

비스테로이드성 항염증제가
n-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine에
의한 사람 중성구의 이동에
미치는 영향

고신대학교 의학부 약리학 교실
김우미, 박승언, 강구일

**Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on
n-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Induced
Migration of Neutrophil**

Woo Mi Kim, Sung-En Park, and Kooil Kang

*Department of Pharmacology, Kosin Medical College
Pusan 602-702, Korea*

= Abstract =

Migration of neutrophil to the inflammatory site is an important phenomenon in inflammatory diseases. To investigate whether non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs), which inhibit cyclooxygenase in prostaglandin synthesis pathway, have a specific property interfering migration of neutrophil or not, we studied the effects of seven NSAIDs on n-formyl-peptide-induced migration of neutrophil using a 48-well micro chemotaxis assembly.

Oxyphenbutazone, phenylbutazone, sulindac, zomepirac and ibuprofen at effective plasma concentration suppressed the migration of neutrophil up to 66.4, 33.7, 33.3, 36.2, and 23.5%, respectively. Salicylate showed no effect on the migration of neutrophil, however, indomethacin showed stimulation effect. Even though same class of indol derivatives, sulindac inhibits and indomethacin stimulates the chemotaxis of neutrophil.

From these results, we suggested that there might be another mode of pharmacological action of NSAIDs for anti-inflammatory effect, in addition to cyclooxygenase inhibition, direct acting on the chemotaxis of neutrophil.

Key words : Migration of Neutrophil, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs.

서 론

염증 반응시 국소 부위에서는 미세 혈관의 투과력 증가, 혈액 성분의 세포간 유출, 백혈구의 동원등이 야기되고, 임상적으로 홍반(erythema), 부종(edema), 압통(tenderness), 통증등과 같은 증상들이 나타난다⁹⁾. 이때 화학주성 인자(chemotactic factor)로 작용하는 histamine, leukotriene, kinin, prostaglandin과 같은 물질들이 생성될 뿐 아니라, 탐식 세포(phagocytic cell)의 이주, 분해 효소(lytic enzyme)의 유리등이 염증 반응에 함께 관여함으로써 상기 증상들을 유발시키는 것으로 알려지고 있다⁹⁾. 이같은 일련의 과정들이 외부로부터 침입한 병원체에 대하여 방어 기전으로서 작용할 뿐 아니라, 병적인 상황하에서는 과다하게 유리된 분해 효소의 활성도가 증가되고 인체내 정상 조직에 대하여 단백분해반응(proteolytic reaction)을 야기시킴으로써 류마치양 관절염등의 비화농성 염증성 질환들을 일으키는 데 관여하기도 한다^{3 15, 16, 18 25)}. 따라서 이러한 염증 반응시의 각각의 단계에 영향을 미칠 수 있는 약제들에 대한 연구는 이 질환들의 병리 기전을 이해하고 치료하는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

한편 이와같은 염증성 질환들에서 이미 사용되고 있는 aspirin계 약물들은 그 약리 기전이 prostaglandin 생합성 과정에 관여하는 cyclooxygenase를 억제함으로써 항염증 작용을 나타내는 것으로 알려지고 있다⁹⁾. 최근에 Bae²⁾등은 보고를 통하여 이 약제들이 분자 단계에서 나타내는 또다른 약리작용 - 류마치양 관절염등의 염증성 질환¹¹⁾에서 prostaglandins에 의해 유발되는 통증, 부종등의 증상을 완화시키는 작용 이외에도 elastase^{15), 16)}, cathepsin G²⁶⁾와 같은 neutral protease의 활성도를 직접 억제함으로써 관절 연골의 조직 파괴를 방지하는 작용 - 을 나타냄을 제시한 바 있다.

