

인간 골격근세포주(HM4)에서 Interleukin-6 생성에 대한 정맥내 글로불린의 효과

아주대학교 의과대학 신경과학교실, 뇌질환연구소*

주인수 주역식 김성희* 이용범*

Effect of Intravenous Immuglobulin on Interleukin-6 Production in Human Skeletal Muscle Cell Line (HM4)

In Soo Joo, M.D., Eok Shik Joo, M.D., Seoung Hoi Kim*, Yong Beom Lee, Ph.D.*

Departments of Neurology and Brain Disease Research Center*, Ajou University College of Medicine, Suwon, Korea

Background: Intravenous immunoglobulin (IVIg) has been widely used in the management of patients with various autoimmune neurological diseases, however, its action mechanisms have not fully been elucidated yet. This study focused on the effects of IVIg on the production of interleukin-6 (IL-6), one of major proinflammatory cytokine, using a human skeletal muscle cell line (HM4). **Methods:** After HM4 cells were cultured in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum for 24 h, the culture medium was changed with serum-free media. TNF- α (tumor necrosis factor- α , 100 ng/mL) and IVIg (5 mg/mL) were treated alone or in combination and cultured for various time. RT-PCR and ELISA kit were employed for mRNA expression and secretion of IL-6, respectively. **Results:** Treatment with TNF- α or/and IVIg significantly induced IL-6 mRNA expression ($p < 0.001$). Although IL-6 production was markedly increased by TNF- α ($p < 0.001$), IVIg treatment alone or in combination with TNF- α had no effect on the production of IL-6 except at 6 h after the treatment. **Conclusions:** IVIg seems not to have a significant effect on IL-6 production as an action mechanism of its immunomodulatory capabilities, at least in the HM4 cell line.

J Korean Neurol Assoc 22(3):249-254, 2004

Key Words: Intravenous immunoglobulin, IL-6, Human skeletal muscle cell line

서 론

고농도 정맥 내 면역글로불린(intravenous immunoglobulin, IVIg)은 초기에 특발성 혈소판감소성자반증(idiopathic thrombocytopenic purpura)이나 카와사키증후군(Kawasaki syndrome)과 같은 자가면역 질환에 주

로 사용된 이후,¹⁻³ 최근에는 급, 만성 염증성탈수초성말초신경병증이나 중증근무력증, 다발성경화증과 같은 많은 자가면역성 신경계 질환의 치료에 그 사용 영역이 확대되고 있다.^{4,5} 그러나 IVIg가 이처럼 많은 질환에 널리 사용되고 또한 치료 효과가 탁월함에도 불구하고, 아직까지 정확한 작용 기전에 대한 이해가 부족한 실정이다. IVIg의 작용 기전으로 Fc 수용체 매개 효과, 보체(complement)의 조절, 사이토카인 생성 조절, 초항원(superantigen)의 중화, 항인자형 항체(antiidiotypic antibody)에 의한 자기항체 중화, 면역글로불린의 대사 항진을 유도하거나 T 임파구의 기능과 항체의 인식 조절 등이 알려져 있다.⁶⁻⁸ 이 중에서도 사이토카인에 대한 IVIg의 영향에 관해서는 많이 알려져 있지 않다. 시험관 내 실험으로 리포다당질(lipopolysaccharide)로 자극을

Received November 10, 2003

Accepted January 2, 2004

* Address for correspondence

In Soo Joo, M.D.

Department of Neurology, Ajou University College of Medicine
San 5 Wonchon-dong, Paldal-gu, Suwon-si, 442-749, Korea
Tel : +82-31-219-5172 Fax : +82-31-219-5178
E-mail : isjoo@ajou.ac.kr

가한 말초 혈액 단핵세포와 복막 대식세포에서 IVIg를 투여하면 각각 IL-6, TNF- α 와 IL-1의 생성이 줄어드는 연구 결과가 보고되었다.^{9,10} 또, IVIg를 투여한 환자의 혈청에서 IL-1 수용체 길항물질(IL-1ra)이 증가하기도 하고,¹¹ IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α 및 TGF- β 의 생성에 IVIg가 영향을 주는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴

