0.01$) by Student T-test.
 b, : significantly different from nonsynchronized control group ($P < 0.05$) by Student T-test.

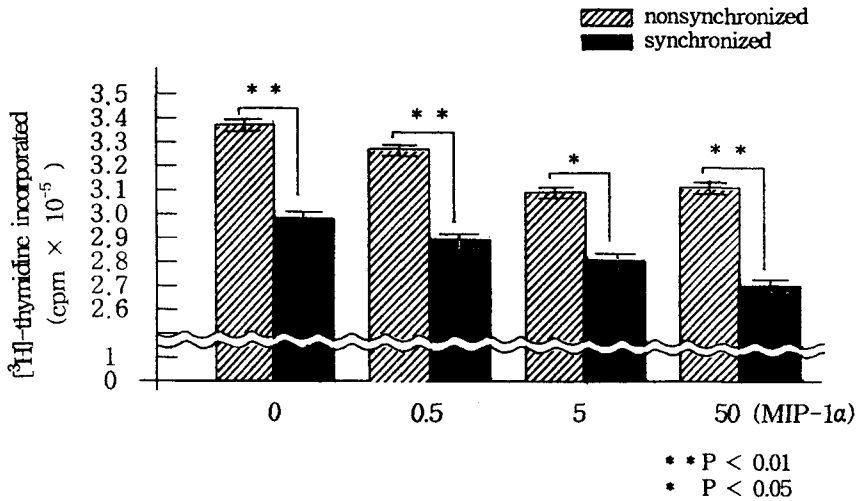


Fig. 5. No differences between MIP-1 α -induced suppression pattern of non-synchronized and synchronized Du.528.101 cells.

Table 4와 Fig. 5는 FCS가 없는 media에 Du. 528.101 cell을 24시간 배양함으로써 cell cycle을 멈추게 한후 10% FCS 와 MIP-1 α 각 농도로 바꾸어 6시간 반응 시켰을때, MIP-1 α 0.5nM ($P < 0.01$) 5, 50nM ($P < 0.01$)에서 Du. 528.101 cell의 성장 억제 효과가 관찰되었다.

IV. 고 찰

본 연구에 의하면 steady-state에서 MIP-1 α 가骨髓幹細胞에 대하여 성장억제효과를 갖고 있음을 보였다. (Table 1, Fig. 2) 정상적인 hematopoietic progenitor cell(HPC)는骨髓의

이식후에造血기능을 회복시키는幹세포와 관계가 있으며, steady-state시의造血中에는 서서히 증식한다. Dunlop(1992)등은 MIP-1 α 는幹세포 억제작용을 하며 사람의造血 전구세포의 증식을 가역적으로 억제할 수 있다는 것을 보고하였다.²⁶⁾ Acute myelogenous leukemia (AML)환자의 말초혈액세포를 사용하여 thymidine suicide 기법으로 연구한 결과 rh MIP-1 α 가 초기와 성숙된 AML전구세포를 억제하는 의미있는 결과를 나타내었다.²⁷⁾ 이는 AML 전구세포가 증식단계로 가는것을 방해한것으로 MIP-1 α 가 AML의 치료에 어떤 임상적인 잇점을 갖을 수도 있다는 가능성을 나타낸 것이기도 하다. Transforming growth factor- β (TGF β)와

MIP-1 α 는 造血幹細胞의 증식의 강력한 억제작용을 한다고 알려져 있다.^{31,32)} TGF와 MIP-1 α 는 서로다른 유전자 집단이다. 즉 하나는 chemokine 집단, 다른 하나는 TGF β 집단으로서 서로 관계가 없지만, 둘다 造血세포의 성장에 증폭되는 생물학적인 역할을 하고 있다. TGF β 는 조절기능에 다기능적인 효과를 갖는 것으로 나타났다.^{30,33)}

또한 chronic myelogenous leukemia(CML)의 초기의 전구세포는 TGF에 정상적으로 억제되나, MIP-1 α 에는 반응이 없었다고 하였다.³⁴⁾ MIP-1 α 의 骨髓 전구세포에 대한 MIP-1 β 의 영향에 대하여 MIP-1 β 와 MIP-1 α 가 4:1(200 mg/ml:50mg/ml)의 비율에서는 MIP-1 α 의 骨髓억제 효과를 완전히 차단하였으며 2:1의 비율에서는 부분적으로 차단되었고 1:1의 비율에서는 MIP-1 α 의 骨髓억제 효과에 하등의 영향을 주지 않았다는 보고도 있다.³⁾

