대한체질인류학회지 제24권 제3호
Korean J Phys Anthropol Vol. 24, No. 3 (2011) pp. 141~154
Korean Journal of Physical Anthropology

흰쥐 가슴샘 재생과정에서 IL-17A의 발현 특성

최학종, 이희우[1], 박종훈, 오세옥, 백선용, 김봉선, 윤 식

부산대학교 의학전문대학원 해부학교실, [1]서울대학교 수의과대학 수의과학연구소

(2011년 4월 18일 접수, 2011년 8월 24일 수정접수, 2011년 9월 7일 게재승인)

간추림 : IL-17A는 활성화된 T 세포에 의해 분비되는 사이토카인으로 5개의 연관된 사이토카인인 IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E 및 IL-17F과 함께 IL-17 family로 분류되며, 이들은 모두 유사한 단백질 구조를 가지고 있다. IL-17A와 IL-17F는 활성화된 T 세포에서 발현되는 반면 IL-17B, IL-17C, IL-17D 및 IL-17E는 모든 조직에서 광범위하게 발현되며 이들의 기능은 IL-17A와 부분적으로 일치하지만 이에 관해서 자세히 연구되어 있지 않다.

가슴샘버팀질세포는 가슴샘세포의 증식, 성숙 및 분화의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 연구에서는 가슴샘세포, 가슴샘상피세포, 큰포식세포, 가슴샘가지돌기세포 및 가슴샘종양세포에서 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 IL-17 family의 발현 특성을 확인하였다. 또한 cyclophosphamide를 흰쥐에 투여하여 가슴샘의 급성 퇴축을 유발시킨 다음 3, 7 및 14일째 실험 동물을 희생시켜, 가슴샘 재생과정 동안 시간의 경과에 따른 IL-17 family와 IL-17 수용체 (IL-17R)의 발현특성을 역전사 중합효소 연쇄반응법을 통해 조사하였으며, IL-17A의 경우는 면역조직화학법을 이용하여 그 발현양상을 더 구체적으로 분석하였다. 그 결과 IL-17A와 IL-17E는 가슴샘종양세포에서만 발현되었고 IL-17C는 큰포식세포를 제외한 모든 세포에서 발현되고 있음을 확인하였다. IL-17F의 경우 실험군의 모든 세포에서 발현된 반면에 IL-17B와 IL-17D는 전혀 발현되지 않았다. 또한 IL-17A는 가슴샘 재생과정 중 가슴샘세포와 가슴샘버팀질세포에서 모두 증가되었으며 IL-17A의 수용체인 IL-17R은 재생모델의 가슴샘세포와 가슴샘버팀질세포에서 발현양이 거의 유사하였다. 면역조직화학법을 이용한 분석에서도 재생과정 동안 상피세포에서 IL-17A의 발현이 증가됨을 확인하였다.

따라서 가슴샘세포와 가슴샘 상피세포에서 IL-17A의 발현 및 그 수용체를 통한 신호전달은 가슴샘의 급성 퇴축 이후 가슴샘이 재생되는 과정에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : IL-17, IL-17A, 가슴샘, 가슴샘버팀질세포, 가슴샘세포, 가슴샘상피세포, 가슴샘 재생

서 론

가슴샘 (thymus)은 골수에서 유래한 T 전구세포 (T precursor cell)를 성숙한 T세포로 분화시키는 데 관여하는 중추 면역기관이다 (Schuurman 등 1997). 가슴샘세포 (thymocyte) 주위의 다양한 종류의 세포 및 세포바깥바탕질 (extracellular matrix) 성분들을 통칭하여 가슴샘미세환경 (thymic microenvironment)이라고 하는데, 가슴샘세포는 가슴샘 미세환경과의 상호작용에 의해 증식, 분화 및 성숙 단계를 거치게 된다 (Boyd 등 1993). 특히 가슴샘미세환경을 구성하는 세포들을 통칭하여 가슴샘버팀질세포 (thymic stromal cell)라고 하는데 가슴샘버팀질세포 중에서도 가슴샘상피세포 (thymic epithelial cell)는 가슴샘세포의 증식과 분화 및 성숙과정에 가장 주된 역할을 수행한다 (Boyd 등 1993). 가슴샘상피세포는 존재부위와 형태학적 특징에 따라 몇 가지 아형 (subpopulation)으로 나누어진다 (Boyd 등 1993). 현재는 면역세포화학적방법을 이용하여 피막밑 상피세포 (subcapsular epithelial cell), 겉질 상피세포 (cortical epithelial cell), 속질 상피세포 (medullary epithelial cell) 및 가슴샘소체 (Hassall's corpuscle)의 네 종류로 분류하는 방법을 널리 사용하고 있다 (Haynes 1984, Rouse 등 1988).

*이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의하여 연구되었음.
교신저자 : 윤 식 (부산대학교 의학전문대학원 해부학교실)
전자우편 : sikyoon@pusan.ac.kr

www.kci.go.kr

가슴샘은 여러 가지 원인에 의해 퇴축이 일어날 수 있다. 나이의 증가와 더불어 발생하는 생리적인 가슴샘의 퇴축 외에도, 나이와 관계없이 전 연령층에서 비생리적으로 가슴샘의 퇴축이 발생할 수 있다. 비생리적인 가슴샘 퇴축을 가져올 수 있는 요인에는 항암 화학제, 스테로이드 투여, 스트레스, 방사선 조사, 독성인자 및 각종 질환 특히 종양, 감염, 만성 소모성 질환 등이 있으며, 이러한 여러 인자들에 의해 T세포 사멸에 의한 가슴샘의 급성 퇴축이 일어난다(Draber와 Nouza 1977, Wang과 Cai 1999). 가슴샘의 퇴축은 신체 면역력을 저하시켜, 여러 가지 질환을 유발하거나 이미 유발되어 있는 질환에 대한 치유능력을 감소시킬 수 있으므로 매우 심각한 문제가 될 수 있다. 급성 퇴축의 경우 가슴샘은 원인인자가 제거되면 서서히 회복하는데(Hofmann 등 1987), 그 과정에서 가슴샘을 이루는 세포의 형태 및 기능적 변화는 가슴샘의 생리와 기능의 연구에 중요한 정보를 제공할 수 있다.

실험적으로 가슴샘의 퇴축과 재생과정의 변화를 연구하기 위하여 cyclophosphamide (CY)를 이용한 동물모델이 개발되었다(Yoon 등 1997). CY는 1958년 이후부터 임상에 쓰이기 시작한 alkylating group에 속하는 합성화합물로 종양성 병변이나 암 치료에 널리 쓰여왔고, 구조적으로는 nitrogen mustard와 유사하다(Brock 1968, Sladek 1971). 또한 CY는 세포생성억제 및 항종양효과와 면역억제기능을 나타내는 약물로, 세포의 정상적인 분열과정을 방해하고, 세포의 구성성분인 amine, -OH, -SH기와 결합하는 알킬화(alkylation)에 의해 DNA 합성을 억제하여 세포대사에 직접적인 영향을 미치고 세포분열을 막으며 세포질 속의 변화를 일으켜 세포를 사멸시킨다(Reynolds와 Prasad 1982). 이러한 CY의 작용에 특히 민감한 세포 집단으로는 골수와 림프계통의 세포, 종자세포(germinal cell) 및 창자샘에 있는 미분화 세포들이 있다. 높은 농도의 CY는 골수이식 환자에서 거부반응을 억제시키는 면역 억제제로도 사용되고 있으나, 골수에 독성을 미치는 등의 부작용을 나타내기도 한다(Hows 등 1984). CY 투여로 인해 급성 퇴축이 일어난 가슴샘은 시간이 지남에 따라 퇴축 후 서서히 크기가 증가하여 정상의 크기로 되는데, 이러한 재생과정 동안 가슴샘에서 가슴샘상피세포의 대사활동이 증가하는 것으로 알려져 있다(Yoon 등 1997).

