

폐흡충 감염 마우스에 rIFN- γ 처치시 혈청내 IgE 및 말초혈액내 호산구수에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 기생충학교실
신 명 현

= Abstract =

Effects of rIFN- γ on Serum IgE and the Number of Pheripheral Blood Eosinophils in Mice Infected with *Paragonimus westermani*

Myeong Heon Shin

Department of Parasitology, College of Medicine, Ewha Womans University

Objective : Elevated serum IgE and pheripheral blood eosinophilia are immunologic hallmark in helminthic infections. Recently, these responses are known to be regulated by Th2-specific cytokine IL-4 and IL-5, respectively. And also, the antagonistic effects of IFN- γ on Th2 cell proliferation were shown *in vitro*. However, few studies on the effect of IFN- γ on Th2 cytokine responses in *Paragonimus westermani* infection are reported. In this study, effects of rIFN- γ on serum IgE production and the number of pheripheral blood eosinophils in mice infected with *P. westermani* were examined.

Methods : 5 - 6week old male BALB/c mice treated with IFN- γ were divided into 3 groups. All the mice were inoculated orally with 20 metacercariae of *P. westermani*. Group I mice(0 - 14 days) were treated intraperitoneally with 2×10^3 unit of rIFN- γ at daily intervals from the time of the infection to 14th day of infection, group II mice(5 - 14 days) were treated with rIFN- γ from the 5th to the 14th day of infection and group III mice(8 - 14 days) were treated from the 8th to the 14th day of infection. Total serum IgE and the number of pheripheral blood eosinophils were examined in infected mice treated with rIFN- γ .

Results : The serum IgE levels in group I and II were decreased compared with those of infected mice with no treatment with rIFN- γ , but not significantly. The number of pheripheral blood eosinophils in group I and II were decreased compared with those of infected mice with no treatment with rIFN- γ , especially significant($p < 0.05$) reduction was shown in group I. However, the serum IgE levels and number of pheripheral blood eosinophils in group III were similar to those of infected mice with no treatment with rIFN- γ .

Conclusion : These results suggest that IFN- γ decreases Th2 cytokine response in *P. westermani*-infected mice. However, IFN- γ treatment has less of an effect once the production of Th2-associated cytokines has become established.

KEY WORDS : rIFN- γ · IgE · Pheripheral blood eosinophils · *Paragonimus westermani*.

서 론

사람 및 마우스의 CD4⁺ 세포(T helper cell: Th cell)는 분비되는 cytokine의 종류에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 구분된다¹⁾. Th1 세포에서는 IL-2, IFN- γ 및 lymphotoxin등이 분비되어 지연형 과민반응과 같은 세포매개성 면역반응에 관여하며, Th2 세포에서는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 및 IL-10등이 분비되어 항체생산과 같은 체액성 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁾.

기생충 감염시 CD4⁺ 세포는 감염기생충의 종류에 따라 Th1 또는 Th2 세포로 분화되어 특정한 cytokine이 분비된다³⁾. 세포내 기생 원충인 *Leishmania sp.* 감염 마우스에서는 IFN- γ 가 분비되어 대식세포를 활성화시켜 감염 원충을 살멸시키는 Th1 cytokine 반응이 주로 일어나며⁴⁾ 조직 기생충인 윤충 감염시에는 IL-4 및 IL-5가 생산되어 IgE의 생산 및 호산구의 수를 증가시켜 감염 충체를 체외로 배출시키거나 살멸시키는 Th2 cytokine 반응이 주로 일어난다⁵⁾. 또한 Th cytokine 반응은 Th1 및 Th2 특이 cytokines중 IFN- γ 와 IL-4가 상호 반대적으로 억제 작용을 하는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

마우스에 폐흡충을 감염시키면 IgE 항체의 생산 및 말초혈액내 호산구의 수가 증가되며⁷⁾ 이때 Th2 cytokine인 IL-4가 감염 초기인 3일부터 급격히 증가되는 Th2 cytokine 반응이 일어남이 보고되었다⁸⁾. 그러나 폐흡충 감염 마우스에 있어 IFN- γ 가 Th2 cytokine 반응에 미치는 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구자는 IFN- γ 가 Th2 cytokine 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 폐흡충 감염 마우스에 rIFN- γ 를 주입한 후 혈청내 IgE의 생산 및 말초혈액내 호산구수의 변동을 관찰하는 한편, 충체의 자극을 받아 이미 활성화된 Th2 세포에 대한 rIFN- γ 의 영향을 알아보기 위해 rIFN- γ 의 주입시기를 감염 후 5일 및 8일째로 달리하여 이 실험을 수행하였다.