본 논문에서 IL-1 β 로 骨髓幹細胞를 자극하여 분화와 성장을 유도해 놓은다음, MIP-1 α 로 처리 했을때는 오히려 세포의 성장이 촉진되는 결과를 보여주었다(Table 2, Fig. 3). 이는 MIP-1 α 가 분화가 안된 幹細胞에는 세포 성장 억제효과를 나타내지만, 분화가 진행된 세포에는 성장촉진효과를 나타낸것을 알수 있다. 그러나 IL-1 β 로 활성화시키기 전에 MIP-1 α 로 미리 처리 했을때는 뚜렷한 MIP-1 α 의 骨髓억제 효과를 나타내었다(Table 3, Fig. 4). Fibbe(1988)등은 HPC의 증식에 대한 IL-1 β 의 효과를 알기위한 연구에서 IL-1 β 가 HPC의 수를 감소시키지 않고 간질세포(stromal cell)로부터 colony 자극 활동의 유도와 함께 HPC의 증식을 자극 하므로써 장기간의 骨髓배양에서 세포의 회복을 향상시켰다고 하였다.²²⁾ 이것은 또한 IL-1 β 가 造血기전에 중요한 조절인자가 됨을 나타낸 것이기도 하다.

MIP는 局所的인 염증반응을 보이는데,^{9,35)} 쥐의 발바닥에 주사했을때 MIP-1 α 는 심한 염증 반응을 보였으며,⁴⁵⁾ 발열 반응에 관여할 가능성은 있으나 prostaglandin과는 무관한것처럼 보인다.⁵⁾ 그외에도 MIP-1 α 는 상피의 각화세포의 증식을 억제하며,³⁶⁾ 기생충 감염이나 알

러지 질환시에 호산구의 이동을 유도하며,³⁷⁾ 정자생성동안에 유사분열과 감수분열중 DNA 합성에 局所的인 조절기능을하고,⁴⁴⁾ 알러지성 천식의 폐에서의 역할에 대한 가능성을 갖고 있기도하다⁵⁰⁾ 또한 MIP-1 α 는 호염기세포와 비만세포의⁴⁵⁾ 새로운 활성화인자로서,⁴²⁾ MIP-1 α mRNA가 LPS(lipopolysaccharide)에 의하여 單球(monocyte)에서 유리 될수 있다고 하였다.⁴³⁾ LPS는 gram 음성균의 세포벽의 구성성분으로서 사람의 말초혈액의 단핵세포에서 IL-1 β 와 TNF를 합성하도록 유도하며,⁴⁰⁾ PMN에 LPS가 첨가되었을때는 MIP-1 α 가 생성될수 있음을 보였다.^{16,32,38)} 이는 MIP-1 α 는 호중구, 단핵식세포, 림프구등에 chemokinetic 하다는 것을 보이며, 백혈구 보충과 섬유화에도 관여한다고 하였다.^{1,6)} CSF는 骨髓 전구세포의 증식을 촉진하고 성숙한 중성구를 骨髓의 저장소로부터 방출한다.²¹⁾ GM-CSF의 chemoprotective 효과를 살펴보면 쥐에게 세포독 성약물이나 방사능을 치사량 이하로 주기전에 GM-CSF를 반복적으로 주사 했을때, 骨髓機能의 복구가 가속화 되었다.⁴⁸⁾ 그러나 치사량의 방사능을 주고서 3시간후 단 한번의 복강내로의 GM-CSF를 주입시에는 GM-CSF가 어떤 방사능방어 효과를 가지지 않았다.⁴⁹⁾ 그럼에도 불구하고, GM-CSF는 적절한 방사능 방어를 위해서 rhIL-1 β 와 rhTNF-의 적당한 용량과 함께 길항작용을 할수 있다. 자가 骨髓 이식후 rh GM-CSF의 지속적인 주입을 한 방사능이 조사된 rhesus원숭이에서 중성자구와 혈소판의 지속적이고 가속적인 회복이 관찰 되었다.^{52,53)} Lord(1992)등은 MIP-1 α 가 hydroxyurea 같은 cycle-specific 약물로 부터 HPC를 방어하는 潛在能力이 있다는 실험결과를 발표하기도 하였다.²⁸⁾ IL-1의 활동을 抑制시키는 인자들이 熱病患者나 骨髓白血病 환자의 혈장과 尿에서 存在한다고 발표되었고,¹³⁾ IRAP(IL-1 β receptor antagonist)에 의해 처리된 IL-1 β 의 조절기능은 T 림프구의 활동을 감소시키는 것 같지는 않으나, 白血球 보충에 관계하는 chemokine의 생성을 조절할 수 있다고 하였다.^{12,41)}