활성화된 T 세포에 의해 분비되는 IL-17 (IL-17A) 사이토카인은 생쥐의 하이브리도마에서 그 유전자가 클로닝되었다(Rouvier 등 1993, Yao 등 1996). 사람의 IL-17A 유전자의 경우 150개의 아미노산과 15 kDa의 분자량으로 이루어져 있으며 30～35 kDa의 당단백과 동종이합체로 이중결합되어 분비된다(Fossiez 등 1996). IL-17A 외에도 IL-17A와 연관된 사이토카인인 IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E 및 IL-17F가 동정되었고 이들은 IL-17A와 함께 시스테인 잔기들이 잘 보존되어 있는 유사한 단백질 구조를 가지고 있어 IL-17 family로 분류되었다(Starnes 등 2001). IL-17A와 IL-17F는 활성화된 T세포에서 주로 발현되는 반면 IL-17B, IL-17C, IL-17D 및 IL-17E는 모든 조직에서 광범위하게 발현되며 그들의 기능은 IL-17A와 부분적으로 일치하지만(Moseley 등 2003) 이에 관해서 아직 자세히 연구되어 있지 않다. IL-17A 수용체(IL-17R)는 대략 130 kDa의 single-pass transmembrane 단백질로 IL-17A와는 달리 여러 조직에서 광범위하게 발현된다(Moseley 등 2003). IL-17A에 의한 IL-17 수용체의 활성의 일반적인 결과로 NF-κB가 활성화되고 이로 인해 다른 전염증성사이토카인(pro-inflammatory cytokine)들의 발현이 유도된다(Moseley 등, 2003). IL-17 family는 연골과 관절염에서 주로 연구되었으며 여기서 IL-17은 주로 연골의 기능과 조직의 항상성에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다(Ziolkowska 등 2000). IL-17A는 관절이나 연골을 파괴시킬 수 있는 다양한 인자들을 유도하고, IL-17E와 IL-17F는 연골의 proteoglycan의 증가 또는 연골 바탕질의 합성을 억제하는 효과를 나타내었다(Cai 등 2001, 2002, Hymowitz 등 2001). 이러한 IL-17A, IL-17E 및 IL-17F는 연골 자체에서 생성되어 분비하는 것인지 다른 조직에서 이동해 온 것인지 아직 명확하게 밝혀지지 않다. 또한 IL-17A는 종양 모델에서 혈관 형성을 촉진시키고 사람의 난소암에서 혈관의 수와 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(Kato 등 2001). 경부 종양에서는 IL-17A가 종양형성을 촉진시키는데 이때 종양 부위에서 IL-6 발현이 증가됨을 확인하였으며(Tartour 등, 1999), 이러한 IL-6 발현의 증가는 경부 종양의 침습성과 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다(Pages 등 1999). 또한 IL-6는 T세포의 분화와 증식에 중요한 요소로 알려져 있다(Helle 등 1989, Kasahara 등 1990). 이러한 연구에 따르면 IL-17A는 종양촉진에 관여하는 것으로 여겨지지만 한편으로는 면역체계에 의해서 유발되는 종양 거부반응을 일으킴으로써 종양의 형성을 억제한다는 상반된 연구결과도 있어 현재까지 종양에서의 IL-17A 기능에 관해서는 정확히 규명되어지지 않았다(Hirahara 2000, 2001, Benchetrit 2002). 또한 최근 면역계나 다른 여러 정상 및 병리 조직에서 IL-17에 관한 연구가 이루어지고 있으나 아직 중추면역기관인 가슴샘

www.kci.go.kr

에서의 역할에 관한 연구는 이루어져 있지 않다(Gaffen 2009). 특히 가슴샘 퇴축의 진행을 막고 재생을 촉진시킬 수 있는 방법의 개발과 관련된 연구의 필요성이 매우 크지만 이와 관련된 연구가 자세히 이루어져 있지 않을 뿐만 아니라 가슴샘의 재생과정에 대한 이해도 매우 부족한 실정이다. 따라서 흰쥐 가슴샘에서 IL-17A와 함께 IL-7 family의 발현 특성을 분석하고 특히 가슴샘의 재생과정에서 IL-17A의 발현 특성을 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험 동물은 Sprague-Dawley (SD)계의 수컷 흰쥐(200～250 g) 및 C57BL/6 수컷 생쥐(20～25 g)이며, 모든 실험 동물은 23±2°C의 항온 조건과 50±0.5%의 항습 상태 및 12시간의 낮 주기와 12시간의 밤 주기가 일정하게 유지되게 하고, 고압 증기로 멸균한 시판용 고형 사료와 물을 자유로이 먹게 하여 specific pathogen free (SPF) 상태가 적절하게 유지되는 조건하에서 사육하였다. 실험 동물은 정상 대조군 및 약물 투여군으로 나누었다.

2. 가슴샘 재생 모델 제작

Cyclophosphamide (CY, Sigma, St Louis, MO, USA) 50 mg/mL을 멸균된 증류수에 녹인 후, 주사 전 재결정이 생기지 않도록 보온 상태를 유지하였다. SPF 조건하에서 사육된 SD계의 흰쥐의 무게를 측정한 후 CY를 복강 내에 150 mg/kg의 농도로 1회 주사하였다. 투여 후 3일, 1주 및 2주째에 동물을 희생하여 가슴샘을 절취하였다.

3. 조직 처리

흰쥐의 가슴샘을 면역조직화학적 염색에 이용하기 위해서 동결조직절편과 파라핀조직절편을 제작하였다. 동결조직절편을 제작하기 위해서 cryomold (Miles Laboratories, Elkhart, IN, USA)에 optimum cutting temperature compound (OCT compound, Tissue-Tek, Miles Laboratories)로 절취된 가슴샘을 포매한 후 액체 질소 속에서 10～15초 동안 동결 고정을 시행하였다. 동결 포매된 조직을 동결조직절편기 (Reichert-Jung 2800 Frigocut E, Bensheim, Germany)를 이용하여 5 μm의 두께로 조직절편을 만들고, 2%의 3-aminopropylmethoxysilane (APES, Sigma)로 표면 처리된 유리 슬라이드(Marienfeld, Bad Mergentheim, Germany)에 부착시켰다. 조직이 부착된 슬라이드는 45°C의 조직 신전기에서 1시간 정도 충분히 말린 후 실온에서 건조시켰다.

파라핀조직절편을 제작하기 위해서 절취된 가슴샘을 Bouin 고정액(4°C)에서 4시간 동안 침적 고정 후 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% 에탄올을 이용한 탈수과정, xylene을 이용한 투명과정, 그리고 파라핀을 이용한 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 조직 박절기 (Microtome, Reichert, Bensheim, Germany)로 5 μm 두께의 파라핀조직절편을 APES로 표면 처리된 유리 슬라이드에 부착시키고 조직 신전기에서 건조시켰다. Xylene을 이용하여 슬라이드에 부착된 조직 절편의 파라핀을 제거한 후 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 및 50% 알코올과 증류수에 3분간씩 가수화(rehydration)하였다.

