

NC/Nga 마우스 전혈을 이용한 항 아토피 피부염 물질 탐색

박동훈¹ · 김연옥^{2*}

¹선문대학교 창업보육센터 (주) 에스에스씨아연스, ²선문대학교 건강과학대학 의생명과학과

Screening of Anti-Atopic Dermatitis Material by Using NC/Nga Mouse Whole Blood System

[Immune Network 2008;8(3):98-105]

Donghoon Park¹ and Youn Uck Kim^{2*}

¹SS Sciences of Sunmoon Business Incubator and ²Department of Biomedical Sciences, Sun Moon University, Asan, Korea

Background: Allergic inflammation was induced by activated Th2 lymphocytes, leading to IgE production and eosinophil activation. A Th2 disproportion was shown in atopic children soon after birth. During specific allergen stimulation, an increase of Th2 cells was observed in most cases. In this study, we prepared new screening "whole blood" system for searching the anti-atopic materials. Cytokine production and IgE secretion from whole blood system were assessed and we confirmed the results by using animal system. **Methods:** Pathological features in NC/Nga mice are similar to those observed in human atopic dermatitis. Whole blood from NC/Nga mouse was stimulated by using TNCB (Th2 activator) or candidate materials of anti-atopic dermatitis, and the production of cytokines (IL-4, IL-12, and IFN- γ) were measured by ELISA. In order to confirm the results of whole blood system, in vivo test was done by using NC/Nga mice. **Results:** In whole blood system, LPS and extracts of green tea, hardy orange and onion induced the production of IL-12 and IFN- γ while they reduced the production of IL-4. Also, LPS and extracts of onion reduced IgE production. Though atopic dermatitis was observed from a mouse stimulated with TNCB, it was not when a mouse was co-stimulated in LPS or extracts of onion. The results are same as those observed in whole blood system. **Conclusion:** Whole blood system was simple and speedy methods for searching a materials compared with the conventional high-cost animal system. And the results using whole blood system was proved to be reliable in our experiments for screening anti-atopic material. We expect that the system can be applied to other experiments for searching similar materials.

서 론

아토피 (Atopy)는 진드기나 꽃가루 및 애완동물의 털 등의 환경적인 물질이 자극 원으로 작용하여 IgE를 매개로한 과도한 신체 방어라고 할 수 있다(1). 아토피는 그리스어가 어원으로 "비정상적인 반응", "기묘한", "뜻을 알 수 없다"는 의미를 갖는 알레르기성 질환이다. 아토피 소인을 가지고 있는 개인에서 피부, 호흡기 점막, 안점막, 장점막 등에 나타나는 일련의 알레르기 증상을 말하며 이러한 아토피 소인은 유전되어 가족적으로 나타나는 경우가 빈번하다. 아토피 소인에 의한 알레르기 질환으로 알레르기 피부염, 알레르기성 비염, 천식, 알레르기성 결막염, 아토피성 두드러기 등이 있으며 이들 질환은 단독 또는 여러 질환이 동시에 나타날 수 있다. 아토피성 피부염(Atopic dermatitis)은 아토피 알레르기를 가진 사람에서 나타나는 대표적인 피부질환으로써 한의학에서는 태열이라고 부르는 피부 건조증 및 가려움증이 주증상인 만성 피부질환이다.

Mouse 면역 시스템에 관련이 있는 세포 중에 두 종류의 helper T cell (Th)있고, 이들 세포들이 생산하는 cytokine의 종류에 의해 다시 Th1과 Th2 등의 subtype으로 분류 된다(2). 이 중에 아토피는 Th2의 활성화에 기초를 둔 면역 시스템으로 특징지어진다. 즉, 미분화된 Th cell이 Th2로의 분화가 과다 촉진되면서 발생되기 시작한다고 알려져 있으며, 이때 Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-13, IL-9과 IL-10 등을 생산 한다(3). 이중에 IL-4와 IL-13이 mouse에서는 IgE와 IgG1의 합성을 촉진하고, 인간의 경우에는 IgE와 IgG4의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(4). 이와 비슷한 질환으로는 기관지 과민반응(Bronchial hyper-responsiveness, BHR) 천식(Asthma) 등을 들 수 있다. 즉 아토피는 Th2의 활성화로 혈액과 피부에서 일어나는 과민 반응이라면, Th1은 Interferon- γ (IFN- γ)와 IL-2 및 TNF- β 등을 분비하여 천식이라는 형태로 기관지와 폐 그리고 혈액에서 일어나는 과민반응의 결과인 것이다(5). 즉, Th1 림프구는 세포

Received on July 21, 2008. Revised on August 1, 2008. Accepted on August 8, 2008.