Mantel(1993)등은 실험을 통해 骨髓 전구세

포가 aggregation된 MIP-1 α 에는 비활동적이며, 단량체의 MIP-1 α 에는 억제작용이 활발했다고 하였으며 세포주기가 DNA 합성기때 이 억제작용이 시작된다고 하였다.²⁹⁾ 이는 MIP-1 α 의 중합은 단량체(monomer)의 MIP-1 α 의 骨髓抑制 효과를 제한 할수도 있음을 보여준다. 즉 합성된 MIP의 효과는 항원 특이성인 T 세포의 증식을 억제하는것 같으며,²⁴⁾ MIP-1 α 는 T 세포 표면에서 CD₄와 CD₈ 발현에 억제조절인자가 된다.^{11,47)} 류마티스성 關節炎 환자에서 분리한 활액을 단핵세포에서 reverse transcriptase PCR과 면역침전 방법을 통하여 MIP-1 α 의 증가를 보이기도 하였다.^{39,46)}

또한 본 논문에서는 骨髓 幹細胞를 synchronized시켰을때 (FCS를배양액에서 제거하면 Go phase에서 멈추고 FCS를 다시 배양액에 넣어 주면 G1 phase에서 S phase로 동시에 진행됨) MIP-1 α 의 효과가 증대될 것을 기대하였으나 non-synchronized된 대조군에 비하여서 차이를 볼 수 없었다. 이는 synchronized 된 세포주가 non-synchronized세포주에 비하여 成長速度가 전반적으로 느린것으로 보아 G₀/G₁ phase에서 상당기간 머물다가 S phase로 들어간 것으로 보인다(Table4, fig. 5).

이상의 결과를 종합해 볼때 MIP-1 α 의 骨髓抑制效果는 幹細胞의 활동적인 상태에 따라 달라질수 있으므로 分化/成長이 유도 되기 전에 抗癌劑가 투여되어야 效果의이며, 이미 세포의 成長이 유도된 후에는 오히려 幹세포의 成長이 促進 됨으로써 骨髓防禦 效果에 방해를 받을수 있다. 이와같이 MIP-1 α 의 造血細胞의 成長抑制 작용을 통하여 MIP-1 α 의 각농도에 따라 幹細胞가 선택적으로 抑制되는 것을 비교하여 抗癌劑 투여에 기준을 정할 수 있으며, 骨髓 幹세포의 회복을 도모하는데 抗癌劑 투여시 보조치료요법으로서의 效果를 기대 할 수 있는 리라 사료된다.

V. 결 론

骨髓 幹세포(bone marrow stem cell)의 증식은 cytokines과 colony stimulating factor에

의하여 전적으로 지배를 받는다고 생각되고 있다.

MIP-1 α 는 cycle-specific 한 抗癌劑의 투여시에 나타나는 세포독성의 영향으로 부터 造血 幹세포들을 방어할 수 있는 잠재능력이 있다고 평가되어왔다.

MIP-1 α 의 骨髓 幹세포에 대한 증식을 억제하는 능력을 알아보기 위하여, ³[H]-thymidine incorporation 기법을 사용하여 다양한 상태에서의 Du.528.101 세포주에 대한 MIP-1 α 의 영향을 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Steady-state 의 Du.528.101 세포주에 대한 MIP-1 α 의 반응은 MIP-1 α 각 농도에서 (10, 50, 100nM) 세포성장억제 효과를 나타내었다(P<0.01).
2. IL-1 β 로 활성화된 Du.528.101 세포주의 성장에 대하여는 MIP-1 α 가 5, 50nM 에서 오히려 성장을 촉진하는 효과가 관찰되었다(P<0.01).
3. IL-1 β 로 활성화 시키기전에 MIP-1 α 로 미리 작용시켰을때의 Du.528.101 세포주에 대해 MIP-1 α 5, 1 50nM 에서 성장억제 효과가 관찰되었다(P<0.01).
4. Synchronized 세포주가 non-synchronized 세포주에 비하여 성장속도가 전반적으로 느렸으며, MIP-1 α 가 synchronized 와 non-synchronized 세포주에 비슷한 양상의 억제작용을 나타내었다.