4. 가슴샘세포 및 가슴샘 기질세포의 분리

생쥐 가슴샘으로부터 가슴샘세포 및 가슴샘버팀질세포를 분리하기 위해서, 생후 3개월의 C57BL/6 수컷 생쥐로부터 가슴샘을 절취하여 세포배양용 접시에 올려두고 수술용 가위로 2～3 mm 간격으로 잘게 잘랐다. 자른 조직을 30 mL의 RPMI1640 (GIBCO-BRL, Rockville, MD, USA) 배지가 첨가된 용기에 넣고 자석교반기를 이용하여 4°C에서 40～50분간 혼합하였다. 상등액을 회수하고, 남겨진 조직의 조각들을 10 mL의 RPMI1640 배지가 들어있는 세포배양용 접시에 옮기고 피펫을 사용하여 여러 번 혼합하였다. 원심분리하여 조직 조각들을 정착시키고 상등액을 회수하였다. RPMI1640 배지에 0.0125% (w/v) collagenase D (Roche, Mannheim, Germany)와 0.1% (w/v) DNase I (Roche)이 포함된 효소반응액 5 mL을 첨가하여 조직의 조각들과 혼합하면서 37°C에서 15분간 반응시켰다. 5 mL의 주사기와 18G 주사바늘을 순차적으로 사용하여 조직을 완전히 풀어주고 원심분리하여 상등액과 침전물을 회수하였다. 회수한 모든 상등액을 125, 106 및 70 μm 메시에 순차적으로 통과시켜 가슴샘세포를 회수하였다. 원심분리하여 상등액을 제거하고 20 mL의 ACK lysis 용액 (0.15 M NH_4Cl, 1 mM $KHCO_3$, 0.1 mM Na_2EDTA)을 첨가하여 적혈구를 제거하였고, 10% 우태아혈청 (FBS, GIBCO-BRL)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, GIBCO-BRL) 30 mL에 세포를 부유시켜 세포수를 측정하였다. 2차 효소반응을 시행하기 위하여, 회수한 침전물을 다시 RPMI1640 배지에 0.0125% (w/v) collagenase D와 0.1% (w/v) DNase

www.kci.go.kr

I이 포함된 효소반응액 5 mL을 첨가하여 조직의 조각들과 혼합하면서 37˚C에서 15분간 반응시켰다. 5 mL의 주사기와 18G, 21G 및 23G 주사바늘을 순차적으로 사용하여 조직을 완전히 풀어주고 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 회수하였다. 3～4차 효소처리과정에서 회수한 상등액을 106 μm 메시에 통과시켜 가슴샘 기질세포를 회수하여 세포수를 측정하였다.

5. 세포배양

Simian virus 40 T antigen transgenic 마우스로부터 얻어진 생쥐 가슴샘피막밑/겉질 상피세포주[thymic subcapsular cortex or thymic nurse cells (427.1; SNEC)], 가슴샘겉질상피세포주[thymic cortex or cortical reticular cells (1308.1; CREC)], 가슴샘속질상피세포주[thymic medullary epithelial cells (6.1.7; MEC)], 가슴샘가지돌기세포주[thymic medullary interdigitating (IDC)-like cells (6.1.1; MDC)]는 Dr. Barbara Knowles (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me, USA)로부터, 큰포식세포에서 유래된 RAW 264.7 세포주 및 가슴샘종양세포에서 유래된 EL4 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 분양받았다. 이 세포주들을 10% 우태아혈청 (GIBCO-BRL), 10,000 U/mL penicillin (GIBCO-BRL) 및 100 μg/mL streptomycin (GIBCO-BRL)이 포함된 DMEM (GIBCO-BRL) 완전배지를 사용하여 5% CO_2 및 37˚C 조건에서 100 mm dish 혹은 96 well plates (Nunc, Roskilde, Denmark)에서 배양하였다. 세포들이 subconfluent 상태에 도달했을 때 세포를 phosphate-buffered saline (PBS) 혹은 DMEM으로 세척한 후 세포를 배양바닥으로부터 떼어 내기 위하여 0.05% trypsin (GIBCO-BRL) 및 0.53 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, GIBCO-BRL) 혼합용액을 사용하였다.

6. Total RNA의 분리

세포에서 total RNA의 분리는 total RNA extraction kit (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)을 이용하였다. Scraper를 이용하여 1×10^5개의 세포를 바닥에서 떼어낸 후, extraction solution 1 mL을 첨가하여 13,000 rpm (4˚C)에서 10분간 원심분리를 하였다. 조심스럽게 상등액을 새 tube에 옮기고 chloroform 200 μL를 첨가한 다음 부드럽게 혼합하였다. 13,000 rpm (4˚C)에서 10분간 원심분리를 한 후, 상등액 (400 μL)을 새 tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 부드럽게 혼합하였다. 13,000 rpm (4˚C)에서 5분간 원심분리를 한 후, 조심스럽게 상등액을 제거하였다. Pellet에 75% 에탄올을 첨가한 후 15초 동안 혼합하고 10,000 rpm (4˚C)에서 5분간 원심분리를 하였다. 조심스럽게 상등액을 제거하고 pellet을 공기 중에 완전히 건조시킨 후 RNA pellet에 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 처리된 증류수 20 μL를 넣어 RNA를 용해시켰다. 추출한 RNA는 흡광 광도계 (SmartSpec TM3000, BioRad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하고 정량하였다.

7. cDNA 합성

5 μg의 total RNA를 주형으로 사용하여 oligo $(dT)_{12\text{-}18}$ (Gibco-BRL) 1 μL를 혼합하고 65˚C에서 5분간 반응시킨 후 얼음 위에서 5분간 보관하였다. 5× first-strand buffer (Promega, Madison, WI, USA) 4 μL, 0.1 M dithiothreitol (DTT, Promega) 2 μL와 10 U/μL의 RNase inhibitor (Invitrogen, San Diego, CA, USA) 1 μL, 2.5 mM deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP, Promega) mix 4 μL, 그리고 200 U/μL의 M-MLV reverse transcriptase (M-MLV RT, Gibco-BRL) 1 μL를 첨가하여 37˚C에서 1시간, 70˚C에서 15분간 반응시키고, 4 mg/mL의 RNase H 1 μL를 첨가하여 37˚C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 같은 양의 chloroform을 첨가하여 30초간 강하게 진탕하고 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 새 tube에 옮기고 −20˚C에 보관하였다.

8. Primer 합성

IL-17 cytokine famaily와 IL-17A 수용체 및 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 증폭하기 위해 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)에서 유전자의 염기서열을 조사하였고, 각 유전자에 특이적인 primer (Table 1) 셋트를 제작하였다 (Bioneer, Daejon, Korea).

9. 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction)

역전사 효소를 이용하여 합성한 cDNA를 주형으로 사용하여 5 μL의 5× PCR reaction buffer (Promega), 2 μL의 2.5 mM dNTP mix, 0.5 μL의 forward primer (FP) 및 reverse primer (RP) 각 10 pmol/μL와 0.125 μL의 *Taq* DNA polymerase (5 U/μL)를 혼합하였다. 94˚C에서 5분간 DNA를 변성시킨 다음 GAPDH는 94˚C에서 30초, 57˚C에서 30초 그리고 72˚C에서 30초간 25회 반복시켰고 IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E 및 IL-

www.kci.go.kr

Table 1. PCR primer sequences

Genes	Forward sequence	Reverse sequence	Size
IL-17A	5′-TCTCTGATGCTGTTGCTGCT-3′	5′-TCAGGACCAGGATCTCTTGC-3′	349 bp
IL-17R	5′-CAGTCCAAGCTGTCGAATCA-3′	5′-TCAAGCAGTCATTTTGGCAG-3′	493 bp
IL-17B	5′-GGAACACCAAAGGCAAAAGA-3′	5′-CGAGGAGGTTGAGGACAGAG-3′	409 bp
IL-17C	5′-GCTAACTCGAAGTGCCAGGT-3′	5′-GGATGAACTCGGTGTGGAAG-3′	398 bp
IL-17D	5′-CTCCTGGAGCAGCTGTACG-3′	5′-CACCGGGATGGTGATGTAGT-3′	378 bp
IL-17E	5′-TGTACCAGGCTGTTGCATTC-3′	5′-GAAGACCGTCTGGTTGTGGT-3′	395 bp
IL-17F	5′-TGCCATTCTGAGGGAGGTAG-3′	5′-GGTGCAGCCAACTTTTAGGA-3′	394 bp
GAPDH	5′-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGC-3′	5′-GGGAGTTGCTGTTGAAGTCACA-3′	449 bp

17F는 94˚C에서 30초, 55˚C에서 30초 그리고 72˚C에서 30초간 35회 반복시켰으며 IL-17A 수용체는 94˚C에서 30초, 58˚C에서 30초 그리고 72˚C에서 30초간 35회 반복하였다. 반응이 끝난 PCR 산물은 ethidium bromide (0.5 μg/mL)가 포함된 1.5% agarose (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA) gel에 6× gel loading buffer (Intron)로 loading하여 100 V에서 전기영동하였다. UV illuminator (Vilber lourmate, Marne-La-Vallée, France)를 통해 증폭된 DNA를 확인하여 Photo-Documentation Camera (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)로 촬영하고 Polaroid film (Polapan 667, Wheathampstead, UK)으로 사진을 현상하였다.