대상 및 방법

1. 폐흡충 피낭유충의 감염

폐흡충 감염 만연지역인 전남 완도군 보길도에서 폐흡충의 제2 중간숙주인 참가재(*Cambaroides similis*)를 수

집하여 이를 마쇄한 후 인공소화액(pepsin 0.2g, 농염산 0.7ml, 증류수 100ml)으로 처리하여 입체현미경하에서 피낭유충을 얻었다. 5~6주된 음성 BALB/c 마우스를 실험에 사용하였으며 마우스당 20개씩의 피낭유충을 도관용을 이용하여 위에 직접 주입하여 감염시켰다.

2. rIFN- γ 의 주사

폐흡충 감염 마우스를 rIFN- γ 주입 시기별로 3 개군으로 나누었다. 감염 당일 부터 감염 후 14일 까지 주사한 군을 I 군으로, 감염 후 5일부터 14일까지 주사한 군을 II 군으로 그리고 감염 후 8일부터 14일까지 주사한 군을 III 군으로 삼았다. 폐흡충 감염 마우스에 rIFN- γ (specific activity 1.1×10^7 units/mg)(Genzyme, Maine)의 주사는 마우스 1마리당 2×10^3 unit씩 복강내 매일 주사하였으며 감염후 4주째에 마우스를 마취시켜 오른쪽 안와에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 -70 $^{\circ}$ C에 보관하여 혈청내 IgE 항체 측정에 사용하였다. 이때 마우스에 폐흡충만을 감염시킨 마우스를 대조군으로 삼았다.

3. 혈청내 중 IgE 항체의 측정

중 IgE 항체의 측정은 Hirano등¹¹⁾의 방법을 약간 수정하여 avidin-biotin을 이용한 ELISA로 측정하였다. 1 μ g/ml로 희석시킨 purified anti-mouse IgE monoclonal antibody(rat IgG₁, Serotec, England)를 96 well microplate(Costar, Maine)의 각 홈에 100 μ l씩 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 하룻 밤 방치하였다. 5% bovine serum albumin(Sigma, St. Louis, USA)을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 후 biotin-conjugated anti-mouse IgE polyclonal antibody(Rabbit IgG, Bio design, Maine, USA)를 각 홈에 첨가한후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 1 μ g/ml로 희석시킨 peroxidase-conjugated streptavidin(Jackson Immuno Research, Pennsylvania)을 각 홈에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 Phosphate-citrate buffer에 orthophenylene diamine과 H₂O₂를 넣어 만든 기질액을 넣고 실온에 20분간 방치한 후 2M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 정지시키고 파장 490nm에서 ELISA 광량계(Dynatech, Virginia)로 흡광도를 측정하였다. 이때 모든 과정은 PBS Tween-20으로 4회 세척하였다. 시험혈청내의 IgE 항체의 정량은 Mouse IgE, κ (Pharminggen, California)를 0.36, 1.11, 3.33, 10ng/ml 농도로 넣어 각 농도에

따른 O.D. 값으로 표준곡선을 그려($Y=0.05x+0.07$, $r=0.99$, $p<0.01$) 시험혈청내의 IgE 양을 측정하였다.

4. 혈액내 호산구수의 계수

혈액은 마우스의 안와 후부의 정맥총에서 채취하였으며 WBC 피펫에 혈액 및 Phloxine 희석액(propylene glycol 50ml, 1% phloxine 10ml, 10% sodium carbonate 1ml, D.W 40ml)을 넣어 잘 섞은 후 호산구수를 haemocytometer로 계수하였다.