또한 1888년 Leber 이후로 염증 세포의

chemotaxis에 대한 많은 연구가 진행되어 오면서^{19, 20, 21, 22 23)}, 이와 관련된 다양한 약제들이 연구되는 가운데 상기 언급한 비스테로이드성 항염증제 중에서 acetylsalicylic acid, phenylbutazone, indomethacin과 같은 약제들이 연구 대상이 되기도 하였다^{1, 4 10, 14)}. 이러한 연구는 aspirin계 약제들이 염증 부위에서 나타내는 약리 작용의 기전을 분자 단계에서 뿐만 아니라, 세포 단계에서 이해하는데 도움이 되므로, 염증 반응시 나타나는 발열, 통증과 같은 증상을 완화시키는 약리 작용을 설명함에 있어서, 지금까지와는 다른 차원의 기전들을 규명하는데 토대가 될 수 있을 것으로 기대된다.

이에 본 연구에서는 aspirin계 약제들이 염증 부위에서 나타내는 항염증 작용의 기전을 규명하기 위한 기본 단계로서 혈액으로부터 중성구를 순수 분리한 후, chemoattractant의 농도와 incubation 시간을 다양하게 변화시켜 가장 많은 수의 세포가 chemotaxis를 일으킬 수 있는 최적 환경을 알아내고, 여기에 7종의 비스테로이드성 항염증제를 첨가하여, 이 약제들이 중성구의 이동에 미치는 영향을 알고자 한다.

실험 방법

1. 중성구의 분리

Step gradient centrifugation method¹⁷⁾를 시행하였다. 15ml의 원심분리용 시험관에 밀도가 서로 다른 hypaque-ficoll용액 A (density=1.133), B (density=1.122), C (density=1.080)를 각각 2ml씩 넣고, 건강한 공여자로부터 채취한 신선 전혈 6ml를 heparin 60units와 혼합한 후 C 용액과 섞이지 않도록 조심스럽게 첨가하였다. 22℃ - 25℃의 실내 온도에서 200g 속도로 25분간 원심분리시킨 다음, 여기서 분리된 각각의 세포 분획들을 확인하고 pasteur pipette을 사용하여 추출한 후, Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 3-5번씩 세척하였다.

2. 세포 생존율(viability) 및 순도

분리된 세포 분획들의 순도를 알기 위하여 각각 slide glass에 도말하여 Wright-Giemsa 염색을 한 후 differential count(%)를 하였다. 세포 생존율은 각 세포층을 trypan blue 시약으로 염색한 다음, hemocytometer를 이용하여 산출하였다.

3. 약물 준비

화학 주성 인자(chemoattractant)로 사용한 n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)을 dimethyl sulphoxide(DMSO)에 10mM 농도로 녹인 다음, -4°C 하에서 보관하였으며, chemotaxis 실험 직전에 10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M 농도가 되도록 HBSS로 희석하여 사용하였다. 비스테로이드성 항염증제는 acetyl salicylic acid, ibuprofen, phenylbutazone, oxyphenbutazone, indomethacin, sulindac, zomepirac를 사용하였으며, 이 약제들은 1% 미만의 DMSO에 녹인 후, HBSS용액을 이용하여 혈중 치료농도와 동일한 농도로 희석시켜 사용하였다.

4. Chemotaxis 실험

Chemotaxis 실험은 48-well micro chemotaxis assembly(multiwell chamber, Neuro probe, Inc., Bethesda, MD)를 이용하여 실시하였다. 하단구획(lower compartment)에 10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M 농도의 FMLP를 27ul씩 넣고, 상단 구획(upper compartment)에는 10^6 여개의 중성구와 혈중 치료 농도로 희석한 상기 항염증제들을 1 well당 45ul씩 넣은 후, 5 micron pore size의 nitrocellulose/cellulose acetate filter를 통하여 세포가 이동할 수 있도록 37°C 에서 10분, 20분, 30분, 60분동안 반응시켰다. 반응후 filter를 통과한 세포는 methanol 용액내에서 20초간 고정시킨 다음 Wright 염색을 하였으며, 이동한 세포수를 산출하기 위하여 현미경상(400배)에서 무작위로 지정한 10개의 시야에서 세포수를

세었고, 각각의 값들을 평균하여 이동한 총 세포수로 나타내었다. 약물의 농도별 효과에 대한 유의성은 t-test를 통하여 판정하였다.