IL-6는 주로 대식세포나 T-임파구, 섬유모세포 등에서 분비되는 전구염증성 사이토카인으로 B-임파구에서 면역글로불린의 생성을 유도하고, T-임파구의 증식과 세포독성 T-세포로 분화시키는 역할을 한다.¹⁵ 뿐만 아니라 감염에 대한 급성 반응에 관여하는 주된 사이토카인 중 한 가지이다. 류마티스관절염 환자의 윤활액(synovial fluid)에는 다량의 IL-6가 존재하고, 이러한 환자의 혈청 내 IL-6 양은 질병의 활성도와 밀접한 관계가 있다.¹⁶ 중증근무력증이나 근염과 같은 신경계 질환에서도 IL-6가 질병의 병인에 어느 정도 관여를 하고 있다. 근염 환자의 근육 조직에는 IL-6를 포함하는 다양한 사이토카인들이 근육 내 염증세포나 내피세포, 혹은 근육 세포 자체에서 발현되거나 분비된다.¹⁷⁻¹⁹ 뿐만 아니라 근육세포주 세포²⁰나 정상 근육세포²¹에서도 IL-6 mRNA의 발현이나 분비가 확인되었다. 근육세포에서 분비되는 다양한 사이토카인은 근염의 병인에 어느 정도 영향을 주고 있는 것으로 알려져 있다.²²

저자들은 이러한 사실을 근거로 염증 상태의 근육에서 IVIg가 IL-6의 발현이나 분비에 어떤 영향을 줄 것인가에 대해 인간골격근 세포주인 HM4 세포를 이용하여 조사해 보았다.

대상과 방법

1. 재료

실험에 사용된 HM4 세포주는 기존의 SKM14 세포주²⁰와 동일한 성질의 인간골격근 근모세포(myoblast)이다. 세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum과 horse serum은 Jeil Biotechservice Inc. (Daegu, Republic of Korea), trypsin, poly-D-lysine, penicillin 및 streptomycin은 Sigma (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다. cDNA를 합성할 때 사용한 재료 중 Trizol과 M-MLV reverse transcriptase, yeast tRNA는 Invitrogen (Life Technologies, Rockville, MD), ribonuclease 억제제는 Promega (Madison, WI, USA), isopropanol, chloroform은 Sigma에서 구입하였다. 생성된 IL-6는 hIL-6 ELISA DuoSet (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), ELISA-strip, 2 \times 8 well flat bottom과 high binding remova-strip용 96 well plate (Greiner, Maybachstrasse 2, FH, Germany)를 이용하여 측정하였다. TNF- α 는 R&D systems사에서 구입하였고, IVIg (I.V.-Globulin

S)는 녹십자(Yongin, Gyeonggido, Republic of Korea)에서 제공해 주었다.

2. 세포 배양

HM4 세포주 세포는 DMEM 용액에 5% fetal bovine serum과 5% horse serum, 그리고 1% penicillin 및 streptomycin이 첨가된 배양액을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3. IL-6 mRNA 발현 측정

6 well plate에 HM4 세포를 10⁶ cell/well의 양으로 하루 동안 배양한 후, 배양액을 무혈청 배양액(DMEM, 1 mg/well)으로 바꾸고 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 mRNA 발현을 측정하였다. 그 방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. HM4 세포에 자극인자 TNF- α (100 ng/mL)와 IVIg (5 mg/mL)를 따로 따로 혹은 동시에 처리하고 4시간이 경과한 다음, 배양액을 제거하고 well마다 산성 페놀(acidic phenol), 클로로포름(chloroform), 구아니딘시안산염(guanidine isothiocyanate)이 함유된 trizol 시약 1 mL를 첨가한다. 상온에서 15분을 방치한 다음, 현미경으로 plate 바닥에서 세포가 다 떨어졌는지를 확인하고 용액의 점성이 없어질 때까지 1 mL 마이크로 피펫으로 피펫팅한다. 이 용액을 1.5 mL 마이크로 튜브에 옮긴 후, 클로로포름 250 μ L를 첨가하여 잘 흔들어 준 다음, 얼음에서 15분간 방치하고 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 유기용매층과 mRNA가 함유된 상층액을 분리시킨다. 이때 중간층에 있는 단백질 및 DNA가 빨리 올라오지 않도록 주의하면서 상층액을 새 튜브에 옮기고 클로로포름 250 μ L를 넣어 다시 흔들어 준 다음, 13,000 rpm으로 5분간 다시 원심분리 하여 잔존하는 페놀 용액을 씻어준다. 혼합액의 상층액을 새 튜브에 옮기고, 같은 용량의 isopropanol, 10 μ L 효모 tRNA (10 mg/mL)를 첨가하고 잘 섞은 후 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치하여 RNA를 침전시킨다. 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 RNA 침전물을 모은 다음, 75% 에탄올로 침전물을 씻어 내고 10분 동안 건조시킨다. RT 완충용액(250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 40 U/mL DNase가 함유된 용액을 25 μ L 첨가하여 RNA 침전물을 녹인 후, 37 $^{\circ}$ C에서 20분 내지 30분 동안 반응시켜 잔존 DNA를 제거시킨다. 그리고 95 $^{\circ}$ C에서 10분, 얼음에서 3분간 방치하여 DNase를 불활성화시키고, 30~50 μ L diethyl pyrocarbonate (DEPC) water (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)로 RNA가 잘 섞일 수 있도록 피펫팅을 한다. 잘 섞인 RNA를 정량하고 0.1 M DTT, M-MLV RTase (200 U/ μ L), 5 \times buffer, 2.5 mM dNTP, RNasin (40 U/ μ L)이 함유된 용액 25 μ L