5. 통계 처리

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

결 과

1. rIFN- γ 를 저지한 폐흡증 감염 마우스의 혈청내 총 IgE의 양

폐흡증 감염 마우스에 rIFN- γ 를 주입하였을 때 혈청내 IgE 항체의 양은 감염 당일로부터 14일까지 주사한 I군과 감염후 5일부터 14일까지 주사한 II군에서 각각 $8.5 \pm 3.29 \mu\text{g/ml}$ 와 $7.3 \pm 3.65 \mu\text{g/ml}$ 로 측정되어 감염 대조군의 $13.3 \pm 4.56 \mu\text{g/ml}$ 에 비해 감소되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 1). 그러나 감염후 8일부터 14일까지 주사한 III군은 $12.3 \pm 4.78 \mu\text{g/ml}$ 로 측정되어 rIFN- γ 를 주입하지 않은 감염 대조군의 것과 비슷하였다. 이때 비감염군의 혈청내 IgE 항체의 양은 $1 \mu\text{g/}$

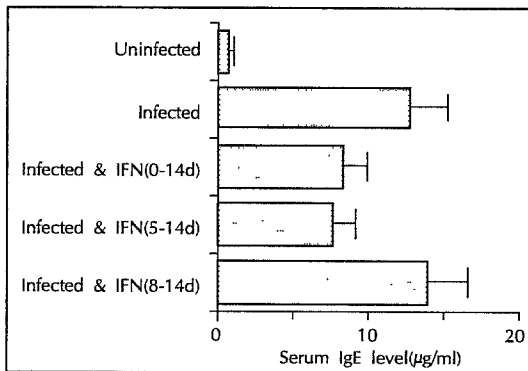


Fig. 1. Effect of rIFN- γ on total serum IgE level in BALB/c mice infected with *P. westermani*. Total serum IgE level was determined by ELISA using polyclonal rabbit anti-mouse IgE. Data are expressed as mean \pm s.d. from five mice per group.

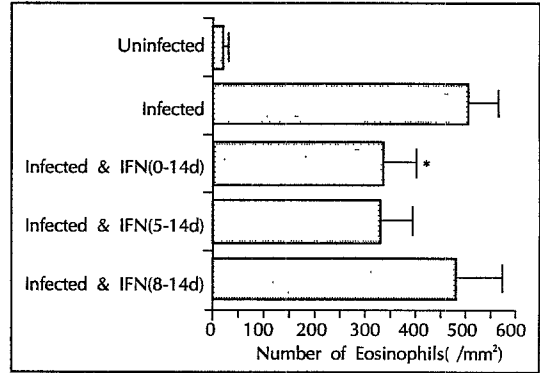


Fig. 2. Effect of rIFN- γ on the number of peripheral blood eosinophils in BALB/c mice infected with *P. westermani*. Data are expressed as mean \pm s.d. from five mice per group.

* $p<0.05$ significant difference from infected group with no treatment with rIFN- γ .

ml 이하로 측정되었다.

2. rIFN- γ 를 저지한 폐흡증 감염 마우스의 말초혈액내 호산구수

감염 마우스에 rIFN- γ 를 주입하였을 때 말초혈액내 호산구수는 감염 당일로부터 14일까지 주사한 I군과 감염 후 8일부터 14일까지 주사한 II군은 각각 339 ± 25.8 개/ mm^3 및 333 ± 61.8 개/ mm^3 로 측정되어 감염 대조군의 506 ± 31.7 개/ mm^3 에 비해 감소되었으며 특히 I군에서는 유의한 수준으로 감소되었다(Fig. 2, $p<0.05$). 그러나 rIFN- γ 를 감염 후 8일부터 14일까지 주사한 III군은 478 ± 37.4 개/ mm^3 로 측정되어 rIFN- γ 를 주입하지 않은 감염 대조군의 것과 비슷한 수준을 보였다. 이때 비감염군의 말초혈액내 호산구수는 평균 100개/ mm^3 이하로 측정되었다.

고 안

본 실험에서는 폐흡증 감염 마우스에 rIFN- γ 를 주사한 후 혈청내 IgE 및 말초혈액내 호산구수의 변동을 조사하여 rIFN- γ 가 폐흡증 감염시 Th2 cytokine 반응에 미치는 영향을 알아보았다. 폐흡증 감염 마우스에 rIFN- γ 를 감염 당일로부터 주사하였을 때 혈청내 IgE 및 말초혈액내 호산구수가 감염 대조군에 비해 감소되었으며 특히 말초혈액내 호산구수는 통계적으로 유의하게 감소되었다. 그러나 이러한 결과는 장내선충류인 *N. brasiliensis* 감염 마