*책임저자. Tel: 82-41-530-2275; Fax: 82-41-530-2939; E-mail: kimyu@sunmoon.ac.kr

Keywords: helper T cell, Th1, Th2, atopic dermatitis, asthma, IL-4, IL-12, IFN- γ

매개성 면역 반응 및 지연성 과민 반응과 관계가 있는 것으로 연구 되었다(6). 아토피의 기작을 간략하게 소개하면 Naive T cell에서 Th2 cell로 분화되고 그리고 Th1은 Th2가 생산하는 IL-4등의 자극으로 Th에서 Th1으로 전환되어야 하는데 그렇게 되지 못하고, 이 과정에서 Th2에서 생산된 IL-4 및 IL-5, IL-9 및 IL-13등에 의해 B cell에서 IgE 생산을 촉진하고 비만세포(mast cell)를 탈 과립화시키고, 호산구(eosinophil)등을 활성화시킨다. 이로 인해 혈액 내 IgE의 함량이 증가되고, histamine과 같은 cytotoxic 물질들의 농도가 증가하면서 각종 염증 반응들이 진행되게 되는 것이다(7). 반대로 Th1세포에 의해 생산된 IL-12와 IFN- γ 등은 Th2에 의해 생산되는 IL-4와 IL-5의 생산을 억제하는 연구 결과도 있다(8). 실제로 아토피와 천식을 동시에 가지고 있는 환자의 혈액을 가지고 혈액 속에 cytokine의 분포를 조사한 결과 이들 환자의 혈액에는 IL-4와 IFN- γ 및 IL-12등이 과다 분비 되는 것이 확인 되었고(9), 이중에 아토피는 IL-4의 과분비와 이에 따른 IgE 생산에 의한 것으로 확인되었고 천식의 경우는 IL-12에 의해 조절되는 IFN- γ 의 과분비로 확인 되었다(9). 이와 같이 mouse의 경우에는 Th1과 Th2의 기능이 어느 정도 명확히 밝혀져 있지만, 인간의 경우는 mouse 만큼 명백하게 밝혀지지 않았다(10,11).

한편, 유아기에 미생물로부터 격리된 생활, 즉 청결한 상태에서 자란 선진국의 사람들이 아토피 질병이 증가했다는 “hygiene 이론”이 있고(12), 최근에는 유아기에 lipopolysaccharide (LPS)에 노출로 아토피 질병을 어느 정도 방어할 수 있다는 보고가 있다(13). 실제로 유아기에서의 농장생활 등으로 인한 아토피 예방에 대한 LPS의 역할 등에 대한 많은 연구가 이루어졌다(14-22). 이들의 근거는 농장에 존재하는 많은 동식물이 존재하고 이것으로부터 발생하는 많은 세균 등에 의해 높은 농도의 LPS에 표출 될 수 있기 때문이다. 이것은 IFN- γ 와 관련이 있는 Th1 cell과 연관이 있기 때문에 Th2로 인한 아토피로의 발전을 저해하는 것으로 이해되고 있다.

아토피는 Th2의 발현 비율에 기인한다는 것은 정설로 받아들여지고 있지만 이들의 반응은 연쇄적이고 파상적인 공세를 펼치고 있다는 점에서 주목할 만하다. 그러나 대부분의 연구들은 혈액 내에서 각각의 혈구들에 대한 각각의 면역 반응을 통하여 측정 및 예측되어지고 있어 전체적인 예측은 불가능하고, 이로 인한 혈액 시스템에 미치는 영향도 분석되어지지 않고 있다. 실제로 면역 반응은 그물망과 같이 얽혀 있는 구조를 이루고 있어 어느 한 부분을 손상시키게 되면 전체적으로 연쇄적인 반응이 일어날 가능성이 크다.

따라서 본 연구에서는 각각의 혈구들을 통한 직접적인 저해가 아닌, 가능한 혈액 내 시스템과 유사한 시스템에서 Th2로의 분화를 억제하거나, 혹은 최종적으로 Mast cell에 의한 histamine 방출 억제, 즉 B cell에서의 IgE의 생산량을 억제시키는 물질을 찾기 위해 새로운 검색 시스템을 연구하는 것에 초점을 맞추고 있다. 그 목적을 위해 착안한 것은 생체의 혈액 시스템

을 외부로 이끌어 내는 방법으로 각각의 혈구들에 의한 *in vitro* 방법이 아닌 전반적인 시스템을 외부로 이끌어 내는 *ex vivo* 시스템을 이용하기로 하였다. 과거에 전혈 배양법은 인간의 말초 혈과 전혈을 배양하여 혈액세포에서 생산하는 각종의 cytokine을 정량하였고 이를 바탕으로 암 환자에서의 cytokine 생산 특이성 등을 확인 하였다(23). 우리는 이 방법을 개량하여 마우스에서 항 아토피 물질 탐색에 적용하였다. 즉 전혈을 배양함으로써 혈액 내에서 일어날 수 있는 모든 면역 반응을 즉각적으로 측정할 수 있고, 기존의 동물 실험을 통해 확보 할 수 있는 데이터들을 여기서 연구된 *ex vivo* 시스템을 일차적인 스크리닝 시스템으로 이용하여 혈액에 대한 부작용이 없는 새로운 아토피 및 면역 질환의 치료 및 예방제의 개발이 가능할 것으로 여겨진다.

대상 및 방법

동물

SPF NC/Nga mice는 일본의 SLC Japan (Shizuoka, Japan)으로부터 구입하였으며, 실험을 하기 위하여 이들 mouse는 일정한 온도($23\pm 3^{\circ}\text{C}$), 습도($55\pm 15\%$) 및 조사량(from 7:00 to 19:00) 하에서 주령 20주까지 사육 하였다.

혈액세포의 분리 배양 및 후보물질 첨가

Mouse의 혈액의 분리(채혈)는 마우스의 심장에서 약 1 ml 정도 분리한 혈액을 Blood collecting tube (Becton Dickinson)에 옮겨 배양용 관으로 이동하였다.

