

## 궤양성 대장염 환자의 대장점막에서 Chemokine 유전자의 발현 양상

울산대학교 의과대학 서울아산병원 내과학교실, <sup>1</sup>아산생명과학 연구소, <sup>2</sup>외과학교실

심기남 · 양석균 · 명승재 · 김옥희<sup>1</sup> · 오현주<sup>1</sup> · 이정아<sup>1</sup> · 조윤경<sup>1</sup> · 유창식<sup>2</sup> · 정훈용 · 홍원선  
김진호 · 민영일

### The Increased Expression of Chemokines in the Colonic Mucosa of Patients with Ulcerative Colitis

Ki Nam Shim, M.D., Suk-Kyun Yang, M.D., Seung-Jae Myung, M.D., Ok-Hee Kim, M.S.<sup>1</sup>, Hyun Ju Oh, B.S.<sup>1</sup>, Jeong A Lee, B.S.<sup>1</sup>, Yoon Kyung Cho, M.S.<sup>1</sup>, Chang Sik Yu, M.D.<sup>2</sup>, Hwoon-Yong Jung, M.D., Weon-Seon Hong, M.D., Jin Ho Kim, M.D., Young Il Min, M.D.

Department of Internal Medicine, <sup>1</sup>Institute for Life Science and <sup>2</sup>Department of Surgery, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea

**Purpose:** To better understand the extent to which chemokines participate in the mucosal inflammatory response in patients with ulcerative colitis (UC), we assessed the expression of an array of chemokines in the colonic mucosa of UC patients.

**Methods:** Colonic mucosal biopsy specimens were obtained from 15 patients with UC and 12 normal controls. Messenger RNA (mRNA) levels for 10 chemokines were quantitated by reverse-transcription PCR using synthetic standard RNAs. The biopsy specimens were also cultured, and secreted chemokines in culture supernatants were assayed by ELISA.

**Results:** The mRNA expression of C-X-C (IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , ENA-78, and IP-10) and C-C (MCP-1, MIP-1 $\beta$ , and RANTES), but not C (lymphotactin) chemokines was significantly higher in the affected mucosa of UC patients than in the unaffected mucosa of UC patients or in the normal mucosa of normal controls. The degree of increased expression was more prominent in the C-X-C than in the C-C chemokines. Further, the secretion of IL-8,

GRO $\alpha$ , ENA-78, and MCP-1 was higher in UC patients than in normal controls. Secretions of MIP-1 $\beta$  and RANTES also showed a trend toward an increase in UC, but it did not reach statistical significance.

**Conclusions:** The increased expression of a variety of chemokines in UC suggest that chemokines may play an important role in the immunopathogenesis of UC. *J Korean Soc Coloproctol 2002;18:147-151*

**Key Words:** Chemokine, Ulcerative colitis, Colon  
Chemokine, 궤양성 대장염, 대장

### 서 론

Chemokine은 크기가 8~14 kD 정도의 항염증성 cytokine으로서 호중구, 단핵구, 호산구, 호염구 또는 림프구 등 각종 염증세포 및 면역세포들이 염증반응 또는 면역반응이 일어나는 장소로의 이동을 유발함으로써 숙주 염증반응의 시작과 유지에 필수적인 역할을 수행한다.<sup>1-3</sup> Chemokine은 amino terminal domain에 있는 cysteine의 배열에 따라 C-X-C, C-C, C 및 C-X<sub>3</sub>-C chemokine으로 분류된다.<sup>1-3</sup> C-X-C chemokine은 다시 ELR (Glu-Leu-Arg) motif의 유무에 따라 둘로 세분된다. ELR motif를 가진 C-X-C chemokine은 호중구의 활성화와 화학주성에 중요한 역할을 하며, 같은 C-X-C chemokine일지라도 ELR motif가 없으면 이와 같은 기능이 없다. C-X-C chemokine과는 달리 C-C chemokine은 단핵구 및 T 림프구에 주로 작용하고 일부 C-C chemokine은 호산구 및 호염구에도 작용하며 C-chemokine은 림프구에만 작용을 한다.<sup>1-3</sup>

한편 궤양성 대장염은 근래에 우리나라에서도 그 발병률이 급격히 증가하고 있어 관심을 모으고 있는데,<sup>4,5</sup> 현재까지 정확한 병태생리 기전이나 원인이 밝

책임저자: 양석균, 서울시 송파구 풍납동 388-1  
울산대학교 의과대학 서울아산병원 소화기내과  
(우편번호: 138-736)  
Tel: 02-3010-3190, Fax: 02-485-5782  
E-mail: sky@amc.seoul.kr

본 연구는 1998년도 아산생명과학연구소 연구 지원(98-154)의 일부 보조로 수행되었음.