실험 결과

1. 중성구의 분리

전혈로부터 중성구를 분리하기 위하여 Step gradient centrifugation method를 시행하였으며, 200g에서 25분간 원심 분리시킨 결과, Fig. 1 과 같은 분획들이 나타남을 볼 수 있었다.

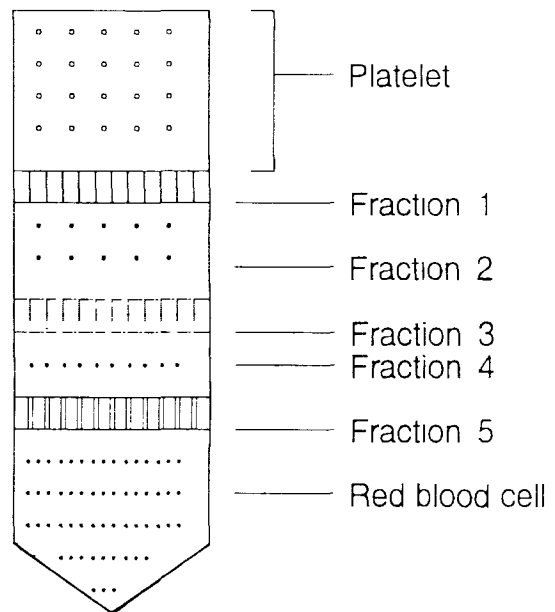


Fig. 1 Band after centrifugation

1번 분획에서는 87%이상의 림프구와 10%미만의 단핵구가 관찰되었고, 2번 분획은 97%이상의 림프구가 주를 이루었으며, 3번 분획은 93%이상의 림프구와 6%미만의 중성구로 구성되었다. 또한 97%이상의 중성구로 구성된 4번 분획과 10%미만의 적혈구가 혼합된 5번 분획 사이의 경계는 불명확하였으며, 두 분획을 따로 채취하기가 어려웠다. 따라서 본 연구에서는 4번 분획과 5번 분획을 함께 채취하여 실험에 사용하

였으며, 이때 세포 생존율은 98% 이상으로 나타났고, 중성구가 96.5% 이상을 차지함을 확인하였다.

2. FMLP의 농도 및 incubation 시간대에 따른 중성구의 chemotaxis

화학 주성 인자(chemoattractant)로 사용한 FMLP의 농도에 따라 중성구의 chemotaxis가 어떠한 차이를 나타내는지를 보기 위하여, 48 well micro chemotaxis assembly를 이용하여 chemotaxis 실험을 하였으며, nitrocellulose/cellulose acetate filter를 통과한 세포수를 계산한 결과, Fig. 2과 같이 나타낼 수 있었다.

FMLP의 농도가 증가함에 따라 중성구의 이주가 증가되었는데, 이 현상은 약물 농도가 10uM 일때 가장 peak를 나타내었으며, 이 농도에서 이동된 세포수는 1.44×10^4 개로 나타났다. 반면에 100uM 이상의 농도에서는 고농도로 갈수록 이동한 세포의 수치가 오히려 줄어드는 현상을 관찰할 수 있었다.

또한 incubation 시간대에 따른 chemotaxis 실험 결과에 의하면, incubation 시간이 20분에서 40분 사이일 때 가장 많은 수의 세포가 이동하였으며, 10분 미만 혹은 40분이상 incubation 시켰을 때에는 세포의 이동이 거의 없었거나 이동한 세포 자체가 형태상의 변화를 나타내었으므로 세포수를 산출하기에 부적절하였다.