10. 면역조직화학염색 (immunohistochemistry)

Acetone (−20˚C)으로 20분간 고정한 후 충분히 건조된 동결조직절편과 파라핀이 제거된 조직절편을 0.02 M PBS에서 5분 동안 수세한 후 내인성 과산화효소를 제거하기 위해 0.3% H_2O_2가 포함된 메탄올 용액에서 20분간 처리한 다음 0.02 M PBS에서 5분간 3회 세척하였다. 항체의 침투력을 높이고 비특이적 항원항체반응을 방지하기 위하여 2% bovine serum albumin에서 30～60분간 반응시킨 후 일차항체인 polyclonal goat anti-mouse IL-17 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 1 : 100으로 희석하여 4˚C에서 16～18시간 동안 반응시켰다. 0.02 M PBS로 5분씩 3회 세척하고 이차항체인 biotinylated donkey anti-goat IgG antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grone, PA, USA)를 1 : 100으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 조직 절편을 0.02 M PBS로 5분씩 3회 세척하고, avidin-biotin horseradish peroxidase complex (ABC, Vectastain Elite Kit, Burlingame, CA, USA) 용액을 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 조직절편을 0.02 M PBS로 5분씩 3회 세척한 후 0.05% 3,3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)와 0.003% H_2O_2 혼합용액을 실온에서 반응시킨 후 광학 현미경하에서 발색 정도를 확인하였다. 반응이 끝난 조직절편은 0.02 M PBS 및 증류수에서 각각 5분간 세척하고 핵 염색을 위한 Mayer's hematoxylin (Muto pure chemicals Ltd, Tokyo, Japan)으로 대조염색 후 알코올을 이용한 탈수과정, xylene을 이용한 투명과정을 거쳐 Entellan (Merck, Darmstadt, Germany)으로 봉입하여 영구표본을 제작하였으며, 광학현미경 (Leica, Wetzlar, Germany)으로 면역반응세포의 분포상태를 관찰하였다. 모든 반응은 습도가 유지되는 상자 내에서 실시하였고, 면역염색의 정확도를 검증하기 위해 일차항체를 제외한 반응액으로 음성 대조군의 염색을 시행하였으며, 과정상 염색 정도를 균일하게 하였다. 이와 같이 염색과정에서 일차 항체 적용과정을 생략시킨 결과, 이 과정을 거친 표본에서는 어떤 면역반응성도 나타나지 않았기 때문에 면역염색의 특이성이 입증되었다. 면역반응이 끝난 영구표본 슬라이드는 광학 현미경 (BX50, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고, 디지털 카메라 (DP70, Olympus)로 촬영하였다.

11. 통계분석

통계분석은 Student's *t* test를 이용하여 수행하였으며, p 값이 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 생쥐 가슴샘 관련 세포에서 IL-17 family의 발현 분석

정상 생쥐의 가슴샘세포와 가슴샘피막밑/겉질상피세포주, 가슴샘겉질상피세포주, 가슴샘속질상피세포주와

www.kci.go.kr

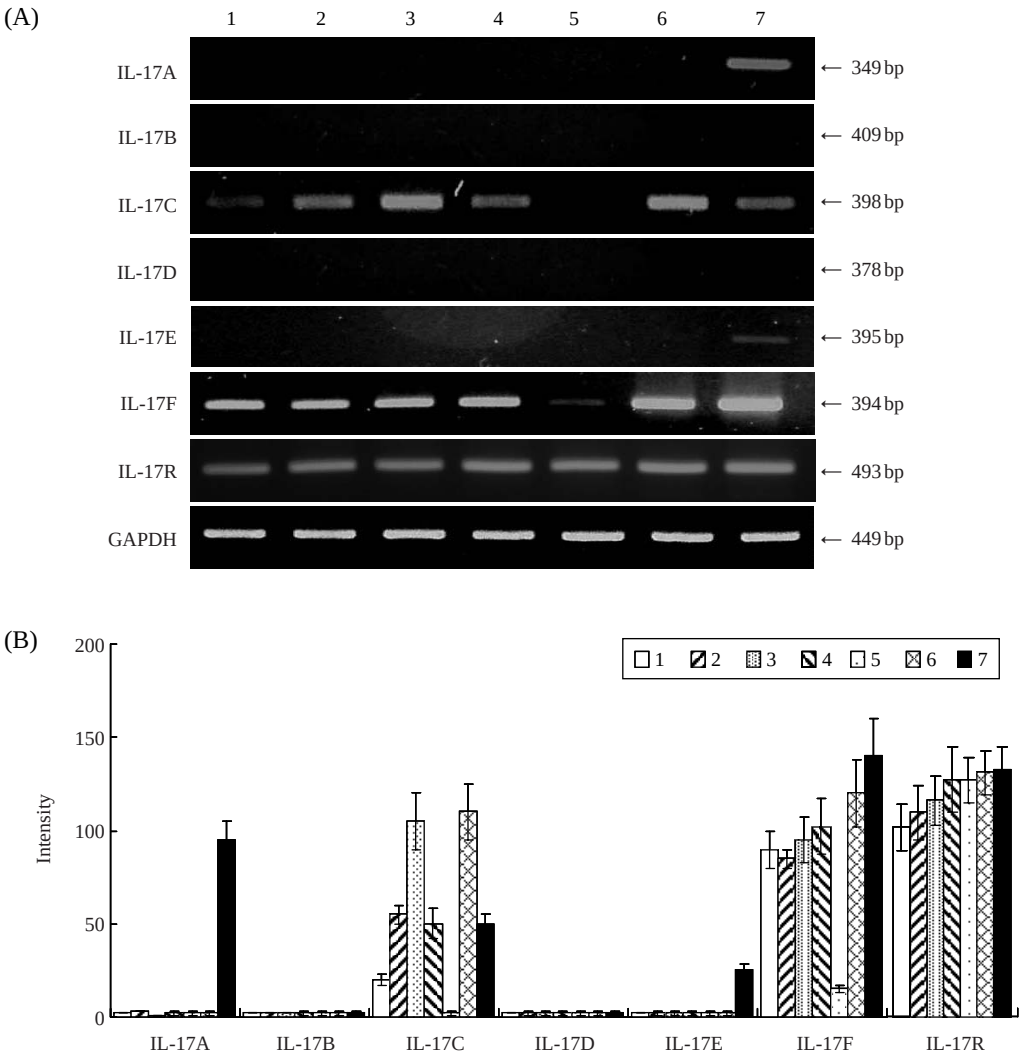

Fig. 1. RT-PCR analysis of IL-17 family mRNA expression in the mouse thymocytes, thymic epithelial cells (SNEC, CREC and MEC), thymic dendritic cells (MDC), macrophages (RAW 264.7 cells) and EL4 thymoma cells. (A) Agarose gel electrophoresis showing a representative RT-PCR result of IL-17 family and GAPDH. Lane 1; SNEC, lane 2; CREC, lane 3; MEC, lane 4; MDC, lane 5; RAW 264.7, lane 6; thymocytes, lane 7; EL4. (B) The density of each band in the each lane was measured by scanning densitometry and then expressed as the mean±SD. Data are expressed as ratios of each IL-17 subtype normalized to GAPDH mRNA.

가슴샘가지돌기세포주, 큰포식세포주 및 EL4 세포주 등에서 IL-17 family의 발현을 확인하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 그 결과 IL-17A와 IL-17E는 EL4 세포에서만 발현되었고 IL-17C는 가슴샘피막밑/겉질상피세포주, 가슴샘겉질상피세포주, 가슴샘속질상피세포주, 가슴샘가지돌기세포주, EL4 세포주 및 가슴샘세포에서 발현되었으나 RAW 264.7 큰포식세포주에서는 발현되지 않았다. IL-17F의 경우 실험군의 모든 세포에서 발현된 반면에 IL-17B와 IL-17D는 전혀 발현되지 않았다. 또한 IL-17 수용체 역시 모든 실험 세포군에서 대체로 유사한 발현 특성을 나타내었다(Fig. 1).