전혈 배양을 하기 위해 SPF NC/Nga 마우스에서 채취한 혈액을 혈액 배양용 배지(IMEM, 2 nM glutamax (Gibco), 10% FBS, $50\mu\text{mol}/\text{beta-mercaptoethanol}$, 0.1% penicillin-Streptomycin complex, etc., (pH 7.4)를 이용하여 1:5로 희석하여 미리 well 당 $150\mu\text{l}$ IMEM media가 넣어진 96-well plate에 $50\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24~48시간 동안 배양하였다.

혈액배양세포를 atopic dermatitis상태로 조성하기 위하여 세포 배양액에 5%로 조절된 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB, Tokyo Kasei, Japan)을 acetone과 ethanol 혼합용액 (acetone: ethanol=1:4) $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게끔 첨가한 후에 96-well plate에 $50\mu\text{l}$ 씩 첨가 하였다.

항 아토피 후보 물질을 테스트하기 위하여 TNCB가 첨가된 well에 각 후보물질을 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게끔 첨가하여 배양하였다.

Cytokine의 정량

혈청내 또는 배양액에서 IFN- γ , IL-12, 그리고 IL-4 level을 측정하기 위하여 배양된 혈액을 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 그 상청액을 cytokine-specific ELISA kits (Endogen, Woburn, MA)을 사용하여 지시된 순서대로 측정하였다. 일반적으로 혈액 및 배양액은 5배에서 20배로 다단 희석하여 5회씩

측정하여 평균 농도를 구하였다. 단 IL-4는 5배로 고정하여 사용하였다. TNCB에 의한 cytokine의 양적 변화 측정하기 위하여 TNCB를 첨가하여 첨가량에 따른 cytokine의 변화를 측정하였다.

IgE의 측정 방법

혈청 및 배양액내의 IgE 레벨은 ELISA Kit (Shibayagi, Japan)를 사용하여 지시된 대로 측정하였다. 일반적으로 혈액 및 배양액은 5배에서 20배로 다단 희석하여 샘플 당 5번씩 측정하여 평균 농도를 측정하였다.

스크리닝 시스템의 적용 및 기본 물질 탐색을 위하여 기존의 아토피 치료제 또는 후보로 되어 있는 물질 및 추출물을 전혈 배양시 첨가하여 cytokine 및 IgE의 양을 측정하여 효능을 평가하였다.

각종샘플 추출방법

각 10 g의 녹차, 탕자, 양파, soybean등의 재료에 D.W.을 50 ml 첨가하여 121°C 15분간 autoclave하여 여액을 0.45 µm membrane을 사용하여 여과 시켰다. 여과된 액을 10 ml 정도로 농축한 후에 그 액을 베이스 크림제형에 첨가하여 아토피 효능을 조사하였다.

NC mouse를 통한 in vivo 효능 측정

아토피를 유발시키기 위하여 일본에서 구입한 SPF NC/Nga mice를 샘플 당 5마리씩 사용하였으며 23±3°C, 습도 55±15%, 빛은 오전 7시에서 12시간 동안 조사하는 환경에서 사육하였다. 인위적인 아토피 유발을 위하여 TNCB를 5% 용액(용매 acetone:ethanol=1:4)으로 제조하여 0.15 ml/mouse의 양으로 약 6주 동안 NC/Nga mice의 전기면도기로 털을 없앤 등 부분에 스크래치 후 도포하였다. 스크래치는 테이프 스트리핑법을 이용하였다.

아토피의 치료 효능 평가를 위하여 상기와 같은 방법과 함께 효능 후보 물질을 베이스 크림제형에 첨가하여 아토피 유발 시점과 함께 도포를 하고 6주 후 NC/Nga mouse의 표피를 육안으로 확인하여 평가하였다. 이때 사용된 베이스 크림의 조성은 및 제조는 다음과 같다. 각 물성별로 A, B, C로 구분하였다. A (유상)는 2% Stearic acid, 1% Glycerin, 1% Cetyl alcohol, 0.5% Sorbitan monostearate, 0.7% Polyoxyethylene stearate, 12% Liquid paraffin, 0.1% Butyl paraben로 구성되어있고, B (수상)는 0.3% Carbomer 934, 0.2% Methyl paraben, 3% 1,3-Butylene glycol, 및 water로 구성되어 있다. 그리고 중화제(C)로는 0.3% Triethanolamine를 사용하였으며, 각 효능물질후보(D)는 10 µg/g로 첨가하였다. 이들 크림의 제조 공정은 우선 A와 B를 70°C에서 가온하여 용해시켜서 혼합하고 homogenizer로 균질화 시킨다. 그 후 다시 C를 첨가하고 다시 균질화 하고 온도를 40°C로 냉각시킨다. 이 베이스 크림에 효능 후보 물질(D)을 첨

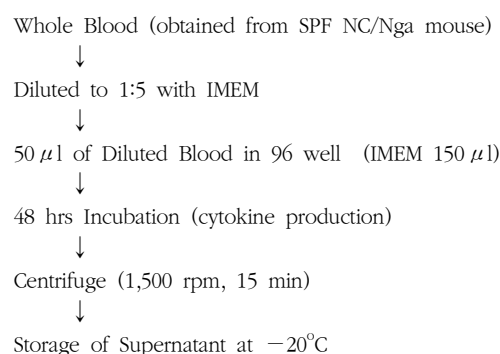
가할 때는 역시 homogenizer로 균질화 시킨 후에 실온으로 낮추고 NC mouse에 도포하였다.