3. 비스테로이드성 항염증제가 중성구의 chemotaxis에 미치는 영향

7종의 비스테로이드성 항염증제를 대상으로 이 약제들이 중성구의 chemotaxis에 미치는 영향을 실험한 결과에 의하면(Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5) 본 연구에서 실시한 약물의 혈중 농도하에서 acetylsalicylic acid와 indomethacin을 제외한 나머지 약제가 모두 중성구의 이동을 억제하였음을 관찰할 수 있었으며, 그 억제 정도에 있어서는 약제에 따라 다소 차이를 나타냄을 볼 수 있었다.

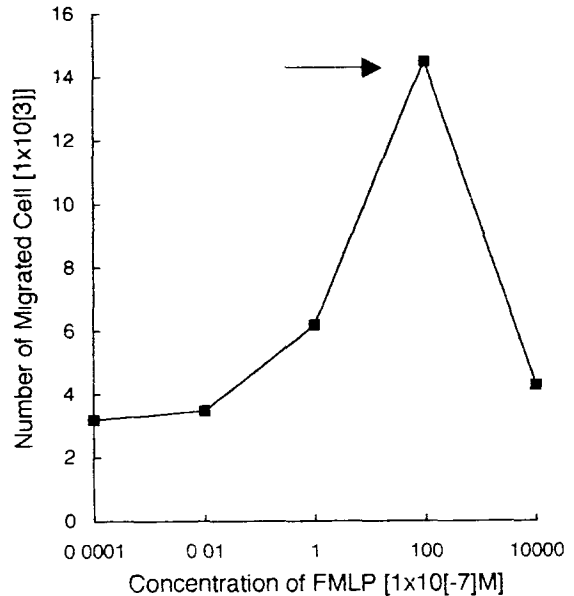


Fig. 2 Dose Response of Human Neutrophil to FMLP.

A 48 well micro chemotaxis chamber was used to evaluate the neutrophil dose response to n-formyl-leucyl-phenylalanine. Values represent the number of migrated neutrophil per 1mm² filter surface as determined with light microscope.

가장 높은 억제효과를 나타낸 oxyphenbutazone이 66.67%의 억제율을 나타내었으며(Fig. 4, Table 2), 그외에 phenylbutazone, sulindac, zomepirac의 억제율은 각각 37.3%, 33.3%, 36.2%로 유사한 값을 나타내었으며(Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5), 이보다 낮은 억제 효과를 나타낸 ibuprofen의 억제율이 23.5%로 나타났다(Fig. 3, Table 1). 특히 Oxyphenbutazone과 phenylbutazone은 모두 pyrazolon 유도체로서 유사한 분자 구조를 나타내지만 중성구의 chemotaxis를 억제하는 작용에 있어서는 서로 차이를 나타냈음을 볼 수 있으며(Fig. 4, Table 2), 이와 비슷한 현상은 indol계열의 약제들 사이에서도 발견할 수 있는데, sulindac이 중성구의 이동을 억제하는 효과를 나타내는

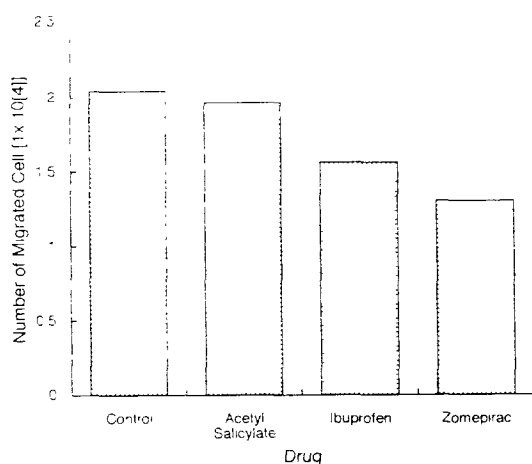


Fig. 3 Effects of Acetyl Salicylate, ibuprofen, and Zomepirac on the FMLP-Induced Migration of Neutrophil.