를 가한 다음, 37°C에서 2시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성한다. 이렇게 만들어진 cDNA에 PCR 완충용액(10 × buffer, 2.5 mM dNTP, primer, Taq. polymerase, template)을 넣고 PCR을 시행한다.

hIL-6의 PCR primer sequence는 5'-GTG TGA AAG CAG CAA AGA GGC-3' (sense primer)와 5'-CTG GAG GTA CTC TAG GTA TAC-3' (antisense primer)이며, PCR product의 크기는 159 bp였다. PCR 조건은 94°C에서 2분, 55°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1분으로 35사이클(IL-6)과 25사이클(GADPH)을 수행하였다. 1.5% agarose gel running상에서 DNA를 분리하고 0.5 μL/mL ethidium bromide로 염색을 하여 PCR 밴드를 확인하였다.

4. IL-6 생성에 대한 ELISA 측정

96 well plate에 HM4 세포(10⁵/well)를 하루 동안 배양한 후, 무혈청 배양액으로 바꾸고 TNF-α (100 ng/mL)와 IVIg (5 mg/mL)를 각각 그리고 동시에 처리한 다음, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6, 12, 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. hIL-6 immunoassay kit를 이용하여 제조회사에서 지시한 측정 방법에 따라 시간에 따른 IL-6의 양을 측정하였다.

5. 통계 분석

각 군 간의 IL-6 mRNA 발현과 사이토카인 생성은 One-way ANOVA (Turkey-Kramer multiple comparisons test, GraphPad Instat, version 3.05)를 이용하여 분석하였다. 데이터는 평균값±표준오차로 표기하였으며, *p*<0.05이면 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

아무런 자극이 없는 상태의 HM-4 세포에서 비록 소량이지만 IL-6의 mRNA 발현이 관찰되었다. TNF-α (100 ng/mL) 혹은 IVIg (5 mg/mL)를 투여하고 4시간 후에 IL-6 mRNA 발현은 현저하게 증가되었으며 (*p*<0.001), 특히 TNF-α에 의한 자극 효과가 두드러졌다. TNF-α와 IVIg를 동시에 투여한 경우, 단독으로 투여한 경우보다 의미 있게 IL-6 mRNA 발현이 증가되어 (*p*<0.001) 서로 상승 효과가 있는 것으로 판단되었다 (Fig. 1).

IL-6 생성의 관점에서 IL-6 mRNA 발현과 다소 다른 양상을 보여주었다. IVIg에 의한 IL-6의 증가는 관찰되지 않아 대조군과 비슷한 IL-6의 생성이 관찰되었다. 자극 시간이 길면 길수록 대조군과 IVIg 자극군에서 IL-6의 생성이 증가하였지만, 의미 있는 차이는 아니었다. 한