참고문헌

1. Urs Widmer, K.R.Manogue, A.Cerami, B. Sherry ; Genomic cloning and promotor analysis of macrphage inflammatory-protein(MIP)-2, MIP-1 α and MIP-1 α , members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines ; J. of Immun., June 1. vol.150, No.11, 4996-5012, 1992.
2. B.Sherry, A.Cerami ; Small cytokine superfamily ; Curr. opinion Immun., Feb.,3 (1),55-60. 1991.

3. H.E. Broxmeyer, B.Sherry, S.Cooper, et al. ; Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 abrogates the capacity of MIP-1 α to suppress progenitor cell growth ; J. of Immun., Oct.15, vol.147, No.8, 2586-94, 1991.
4. T.J.Fahey III, K.J.Tracey, P.Tekamp-Olson, et al. ; MIP-1 α modulates macrophage function ; J. of Immun., May 1, No.1 vol. 148, 2764-69, 1992.
5. G.Davatelis, S.D.Wolpe, B.Sherry, J.M.Dayer, R.Chicheportiche, A.Cerami ; MIP-1 : A Prostaglandin-independent endogenous pyrogen ; Science, vol. 243,1066-8, 1989.
6. R.E.Smith, R.M.Strieter, et al. ; Production and function of murine MIP-1 α in bleomycin-induced lung injury ; J. of Immun., Aug. 12, 153, 4704-12, 1994.
7. B.Sherry, P.Tekamp-Olson, C. Gallegos, D. Bauer, G.Davatelis, et al. ; Resolution of two components for MIP-1 α and cloning and characterization of one of these components, MIP- ; J.Exp. Med., Dec.1, 168 (6), 2251-9, 1988.
8. B.S.Kwon, D.P.Kestler, Z.Eshhar, K.O.Oh, M.Wakulchik ; Expression characteristics of two potential T-cell mediator genes ; Cell Immun., July, 121, 414-422, 1989.
9. S.D.Wolpe, G.Davatelis, B.Sherry, et al. : MIP-1 α and 2 : Members of a novel superfamily of cytokines ; FASEB Journal, Dec., vol3, 2565-73, 1989.
10. K.Miyazawa, C.Mantel, Li Lu, D.C. Morrison, H.E. Broxmeyer ; Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions : Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage differentiated HL-60 cells ; J. of Immunology, Jan.15, vol.146, 723-729, 1991.
11. Z.Zhou, Y.J.Kim, K.Pollok, J.Hurtado, J.K. Lee, H.E.Broxmeyer, B.S.Kwon ; MIP-1 α rapidly modulates its receptor and inhibits the anti-CD₃ mAb-mediated proliferation of T lymphocytes ; J.of Immun., Oct.15, Vol.151, 433-41, 1993.
12. N.W.Lukacs, S.L.Kunkel, M.D. Burdick, P. M Lincoln, R.M.Strieter ; Interleukin-1 receptor antagonist blocks chemokine production in the mixed lymphocyte reaction ; Blood, Dec.15, Vol.82, No.12, 3688-74, 1993.
13. E.Fischer, K.J.Van Zee, M.A.Marano, C.S. Rock, et al. ; Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease ; Blood, May 1. No.9, Vol. 79, 2196-2200, 1992.
14. G.J.Graham, E.G.Wright, R.Hewick, S.D. Wolpe, et al. ; Identification and characterization of an inhibitor of hemopoietic stem cell proliferation ; Nature, March, Vol. 344, 442-444, 1990.
15. G.J.Graham, J.Mackenzie, S.Lowe, M.L. Tsang, et al. ; Aggregation of the chemokine MIP-1 α is a dynamic and reversible phenomenon. Biochemical and biological analyses ; J.Bio-Chem., Feb.18, 269(7), 974-8. 1994.
16. G.J.Graham, L.Zhon, J.A.Weatherbee, et al. ; Characterization of a receptor for MIP-1 α and related proteins on human and murine cells ; Cell-Growth-Differ. Mar, 4(3) ; 137-146, 1993.
17. B.I.Lord, C.M.Heyworth, L.B.Woolford ; MIP : its characteristics, biological properties and role in the regulation of hemopoiesis ; Int-J-Hematol., June, 57(3), 197-206, 1993.
18. H.E.Broxmeyer, B.Sherry, S.Cooper, L.Lu, R.Maze, et al. ; Comparative analysis of the human MIP family cytokine on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression ; J.of Immun., Apr.15, 150