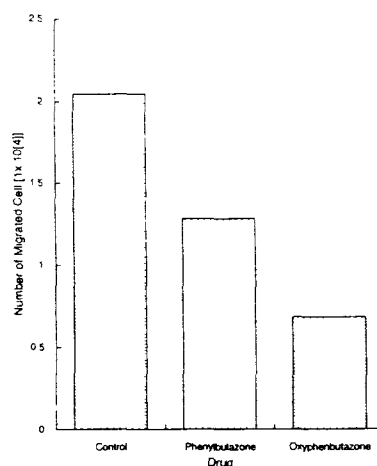


Fig. 4 Effects of Pyrazolon Derivatives on the FMLP-Induced Migration of Neutrophil.

Table. 1 Effects of Acetyl Salicylate, Ibuprofen, and Zomepirac on the FMLP-induced Migration of Neutrophil

Drug	Migrated Cell Number (1×10^4)	Inhibition (%)	p-Value
Control	2.04 ± 0.08	100	—
Acetyl Salicylate	1.96 ± 0.12	95	<0.186
Ibuprofen	1.56 ± 0.04	76	<0.001
Zomepirac	1.30 ± 0.02	64	<0.003

Values represent the number of migrated neutrophil per 1mm^2 filter surface as determined with light microscope. Statistical analysis was done by t-test and significance was accepted by p-value of less than 0.05.

Table. 2 Effects of Pyrazolon Derivatives on the FMLP-induced Migration of Neutrophil

Drug	Migrated Cell Number (1×10^4)	Inhibition (%)	p-Value
Control	2.04 ± 0.08	100	—
Phenylbutazone	0.28 ± 0.08	63	<0.001
Oxyphenbutazone	0.68 ± 0.11	33	<0.001

Values represent the number of migrated neutrophil per 1mm^2 filter surface as determined with light microscope. Statistical analysis was done by t-test and significance was accepted by p-value of less than 0.05.

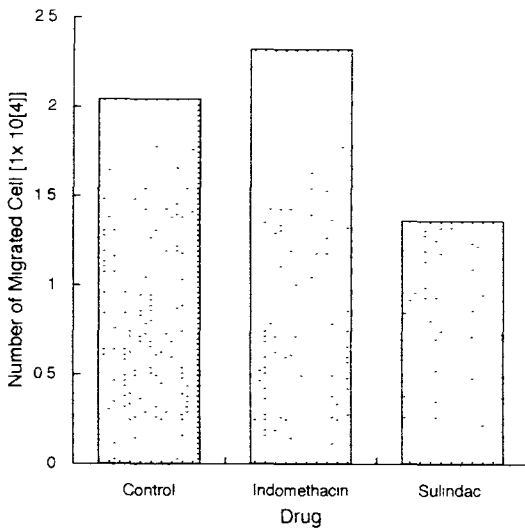


Fig. 5 Effects of Indomethacin and Sulindac on the FMLP-Induced Migration of Neutrophil.

반면에, 같은 계열인 indomethacin은 오히려 증가시키는 작용을 나타냄을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, Table 3).

Table. 3 Effects of Indomethacin and Sulindac on the FMLP-induced Migration of Neutrophil

Drug	Migrated Cell Number (1×10^4)	Inhibition (%)	p-Value
Control	2.04 ± 0.08	100	—
Indomethacin	2.32 ± 0.02	114	<0.007
Sulindac	1.36 ± 0.01	67	<0.001

Values represent the number of migrated neutrophil per 1mm^2 filter surface as determined with light microscope. Statistical analysis was done by t-test and significance was accepted by p-value of less than 0.05.