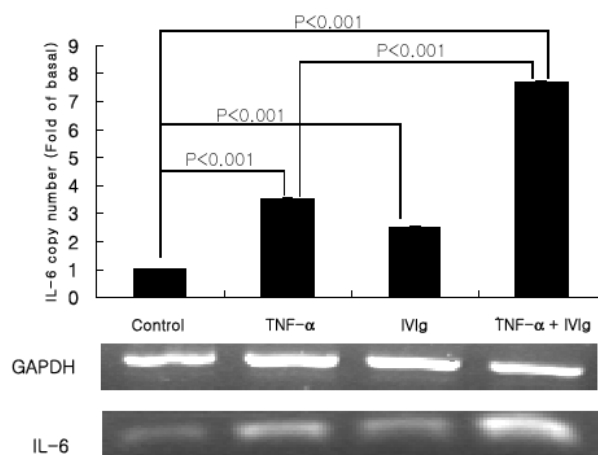


Figure 1. IL-6 mRNA expression 4 h after TNF-α (100 ng/mL) or/and IVIg (5 mg/mL) administration to HM4 cells. TNF-α and IVIg, alone or in combination, induce a significant expression of IL-6 mRNA in HM4 cells (*p*<0.001).

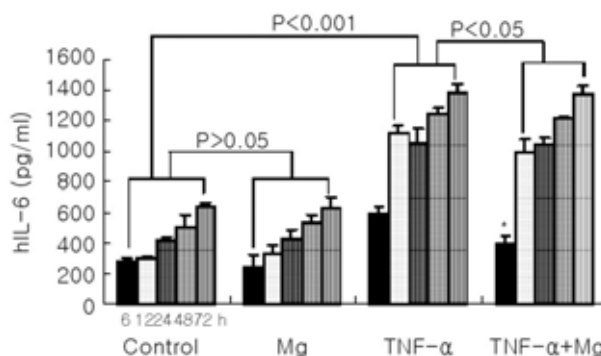


Figure 2. IL-6 production of HM4 cells according to time (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h) after treatment of TNF-α (100 ng/mL) and/or IVIg (5 mg/mL). TNF-α significantly increases the production of IL-6 by time, but IVIg does not. Co-treatment of TNF-α and IVIg can not reduce IL-6 production except at 6 h. All values are mean±SEM. Asterisk indicates *p*<0.05.

편, TNF-α 자극군의 경우, 대조군이나 IVIg 자극군에 비해 현저하게 IL-6의 증가를 보였으며 동시에 두 가지를 처리한 경우에도 결과는 마찬가지였다(*p*<0.001). 그러나 TNF-α와 IVIg를 동시에 투여한 경우와 TNF-α를 단독으로 처리한 경우를 비교해 보면, 투여 6시간째를 제외하고 IL-6의 생성에 의미 있는 변화는 관찰되지 않았다. 다만, 투여 6시간째 TNF-α에 의한 IL-6 생성 증가가 IVIg에 의해 어느 정도 억제되는 것으로 밝혀졌다(*p*<0.05) (Fig. 2).

고 찰

1981년 처음으로 사용된 이래, 다양한 영역의 질환에 IVIg가 사용되고 있으며, 최근 신경계 질환의 영역에서도 IVIg의 사용이 증가되고 있는 추세이다.⁴⁻⁵ 이미 효과

가 검증된 길랑-바레증후군(Guillain-Barre syndrome)이나 다초점성운동신경병증(multifocal motor neuropathy), 만성염증성탈수초성다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)뿐만 아니라, 중증근무력증, 다발성근염(polymyositis), 다발성경화증, 근강직증후군(the stiff-man syndrome) 등 다양한 질환의 치료에 IVIg가 시도되고 있다. 이들 자가면역 질환을 치료하는 기전 중 하나가 IVIg에 의한 사이토카인 분비의 조절이다.⁸ IVIg를 투여한 후 검사한 피부근염(dermatomyositis) 환자의 근육 생검에서 MHC-I과 ICAM-I의 발현이 현저하게 감소하였고,²³ Ling 등은 난치성 간질 환자에서 IVIg를 주고 나서 혈액 내 Interferon- γ (IFN- γ)와 IL-6의 변화를 보고하였다.²⁴