혀져 있지 않은 상태이나 점막의 손상을 매개하는 매개체 중의 하나로서 일부 chemokine의 역할이 제기되고 있다.<sup>6</sup> Chemokine은 다양한 종류의 세포에서 생산되며, 반감기가 길고, 다양한 세포들을 활성화하여 염증 물질의 생성을 유도할 수 있으므로 궤양성 대장염의 병태생리에 중요한 역할을 수행할 가능성이 있다.<sup>6</sup> 그러나 지금까지 궤양성 대장염에서 연구된 chemokine의 종류는 IL-8,<sup>7,9</sup> MCP-1,<sup>10</sup> ENA-78<sup>11</sup> 등 일부 chemokine에 국한되어 있으며 아직 수십 종에 이르는 chemokine의 역할에 대한 연구는 미미한 실정이다.

저자들은 대장 상피세포에서 과거에 알려진 것보다 훨씬 다양한 chemokine들이 생성되고 조절됨을 보고한 바 있으며 따라서 대장 상피세포가 chemokine의 발현을 통하여 대장 점막의 염증반응의 초기단계에 능동적으로 참여할 것이라는 것을 시사한 바 있다.<sup>12</sup> 또한 궤양성 대장염 환자의 점막에서 여러 가지 C-X-C chemokine 유전자의 발현이 증가함을 보고함으로써 다양한 chemokine들이 궤양성 대장염에서의 염증의 발현이나 증폭에 관여하고 있을 가능성을 제시한 바 있다.<sup>13</sup> 그러나 저자들의 이전의 연구는 C-X-C chemokine에 국한되었으며, 또한 RNA 발현의 증가를 확인하기는 하였으나 과연 이러한 RNA 발현의 증가가 단백질 생성의 증가로 이어지는지는 확인하지 못하였다. 따라서 저자들은 궤양성 대장염 환자의 대장 점막에서 C-X-C chemokine뿐만 아니라 C-C 또는 C-chemokine 유전자의 발현 및 단백질의 생성 양상을 밝힘으로써 서로 다른 chemokine 종류들 사이에 상대적인 중요성을 밝히고자 본 연구를 수행하였다.

## 방 법

### 1) 대상

15명의 궤양성 대장염 환자와 13명의 정상 대조군을 대상으로 하였다. 궤양성 대장염의 진단은 기존의 연구들에서 사용된 임상적, 내시경적, 방사선학적 및 조직학적 진단 기준을 따랐다.<sup>4</sup> 궤양성 대장염 환자들은 모든 예에서 대장내시경 검사 당시 활동성 직장염 또는 좌측 결장염<sup>14</sup>을 갖고 있었으며, 검사 전 3개월 이내에 스테로이드나 면역 억제제를 사용한 환자는 없었다. 대장 점막의 채취는 내시경적 생검 방법을 이용하였으며 궤양성 대장염 환자에서는 병변 부위와 정상 부위에서 각각 조직을 얻었다. 생검 절편수는 각 부위당 4점씩으로 하였으며 채취한 조직 중 2점은 즉시 액체 질소에 넣어 급속 냉동시킨 후 -70°C에 보관

하였다가 RNA의 추출 및 PCR에 사용하였고 1점은 ELISA를 위하여 배양하였다. 나머지 1점은 조직학적 검사에 사용하였다.