결 과

전혈 배양을 통한 cytokine의 분비량 측정

전혈 배양을 하기 위하여 5마리의 NC/Nga mouse의 심장으로 부터 채혈한 혈액을 48시간(Fig. 1A) 배양하여 IL-4와 IL-12, IFN-γ를 측정된 결과는 아래의 Fig. 1B와 같이 확인되었다. 생체 내 혈액에 존재하는 cytokine 농도와 비교 할 때 두 sample 모두 비슷한 농도로 cytokine이 분포되어 있는 것을 알 수 있었다. 전혈 배양을 실시하여도 Fig. 1B와 같이 생체내의 cytokine이 분비와 크게 변화된 현상을 볼 수 없었고, 이를 이용하여 전혈 배양을 통한 알레르기 치료 후보 물질을 screening 하는 시스템을 확립할 수 있다는 가능성을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구는 많은 연구에서 보고된 것과 같이 Th2 활성화를 아토피유발에 관하여 맨 처음 단계로 규정하고 전혈 배양시 Th2를 활성화 시켰을 때와 정상적인 혈액 상태의 cytokine 분비

(A)



(B)

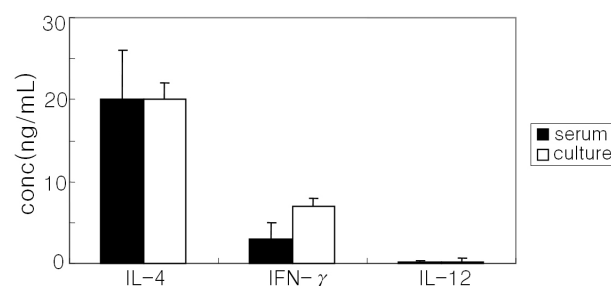


Figure 1. (A) Flow-chart of whole blood culture system. (B) Cytokine production in whole blood culture system. Whole blood cells were cultured for 48 hrs and IL-4, IFN-γ, and IL-12 were measure by using ELISA. Serum and culture indicate the NC/Nga blood and cultured whole blood cell, respectively. In case of IL-4, concentrate unite is pg/ml.

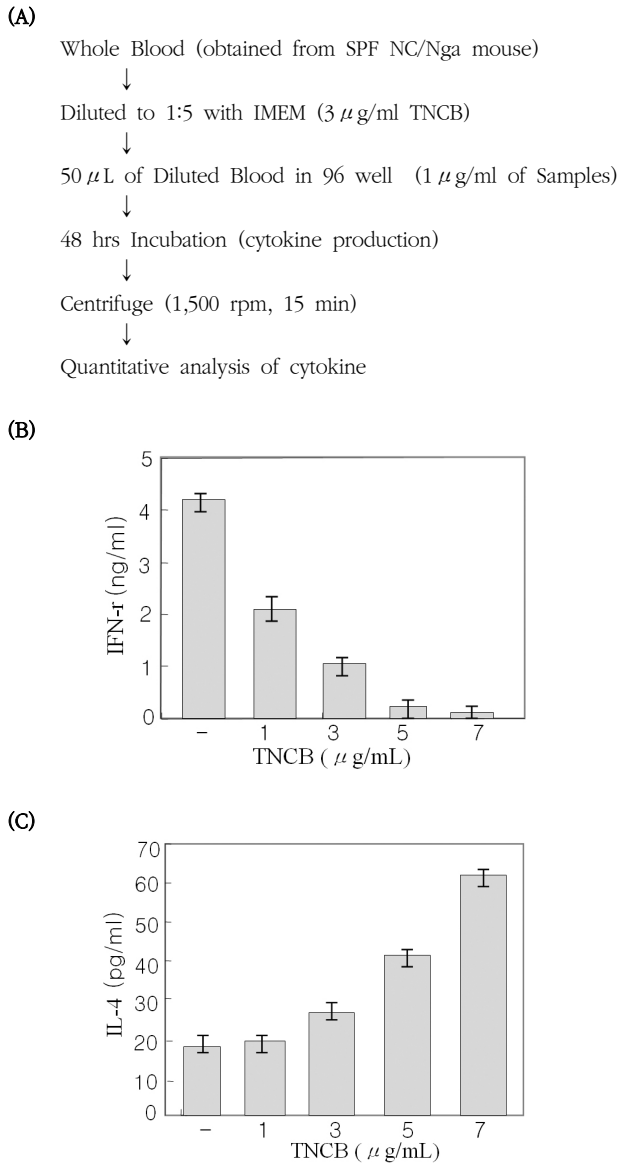


Figure 2. (A) Flow-chart of screening procedure by using whole blood system. TNCB and tested sample were added 2nd and 3rd step, respectively. (B) and (C) Whole blood cells were treated with indicated amount of TNCB for 48hrs. IFN- γ and IL-4 in the culture supernatant were measured by ELISA.

량을 측정하였다(Fig. 2A).

전혈 배양시 Th2 활성화 후의 cytokine 분비량 측정

전혈을 배양하는 시점에서 배지에 Th2 activator인 TNCB(24)를 각 농도별로 첨가하여 activator 첨가량에 따른 IL-4, IFN- γ , IL-12의 변화량을 측정하였다(Fig. 2B and C). TNCB를 첨가하고 약 48시간동안 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 상등액에

분포되어 있는 IL-4와 IL-12, IFN- γ 의 양을 측정하여 본 결과, activator 첨가에 대한 IL-4, IL-12, IFN- γ 의 상관관계는 IFN- γ (Fig. 2B) 및 IL-4(Fig. 2C)에 의해서만 나타나는 것으로 밝혀졌다. IL-12는 activator를 첨가하면서부터 측정되지 않아 발현량이 매우 떨어지는 양상을 나타내었다.