염증성근병증의 근육 조직에 대식세포의 침윤이 특징적이며,²⁵ 대식세포에서 생성되는 주된 사이토카인 중 하나가 TNF- α 이다. TNF- α 는 IL-6를 포함하는 다양한 사이토카인의 발현을 조장함으로써 염증반응에 관여한다.²⁰ 본 실험에서도 TNF- α 를 투여하고 나서 상당한 IL-6의 증가가 관찰되었다. 처치 시간이 길수록 IL-6의 생성이 증가하는 경향을 보였으나, 단일 용량만 사용하였기 때문에 용량에 따른 IL-6의 변화는 확인할 수 없었다. IVIg의 경우, mRNA 발현과 달리 의미 있는 IL-6의 증가는 관찰되지 않았다. 이것의 정확한 이유를 알 수 없지만, mRNA 발현 정도와 단백질의 생성이나 분비가 반드시 일치하지 않는 점을 고려한다면 가능한 일이라고 하겠다. 지금까지 IL-6에 대한 IVIg의 영향은 다양한 것으로 알려져 있다. Ballow 등,⁷ Schiller와 Elinder,²⁶ 그리고 Gupta 등¹²은 IVIg 투여 후에 IL-6의 양이 줄어드는 것으로 보고하였지만, Ling 등²⁴은 반대의 결과를 보고하였다. 뿐만 아니라, IVIg 투여 후 IL-6의 증가 혹은 감소되는 시점도 대체로 수신편에서 수시간이지만 길게는 수일에 걸쳐 다양하게 나타났다. 이는 사용된 검사 방법이나 면역글로불린의 종류와 용량이 서로 다르기 때문으로 생각된다. 더욱 중요한 것은 연구 방법으로 생체내(in vivo) 연구는 시험관내(in vitro) 연구와 달리 생체에 존재하는 여러 가지 사이토카인이나 사이토카인의 생성에 영향을 줄 수 있는 호르몬과 같은 물질, 혹은 이와 관련이 있는 세포들과의 상관 관계로 인해 다양한 양상을 보일 수 있다.

IVIg는 TNF- α 를 포함하는 다양한 사이토카인의 생성을 조절하며,²⁷ TNF- α 에 의해 조장된 염증반응을 억제한다.²⁸ IL-6의 대표적 기능 중 하나가 염증과 관련된 것으로 B-cell을 자극하여 면역글로불린의 생성을 촉진하고, IL-2와 IL-2 수용체를 통한 T-cell의 분화, 대식세포의 분화를 유도한다. 특발성염증성근염(idiopathic inflammatory myopathy)과 같은 염증 상태의 근육에서 IL-6의 발현이 증가되고,²⁹ 근모세포에 TNF- α 와 같은 염증성 자극을 주면 IL-6의 생성이 증가되는 점³⁰을 고려해 볼 때 근육 염증에 IL-6가 어느 정도 관련되어 있

음을 시사한다. 이러한 관점에서 HM4 세포에 TNF- α 와 IVIg를 동시에 투여하면 TNF- α 에 의한 IL-6의 증가가 억제될 것을 예상하였지만 투여 6시간을 제외하고 의미 있는 IL-6의 감소가 관찰되지 않았다. 이것은 IVIg의 항염증 효과가 적어도 근육세포에서 IL-6의 억제를 통한 경로가 아닌 다른 경로로 인한 가능성을 의미한다. 하지만 IVIg 투여 6시간 후 TNF- α 만 처치했을 때에 비하여 뚜렷하지는 않지만 통계적으로 의미 있는 IL-6의 감소가 확인되었다. 이는 대부분의 연구처럼 IVIg 투여 후 IL-6의 감소 시점이 수신편에서 수시간 이내인 것을 감안한다면 시간적 요인에 의한 결과일 수도 있다. 본 실험에 사용된 IVIg의 용량은 5 mg/mL로서 치료에 사용되는 적정 용량을 투여하였을 때의 생체 내 농도(6 mg/mL)²⁷보다 다소 낮아 이것이 결과에 영향을 줄 수 있었다고 생각된다.

IL-6를 포함하는 여러 가지 사이토카인에 대한 IVIg의 조절 기전에 관해서는 아직까지 정확하게 알려진 바 없다. 다만 몇 가지 가능한 기전을 생각해 볼 수 있는데, 첫째로 IVIg에 포함된 다양한 물질에 의한 효과이다. IVIg는 다량의 TGF- β 를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁴ TGF- β 는 대식세포나 Th1 세포의 분화를 억제하여 자가 면역반응을 감소시키는 역할을 한다. 둘째, IVIg는 다양한 항체를 포함하고 있어 이들 항체들이 항 사이토카인의 성질을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.³¹ 마지막으로, 단백질의 응집을 막기 위해 IVIg에 첨가되어 있는 sucrose나 maltose와 같은 안정제가 면역세포의 증식을 억제하기도 한다.³² 뿐만 아니라, 최근 난소암세포를 산성 배지에서 배양하면 IL-8의 생성이 증가하는 연구 결과³³를 토대로 볼 때, 본 실험에 사용된 IVIg의 이온농도(pH)가 4.25 (제품 설명서에 의거함)인 것을 감안한다면 이것이 사이토카인의 생성에 영향을 미칠 가능성을 배제할 수 없다.