### 2) RNA의 추출 및 정량적 역전사 PCR

대장 점막으로부터의 RNA추출은 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 법을 사용하여 이전에 기술된 방법에 따라 시행하였으며,<sup>15</sup> 총 10종류의 chemokine의 mRNA를 이미 기술한 방법에 따라 정량적 역전사 PCR법으로 정량하였다.<sup>12,16,17</sup> 분석 대상이었던 chemokine의 종류는 C-X-C chemokine 중 IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , ENA-78 및 IP-10, C-C chemokine 중 MCP-1, MIP-1 $\beta$  및 RANTES, 그리고 유일하게 알려진 C-chemokine인 lymphotactin이었다. Chemokine mRNA를 역전사 PCR법으로 정량하는데 필요한 표준 RNA는 이전의 연구에서 제작된 plasmid인 pHCQ1, pHCQ5 및 pHCQ6로부터 in vitro transcription에 의해 만들었다.<sup>12,13,16</sup> PCR에 필요한 primer 역시 이전의 연구에서 기술된 것을 사용하였다.<sup>12,13,16</sup>

이를 간략히 설명하면 2~5배로 연속 희석시킨 표준 RNA를 5~7개의 시험관에 준비하여 대장 점막에서 추출한 일정량의 mRNA를 각각의 시험관에 혼합한 후 reverse transcription 및 PCR을 시행하였다. 이렇게 하여 만들어진 PCR product를 전기 영동하여 Polaroid 665 film으로 찍은 후 imaging densitometer (GS-670; BioRad, Hercules, CA)를 이용하여 각 PCR band의 intensity를 비교하였다. 즉 표준 RNA와 목표 RNA로부터 얻은 PCR product의 비를 구함으로써 특정 chemokine의 mRNA 양을 계산하였다.

### 3) 조직배양 및 ELISA

내시경적 생검에 의해 얻은 대장 점막 조직 중 1점씩을 생검 즉시 배양액에 넣어 배양을 하였다.<sup>8</sup> 배양액은 1 mL의 RPMI-1640에 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100  $\mu$ g/ml)을 첨가한 것을 이용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 20시간 배양 후 상층액은 원심 분리하여 -70°C에 보관하였다가 chemokine ELISA에 사용하였다.

ELISA법은 R&D Systems (Minneapolis, MN)의 kit를 이용하여 quantitative sandwich enzyme immunoassay법으로 시행하였다. 배양이 끝난 조직은 Bio-Rad (Hercules, CA)의 단백질 분석 kit로 총단백의 양을 측정하여 ELISA 결과를 보정하였다. 즉, 배양이 끝난 생검조직을 파쇄하여 주어진 색소시약과 섞은 후 분광광도계

로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선과 비교함으로써 총단백의 양을 구하였다.<sup>18</sup>

4) 통계 처리

통계 분석은 Mann-Whitney U test를 사용하였으며, P값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) Chemokine 유전자의 발현(Table 1)

궤양성 대장염 환자 15명과 정상 대조군 13명 모두에서 C-X-C chemokine인 IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , ENA-78, IP-10, C-C chemokine인 MCP-1, MIP-1 $\beta$ , RANTES, 그리고 C-chemokine인 lymphotactin mRNA의 발현을 관찰할 수 있었다. 궤양성 대장염 환자의 병변이 없는 부위에서 채취한 대장 점막에서 측정된 chemokine의 발현 수준은 정상 대조군에서 채취한 대장 점막에서 측정된 chemokine의 발현 수준과 차이가 없었다. 그러나 궤양성 대장염 환자의 병변 부위에서의 C-X-C chemokine과 C-C chemokine의 발현 수준은 같은 환자의 정상 부위에서의 발현 수준보다 유의하게 증가하였으며, 정상 대조군과 비교하여도 높은 수준을 보였다(P<0.05). 한편 C-chemokine인 lymphotactin의 발현은 정상부위에 비해 궤양성 대장염 환자의

병변부위에서 증가하지 않았다.