상기의 실험 결과를 통하여 Th2 activator를 첨가하였을 경우 전혈 배양 시스템에서 cytokine중의 IL-4와 IFN- γ 의 발현량만이 유의적으로 보인 것을 알 수 있었다. 따라서 이 결과를 토대로 하여 전혈 배양을 통한 아토피 개선 물질의 스크리닝 시스템을 확보 할 수 있었다.

스크리닝 시스템

Table I에서는 Fig. 2A에 의한 실험 순서대로 Th2 activator 3 μ g/ml을 전혈 배양 배지에 첨가한 후 각 샘플들을 1 μ g/ml의 농도로 첨가하여 48시간 배양하였다. 그리고 배양여액을 ELISA를 이용하여 cytokine 중에 IFN- γ 또는 IL-12의 생산량을 높이는 물질, 또는 IL-4 생산을 저해하는 것을 아토피 후보 물질로 선정하였다. 이 실험에서는 LPS (lipopolysaccharide), 녹차와 탱자 및 양파추출물, soybean과 ceramide, OVA (ovalbumin), BSA (bovine serum albumin), 루이보스, 비타민 C등을 사용하였고 negative control로서는 PBS (Phosphate-buffered saline)를 사용하였다. 녹차와 탱자 및 양파 추출물은 고압 열수추출물을 사용하였다(Table I). 그리고 이들 그룹을 active와 moderate, weak, non group으로 분류하고 이들 중 대표 물질을 선별하여 NC/Nga mouse에 적용함으로써 실제 전혈 배양을 통한 스크리닝 방법과 기존의 동물실험에 대한 상관관계를 조사하기로 하였다(Fig. 3 and 4).

이 결과에 대한 물질의 분류는 IFN- γ 의 생산량을 기준으로 평가하였으며 비타민의 경우는 IL-4의 값이 높아 none으로 분류하였다. 분류는 IFN- γ 를 기준으로 하여 3.0 이상을 active, 2.99-1.5를 moderate, 1.5-1.0을 weak, 그 이하를 none으로 평가하였다. 그러나 weak와 none에서는 IL-4의 생산량에 따라 오고 갈 수도 있을 것이다. 그러나 결과적으로는 두 그룹 모두 아토피에는 효능이 없는 물질로 생각되기 때문에 IFN- γ 1.5 이하의 생산량을 나타내는 물질에는 크게 의미를 두지는 않았다.

NC mouse에 의한 *in vivo* 효능 평가

전혈배양을 통한 실험결과를 실제로 동물실험을 통해 확인하였다. 이 실험은 상기의 재료 및 방법에서 언급한대로 NC/Nga mouse에 처리한 후, Fig. 3과 같이 1주일 간격으로 채혈을 실시하여 혈중의 IgE 함량을 ELISA kit으로 정량하였다. 동물실험에 사용된 4종류의 sample중에 그람 음성균의 세포벽 성분인 LPS와 양파 추출물에서 IgE 발현이 억제되는 현상을 확인하였다. 이러한 혈액성분의 IgE 함량과 Atopy의 표현형의 연관성을 6주 후의 마우스 등에 형성된 Atopy와 비교 하였다(Fig. 4).

Fig. 4에서의 *in vivo* test에서는 효능 후보 물질을 각 10 μ

Table I. Cytokine production measured from various samples treatment in whole blood system

	Materials	IFN- γ (ng/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
Active	LPS	4.21 \pm 0.46	12.3 \pm 1.54	6.48 \pm 1.24
	Green tea	3.12 \pm 1.22	11.1 \pm 1.22	8.71 \pm 1.66
	Hardy orange	3.14 \pm 1.37	13.47 \pm 1.74	4.23 \pm 2.17
Moderate	Onion	2.11 \pm 1.24	8.29 \pm 1.71	11.67 \pm 3.41
	Soybean	1.76 \pm 1.21	6.77 \pm 2.11	14.22 \pm 4.32
	Ceramide	1.99 \pm 0.64	4.68 \pm 1.63	16.41 \pm 2.57
Weak	OVA	1.37 \pm 1.02	2.1 \pm 0.1	27.13 \pm 3.29
	BSA	1.26 \pm 0.55	N.D.	31.68 \pm 4.11
	Rooibos	1.04 \pm 0.27	N.D.	27.47 \pm 4.67
None	Vitamin C	1.55 \pm 0.43	N.D.	36.02 \pm 5.13
	PBS	1.06 \pm 0.59	N.D.	31.22 \pm 4.21

Whole cells were treated with 5 μ g/ml of TNCB plus 1 μ g/ml of indicated samples and incubated for 48 hrs. The culture supernatants were measured by ELISA. Each group represents the candidate of potent anti-atopic materials (active, moderate, weak, and none). LPS: Lipopolysaccharide, OVA: Ovalbumin, BSA: Bovine serum albumin, PBS: Phosphate- buffered saline.