2. 가슴샘 재생모델에서 IL-17A와 IL-17A 수용체의 발현 확인

CY를 투여하여 정상 흰쥐의 가슴샘을 퇴축시킨 후 3일, 7일 및 14일째의 가슴샘세포와 가슴샘버팀질세포를 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 그 결과 가슴샘 재생과정 동안 CY 투여 후 3일째 가슴샘세포에서 IL-17A의 발현이 높게 나타났으며 CY 투여 후 7일째 가슴샘세포에서도 발현이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 가슴샘버팀질세포에서는 정상 대조군에 비해 CY 투여 후 3일째에서 가장 높게 발현되

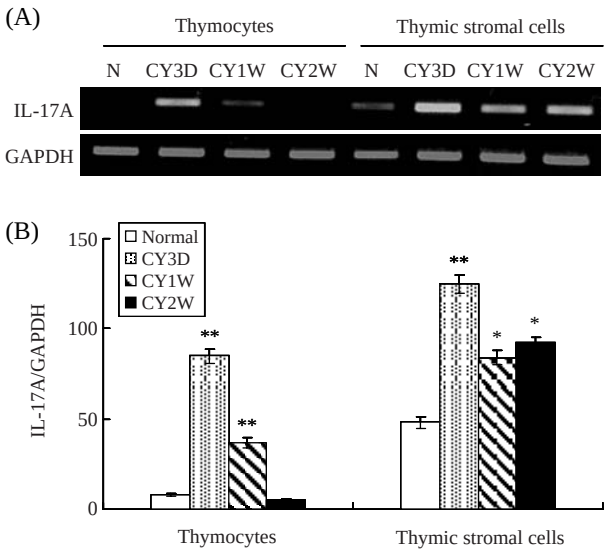

Fig. 2. RT-PCR analysis of IL-17A mRNA expression in the thymocytes and thymic stromal cells of the normal rat thymus (N) and regenerating thymus 3 (CY3D), 7 (CY1W) and 14 (CY2W) days. (A) Agarose gel electrophoresis showing a representative RT-PCR result of co-amplified IL-17A and GAPDH. The 349-bp bands represent IL-17A mRNA. Rat thymocytes especially at 3 days after cyclophosphamide treatment exhibited a significant increase in IL-17A mRNA expression compared with those of the control animals. Rat thymic stromal cells especially at 3, 7 and 14 days after cyclophosphamide treatment exhibit a significant increase in IL-17A mRNA expression compared with those of the control animals. (B) The density of each band in the each lane was measured by scanning densitometry and then expressed as the mean±SD. Data are expressed as ratios of IL-17A normalized to GAPDH mRNA. $*P<0.05$, $**P<0.01$.

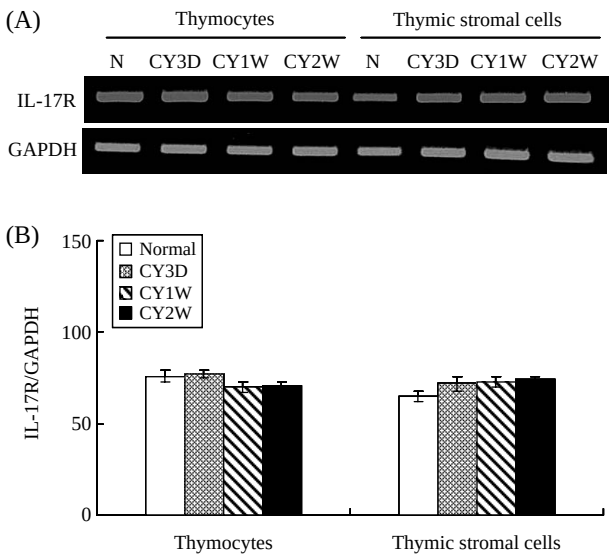

Fig. 3. RT-PCR analysis of IL-17R mRNA expression in the thymocytes and thymic stromal cells of the normal rat thymus (N) and regenerating thymus 3 (CY3D), 7 (CY1W) and 14 (CY2W) days after CY treatment. (A) Agarose gel electrophoresis showing a representative RT-PCR result of co-amplified IL-17R and GAPDH. The 493-bp bands represent IL-17R mRNA. (B) The density of each band was measured by scanning densitometry and then expressed as the mean±SD. Data are expressed as ratios of IL-17R mRNA normalized to GAPDH mRNA.

었으며, CY 투여 후 7일째에도 정상 대조군에 비해 여전히 발현이 높게 나타났다(Fig. 2).

3. 가슴샘 재생모델 조직에서의 IL-17A 발현 확인

정상 대조군의 가슴샘상피세포에서 IL-17A의 발현을 확인할 수 있었고, 속질상피세포에 비해 겉질상피세포에서 좀더 높은 발현을 나타냈다(Fig. 4, Table 2). 가슴샘 재생과정에서 IL-17A의 발현 변화를 조사한 결과, CY 투여 후 3일째에서는 정상 대조군에 비해 IL-17A의 발현이 현저하게 증가하였다(Fig. 4, Table 2). CY 투여 후 7일째 IL-17A의 발현 역시 정상 대조군에 비해 증가하였지만 CY 3일째에 비해서는 발현이 감소하였다(Fig. 4, Table 2). CY 투여 후 14일째 가슴샘에서는 정상 대조군과 거의 유사한 발현특성을 보였다(Fig. 4, Table 2).

Table 2. The intensity of IL-17 immunoreactivity in the cortex and medulla of the normal thymus (N) and regenerating thymus 3 (CY3D), 7 (CY1W) and 14 (CY2W) days after CY treatment

	Cortex	Medulla
N	−/+	−/+
CY3D	++	++
CY1W	+	+
CY2W	−/+	−/+

Values were expressed as representative intensities in each group. Negative to weak (−/+), weak (+) and strong (++) immunoreactivity.

고 찰

Wang과 Cai (1999)는 흰쥐에 CY (70 mg/kg)를 투여한 후 8시간째부터 대조군의 가슴샘에 비해 apoptotic cell의 수가 증가하고, 48시간 후에는 더 이상의 apoptotic cell을 확인할 수 없었다고 하였다. 이는 70 mg/kg의 CY 투여 후 적어도 48시간 후부터는 가슴샘의 재생과정이 시작되는 것을 의미하므로, 본 실험의 시기 설정은 가슴샘의 재생과정을 연구하는 데 적절하였던 것으로 생각된다. 가슴샘상피세포는 가슴샘세포 사이의