궤양성 대장염 환자에서 발현이 증가된 chemokine들을 종류별로 나누어 분석해 보면 ELR motif를 갖고 있는 C-X-C chemokine인 IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  및 ENA-78의 발현은 궤양성 대장염 환자의 정상 대장 부위에 비해 병변 부위에서 중앙값이 20~50배의 증가를 보였다. 이에 비해 C-C chemokine인 MCP-1, MIP-1 $\beta$  및 RANTES는 불과 2.5~5.7배의 증가에 그쳤다. 한편 C-X-C chemokine이면서도 ELR motif가 없어 ELR motif를 가진 다른 C-X-C chemokine과는 달리 호중구의 화학주성에는 관여하지 않고 대신에 단핵구와 T 림프구의 화학주성에 관여함으로써 오히려 C-C chemokine에 가까운 성질을 지닌 IP-10의 발현 수준은 6.7배의 증가에 그쳐 ELR motif를 가진 C-X-C chemokine보다는 C-C chemokine의 증가 수준에 가까운 양상을 보였다.

2) Chemokine 단백질의 분비

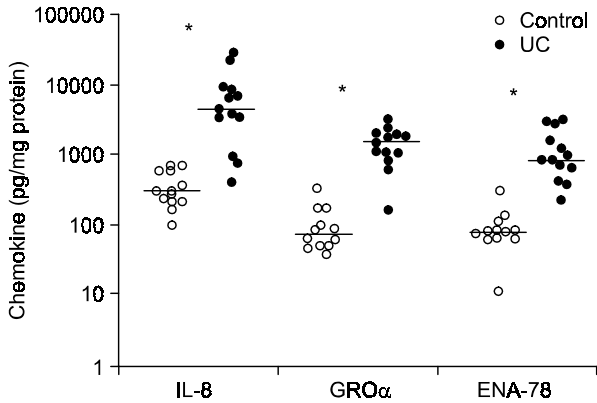
궤양성 대장염 환자의 대장 점막에서 chemokine 유전자의 발현이 증가할 뿐만 아니라 단백질의 분비도 증가함을 증명하고자 12명의 정상 대조군과 13명의 궤양성 대장염 환자의 대장 점막을 배양하여 배양 상층액에서 C-X-C chemokine인 IL-8, GRO $\alpha$ , ENA-78와 C-C chemokine인 MCP-1, MIP-1 $\beta$ , RANTES의 분비 수준을 ELISA로 측정하였다. C-X-C chemokine의 분비는 정상 대조군의 대장점막에 비해 궤양성 대장염 환자

Table 1. Chemokine mRNA levels in colonic mucosa of 12 controls and 15 patients with ulcerative colitis

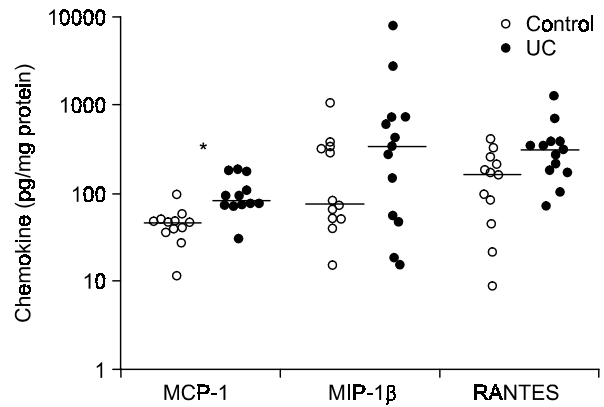
Chemokine		Normal control ( $\times 10^4$ transcripts/ $\mu$ g RNA)	Ulcerative colitis ( $\times 10^4$ transcripts/ $\mu$ g RNA)	
Family member			Unaffected area	Affected area
C-X-C	IL-8	21 (4~200)	20 (1.5~600)	900 (13~5000)*
	GRO $\alpha$	9 (3~40)	20 (1~200)	400 (12~1500)*
	GRO $\beta$	10 (4~25)	15 (0.5~400)	400 (40~1000)*
	GRO $\gamma$	10 (0.8~40)	10 (0.5~150)	500 (50~20000)*
	ENA-78	1 (<0.5~5)	0.8 (<0.5~26)	18 (3~740)*
	IP-10	5 (<0.5~50)	15 (0.5~200)	100 (16~1000)*
C-C	MCP-1	4 (<0.5~15)	10 (<0.5~50)	45 (4~200)*
	MIP-1 $\beta$	20 (4~100)	35 (8~140)	200 (13~1500)*
	RANTES	23 (4~120)	40 (5~240)	100 (13~360)*
C	Lymphotactin	3 (0.5~40)	1.5 (<0.5~24)	1.5 (<0.5~13)
-	$\beta$ -actin <sup>†</sup>	6000 (1000~10000)	5000 (2000~10000)	6000 (2000~10000)

Data are expressed as median (range).