어떠한 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 이 가운데 Boyden의 방법을 변형하여 최근에 고안된 48-well micro chemotaxis assembly⁸⁾를 이용하였으며, Harvath¹³⁾ 등이 보고한 바 있는 polyvinylpyrrolidone-free

고 찰

중성구의 chemotaxis는 일련의 염증 반응이 일어나는 과정중 그 초기 단계로써 외부에서 유입된 병원체에 대하여 숙주가 방어 작용을 나타내는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 병적인 상황하에서는 chemotaxis에 의해 환부에 집결한 중성구가 neutral protease를 과다하게 분비함으로써 비화농성 염증성 질환들을 야기시키기도 한다.^{3, 15, 16, 18, 25)} 따라서 이러한 염증 반응이 일어나는 기전들을 이해하고 그 과정을 조절하는데 도움이 되고자 chemotaxis에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔으며^{4, 10, 14, 23, 27)}, 실험 방법면에 있어서도 다양한 기술들이 개발되어 왔다^{6-8, 12)}. 그 예로서 Grimes¹²⁾는 슬라이드 상에서 각각의 세포의 이동을 관찰하였고, Clausen⁶⁾, Cutler⁷⁾ 등은 chemotaxis 실험에 agarose를 사용하였으며, 1962년 Boyden⁵⁾은 membrane filter를 이용한 방법을 보고하였다. 이에 본 연구에서는 비스테로이드성 항염증제들이 중성구의 chemotaxis 과정에

polycarbonate membrane을 사용하였다. 특히 실험에 사용한 중성구는 98%의 생존율과 96.5% 이상의 순도를 나타내는 세포 분획으로서 이 세포들은 건강한 공여자로부터 채혈한 신선 전혈로부터 분리하였으며,

1987년 Ghim¹⁷⁾ 등이 보고한 step gradient centrifugation method를 이용하여 분리한 결과, 최적 분리조건 및 분리결과에 있어서 다소 차이를 나타냄을 볼 수 있었다. 이전의 연구에서는 혈구 세포들의 분리시 각 세포들의 생존율 및 순도를 높이는데 필요한 환경조건으로 원심 분리시의 속도, 시간, 온도 등이 제시되기도 하였으나, 본 연구에서는 이 조건외에 사용한 혈액의 신선도가 가장 중요한 변수로 작용하였음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 채혈 후 1시간 이내의 전혈을 사용하여, 22℃에서 24℃사이의 실온하에서 200g 속도로 25분간 원심 분리시켰으며, 그 결과 Fig. 1에 표식한 바와 같이 Ghim¹⁷⁾의 보고에서보다 더욱 세분화된 5개의 분획을 얻을 수 있었으며, 여기서 분리된 중성구는 96.7% 이상의 순도를 나타내었다.

화학주성인자로 사용한 FMLP의 농도에 따른 세포의 이동은 Fig. 2와 같이 나타났는데, 가장 많은 수의 세포가 이동하였을 때의 FMLP의 최대 농도는 10uM임을 알 수 있었으며, 10uM 이상의 농도에서는 고농도로 갈수록 오히려 이동한 세포수가 감소하였음을 관찰할 수 있었다. 그리고 incubation 시간은 20분에서 30분 사이가 가장 적당하였으며, 본 실험 조건하에서 30분 이상 경과된 incubation 시간은 오히려 세포의 생존율 자체에 악영향을 줄 수 있음을 알 수 있었다.

비스테로이드성 항염증제가 중성구의 chemotaxis에 미치는 영향을 관찰한 바에 의하면 혈중 농도하에서 oxyphenbutazone을 비롯한 phenylbutazone, zomepirac, sulindac, ibuprofen과 같은 약제들이 모두 중성구의 이동에 대한 억제 작용을 나타내었음을 볼 수 있었다(Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5). 지금까지의 보고에 의하면 aspirin계 약제들은 lipooxygenase를 억제하지 못하므로 화학주성인자로 작용하는 leukotriene 계열의 생성에는 영향을 미치지 못하는 것으로 알