www.kci.go.kr

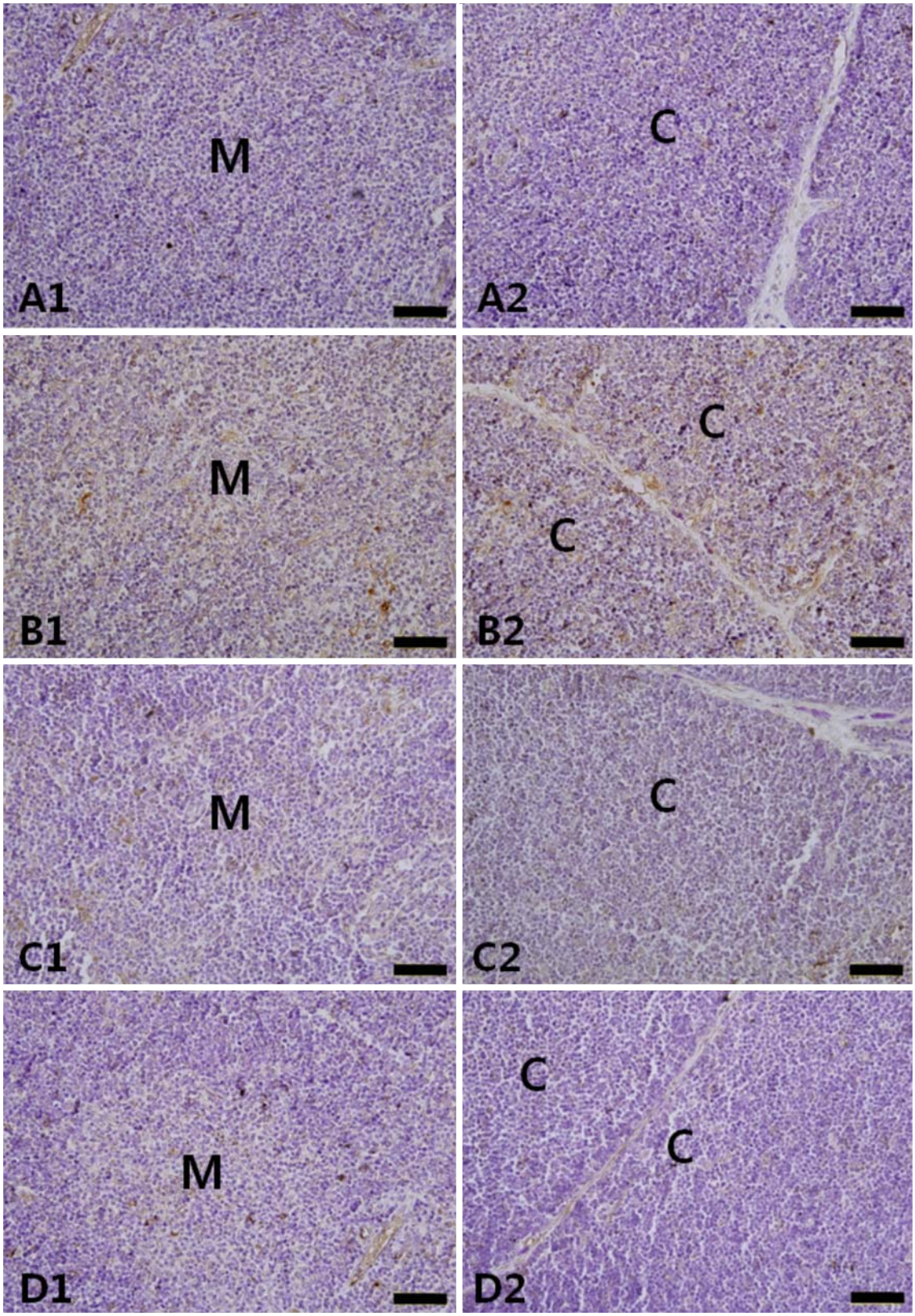

Fig. 4. Immunohistochemical localization of IL-17 in the cortex (C) and medulla (M) of the normal thymus (A) and regenerating thymus 3 (B), 7 (C), and 14 (D) days after cyclophosphamide treatment. Scale bars: 50 μm.

세포표면 분자들의 상호작용 외에도(Boyd 등 1993, Savino 등 1993, Anderson 등 1996) thymulin, thymopoietin 그리고 thymosin과 같은 가슴샘 호르몬(Kendall 1991), IL-1, IL-3, IL-7, transforming growth factor (TGF), leukemia inhibitory factor, granulocyte and macrophage colony stimulation factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulation factor (G-CSF)와 macrophage colony stimulation factor (M-CSF) (Le 등 1988, 1990, 1991, Dalloul 등 1991, Nanno 등 1991, Chen 등 1992), stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), laminin 5 및 thymus-expressed chemokine (TECK) (Wurbel 등 2000, 2001), thymus and activation-regulated chemokine (TARC) (Oda 등 2002, Kakinuma 등 2003, Hirata 등 2003) 등과 같은 사이토카인과 oxytocin, vasopressin 및 calcitonin gene-related peptide와 같은 neuropeptide (Geenen 등 1987, Kurz 등 1995)의 다양한 생물학적인 활성인자들을 분비함으로써 가슴샘세포의 증식과 성숙, 그리고 분화에 중추적인 역할을 수행한다.

본 연구에서 사용된 생쥐 가슴샘상피세포주들은 simian virus 40 T antigen transgenic mice의 가슴샘으로부터 분리한 가슴샘상피세포주로서 생체의 가슴샘상피세포와 유사하게 IL-6, IL-7 및 GM-CSF를 포함한 가슴샘세포 형성 촉진인자뿐만 아니라 여러 가지 사이토카인 및 성장인자를 발현하고, 가슴샘세포의 성장을 도와주는 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다(Faas 등 1993).

IL-17은 활성화된 T 세포에 의해 분비되는 사이토카인으로 IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E 및 IL-17F와 함께 IL-17 family 사이토카인에 속하며 흔히 처음 발견된 IL-17을 IL-17A라고 부르고 있다(Moseley 등 2003). IL-17은 활성화된 $CD4^+CD45RO^+$ memory T세포에 의해 주로 발현되어지며(Yao 등 1995, Fossiez 등 1996), 전염증성 사이토카인으로 간주되고 있는데 이는 큰포식세포와 섬유모세포, 각질세포(keratinocyte) 및 윤활세포(synovial cell) 등에서 IL-6와 IL-8의 생산을 증가시키고(Yao 등 1995, Fossiez 등 1996, Chabaud 등 1998, Jovanovic 등 1998, Teunissen 등 1998), 사람의 뼈 관절 연골에서 일산화질소의 생산을 증가시키기 때문이다(Attur 등 1997, Shalom-Barak 등 1998). 또한 IL-17은 사람의 큰포식세포와 내피세포에서 IL-1β와 TNF-α의 분비를 유도한다(Jovanovic 등 1998, Kurasawa 등 2000). IL-17은 G-CSF와 CXC chemokine의 생산을 유도하여 과립구 형성을 촉진하며 조직 내로 호중구(neutrophil)를 유인한다(Laan 등 1999, Schwarzenberger 등 2000, Witowski 등 2000, Liu 등 2011). IL-17의 수용체는 type I transmembrane 단백질로 실질적으로 거의 모든 조직과 세포에서 발현되는 반면 IL-17은 한정된 T세포에 의해 제한적으로 발현된다(Yao 등 1995, 1997, Gaffen 2009). 이러한 IL-17 family 사이토카인과 수용체의 발현은 T세포의 면역체계와 관련된 염증성 반응에 관여하며 이로 미루어 보아 T세포의 성숙에 관여하는 가슴샘의 분화와 발달에도 영향을 줄 것이라 생각된다.

본 연구에서 정상 흰쥐의 가슴샘세포, 가슴샘상피세포주, 큰포식세포주, 가슴샘가지돌기세포주, 그리고 EL4 세포주에서 이들 IL-17 family 발현 특성을 분석한 결과, IL-17A의 경우 정상 가슴샘세포와 가슴샘상피세포주에서는 발현이 관찰되지 않았고 가슴샘종양세포로부터 유래한 EL4 세포주에서만 발현이 관찰되었다. 이는 IL-17A가 종양 조직에서 혈관형성을 촉진시키고 그 종양 부위에서 IL-6의 발현을 증가시키는 등, 종양과 관련된 여러 인자들의 분비를 촉진시킨다는 연구결과와 유사하게 가슴샘종양세포에서도 그 기능조절에 중요한 역할을 수행할 것이라고 생각된다. 가슴샘상피세포주에서 IL-17A가 발현된다는 연구결과는 아직 보고되어 있지 않다. 그러나 IL-17A는 뼈조직, 활액 및 연골에서 IL-6의 발현을 계속적으로 조절하며(Chabaud 등 1998, 1999, 2000, 2001, Shalom-Barak 등 1998, Rifas 등 1999, Katz 등 2001, Tokuda 등 2002), IL-6는 관절염에서 염증반응을 일으키는 강력한 매개체로 작용하여 연골 파괴에 관여한다. 또한 IL-6는 T세포의 분화와 증식에도 중요한 요소로 알려져 있으며(Helle 등 1989, Kasahara 등 1990), 가슴샘버팀질세포에서도 발현된다는 사실이 밝혀졌다(Lee 등 2000, Tokuda 등 2004). 따라서 IL-17A의 발현으로 인해 IL-6의 발현이 조절되고 이로 인해 T세포의 증식과 분화에도 영향을 줄 것으로 추정된다. 정상 생쥐 가슴샘세포 및 흰쥐 가슴샘세포에서 동일하게 IL-17A 유전자의 전사체가 검출되지 않았는데, 이는 정상 가슴샘세포에서는 두 종간에 IL-17A의 발현이 일치한다는 사실을 증명해주는 결과라고 할 수 있다. 또한 IL-17A는 가슴샘상피세포주, 큰포식세포주 및 가슴샘가지돌기세포주에 비하여 생체로부터 분리한 정상 가슴샘버팀질세포에서 발현이 약간 증가되었지만, 정상 가슴샘버팀질세포에서 IL-17A의 발현이 매우 약하였다는 점에서 미루어 볼 때 본 실험에 사용된 각종 가슴샘버팀질세포주는 생체 가슴샘버팀질세포와 본질적으로 동일한 발현 특성을 나타내는 것으로 판단된다.