\*P<0.01 vs normal control or unaffected mucosa of ulcerative colitis; <sup>†</sup>  $\beta$ -actin, a constitutively expressed “housekeeping” gene, was included as a control.



**Fig. 1.** Secretion of C-X-C chemokines in colonic mucosa. The secreted protein levels of 3 C-X-C chemokines including IL-8, GRO $\alpha$ , and ENA-78 were determined in the culture supernatants of the normal colonic mucosa from 12 normal controls and of the affected mucosa from 13 patients with ulcerative colitis by ELISA. Horizontal bars indicate median values for each group. \*P<0.01.



**Fig. 2.** Secretion of C-C chemokines in colonic mucosa. The secreted protein levels of 3 C-C chemokines including MCP-1, MIP-1 $\beta$ , and RANTES were determined in the culture supernatants of the normal colonic mucosa from 12 normal controls and of the affected mucosa from 13 patients with ulcerative colitis by ELISA. Horizontal bars indicate median values for each group. \*P<0.01.

의 병변이 있는 대장점막에서 11~19배 증가하였다 (Fig. 1). 그러나 C-C chemokine의 경우는 MCP-1의 분비만 유의하게 증가하였으며, MIP-1 $\beta$ 와 RANTES의 경우는 증가 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 2).

### 고 찰

궤양성 대장염 환자의 대장 점막에서 몇 가지 chemokine의 발현이 증가되어 있음이 알려져 있으며 따라서 chemokine이 궤양성 대장염의 병태생리에 중요한 역할을 할 가능성이 제기되어 왔다.<sup>6-11,19,20</sup> 이 연구들은 궤양성 대장염 환자의 대장 점막에서 C-X-C chemokine 중 IL-8<sup>7-9</sup>과 ENA-78,<sup>11</sup> C-C chemokine 중 MCP-1 등의 발현이 증가되어 있음을 보여 주었다. 그러나 지금까지 알려진 chemokine의 종류가 50가지<sup>21</sup>가 넘는다는 것을 고려하면 궤양성 대장염 환자의 대장점막에서 발현되는 chemokine의 종류에 대해서는 아직 모르는 부분이 많다고 할 수 있다. 또한 수많은 chemokine 중 어떤 chemokine 또는 chemokine family가 더 중요한 역할을 하는지도 밝혀지지 않은 상태이다.

기존의 연구들은 몇 가지 점에서 제약을 갖고 있는 것으로 보인다. 첫째, 많은 연구들이 수술에 의해 얻은 조직으로 연구를 수행하였다.<sup>8,11,19,20</sup> 그런데 수술은 스테로이드나 면역 억제제의 치료에도 불구하고 반응이 없는 중증 불응성 환자에서 시행되는 수가 많다. 따라

서 스테로이드나 면역 억제제의 치료에 반응이 없는 중증 불응성 환자만을 대상으로 할 경우 chemokine 발현 수준에 영향을 미칠 가능성이 있다고 보여진다. 또한 스테로이드나 면역 억제제 치료 자체가 chemokine 발현 수준에 영향을 미칠 가능성이 있으므로 잘못된 결론을 얻을 우려가 있다. 둘째, 대부분의 연구<sup>7,8,10,11,19</sup>가 C-X-C chemokine이나 C-C chemokine 중 한 family에 속하는 1~2개의 chemokine을 대상으로 연구하였으므로 상대적인 중요성을 비교할 수 없다는 문제점이 있다.