- (8), 3448–58, 1993.
19. G.J.Graham, M.G.Freshney, D.Donaldson, I.B.Pragnell ; Purification and biochemical characterisation of human and murine stem cell inhibitor ; *Growth-Factors*, 7(2), 151–60, 1992.
 20. D.J.Dunlop, E.G.Wright, S.Lorimore, et al. ; Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of SCI/rh MIP-1 In vivo ; *Blood*, May 1, Vol. 79, No. 9, 2221–5, 1992.
 21. M.chang, T.Suen, S.M.Lee. et al. ; TGF-1 , MIP-1 α and IL-8 gene expression is lower in stimulated human neonatal compared with adult mononuclear cells ; *Blood*, Jul.1, 84(1), 118–24, 1994.
 22. W.E.Fibbe, H.M Goselink, G.V.Eden, J.V. Damme, et al. ; Pro-liferation of myeloid progenitor cells in human long-term bone marrow cultures is stimulated by IL-1 β ; *Blood*, Oct., Vol.72, No. 4, 1242–7, 1988.
 23. K.W.Oh, Z.Zhou,K.K.Kim, H.Samatana, M. Fraser, et al. ; Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein-1 ; *J. of Immun.*, Nov.1, No.9, Vol.147, 2978–83, 1992.
 24. P.E.Harris, A.Maffei, Z.Liu, et al. ; Naturally processed cytokine derived peptide bound to HLA-Class II molecules ; *J. of Immun.*, Dec. 1, Vol. 151, 5975–83, 1993.
 25. S.Cooper, C.Mantel, H.E. Broxmeyer ; Myelosuppressive effects in vivo with very low dosages of monomeric recombinant murine MIP-1 α ; *Exp-Hematol*, Feb., 22 (2), 186–93, 1994.
 26. H.E.Broxmyer, B.Sherry, L.Lu, S.Cooper, et al. ; Myelopoietic enhancing effects of murine MIPs and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor cells ; *J-Exp-Med*, Nov.1, 170(5), 583–94, 1989.
 27. A.Ferrajolo, M.Tolpaz, et al. ; Inhibition of acute myelogenous leukemia progenitor proliferation by MIP-1 ; *Leukemia*, May, 8(5), 798805, 1994.
 28. B.I.lord, T.M.Dexter, J.M.Clements, et al. ; MIP protects multipotent hematopoietic cells from the cytotoxic effects of hydroxyurea in vivo ; *Blood*, May.5, Vol. 79, No.10, 1992.
 29. C.Mantel, Y.T.Kim, W.Cooper, B.Kwon, H. E.Broxmeyer ; Polymerization of murine MIP-1 α in activates its myelo-suppressive effects in vitro : the active form is a monomer ; *Proc-Natl-Aca-Sci-U.S.A.* ; Mar. 15, 90(6), 2232–6, 1993.
 30. H.E.Broxmeyer, B.Sherry, L-Lu, S.Cooper, K.O.Oh. et al. ; Enhancing and suppressing effects of recombinant murine MIP on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells ; *Blood*, Sep.15, Vol.76, No.5, 1100–16, 1990.
 31. J.Maltman, I.B.Pragnell, G.J.Granam ; TGF beta ; is it a down- regulator of stem cell inhibition by MIP-1 α ; *J-Exp- Med*, Sep.1, 173(3), 925–32, 1993.
 32. T.Kasama, R.M.Strieter, et al. ; Expression and regulation of human neutrophil-derived MIP-1 α ; *J-Exp-Med*, Jul.1,178 (1), 63–72, 1993.
 33. J.R.Keller, S.H.Bartelmez, et al. ; Distinct and overlapping direct effects of MIP-1 α and TGF-on hematopoietic progenitor/ stem cell growth ; *Blood*, Oct.1, Vol.84,No. 7, 2175–81, 1994.
 34. T.L.Holyoak, M.G.Freshney, et al. ; Contrasting effects of rhMIP-1 and TGF-1 on chronic myeloid leukemia progenitors in vitro ; *Stem-Cell-Dayt.*, Oct.11, Supp.3, 122–8, 1993.
 35. S.D.Wolpe, G.Davatelis, B.Sherry, et al. ; Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neut-