IL-17A와는 다르게 IL-17 수용체의 경우 정상 흰쥐의 가슴샘세포, 가슴샘상피세포주, 큰포식세포주, 가슴샘가지돌기세포주, 그리고 EL4 세포주 모두에서 일정하게

www.kci.go.kr

발현이 되는 것으로 나타났는데, 이는 다양한 조직과 세포에서 널리 발현되는 것으로 알려져 있는 IL-17 수용체의 특성과 일치하는 현상으로 사료된다(Gaffen 2009). 또한 가슴샘 재생 과정에서도 IL-17A와는 다르게 IL-17 수용체의 경우 흰쥐의 가슴샘세포 및 가슴샘버팀질세포 모두에서 유의한 발현상의 변화가 없는 것으로 나타났는데, 이는 아마도 유전자 발현 분석에 가장 일반적으로 사용되며, 또한 본 연구에서도 사용된 기법인 반정량 역전사 중합효소 연쇄반응의 감도의 한계에 기인하는 것으로 여겨진다.

본 연구에서 가장 특징적인 사실은 정상 가슴샘세포에서는 발현되지 않고 정상 가슴샘버팀질세포에서는 매우 약하게 발현되었던 IL-17A가 가슴샘 재생과정 중 가슴샘세포 및 가슴샘버팀질세포 모두에서 현저하게 발현이 증가되었다는 점이다. 특히 CY 투여 후 3일째에 발현이 최대로 증가하였다가 CY 투여 후 7일째부터 감소하는 양상을 나타내었다. 이는 IL-17A가 가슴샘에서 여러 종류의 인자들의 발현을 유도하고 그 분비를 촉진시키는 등 중요한 작용을 할 것으로 추측되며, 앞으로 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구의 결과는 가슴샘 재생과정 동안 가슴샘상피세포에서 IL-17A의 발현이 증가됨을 확인함으로써 IL-17A가 수용체인 IL-17R을 통해 가슴샘의 재생과정 동안 중요한 역할을 수행할 것이라는 사실을 시사한다.

참 고 문 헌

Anderson G, Moore NC, Owen JJT, Jenkinson EJ : Cellular interaction in thymocyte development. Annu Rev Immunol 14: 73-99, 1996.

Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR : Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. Arthritis Rheum 40: 1050-1053, 1997.

Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautes-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E : Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. Blood 99: 2114-2121, 2002.

Boyd RL, Tucek CL, Godfrey DI, Izon DJ, Wilson TJ, Davidson NJ, Bean AG, Ladyman HM, Ritter MA, Hugo P : The thymic microenvironment. Immunol Today 13: 445-459, 1993.

Brock N : New nitrogen mustard phosphamide esters and their cytostatic activity. Laval Med 39: 696-701, 1968.

Cai L, Suboc P, Hogue DA, Fei DT, Filvaroff EH : Interleukin 17 induced nitric oxide suppresses matrix synthesis and protects cartilage from matrix breakdown. J Rheumatol 29: 1725-1736, 2002.

Cai L, Yin JP, Starovasnik MA, Hogue DA, Hillan KJ, Mort JS, Filvaroff EH : Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. Cytokine 16: 10-21, 2001.

Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P : Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. Arthritis Rheum 42: 963-970, 1999.

Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P : Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. J Immunol 161: 409-414, 1998.

Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P : Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. Cytokine 12: 1092-1099, 2000.

Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, van Den Berg W, Miossec P : IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. Arthritis Res 3: 168-177, 2001.

Chen WF, Fan W, Cao LX, Zhang PX : Multiple types of cytokines constitutively produced by an established murine thymic epithelial cell line. Eur Cytokine Nets 3: 43-52, 1992.

Dalloul AH, Arock M, Fourcade C, Hatzfeld A, Bertho JM, Debre P, Mossalayi MD : Human thymic epithelial cells produce interleukin-3. Blood 77: 69-74, 1991.

Draber P, Nouza K : Nuclear and functional characterization of lymphocytes following cyclophosphamide treatment. Folia Biol 23: 158-169, 1977.

Faas SJ, Rothetein JL, Kreider BL, Rovera G, Knowles BB : Phenotypically diverse mouse thymic stromal cell lines which induce proliferation and differentiation of hematopoietic cells. Eur J Immunol 23: 1201-1214, 1993.

Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S : T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. J Exp Med 183: 2593-2603, 1996.

Gaffen SL : Structure and signalling in the IL-17 receptor family.

www.kci.go.kr

Nat Rev Immunol 9: 556-567, 2009.

Geenen V, Legros JJ, Franchimont P, Defresne MP, Boniver J, Ivell R, Richter D : The thymus as a neuroendocrine organ. Synthesis of vasopressin and oxytocin in human thymic epithelium. Ann NY Acad Sci 496: 56-66, 1987.

Haynes BF : The human thymic microenvironment. Adv Immunol 36: 87-142, 1984.

Helle M, Boeije L, Aarden LA : IL-6 is an intermediate in IL-1 induced thymocyte proliferation. J Immunol 142: 4335-4338, 1989.

Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Minari Y, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Tamura K : Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. Oncology 61: 79-89, 2001.

Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Itakura M, Tamura K : Reduced invasiveness and metastasis of Chinese hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. Anticancer Res 20: 3137-3142, 2000.

Hirata H, Arima M, Cheng G, Honda K, Fukushima F, Yoshida N, Eda F, Fukuda T : Production of TARC and MDC by naïve T cells in asthmatic patients. J Clin Immunol 23: 34-45, 2003.

Hofmann WJ, Moller P, Otto HF : Thymic hyperplasia. I. True thymic hyperplasia. Review of the literature. Klin Wochenschr 65: 49-52, 1987.

Hows JM, Mehta A, Ward L, Woods K, Perez R, Gordon MY, Gordon-Smith EC : Comparison of mesna with forced diuresis to prevent cyclophosphamide induced haemorrhagic cystitis in marrow transplantation: a prospective randomised study. Br J Cancer 50: 753-756, 1984.

Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM, Starovasnik MA : IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. EMBO J 20: 5332-5341, 2001.

Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP : IL-17 Stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-β and TNF-α, by human macrophages. J Immunol 160: 3513-3521, 1998.

Kakinuma T, Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Matsushima K, Tamaki K : High level of thymus and activation-regulated chemokine in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid. Br J dermatol 148: 203-210, 2003.

Kasahara Y, Miyawaki T, Kato K, Kanegane H, Yachie A, Yokoi T, Taniguchi N : Role of interleukin 6 for differential responsiveness of nave and memory CD4+ T-cells in CD2-mediated activation. J Exp Med 172: 1419-1424, 1990.

Kato T, Furumoto H, Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, Kamada M, Aono T : Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. Biochem Biophys Res Commun 282: 735-738, 2001.

Katz Y, Nadiv O, Beer Y : Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1, 6 and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a “fine-tuning cytokine” in inflammation processes. Arthritis Rheum 44: 2176-2184, 2001.

Kendall MD : Funcional anatomy of the thymic microenviroment. J Anat 177: 1-29, 1991.

Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I : Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 43: 2455-2463, 2000.