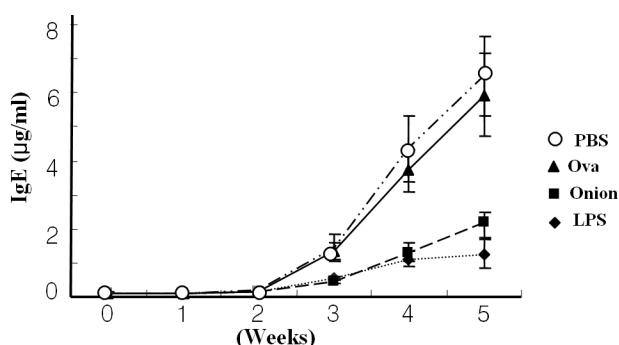


Figure 3. IgE production from NC/Nga mouse treated with 0.15 ml of 5% TNCB solution plus 10 μ g/g of indicated samples and breeding for 6 weeks. Blood has been collected from the tail vein of the sample treated mice with the interval of 1 week, and IgE production was measured by ELISA.

g/g의 농도로 베이스 크림제형(carbopol 0.35%)에 첨가하여 6 주 후 쥐 등 표피를 육안으로 확인하여 평가하였다. 팔호안의 value는 *in vivo* 실험에서의 얻어진 각 효능물질의 아토피 억제 정도를 나타낸다.

전혈 배양을 통한 스크리닝과 *in vivo*의 효능 관계

본 연구는 크게 두 단계로 나눌 수 있다. 첫 번째는 전혈 배양을 통한 아토피 효능 물질의 탐색 시스템을 구성하는 단계로 이 단계에서는 효능 물질을 스크리닝하여 선별하는 작업이 이루어진다. 그리고 두 번째는 첫 단계에서 선별된 물질이 NC/Nga mouse를 이용한 아토피 유발 시험에서 어떠한 효능을 나타내는가의 확인 단계로 개발된 시스템과 동물 시스템과의 상관관계를 나타내는 중요한 단계인 것이다. 통상적으로 전혈 배양을

*ex vivo*라 하고 동물 실험 모델을 *in vivo*로 명칭 하였다. 샘플에 따른 cytokine의 변화량을 4가지 그룹으로 선별하여 가장 효능 있는 그룹을 ‘activate’로 명명하고 이후를 ‘moderate’, ‘weak’, ‘none’으로 분류하였다.

Table II에서는 전혈배양을 통해 각 단계별로 선별된 물질 4종류와 NC/Nga mouse를 통한 *in vivo* 실험의 유효성을 비교하고 분석한 결과이다. 통상적으로 NC/Nga mouse는 육안 식별 value를 0~13까지로 지니고 보았을 때 각 단계별로 선별된 물질은 전혈배양을 통해 스크리닝된 결과와 유사하게 active group은 value 0~3까지, 그리고 moderate group은 4~8까지, weak group은 9~11까지, non group은 13을 나타내고 있는 것으로 나타나 전혈배양을 통한 스크리닝 시스템과 NC/Nga mouse의 *in vivo* test는 상관성이 높은 것으로 밝혀졌다.

고 찰

현재까지 연구된 아토피의 결론은 Th2가 활성화되고 이에 따라 여러 종류의 cytokine을 분비할 수 있고, 그중에 IL-4가 B cell을 자극하여 IgE생산하고 비만세포 및 호산구등을 활성화하여 특유의 알레르기 현상이 나타나게 하는 것으로 알려져 있다. 다시 말하면 아토피 현상을 혈액에서 조사하면 IL-4 및 IgE등의 농도로 질병의 진단이 가능하다는 것이다. 그리고 서론에서 언급했다시피, Th1에 의해 생산되는 IL-12와 IFN- γ 에 의하여 Th2의 활성화가 억제된다는 보고가 있다. 즉 혈액에서 IL-12와 IFN- γ 의 농도가 높다는 것은 그만큼 아토피를 저해한다는 결론을 내릴 수 있을 것이다. Th1과 Th2의 관계를 살펴 보면 Th1 림프구는 세포 매개성 면역 반응 및 지연성 과민 반응과 관계가 있으며, Th2 림프구는 염증과 관련된 면역반응을 발생시키는 것으로 알려져 있다.

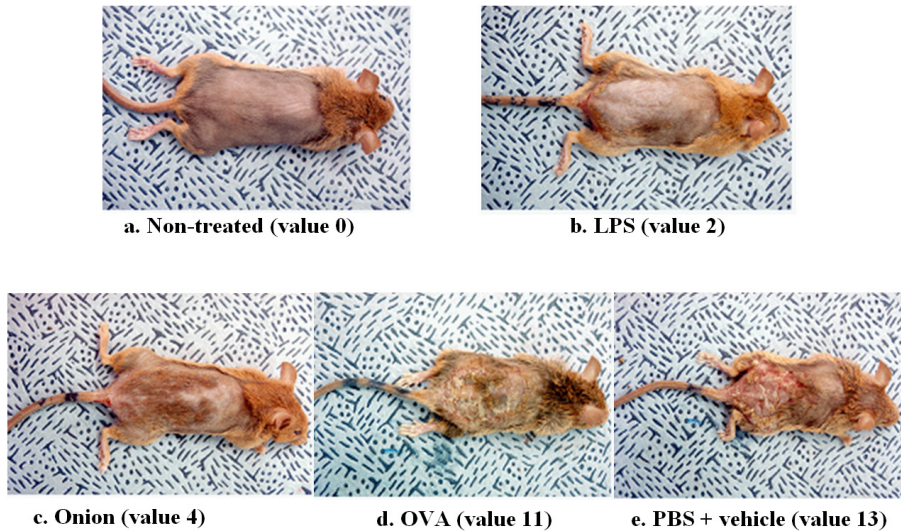


Figure 4. Phenotype of NC/Nga mouse treated with 0.15 ml of 5% TNCB solution plus 10 µg/g of indicated samples for 6 weeks. Value means extend of atopic dermatitis state (0~13 grades).