IVIg에 의한 IL-6의 분명한 억제가 관찰되지 않는다고 해서 IVIg의 치료 효과를 나타내는 데 IL-6가 아무런 역할을 하지 않는 것은 아니다. 최근에는 IL-6가 항염증 사이토카인으로 분류되어야 한다는 주장이 있듯이,³⁴ 고농도의 IL-6는 IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)의 발현을 유도함으로써 대표적인 전구염증성 사이토카인인 IL-1의 기능을 억제하여 오히려 항염증작용을 나타내기도 한다.³⁵ 최근의 한 연구에 의하면, 생리적 농도의 IL-6가 IL-1ra뿐만 아니라 IL-10의 생성을 촉진하여 역시 항염증 효과를 보인다고 하였다.³⁶ 게다가 IL-6는 근모세포(위성세포, satellite cell)의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있고,³⁷ IL-6 receptor (IL-6R)와 같이 작용하여 근육세포에 gp130의 발현을 유도함으로써 심장근육의 비대를 초래하는 것³⁸으로 보아 IL-6가 근육의 재생에 긍정적인 효과를 보이는 것으로 판단된다.

본 연구의 결과에 의하면, IL-6에 대한 IVIg의 효과는 적어도 근육세포에서 주된 항염증 기전으로 작용하지

않는 것으로 판단된다. 하지만 실험에 사용된 세포가 유전적으로 조작된 세포인 것, IVIg의 농도가 일반적으로 치료에 사용되는 용량에서 기대되는 혈중 수치보다 조금 낮은 것, IL-6 이외 IVIg의 항염증 효과와 관련된 다른 사이토카인의 분석이 없었던 것 등이 근육세포에서 IL-6를 통한 IVIg의 항염증 기전을 이해하려고 시도한 이 논문의 단점이다. 향후, 근육세포의 일차 배양을 통하여 여러 종류의 면역글로불린 및 다양한 농도를 적용함으로써 염증과 관련된 많은 사이토카인의 분석이 근육 질환에서 IVIg의 항염증 기전을 이해하는 데 도움이 될 것이다.

