

폐흡충(*Paragonimus Westermani*) 감염 마우스에 있어 비장 B 세포표면의 CD23(FcεRII) 항원의 발현

이화여자대학교 의과대학 기생충학교실
신 명 현

= Abstract =

CD23(FcεRII) Expression on Splenic B Cells in *Paragonimus Westermani*-infected Mice

Myeong Heon Shin

Department of Parasitology, College of Medicine, Ewha Womans University

Object : Elevation of serum IgE is the most characteristic immune response in helminthic infections. Recently, expression of CD23(FcεRII) on B lymphocytes play a major role in IgE production in allergic diseases. However, the mechanisms causing increased IgE production during helminthic infections are poorly understood. In the present study, the expression of CD 23 on splenic B lymphocytes during the course of infection with *Paragonimus westermani* was examined.

Methods : Female, 4-6-week old BALB/c mice were inoculated orally with 20 metacercariae of *P. westermani*. For detection of CD23 positive B lymphocytes by flow cytometry, splenocytes from infected mice and non-infected age matched controls were stained with FITC-conjugated rat anti-mouse CD23 and PE-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 mono-clonal antibody. And also, to observe the effect of metacercarial ESP on the expression of CD23 antigen, splenocytes from non-infected mice were incubated in the presence of ESP at 37°C for 6 h and 24 h.

Results : The frequency of CD23 positive B lymphocytes of infected mice was increased significantly($P < 0.05$) at two and three weeks after infection($43.4 \pm 7.52\%$ and $44.4 \pm 2.99\%$, respectively) and persisted the higher levels at four and six weeks after infection. Expression of CD23 antigen of cultured splenocytes from non-infected mice in the presence of metacercarial ESP was increased significantly($P < 0.05$) at 24 h after incubation($60.1 \pm 7.54\%$).

Conclusion : These results suggest that the expression of CD23 antigen induced by metacercarial ESP might play a important role in serum IgE production in mice infected with *P. westermani*.

KEY WORDS : CD23(FcεRII) · Excretory-secretory products(ESP) · *Paragonimus westermani*.

서 론

Fc epsilon receptor(FcεR)는 비만세포 및 호염구의 세포표면에 존재하는 고친화성인 FcεRI 및 B 세포, 대식세포, 호산구 및 혈소판의 표면에 존재하는 저친화성인 FcεRII로 나누어지며 특히 FcεRII를 CD23 항원이라 한다¹⁾²⁾. CD23 항원의 발현은 TH2 세포에서 분비되는 interleukin 4(IL-4)에 의해 증가되며³⁾ 알레르기 질환시 CD23 항원에 대한 특이 항체를 처치시 IgE의 생산이 억제됨을 관찰하여⁴⁾ CD23 항원의 발현이 IgE 생산에 관여함을 알 수 있다.

윤충(helminths) 감염시 가장 특징적인 면역반응은 혈청내 IgE의 증가이며⁵⁾ 이때 IgE의 생산에도 CD23 항원의 발현과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각하나 이에 대해서는 아직도 논란의 대상이 되고 있다. 즉 조직기생충인 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*) 감염 마우스의 비장 B 세포의 CD23 항원의 발현은 증가되었으나⁶⁾ 간흡충(*Clonorchis sinensis*) 감염 환자에서는 CD23 항원의 발현은 증가되지 않음이 보고⁷⁾되었다. 우리나라에서 간흡충과 더불어 아직도 널리 산재해 있는 국민 보건상 중요한 기생충으로 취급되고 있는 폐흡충 감염시 혈청내 IgE가 증가됨을 관찰하였으나⁸⁾ 림프구의 CD23 항원의 발현 및 그 발현기전에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

이 연구에서는 마우스에 폐흡충 피낭유충을 감염시킨 후 비장 B 림프구의 CD23 항원의 발현을 유세포 분석기로 측정하여 폐흡충 감염 마우스에 있어 증가되는 혈청내 IgE의 생산에 CD23 항원의 역할을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 폐흡충 피낭유충의 수집 및 감염

전라남도 완도군 보길도에서 폐흡충의 제 2 중간숙주인 참가재(*Cambaroides similis*)를 채집하여 유발에서 마쇄한 후 인공소화액(pepsin 0.2g, 농염산 0.7ml, 증류수 99.3ml)에 처리하여 분리한 폐흡충 피낭유충을 4~6주령의 BALB/c 마우스에 한 마리당 20개씩 경구 감염시켰다.