Table II. Results from whole blood system are compared with those obtained from in vivo test of NC/Nga mouse

Materials	IFN- γ (ng/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IgE (ng/ml) (After 6 weeks)	In vivo (Fig. 4)
LPS	4.21 \pm 0.46	12.3 \pm 1.54	6.48 \pm 1.24	1,254	Active (2)
Onion	2.11 \pm 1.24	8.29 \pm 1.71	11.67 \pm 3.41	2,189	Moderate (4)
OVA	1.37 \pm 1.02	2.1 \pm 0.1	27.13 \pm 3.29	5,928	Weak (11)
PBS	1.06 \pm 0.59	N.D.	31.22 \pm 4.21	6,494	None (13)

Three kinds of cytokine were measured from whole blood system (Table 1). IgE and *in vivo* were derived from animal system, respectively (Fig. 3 and 4).

따라서 본 연구에서는 일차적으로 전혈 배양 시스템을 확립하는 것을 목표로 하였으며, 이차적으로는 Th cell (Th1과 Th2)을 activation 하는 여러 샘플들을 이용하여 세포의 분화 유도하고 cytokine을 생성케 하는 것이었다. 그리고 최종적으로 이들의 cytokine 분비량을 분석하여 아토피 저해 물질을 스크리닝하여, 최종적으로 NC mouse에 적용함으로써 아토피에 대한 *in vivo* 효능을 확인함을 본 연구의 최종 목표로 삼았다.

전혈 배양 시스템은 아토피 적용 대상인 NC/Nga mouse의 심장채혈을 이용하여 실시하였고, 그 결과 glutamax가 첨가된 minimal media에서는 거의 대부분의 세포가 생육 가능하다는 것을 알 수 있었으며 이를 이용하여 이 단계 목표인 cytokine 생산시스템을 확립하고자 하였다. 확립된 전혈 배양을 통한 cytokine의 spectrum 및 농도를 분석하여 Th2의 활성을 저해하는 IL-12 및 IFN- γ 의 생산량을 증가시키고, 한편으로는 IL-4양이 감소되는 물질이 최종적으로 아토피의 유발을 저해 할 수 있는가를 NC/Nga mouse를 이용한 *in vivo* system으로 확인하는 것이었다.

본 연구의 수행 과정 중 수용성 물질의 경우는 전혈배양을

통한 아토피 효능 물질의 탐색 시스템에 적용하는데 아무런 문제점이 없었지만 본 연구에 사용된 다수의 샘플을 고압 열수 추출하는 동안에 지용성 물질의 경우는 혼합되어지지 않아 정확한 측정이 불가능한 상황이었다. 그러나 본 연구의 수행 과정 중 지용성 물질의 인체 이동경로를 사용하게 되면 검색 시스템을 완비할 수 있다는 가정 하에 연구를 수행한 결과 지용성 물질도 수용성 물질과 마찬가지로 시스템에 적용할 수 있는 방법을 개발하게 되었다. 지용성 물질이 인체 내에서 이동되는 메커니즘을 적용함으로써 해결할 수 있었다. 즉, 지용성 물질은 인체 내에서 단백질 등 기타 물질에 흡착된 상태로 이동을 하는 점에 착안하여 테스트 하고자 하는 지용성 물질을 실험실에서 단백질에 흡착 시켜 적용한 결과 무리 없이 작동함을 알게 되었다. 현재 지용성 물질은 현재의 다른 연구팀에서 실시하는 스크리닝 시스템에서는 그 효능을 나타낼 수 없고 오직 동물 실험의 도포법 또는 경구 투여만을 통해서 그 효능을 확인 할 수 있었다. 그러나 새로운 지용성 물질의 효능을 측정 할 수 있는 방법이 개발되어 수용성 외에 지용성 물질도 효능을 측정할 수 있어 새로운 지용성 물질에 대한 개발 가능성을 높여주고 있다(특히

출원증).

결론적으로 Th2의 활성을 저지하는 것으로 알려진 LPS 및 탱자 등을 비롯한 수종의 식물 추출물을 틀 이용한 전혈 시스템 결과가 in vivo 시스템인 NC/Nga mouse에서 일치된 결과인 아토피 저해 능력이 있는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 Th2 활성 저해를 이용한 전혈 배양 시스템과 NC/Nga mouse를 이용한 아토피 예방 물질의 연구모델과 매우 유사한 유의성을 지니는 것으로 나타났다. 종합하면 본 연구의 결과를 이용하여 아토피의 개선 물질을 스크리닝 할 경우 경제적으로는 NC/Nga 마우스를 이용한 동물 스크리닝 모델의 연구비의 약 20% 정도만으로도 같은 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 그리고 전혈 배양을 통하여 배양하기 때문에 첨가된 물질에 대한 혈액 내에서의 반응성 또는 세포 독성 등을 일차적으로 판별 할 수 있다는 장점이 존재한다.