Kurz B, Von Gradecker B, Kranz A, Kirisch B, Mentlein R : Calcitonin gene-related peptide and its receptor in the thymus. Peptides 16: 1497-1503, 1995.

Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Linden A : Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. J Immunol 162: 2347-2352, 1999.

Le PT, Kurtzberg J, Brandt SJ, Niedel JE, Haynes BF, Singer KH : Human thymic epithelial cells produce granulocyte and macrophage colony-stimulating factors. J Immunol 141: 1211-1217, 1988.

Le PT, Lazorick S, Whichard LP, Haynes BF, Singer KH : Regulation of cytokine production in the human thymus: epidermal growth factor and transforming growth factor alpha regulate mRNA levels of interleukin 1alpha (IL-1 alpha), IL-1 beta, and IL-6 in human thymic epithelial cells at a post-transcriptional level. J Exp Med 174: 1147-1157, 1991.

Le PT, Lazorick S, Whichard LP, Yang YC, Clark SC, Haynes BF, Singer KH : Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. J Immunol 145: 3310-3315, 1990.

Lee CK, Kim JK, Kim K, Han SS : A mouse thymic stromal cell line producing macrophage-colony stimulating factor and interleukin-6. Arch Pharm Res 23: 252-256, 2000.

Liu Y, Mei J, Gonzales L, Yang G, Dai N, Wang P, Zhang P, Favara M, Malcolm KC, Guttentag C, Worthen GS : IL-17A and TNF-α exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. J Immunol 186: 3197-3205, 2011.

www.kci.go.kr

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH : Interleukin-17 family and IL-17 receptors. Cytokine Growth Factor Rev 14: 155-174, 2003.

Nanno M, Takahashi T, Sakata T, Horikawa T, Sako T, Suzuki R, Itoh T, Kumagai K : Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or GM-CSF-like growth factor by rat thymic epithelial cell line. J Leukoc Biol 50: 561-567, 1991.

Oda N, Minoguchi K, Tanaka A, Yokoe T, Minoguchi H, Matsuo H, Nakashima M, Tasaki T, Adachi M : Suplatast tosilate inhibits thymus and activation-regulated chemokine production by antigen-specific human Th2 cells. Clin Exp Allergy 32: 1782-1786, 2002.

Pages F, Vives V, Sautes-Fridman C, Fossiez F, Berger A, Cugnenc PH, Tartour E, Fridman WH : Control of tumor development by intratumoral cytokines. Immunol Lett 68: 135-139, 1999.

Reynolds JEF, Prasad AB : Martindale: The Extra Pharmacopeia, 28th edi., Martindale: The Extra Pharmacopoeia, London, The Parmaceutical Press, p 199, 1982.

Rifas L, Avioli LV : A novel T cell cytokine stimulates interleukin-6 in human osteoblastic cells. J Bone Miner Res 14: 1096-1103, 1999.

Rouse RV, Bolin LM, Bender JR, Kyewski BA : Monoclonal antibodies reactive with subsets of mouse and human thymic epithelial cells. J Histochem Cytochem 36: 1511-1517, 1988.

Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P : CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a Herpesvirus saimiri gene. J Immunol 150: 5445-5456, 1993.

Savino W, Villa verde DM, Lannes Vieira J : Extracellular matrix proteins in intrathymic T celll migration and differentiation? Immunol Today 14: 158-161, 1993.

Schuurman HJ, Kuper CF, Kendall MD: Thymic microenvironment at the light microscopic level. Microsc Res Tech 38: 216-226, 1997.

Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S, Kolls JK : Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. J Immunol 164: 4783-4789, 2000.

Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M : Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogenactivated protein kinases and NF-κB. J Biol Chem 273: 27467-27473, 1998.

Sladek NE : Metabolism of cyclophoshamide by rat hepatic microsomes. Cancer Res 31: 901-908, 1971.

Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, Hromas R : Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. J Immunol 167: 4137-4140, 2001.

Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautes-Fridman C : Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. Cancer Res 59: 3698-3704, 1999.

Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD : Interleukin-17 and interferon-γ synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. J Invest Dermatol 111: 645-649, 1998.

Tokuda H, Kozawa O, Uematsu T : Interleukin (IL)-17 enhances prostaglandin $F_{2\alpha}$-stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 66: 427-433, 2002.

Tokuda N, Hamasaki K, Mizutani N, Adachi Y, Sawada T, Funahashi H, Shioda S, Fukumoto T : Expression of PAC1 receptor in rat thymus after irradiation. Regul Pept 123: 167-172, 2004.

Wang GJ, Cai L : Relatively low-dose cyclophosphamide is likely to induce apoptotic cell death in rat thymus through Fas/Fas ligand pathway. Mutation Res 427: 125-133, 1999.

Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A : IL-17 stimulates intra-peritoneal neutrophil infiltration through the release of GRO a chemokine from mesothelial cells. J Immunol 165: 5814-5821, 2000.

Wurbel MA, Malissin M, Guy-Grand D, Meffre E, Nussinzweig MC, Richelme M, Carrier A, Malissen B : Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T-and B-cell development and a reduction in T-cell receptor $\gamma\delta^+$ gut intraepithelial lymphocytes. Blood 98: 2626-2632, 2001.

Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, Victorero G, Freeman, Wooding P, Miazek A, Mattei MG, Malissen M, Jordan BR, Malissen B, Carrier A, Maquet P : The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double-and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. Eur J Immunol 30: 262-271, 2000.

Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF : Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. Immunity 3: 811-821, 1995.

Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, Vanden-Bos T, Zappone JD, Painter SL, Armitage RJ : Mole-

www.kci.go.kr

cular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. Cytokine 9: 794-800, 1997.

Yao Z, Timour M, Painter S, Fanslow W, Spriggs M : Complete nucleotide sequence of the mouse CTLA8 gene. Gene 168: 223-225, 1996.

Yoon S, Yoo YH, Kim BS, Kim JJ : Ultrastructural alterations of the cortical epithelial cells of the rat thymus after cyclophosphamide treatment. Histol Histopathol 12: 401-413, 1997.

Ziolkowska M, Koc A, Luszczykiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W : High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. J Immunol 164: 2832-2838, 2000.

www.kci.go.kr

Expression of IL-17A during Thymus Regeneration in the Rat

Hak-Jong Choi, Hee-Woo Lee[1], Jong-Hun Park, Sae-Ock Oh, Sun-Yong Baek, Bong-Seon Kim, Sik Yoon

Department of Anatomy, Pusan National University School of Medicine
[1]*Research Institute for Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

Abstract : IL-17A is a pro-inflammatroy cytokine secreted by activated T cells. The IL-17 family consist of IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E and IL-17F. IL-17A and IL-17F are produced primarily in activated T cells. In contrast, IL-17B, IL-17C, IL-17D and IL-17E are expressed in a wide assortment of tissues. Their functions partially overlap those of IL-17A, although they have not been as thoroughly investigated. The receptor for IL-17A (IL-17R) is widely expressed in a variety of tissues.

IL-17A and IL-17E mRNAs were expressed in only EL4 cells. IL-17C mRNA expression was observed in the thymic subcapsular/cortex epithelial cells (SNEC), cortex or cortical reticular cells (CREC), medullary epithelial cells (MEC), medullary interdigitating-like cells (MDC), thymocytes and EL4 cells. However, IL-17C mRNA was not expressed in RAW 264.7 cells. Immunohistochemical study also demonstrated not only the presence of IL-17A mainly in the thymic epithelial cells, but also the upregulated expression of IL-17A in the thymic epithelial cells of the regenerating thymus.

Thus, the results of the present study suggest that IL-17A expressed in the thymocytes and thymic epithelial cells could play an important role in the development of new T cells to replace T cells damaged by cyclophosphamide treatment during thymus regeneration.

Keywords : IL-17, IL-17A, Thymus, Thymic stromal cells, Thymocytes, Thymic epithelial cells, Thymus regeneration

Correspondence to : Sik Yoon (Department of Anatomy, Pusan National University School of Medicine)
E-mail : sikyoon@pusan.ac.kr

www.kci.go.kr