2. 폐흡충 피낭유충의 탈낭 및 배설 - 분비항원의 제조

위에서 분리한 피낭유충을 생리식염수로 세척한 후 40°C의 Tyrode 용액(NaCl 8.0g, KCl 0.2g, CaCl₂ 0.1g, NaH₂PO₄·H₂O 1.0g, NaHCO₃ 1.0g, D.W 1.0L)에서 2시간 배양하여 탈낭시켰다. 1,000~2,000개의 탈낭시킨 피낭유충에 3ml의 생리식염수를 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 12시간 배양한 후 배양액을 수집하여 이를 탈염시킨 후 10,000g로 30분간 원심 분리하여 상층액을 배설 - 분비 항원으로 사용하였다. 이때 단백질 함량은 Lowry등⁹⁾(1957)의 방법에 따라 정량하였다.

3. 마우스 비장으로부터 단핵세포의 분리 및 B 세포 표면의 CD23 항원의 염색

감염 시기별(0, 2, 3, 4, 6주)로 마우스를 5마리씩 희생시켜 복부를 절개한 후 비장을 무균적으로 적출하여 4ml의 PBS가 담긴 세포배양접시(Costar, Maine)에 옮겨 잘게 부순후 1ml 주사기로 pumping하여 세포부유액을 만들었다. 세포부유액을 1.5ml의 tube에 옮겨 1,500rpm으로 3분간 원심시킨 후 비장세포를 인산완충액으로 3회 세척하였다. 비장 B 세포표면의 CD23항원의 측정을 위해 분리한 비장세포 부유액에 FACS lysing solution(Becton Dickinson, California) 1ml를 첨가하여 10분간 실온에 방치하여 적혈구를 용혈시킨 후 단핵세포를 1×10⁶/50μl의 농도로 조정하였다. Phycoerythrin(PE)-conjugated rat anti-mouse CD45 R/B220 단일클론항체(rat IgG_{2b})(Pharmigen, California) 및 Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated rat anti-mouse CD23 단일클론항체(rat IgG_{2a})(Pharmigen, California)를 4μ씩 넣고 4°C 냉장고에서 30분간 반응시킨 후 인산완충액으로 2번 세척후 1% paraformaldehyde를 넣어 고정시킨 뒤 유세포분석을 할 때까지 4°C 냉장고에 보관하였다. 이때 대조염색으로 PE-conjugated rat IgG_{2b} 및 FITC-conjugated rat IgG_{2a}를 각각 사용하였다.

4. 세포배양 및 B 세포표면의 CD23 항원의 염색

폐흡충 피낭유충을 감염시키지 않은 정상 마우스로부터 분리한 비장세포를 0.17M Tris-NH₄Cl(pH 7.2)을 첨가하여 5분간 실온에서 방치하여 적혈구를 용혈시킨 후 Dulbecco's Modification Eagle's Medium(DM

Table 1. Percent FcεR II + splenic B lymphocytes in mice infected with *Paragonimus westermani*

	2w ^{a)}	3w	4w	6w
Non-infected mice(n=5)	26.1±3.18 ^{b)}	33.6±2.91	30.7±5.94	31.1±3.77
Infected mice(n=5)	43.4±7.52 ^{c)}	44.4±2.99 ^{c)}	35.7±3.29	38.9±4.96

a) week of infection, b) each value represents the mean±SD, c) Student's t-test(p < 0.05)

EM)(Sigma, St. louis) 배지로 2회 세척한 후 단핵세포를 분리하였다. 이때 세포수는 0.4% trypan blue로 염색을 한 후 haemocytometer를 이용하여 계산하였고 이때의 세포 생존능은 95% 이상이었다. 이와 같이 분리한 마우스의 비장세포를 10% 우태아혈청이 함유된 DMEM 배지에 2×10⁶개/ml 되게 조정된 후 96 well polystyren plate(Nunc, Denmark)의 각 홈에 200 µl씩 분주한 후 폐흡충 피낭유충의 분비-배설물을 well당 30µg/ml의 농도가 되게 첨가하였다. 이 plate를 37 °C, 5% CO₂ 항온항습기에서 6시간 및 24시간 배양한 후 단핵세포를 수거한 뒤 앞에서 사용한 단일크로항체로 염색하였다. 이때 DMEM 배지만 첨가한 것을 대조군으로 삼았다.