본 연구를 수행하는 동안에도 많은 물질을 대입해 보았지만 결과적으로 혈액내의 혈구를 손상시키는 물질들을 상당히 많이 볼 수 있었다. 만약 이런 물질등이 동물 실험 모델로 효능 원료로 스크리닝 될 경우 최종적으로 세포 독성이나 인체에 독성을 지니고 있어 사용하지 못하게 될 경우가 많다. 본 연구의 결과인 전혈 배양을 이용한 스크리닝 시스템은 일차적으로 인체에 미칠 영향도 알 수 있다는 장점이 있어 상기와 같은 경우 낭비되는 인력과 시간, 그리고 막대한 연구비의 낭비를 줄일 수 있어 비용의 절감성이 산술적인 것보다 클 것으로 예상된다. 또한 본 연구에서 개발된 '전혈배양을 통한 아토피 효능 물질의 탐색 시스템'은 꼭 아토피에 적용되는 것만은 아니다. 즉 목적으로 하는 혈구세포나 cytokine의 종류에 따라 그 적용은 상당히 광범위 할 것이다. 그리고 전혈 배양을 통하여 혈액내의 면역 메커니즘의 규명 또한 활발히 진행 될 수 있을 것이다. 기존의 경구 투여 또는 정맥 투여를 통한 동물 실험을 통해서만 규명할 수 있었던 인체 면역 시스템을 전혈 배양을 통하여 간단히 확인할 수 있으며, 부작용 또한 바로 판별 할 수 있을 것이다. 전혈 배양을 통한 아토피 효능 물질의 탐색 시스템의 개발은 전혈을 이용한 최초의 스크리닝 시스템으로서 전혈을 배양하는 ex vivo 시스템의 파급 효과는 무한할 것이다. 앞서 언급한 응용분야 외에도 체내에서 효과를 나타내는 신물질의 탐색 및 각종 메커니즘 연구에 유용한 도구로 쓰이리라 기대된다. 본 시스템을 이용하여 단기적으로는 아토피 증상을 억제 또는 완화시키면서 체내에 독성이 적은 원료를 탐색할 것이며, 이 결과는 곧바로 화장품 또는 의약품 원료로 사용할 수 있을 것이다. 추후 우리는 기타 알레르기성 질환에 효과적인 원료 탐색 및 검증에 응용할 계획을 가지고 있다.

참고문헌

1. Ishizaka K: Mechanisms of reaginic hypersensitivity. Clin Allergy 1:924, 1971

2. Mosmann T, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T-cell clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 136: 2348-2357, 1986
3. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H: Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. Nature 373:255-257, 1995
4. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, de Waal Malefyt R, Vega F Jr, Zurawski SM, Zurawski G, de Vries JE: An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. J Exp Med 178:2213-2218, 1993
5. Mosmann T, Coffman R: Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation. Immunol Today 8:223-227, 1987
6. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR: Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. Science 254:277-279, 1991
7. Romagnani S: immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. J Allergy Clin Immunol 113:395-400, 2004
8. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH: Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. Immunol Today 21:479-483, 2000
9. Magnan AO, Mely LG, Camilla CA, Badier MM, Montero-Julian FA, Guillot CM, Casano BB, Prato SJ, Fert V, Bongrand P, Vervloet D: Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. Am J Respir Crit Care Med 161:1790-1796, 2000
10. Romagnani S: Lymphokine production by human T cells in disease states. Annu Rev Immunol 12:227-257, 1994
11. Abbas AK, Murphy K, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 383: 787-793, 1996
12. Strachan DP: Family size, infection and atopy: the first decade of the hygiene hypothesis. Thorax 55:S2S10, 2000
13. Gereda JE, Leung DYM, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klennert MD: Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitization in infants at high risk of asthma. Lancet 355:1680-1683, 2000
14. Ernst P, Cormier Y: Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. Am J Respir Crit Care Med 161:1563-1566, 2000
15. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS: Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. Clin Exp Allergy 28:2829-2834, 1999
16. Von Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R: Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. Clin Exp Allergy 30:187-193, 2000
17. Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M: Austrian chil-

- dren living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 30;194-200, 2000
18. Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M: Childhood farm environment and asthma and sensitization in young adulthood. *Allergy* 57;1130-1135, 2002
 19. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S: Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358;1129-1133, 2001
 20. Leynaert B, Neukirch C, Jarvis D, Chinn S, Burney P, Neukirch F: European Community Respiratory Health Survey. Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood?. *Am J Respir Crit Care Med* 164;1829-1834, 2001
 21. Portengen L, Sigsgaard T, Omland O, Hjort C, Heederik D, Doekes G: Low prevalence of atopy in young Danish farmers and farming students born and raised on a farm. *Clin Exp Allergy* 32: 247-253, 2002
 22. Horak F Jr, Studnicka M, Gartner C, Veiter A, Tauber E, Urbanek R, Frischer T: Parental farming protects children against atopy: longitudinal evidence involving skin prick tests. *Clin Exp Allergy* 32;1155-1159, 2002
 23. Elsässer-Beile U, von Kleist S, Gallati H: Evaluation of a test system for measuring cytokine production in human whole blood cell cultures. *J Immunol Methods* 139;191-195, 1991
 24. Yokozeki H, Ghoreishi M, Takagawa S, Takayama K, Satoh T, Katayama I, Takeda K, Akira S, Nishioka K: Signal transducer and activator of transcription 6 is essential in the induction of contact hypersensitivity. *J Exp Med* 191;995-1004, 2000