Acknowledgement

실험에 사용된 면역글로불린(I.V.-Globulin S)을 제공해주신 주식회사 녹십자에게 개인적으로 깊은 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, Baumgartner C, Hirt A, Morell A, et al. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1981;1:1228-1231.
2. Berkman SA, Lee ML, Gale RP. Clinical uses of intravenous immunoglobulins. *Ann Intern Med* 1990;112:278-292.
3. Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *N Engl J Med* 1992;326:107-116.
4. Wiles CM, Brown P, Chapel H, Guerrini R, Hughes RA, Martin TD, et al. Intravenous immunoglobulin in neurological disease: a specialist review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:440-448.
5. Dalakas MC. Intravenous immune globulin therapy for neurological diseases. *Ann Intern Med* 1997;126:721-730.
6. Emmi L, Chiarini F. The role of intravenous immunoglobulin therapy in autoimmune and inflammatory disorders. *Neurol Sci* 2002;23:S1-S8.
7. Ballow M. Mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:151-157.
8. Dalakas MC. Mechanism of action of intravenous immunoglobulin and therapeutic considerations in the treatment of autoimmune neurologic diseases. *Neurology* 1998;51:S2-S8.
9. Andersson JP, Andersson UG. Human intravenous immunoglobulin modulates monokine production in vitro. *Immunology* 1990;71:372-376.
10. Shimozato T, Iwata M, Kawada H, Tamura N. Human immunoglobulin preparation for intravenous use induces elevation of cellular cyclic adenosine 3':5'-monophosphate levels, resulting in suppression of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 production. *Immunology* 1991;72:497-501.
11. Aukrust P, Frøland SS, Liabakk NB, Müller F, Nordøy I, Haug C, et al. Release of cytokines, soluble cytokine receptors, and interleukin-1 receptor antagonist after intravenous immunoglobulin administration in vivo. *Blood* 1994;84:2136-2143.
12. Gupta M, Noel GJ, Schaefer M, Friedman D, Bussel J, Johann-Liang R. Cytokine modulation with immune gamma-globulin in peripheral blood of normal children and its implications in Kawasaki disease treatment. *J Clin Immunol* 2001;21:193-199.
13. Noh GW, Lee WG, Lee W, Lee K. Effects of intravenous immunoglobulin on plasma interleukin-10 levels in Kawasaki disease. *Immunol Lett* 1998;62:19-24.
14. Kekow J, Reinhold D, Pap T, Ansorge S. Intravenous immunoglobulins and transforming growth factor beta. *Lancet* 1998;351:184-185.
15. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 2002;4:S233-S242.
16. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988;31:784-788.
17. Tews DS, Goebel HH. Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:342-347.
18. Lundberg I, Ulfgrén AK, Nyberg P, Andersson U, Klareskog L. Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 1997;40:865-874.
19. Lundberg I, Brengman JM, Engel AG. Analysis of cytokine expression in muscle in inflammatory myopathies, Duchenne dystrophy, and non-weak controls. *J Neuroimmunol* 1995;63:9-16.
20. Joo IS, Huh K, Lee YB, Kim SU. The expression of cytokines and chemokine mRNA by human skeletal muscle cell line (SKM14). *J Korean Neurol Assoc* 2003;21:89-96.
21. Baron P, Galimberti D, Meda L, Scarpini E, Conti G, Cogiamanian F, et al. Production of IL-6 by human myoblasts stimulated with Abeta: relevance in the pathogenesis of IBM. *Neurology* 2001;57:1561-1565.
22. De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, de Waal Malefyt R, Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol* 2000;12:1329-1335.
23. Dalakas MC, Illa I, Dambrosia JM, Soueidan SA, Stein DP, Otero C, et al. A controlled trial of high-dose intravenous immune globulin infusions as treatment for dermatomyositis. *N Engl J Med* 1993;329:1993-2000.
24. Ling ZD, Yeoh E, Webb BT, Farrell K, Doucette J, Matheson DS. Intravenous immunoglobulin induces interferon-gamma and interleukin-6 in vivo. *J Clin Immunol* 1993;13:302-309.
25. Engel AG, Arahata K. Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different

- inflammatory myopathies. *Hum Pathol* 1986;17:704-721.
26. Schiller B, Elinder G. Inflammatory parameters and soluble cell adhesion molecules in Swedish children with Kawasaki disease: relationship to cardiac lesions and intravenous immunoglobulin treatment. *Acta Paediatr* 1999;88:844-848.
 27. Andersson U, Björk L, Skansén-Saphir U, Andersson J. Pooled human IgG modulates cytokine production in lymphocytes and monocytes. *Immunol Rev* 1994;139:21-42.
 28. Ito Y, Lukita-Atmadja W, Machen NW, Baker GL, McCuskey RS. Effect of intravenous immunoglobulin G on the TNF α -mediated hepatic microvascular inflammatory response. *Shock* 1999;11:291-295.
 29. Lepidi H, Frances V, Figarella-Branger D, Bartoli C, Machado-Baeta A, Pellissier JF. Local expression of cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:73-79.
 30. Gallucci S, Provenzano C, Mazzarelli P, Scuderi F, Bartocioni E. Myoblasts produce IL-6 in response to inflammatory stimuli. *Int Immunol* 1998;10:267-273.
 31. Abe Y, Horiuchi A, Miyake M, Kimura S. Anti-cytokine nature of natural human immunoglobulin: one possible mechanism of the clinical effect of intravenous immunoglobulin therapy. *Immunol Rev* 1994;139:5-19.
 32. Alder LB, Morgan LA, Spickett GP. Contribution of stabilizing agents present in intravenous immunoglobulin preparations to modulation of mononuclear cell proliferation in vitro. *Scand J Immunol*. 1996;44:585-591.
 33. Xu L, Fidler IJ. Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60:4610-4616.
 34. Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 1997;18:428-432.
 35. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and dsoluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994;83:113-118.
 36. Steenberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:433-437.
 37. Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, Rossini K, Catani C, Dalla Libera L, et al. Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;216:49-53.
 38. Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4862-4866.