5. 유세포분석기에 의한 세포분석

CD23 항원을 지닌 B 림프구군은 유세포분석기(Becton Dickinson, California)를 사용하여 분석하였다. 이때 forward 및 side scatter를 이용하여 단핵세포중 림프구군만을 gating하였으며 1회 분석을 위한 세포수는 gating한 구역에 10,000개의 세포가 될 때까지 측정하였다.

6. 통계 처리

실험군과 대조군의 유의성은 Student's t-test를 이용하여 검증하였다.

결 과

1. 폐흡충 감염 마우스의 비장 B 세포표면의 CD 23 항원의 발현(Table 1, Fig. 1)

폐흡충 감염 마우스의 비장 B 림프구중 CD23 항원 양성 세포율은 감염 2주에 43.4±7.52%로 대조군의 26.1±7.52%에 비해 유의한 수준으로 증가되기 시작하여 감염 3주에도 44.4±2.99%로 대조군의 33.6±2.91에 비해 유의한 수준으로 증가되었다. 또한 감염 4주 및 6주의 CD23 항원 양성 세포율도 각각 35.7±3.29% 및 38.9±4.96%로 대조군의 30.7±5.94% 및 31.1±3.77

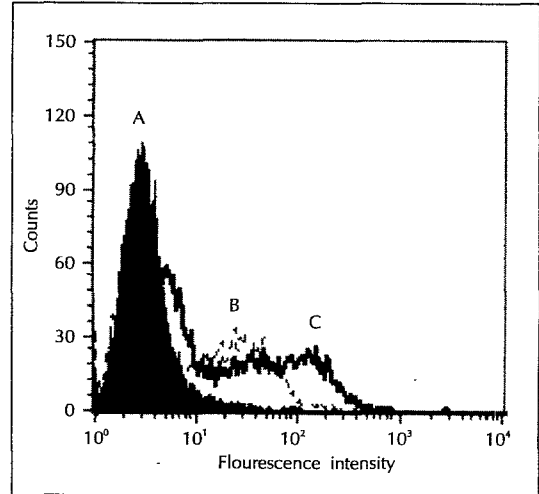


Fig. 1. CD23 cell surface expression on splenic B lymphocytes(A : autofluorescence, B : non-infected mice, C : infected mice).

Table 2. Percent FcεR II + splenic B lymphocytes of 6 h and 24 h cultured splenocytes from non-infected mice

	6h ^{a)}	24h
Media only	18.6±3.01 ^{c)}	17.8±1.54
Media+ESP ^{b)}	24.8±2.78	60.1±7.54 ^{d)}

a) hour of incubation

b) ESP means metacercarial excretory-secretory products

c) each value represents the mean±SD

d) Student's t-test(p < 0.05)

%에 비해 증가되었으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.

2. 폐흡충 피낭유충의 분비-배설물이 정상 마우스의 비장 B 세포표면의 CD23 항원의 발현에 미치는 영향(Table 2, Fig. 2)

정상 마우스의 비장으로부터 분리한 단핵세포에 폐흡충 피낭유충의 분비-배설물을 첨가하였을 때 배양 6시간 후의 B 림프구중 CD23 양성 세포율은 24.8±2.78%로서 배지만을 첨가한 대조군의 18.6±3.01%에 비해 약간 증가되었으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 배양 24시간 후의 CD23 양성 세포율은 60.1±7.54%로