려져 왔으며⁹⁾, 이것은 백혈구의 동원에는 거의 관여치 않음을 시사해 주고 있다. 하지만 본 연구의 이같은 결과는 이 약제들이 prostaglandin 생합성 과정에서 cyclooxygenase의 작용을 억제시켜 항염증 작용을 나타낸다는 종래의 약리 기전외에도, 염증 부위로 중성구의 이동 자체를 세포 단계에서 직접 억제할 수 있는 또다른 작용이 있음을 나타내어 준다. 또한 Fig. 4와 Fig. 5에서 보는 바와 같이 동일한 계열의 약제들이 서로 다른 억제율을 보였는데, 그 예로서 cyclooxygenase를 억제하는 과정에서 동일한 기전을 나타내며, 유사한 분자 구조를 갖는 phenylbutazone과 oxyphenbutazone은 같은 pyrazolon 계열의 약제이지만 중성구의 chemotaxis를 억제하는데 있어서는 서로 차이를 나타냄을 볼 수 있다. 이와 마찬가지로 indol 유도체인 indomethacin은 중성구의 이동을 오히려 증가시킨 반면에, 같은 계열의 약제인 sulindac은 이와는 상반된 효과적인 억제 작용을 나타냄을 관찰할 수 있었다. 이는 본 실험에서 제시하였던 chemotaxis 억제작용이 prostaglandin 생합성 억제 기전과는 다른 독립된 기전으로 일어나는 새로운 차원에서 약리 작용임을 나타내어 준다.

이상의 연구를 통하여 비스테로이드성 항염증제가 항염증 작용을 나타내는 일련의 과정 중에서, 초기 단계에 중성구가 환부로 이동하는 과정 자체를 세포 단계에서 직접 억제할 수 있다는 새로운 기전을 제시할 수 있으며, 이는 약리학적 측면에서 그 의의가 클 뿐만 아니라, 이 약제들이 염증 부위에서 나타내는 전반적인 약리 기전들을 이해하고 이를 토대로 만성 염증성 질환들을 치료하고자 하는 관점에 있어서 큰 도움이 될 것으로 기대되는 바이다.

결 론

1. FMLP의 농도가 10uM일 때와 37℃에서 20분간 incubation 시켰을 때 가장 많은 수의 세포가 이동하였음을 볼 수 있었다.

2. Oxyphenbutazone, Phenylbutazone, Sulindac, Zomepirac, Ibuprofen이 각각 혈중 농도하에서 66.4%, 33.7%, 33.3%, 36.2%, 23.5%의 억제율을 나타내었다.
3. 동일한 pyrazolon 계열의 약제인 phenylbutazone과 oxyphenbutazone은 서로 다른 억제율을 나타내었으며, indol 계열의 약제인 sulindac은 세포의 이동을 효과적으로 억제한 반면에, 같은 계열의 indomethacin은 중성구의 이동을 오히려 증가시키는 작용을 나타내었다.
4. 본 연구를 통하여 비스테로이드성 항염증제가 항염증 작용을 나타내는데 있어서 지금까지 밝혀진 PGs 생합성 억제 및 protease 활성화도 억제 작용 외에 중성구의 chemotaxis 억제 작용이 함께 관여하는 것으로 사료된다.
5. Boyden S : The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 116 : 453, 1962
6. Clausen JE : Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leukocytes in agarose medium. *Acta Allergol* 26(1) : 56-80, 1971
7. Cutler, Munoz JJ : A simple in vitro method for studies on chemotaxis. *Proc Soc Exp Biol Med* 147(2) : 471-474
8. Falk W, Goodwin RH, Leonard EJ : A 48-well micro assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Methods* 33(3) : 239-247, 1980