- rophil chemokinetic properties ; *J-Exp-Med*, Feb. Vol.167, 570–81, 1988.
36. E.K.Parkinson, G.J.Graham, et al. ; Hemopoietic stem cell inhibitor(SCI/MIP-1 α) also inhibits clonogenic epidermal keratinocyte proliferation ; *J-Invest-Dermatol.*, Aug., 102(2), 113–7, 1993.
 37. A.Rot, M.Krieger, T.Brunner et al. ; RANTES and MIP-1 α induce the migration a activation of normal human & eosinophil granulocytes ; *J-Exp-Med.*, Dec.1, 176(6), 1489–95, 1992.
 38. N.W.Lukacs, S.L.Kunkel, R.M.Strieter, et al. ; The role of MIP-1 α in schistosoma manson egg-induced granulomatous inflammation ; *J-Exp-Med.*, Jun.(1), 176(6), 1551–9, 1993.
 39. N.W.Lukacs, S.W.Chensue, R.Z.Smith, et al. ; Production of monocyte chemoattractant protein-1 and MIP-1 α by inflammatory granuloma fibroblasts ; *Am-M-Path.*, Apr., 144(4). 1711–8, 1994.
 40. E.V.Granowitz, E.Annier, et al. ; II. Effect of IL-1 β blockade cytokine synthesis : IL-1 β receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis by human monocytes ; *Blood*, May.1, No.9, Vol. 79, 2364–9, 1992.
 41. E.V.Granowitz, B.D.Clark, et al. ; I. Effect of IL-1 β blockade on cytokine synthesis : IL-1 β receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and block the binding of IL-1 β to its type II receptor on human monocytes ; *Blood*, May.1, No.9, Vol.79, 2356–63, 1992.
 42. R.Alam, P.A.Forsythe, et al. ; MIP-1 α activates basophils and mast cell ; *J-Exp-Med*, Sep.1, 176(3), 781–6, 1992.
 43. J.P.Maciejewski, J.M.Liu, et al. ; Expression of stem cell inhibitor gene in pts with bone marrow failure ; *Exp-Hemato.*, Oct., 20(9), 1112–7, 1992.
 44. H.Hakovirta, M.Vierula, S.D.Wolpe, et al. ; MIP-1 α is a regulator of mitotic and mitotic DNA synthesis during spermatogenesis ; *Med-cell-endo.*, Feb.,99(1), 119–24, 1994.
 45. R.Alam, D.Kumar, et al. ; MIP-1 α and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reaction and activate murine mast cells in vivo ; *J. of Immun.*, Feb.1, 152(3), 1298–303, 1994.
 46. S.Hosaka, T.Akahoshi, C.Wada, H.Kondo ; Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis ; *Clin-Exp-Immun.*, Sep., 97(3), 451–7, 1994.
 47. T.Sato, T.Sasahara, et al. ; Native T cells can mediate delayed-type hypersensitivity response in T cell receptor transgenic mice ; *Eur-J-Immuno.*, Jul., 24(7), 1512–6, 1994.
 48. R.Neta, J.J. Oppenheim, S.D.Douches ; Interdependence of the radioprotective effect of human recombinant IL-1 β , TNF-, G-CSF, and murine recombinant GM-CSF ; *J.of Immun.*, 140 : 108–111, 1988.
 49. R.Neta, J.J. Oppenheim ; Cytokines in therapy of radiation injury ; *Blood*, 72 : 1093–1095, 1988.
 50. P.J.Jose, D.A.Griffiths-Johnson, et al. ; A potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation ; *J-Exp-Med*, Mar. 1, 179(3), 881–7, 1994.
 51. J.Kurtyberg, S.H.Bigner, M.S.Hershfield ; Establishment of Du.528 human lymphohematopoietic stem cell line ; *J-Exp-Med.*, Nov.1, 162, 1561–78, 1985.
 52. R.L. Monroy, R.R. Skelly, T.J. Macvittie, et al. ; The effect of recombinant GM-CSF on the recovery of monkeys transplanted with autogenous bone marrow ; *Boold*, 70 : 1696–1699, 1987.

53. A.W. Nienhuis, R.E. Donahue, et al. ; Recombinant human GM-CSF shortens the period of neutropenia after autogenous bone marrow transplantation in a primate model. ; J. Clin. Invest. 80, 573—577, 1987.
54. M. Tsudo, H. Karasuyama, F. Kitamura, et al. ; The IL-2 receptor beta-chain. Ligand binding ability of the cDNA-encoding membrane and secreted forms. ; J. of Immun., July 15, 145(2)1, 599—606, 1990.