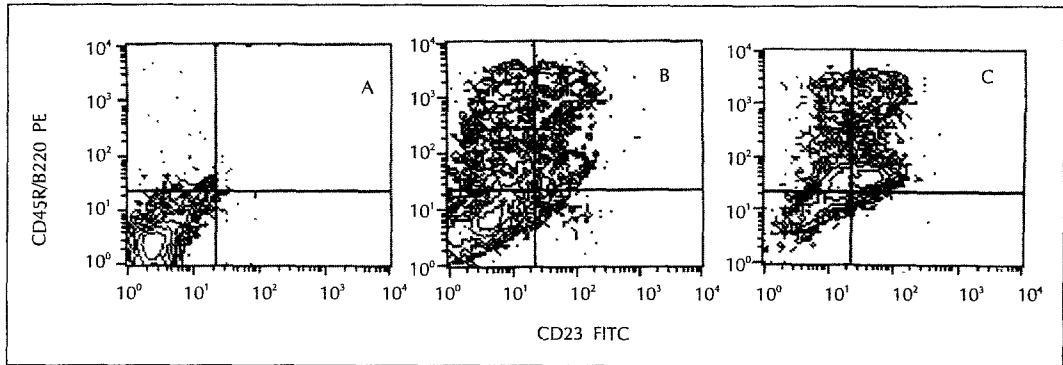


Fig. 2. Expression of CD23 antigen of 24 h cultured splenocytes from non-infected mice(A : autofluorescence, B : media only, C : media+metacercarial ESP).

서 대조군의 $17.8 \pm 1.54\%$ 에 비해 유의한 수준($p < 0.05$)으로 증가되었다.

고 안

이 실험에서는 폐흡충 감염 마우스에서 증가되는 혈청 내 IgE의 생산에 CD23 항원의 역할을 알아보기 위해 마우스에 폐흡충 피낭유충을 감염시킨 후 시기별로 비장 B 세포 표면의 CD23 항원의 발현을 측정하였다. 폐흡충 감염 마우스의 비장 B 세포중 CD23 항원 양성율은 전 실험기간 동안 대조군에 비해 증가되어 있었으며 특히 감염 초기인 2주 및 3주에는 각각 $43.4 \pm 7.52\%$ 및 $44.4 \pm 2.99\%$ 로 정상 대조군에 비해 유의한 수준($p < 0.05$)의 증가를 관찰하였다. 이러한 결과는 만손주혈흡충 감염 마우스의 비장 B 세포의 CD23 항원의 발현이 증가되었다는 보고⁹와 일치하나 다른 윤충 감염인 간흡충 감염 환자에서 혈청내 높은 IgE는 있으나 혈액내 림프구의 CD23 항원의 발현이 증가되지 않았다는 보고⁷와는 일치하지 않았는데 이러한 결과는 감염 기생충 및 숙주가 다르기 때문으로 생각된다. 또한 이 실험에서 증가된 비장 B 세포의 CD23 항원의 발현은 폐흡충 감염 마우스에서 증가되는 혈청내 IgE의 변동 시기⁹와 일치한다. 또한 폐흡충 감염 마우스의 비장 림프구를 Con A로 자극시켰을 때 IL-4의 생산이 감염초기에 증가되었다는 보고¹⁰가 있어 폐흡충 감염시 증가되는 혈청내 IgE는 TH2 세포에서 분비되는 IL-4의 자극으로 인해 증가된 CD23 항원의 발현과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다. 이러한 증거로는 만손주혈흡충 감염 및 DNP (dinitrophenol)-OVA(ovalbumin)로 처리한 마우스

에 anti-IgE 단일클론항체를 생체내에 주입한 결과 증가된 비장 림프구의 CD23 항원의 발현 및 IgE의 생산이 감소되었다는 보고^{6,11}가 이를 뒷바침하고 있다.

사상충체의 분비-배설물이 림프구의 CD23 항원의 발현을 증가시키며 이때 분비-배설물에 대한 특이 항체를 처치하였을 때에 증가된 CD23 항원의 발현이 억제되었다는 보고^{12,13}가 있다. 이 실험에서도 폐흡충 피낭유충의 분비-배설물을 정상 마우스의 비장 림프구에 첨가하였을 때 배양 24시간 후의 CD23 항원의 발현이 대조군에 비해 유의한 수준($p < 0.05$)으로 증가됨을 관찰하여 폐흡충 유충에서 분비되는 물질이 CD23 항원의 발현을 증가시킬 수 있음을 알 수 있다. 그러나 이 실험에서는 피낭유충의 분비-배설물체에 대한 특이 항체를 첨가한 후의 CD23 항원의 발현을 측정하지 않아 다음 실험에서는 피낭유충의 분비-배설물에 대한 특이 항체를 첨가한 후의 CD23 항원의 발현을 함께 측정하고 분비-배설물중 CD23 항원의 발현을 유도하는 물질을 순수 분리하는 연구가 필요하다고 생각된다.