따라서 저자들은 이러한 문제점들을 해결하고자 다음과 같은 방법을 채택하였다. 첫째, 대장점막은 수술 조직이 아니라 내시경적 생검에 의하여 채취하였다. 모든 환자들은 중등도 또는 중증도의 조직학적 활성도를 갖고 있었으며 검사 전 3개월 이내에 스테로이드나 면역 억제제를 사용한 환자는 없었다. 둘째, 분석대상 chemokine의 숫자를 기존의 연구보다 대폭 늘려 10개로 하였으며, 또한 C-X-C, C-C 및 C-chemokine family에 골고루 분포하도록 하여 상대적인 중요성을 분석하는데 도움이 되고자 하였다. 현재로서는 궤양성 대장염의 병태생리에 있어 어떤 chemokine이 더 중요한 역할을 하는지는 확실치 않다. 비록 본 연구에서 C-C chemokine에 비해 C-X-C chemokine의 절대 발현 수준이 더 높았고, 정상부위와 병변부위 사이의 발현 수준의 상대적 차이가 더 현저하기는 하였지만 궤양성 대장염의 병태생리에 있어 C-C chemokine보다 C-X-C

chemokine이 더 중요한 역할을 한다고 결론을 내리는 데는 문제가 있다. 왜냐하면 chemokine의 발현 수준의 차이뿐만 아니라 조직내의 chemokine의 농도 차이나 chemokine에 대한 목표 세포(target cell)의 감수성의 차이 등 고려해야 할 변수가 많기 때문이다. 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 결 론

궤양성 대장염 환자의 대장점막에서는 다양한 chemokine들이 발현되고 생성되며, 이러한 사실은 궤양성 대장염에서의 염증의 발현, 증폭 또는 지속에 복잡한 경로 또는 기전이 있음을 시사한다. 즉, chemokine들은 단독으로 또는 공동으로 작용하여 궤양성 대장염의 병태생리에 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다.

### REFERENCES

1. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-42.
2. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.
3. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-45.
4. Yang S-K, Hong W-S, Min YI, Kim HY, Yoo JY, Rhee P-L, et al. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa-Kangdong District, Seoul, Korea, 1986-1997. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1037-42.
5. 김영민, 양석균, 명승재, 장우영, 정세라, 박종범 등. 한국인 궤양성 대장염 환자의 진단시 임상적 특징과 진단 첫째의 예후. *대한소화기학회지* 2000;36:635-43.
6. MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker HC. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:54-67.
7. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996;38:216-22.
8. Ina K, Kusugami K, Yamaguchi T, Imada A, Hosokawa T, Ohsuga M, et al. Mucosal interleukin-8 is involved in neutrophil migration and binding to extracellular matrix in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1342-6.
9. Ugucioni M, Gionchetti P, Robbiani DF, Rizzello F, Peruzzo S, Campieri M, et al. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1999;155:331-6.

10. Reinecker HC, Loh EY, Ringler DJ, Mehta A, Rombeau JL, MacDermott RP. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 1995;108:40-50.
11. Z'Graggen K, Walz A, Mazzucchelli L, Strieter RM, Mueller C. The C-X-C chemokine ENA-78 is preferentially expressed in intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997;113:808-16.
12. Yang S-K, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 1997;113:1214-23.
13. 양석균, 김옥희, 이미화, 심기남, 박의련, 정훈용 등. 궤양성 대장염 환자의 대장점막에서 chemokine 유전자의 발현 양상에 대한 예비 연구. *대한대장항문학회지* 1998;14:735-41.
14. Yang S-K, Jung H-Y, Kang GH, Kim YM, Myung SJ, Shim KN, et al. Appendiceal orifice inflammation as a skip lesion in ulcerative colitis: an analysis in relation to medical therapy and disease extent. *Gastrointest Endosc* 1999;49:743-7.
15. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
16. Jung HC, Eckmann L, Yang S-K, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995;95:55-65.
17. Rowell DL, Eckmann L, Dwinell MB, Carpenter SP, Raucy JL, Yang S-K, et al. Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion. *Am J Physiol* 1997;273(Pt 1):G322-32.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
19. Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner HE, Hess MW, Laissue JA, et al. Differential in situ expression of the genes encoding the chemokines MCP-1 and RANTES in human inflammatory bowel disease. *J Pathol* 1996;178:201-6.
20. Grimm MC, Doe WF. Chemokines in inflammatory bowel disease mucosa: expression of RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , and  $\gamma$ -interferon-inducible protein-10 by macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and granulomas. *Inflamm Bowel Dis* 1996;2:88-96.
21. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000;21:418-20.