REFERENCES

1. Abita JP : Indomethacin is a competitive inhibitor of the binding of the chemotactic peptide FMLP on human polymorphonuclear neutrophil(PMN). *Agents Actions* 11(6-7) : 610-612, 1981
2. Bae SJ, Ghim SY and Kang K : Inhibition of human leukocyte cathepsin G by NSAIDs. *Korean J Pharmacol* 26(1) : 51-54, 1990
3. Baggiolini M, Schnyder J, Bretz U, Dewald B and Ruch W : Cellular mechanisms of proteinase release from inflammatory cells and the degradation of extracellular proteins. *Ciba Found Symp* 75 : 105, 1979
4. Borel JP : Effect of some drugs on the chemotaxis of rabbit neutrophils in vitro. *Experientia* 29 : 676, 1973
9. Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F : The pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York : Macmillan publishing Co., 1990, 638-681
10. Giroud JP, M Roch-Arveiller : Modification of polymorphonuclear chemotaxis by various groups of drugs. *Trends Pharmacol Sci* 39 : 447-449, 1982
11. Glynn LE : Occasional Survey, Royal Cameron Lecture, 1971. Pathology, pathogenesis and etiology of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 31 : 410-420, 1972
12. Grimes GJ, Barnes FS : A technique for studying chemotaxis of leukocytes in well-defined chemotactic fields. *Exp cell Res* 79(2) : 375-385, 1973

13. Harvath L, Falk W and Leonard EJ : Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis : Use of a polyvinyl-pyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J Immunol Methods* 37 : 39-45, 1980
14. Huy DP, M Roch-Arveiller, Muntaner O, Giroud JP : Effect of some anti-inflammatory drugs on FMLP-induced chemotaxis and random migration of rat polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Pharmacol* 111 : 251-256, 1985
15. Janoff A : Neutrophil proteases in inflammation. *Annu Rev Med* 23 : 177-190, 1972a
16. Janoff A : Human granulocyte elastase : Further delineation of its roles in connective tissue damage. *Am J Pathol* 68 : 579-591, 1972b
17. Jeong HY, Ghim SY and Kang K : Simultaneous separation of pure neutrophils from normal human blood by step gradient centrifugation. *Korean J Immunol* 9(1) : 27-31, 1987
18. Kang K : The role of neutral proteinases in cellular invasion. *J Kosin Med Coll* 2 : 187-212, 1986
19. Parente L, Koh MS, Willoughby DA and Kitchen A : Studies on cell motility in inflammation II. The in vivo effect of anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs on chemotaxis in vitro. *Agents Actions* 9 : 196-200, 1979
20. Rivkin I, Foschi GV and Rossen CH : Inhibition of in vitro neutrophil chemotaxis and spontaneous motility by anti-inflammatory agents. *Proc Soc Exp Biol(N.Y.)* 153 : 236-240, 1976
21. Roch-Arveiller M, Bradshaw D and Giroud JP : Relationship between inhibition of rat polymorphonuclear chemotaxis and various inflammatory reactions. *Agents Actions* 9 : 289-293, 1979
22. Schiffmann E, corcoran BA and Wahl SA : N-Formylmethylionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc natl Acad Sci USA* 72 : 1059-1062, 1975
23. Smith RJ, Iden SS : Pharmacological modulation of chemotactic factor elicited release of granule associated enzymes from human neutrophils. Effects of prostaglandins, non-steroidal anti-inflammatory agents and corticosteroids. *Biochem Pharmacol* 29 : 2389-2395, 1980
24. Starky PM : The role of cellular elastase in inflammation. *Front Matrix Biol Sci* 8 : 188-198, 1980
25. Starky PM, Barret AJ, Burleigh MC : The degradation of articular collagen by neutrophil proteases. *Acta Biochim Biophys* 483 : 386-397, 1977
26. Travis TJ, Gilles PJ, Procelli L, Relly CF, Baugh R, Power J : Human leukocyte elastase and cathepsin G : Structural and functional characteristics. *Exp Med* 75 : 51, 1979
27. Zigmond SH, Hirsch JG : Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med* 137(2) : 387-410, 1973