기생충 감염시 증가되는 IgE 항체는 감염숙주와 기생충 상호관계에서 항기생충 작용을 하는 것으로 알려져 있다^{14,15}. 그러나 만손주혈흡충 감염시 anti-IgE 단일클론항체를 마우스에 주사하여 비기생충성 IgE를 억제시켰을 때 감염충체수와 충란 생산이 감소됨을 관찰하여 윤충 감염시 증가되는 IgE 항체는 숙주가 아닌 충체에 대해 보호하는 역할을 하여 증가된 IgE가 오히려 감염숙주의 방어면역에 폐해를 끼친다는 보고가 있다⁹. 이러한 결과는 윤충 감염시 증가되는 총 IgE 중 기생충 특이 IgE 항체가 차지하는 양이 10% 미만으로 대부분의 증가된 비기생충성 IgE가 수용가능한 IgE 수용체(FcεR)

를 이미 포화상태로 만들어 기생충 특이 항원에 대한 IgE 매개성 세포독성을 저하시켜 감염충체를 보호할 수 있다는 이론¹⁰⁾을 뒷받침하게 된다. 그러나 이 실험에서는 IgE 및 세포표면의 IgE 수용체의 발현이 숙주의 방어면역에 미치는 역할을 알 수 없어 이에 대한 연구가 요구된다.

이상의 성적을 종합하면 폐흡충 감염 마우스에 있어 혈청내 IgE의 생산은 CD23 항원의 발현과 밀접한 관계가 있으며 이때 폐흡충 유충의 분비-배설물이 비장 B 세포표면의 CD23 항원의 발현을 증가시키는 것으로 생각된다.

요 약

목 적 :

윤충 감염시 가장 특징적인 면역반응인 혈청내 IgE의 생산에는 CD23(FcεRII) 항원의 발현과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되나 이에 대해서는 감염 기생충의 종류에 따라 다른 결과를 보이고 있다. 따라서 이 연구에서는 조직 기생충인 폐흡충을 마우스에 감염시킨 후 비장 B 세포표면에 CD23(FcεRII) 항원의 발현을 측정하여 폐흡충 감염마우스에 있어 증가되는 혈청내 IgE 생산에 CD23 항원의 역할을 알아보고자 하였다.

방 법 :

폐흡충의 제2중간숙주인 참가재에서 분리한 폐흡충 피낭유충을 4~6주령의 BALB/c 마우스에 한 마리당 20개씩 경구 감염시킨 후 감염 시기별로(0, 2, 3, 4, 6주)로 마우스의 비장으로 부터 단핵세포를 분리한 후 B 세포표면의 CD23항원의 발현을 유세포분석기로 측정하였다. 또한 정상 마우스로부터 분리한 비장세포에 폐흡충 피낭유충의 분비-배설물을 첨가한 후 6시간 및 24시간 배양한 후 B 세포표면의 CD23항원의 발현을 측정하였다.

결 과 :

폐흡충 감염 마우스의 비장 B 림프구중 CD23 항원 양성 세포율은 감염 2주에 43.4±7.52%로 대조군의 26.1±7.52%에 비해 유의한 수준으로 증가되기 시작하여 감염 3주에도 44.4±2.99%로 대조군의 33.6±2.91에 비해 유의한 수준(p<0.05)으로 증가되었다. 또한 감염 4주 및 6주의 CD23 항원 양성 세포율도 각각 35.7±3.29% 및 38.9±4.96%로 대조군의 30.7±5.94% 및 31.

1±3.77%에 비해 증가되었으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 정상 마우스의 비장으로 부터 분리한 단핵세포에 폐흡충 피낭유충의 분비-배설물을 첨가하였을 때 배양 6시간 후의 B 림프구중 CD23 양성 세포율은 24.8±2.78%로서 배지만을 첨가한 대조군의 18.6±3.01%에 비해 약간 증가되었으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 배양 24시간 후의 CD23 양성 세포율은 60.1±7.54%로서 대조군의 17.8±1.54 %에 비해 유의한 수준(p<0.05)으로 증가되었다.

결 론 :

폐흡충 감염 마우스에 있어 혈청내 IgE의 생산은 CD23 항원의 발현과 밀접한 관계가 있으며 이때 폐흡충 유충의 분비-배설물이 비장 B 세포표면의 CD23 항원의 발현을 증가시키는 것으로 생각된다.

References

- 1) Spiegelberg HL : *Interaction of immunoglobulins of different classes and subclasses with Fc receptors on leukocytes.* In : Weigle WO(ed.). *Advances in immunopathology.* Elsevier North Holland, Inc., New York, 1981 : p123-140
- 2) Spiegelberg HL : *Fc receptors for IgE and interleukin-4 induced IgE and IgG4 secretion.* *J Invest Dermatol* 1990 ; 94 : 49S-52S
- 3) Vercelli D, Jabara HH, Lee BW, Woodland N, Geha RS, Leung DYM : *Human recombinant interleukin 4 induces FcεR2/CD23 on normal human monocytes.* *J Exp Med* 1988 ; 167 : 1406-1416
- 4) Flores-Romo L, Shields J, Humbert Y, Graber P, Aubry JP, Gauchat JF, et al : *Inhibition of an in vivo antigen-specific IgE response by antibodies to CD23.* *Science* 1993 ; 261 : 1038-1041
- 5) Radermecker M, Bekhti A, Doncelet E, Salmon J : *Serum IgE levels in protozoal and helminthic infections.* *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1974 ; 143 : 285-295
- 6) Amiri P, Haak-Frendscho M, Robbins K, McKerrow JH, Stewart T, Jardieu : *Anti-immunoglobulin E treatment decreases worm burden and egg production in Schistosoma mansoni-infected normal and interferon γ knockout mice.* *J Exp Med* 1994 ; 180 : 43-51
- 7) Watanabe N, Yanagihara Y, Joh K, Hamada A, Tomita Y : *Fc-epsilon-receptor-bearing lymphocytes*

- in patients with clonorchiasis. Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989 ; 89 : 103-107
- 8) Min DY, Ryu JS, Shin MH : *Changes of IgE production and splenic helper and suppressor T lymphocyte subpopulation in mice infected with Paragonimus westermani. Korean J Parasitol* 1993 ; 31 : 231-238
 - 9) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : *Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem* 1951 ; 193 : 265-275
 - 10) Shin MY, Min DY : *Production of interferon- γ and interleukin-4 by splenocytes in mice infected with Paragonimus westermani. Korean J Parasitol* 1996 ; 34 : 185-189
 - 11) Haak-Frendscho M, Robbins K, Lyon R, Shields R, Hooley J, Schoenhoff M, et al : *Administration of an anti-IgE antibodies inhibits CD23 expression and IgE production in vivo. Immunology* 1994 ; 82 : 306-313
 - 12) Yamaoka KA, Tsukidate S, Higaki M, Miyasaka N, Fujita K : *Induction of Fc epsilon RII/CD23 on human T cells by excretory and secretory antigen of Dirofilaria immitis Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991 ; 95 : 92-93
 - 13) Yamaoka KA, Kolb JP, Miyasaka N, Inuo G, Fujita K : *Purified excretory-secretory component of filarial parasite enhances Fc epsilon RII/CD23 expression on human splenic B and T cells and IgE synthesis while potentiating T-helper type 2-related cytokine generation from T cells. Immunology* 1994 ; 81 : 507-512
 - 14) Capron A, Dessaint JP, Haque A, Capron M : *Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity against parasites. Prog Allergy* 1982 ; 31 : 234-238
 - 15) Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Veins P : *A new function for platelets : IgE-dependent killing of schistosomes. Nature* 1983 ; 303 : 810-812
 - 16) Prichard DI : *Immunity to helminths : is too much IgE parasite-rather than host-protective? Parasite Immunol* 1993 ; 15 : 5-9