우스에 rIFN- γ 를 주입하였을 때 IgE 항체 및 호산구의 생산이 비감염군의 수준으로 크게 억제되었다는 보고¹²와는 달리 이 실험에서는 IgE 항체 및 말초혈액 내 호산구 수가 비감염군의 수준으로 완전히 억제되지는 않았다. 이와 같은 차이는 이 실험에서 마우스에 주입한 rIFN- γ 의 양이 Th2 cytokine의 생산을 완전히 억제시킬 수 있는 충분한 양이 되지 않았거나 IFN- γ 를 주입한 후 2주 후에 IgE 항체가 및 호산구수를 측정하여 rIFN- γ 의 지속적인 생체내 효과가 떨어져 나타난 결과가 아닌가 생각되나 이에 대해서는 정확히 알 수 없어 다량의 rIFN- γ 를 주사한 후 IgE 항체 및 호산구의 생산을 측정하는 연구가 필요하다고 생각된다. 그러나 이 실험에서 감염 8일 이후에 rIFN- γ 를 주입한 군들의 혈청내 IgE 및 말초혈액내 호산구수는 감염 당일 당일부터 주사한 군에 비해 그 억제 효과가 떨어져 감염 대조군의 것과 비슷하였다. 이러한 결과는 *N. brasiliensis* 감염 마우스에 있어 감염 6일 이후에 IL-12를 주사하였을 때에는 혈청내 IgE, 말초혈액내 호산구수 및 장점막의 비만세포수가 IL-12를 주사하지 않은 감염 대조군과 비슷한 수준을 보였다는 보고¹³와 유사하였다. 이러한 결과로 보아 이 실험에서 감염 8일 이후에 주입한 rIFN- γ 로는 기생충체의 자극으로 인해 이미 활성화된 Th2 세포에서 분비되고 있는 cytokines의 생산을 억제시킬 수 있는 능력이 떨어짐을 시사하고 있다. 그러나 이 실험에서는 IFN- γ 의 주사시기에 따른 Th2 cytokine의 생산량을 동시에 측정하지 않아 이에 대한 정확한 것은 알 수 없었다.

윤충 감염시 일어나는 Th2 cytokine 반응을 조절하는 Th2 특이 cytokine중 IL-4의 생산은 감염 기생충의 종류 및 숙주의 저항성에 따라 다르게 나타난다. 즉 혈액 내 기생하는 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*) 감염시 IL-4의 생산은 감염 6주 이후에 증가되어 8주에 최고치에 이르렀으나¹⁴ 폐흡충 감염 마우스에서는 감염 1주 이내에 IL-4의 생산이 가장 증가되어 있었다¹⁰. 따라서 이 실험에서도 rIFN- γ 를 처치한 감염군중 감염 1주 이내에 주사한 I 군 및 II 군이 감염 1주 이후에 주사한 III 군보다 혈청내 IgE 및 말초혈액내 호산구수가 감소되었는데 이러한 원인은 아마도 외부에서 주입한 rIFN- γ 가 폐흡충 감염 초기에 생산되는 Th2 특이 cytokine의 생산을 감소시켜 나타난 결과로 생각된다.

윤충 감염시 증가되는 IgE 항체 및 말초혈액내 호산구는 기생충체를 살멸시키는 작용을 하며^{15,16} 또한 이러

한 면역반응들을 조절하는 것으로 알려진 Th2 cytokine이 감염 숙주의 방어면역에 중요한 역할을 한다. 즉 장내 선충류인 *Trichuris muris*를 저항력이 강한 마우스에 감염시킨 후 anti-IL-4를 처치하면 방어면역이 감소되어 충체가 성충까지 발육되며, 이 기생충을 저항력이 약한 마우스에 감염시킨 후 IL-4를 주입하면 충체의 배출을 증가됨을 관찰하여 IL-4의 생산의 저하가 숙주의 방어면역을 감소시킬 수 있음을 시사하였다¹⁷. 한편 이 실험에서 rIFN- γ 를 주입한 I 군과 II 군에서 7마리중 2마리가 죽은 것이(미발표) rIFN- γ 의 주입으로 IL-4의 생산이 감소되어 감염 숙주의 방어면역이 떨어져 생긴 결과인지는 알 수 없어 다음 실험에서는 폐흡충 감염 마우스에 있어 증가된 IL-4가 감염 숙주의 방어면역에 미치는 역할을 알아보는 연구가 필요하다고 생각된다.

결론적으로 폐흡충 감염 마우스에 rIFN- γ 를 감염 당일부터 주사하면 생체내에서 일어나는 Th2 cytokine 반응이 억제됨을 알 수 있었으나, 일단 감염 충체의 자극을 받아 이미 Th2 cytokine의 생산이 일어난 후에는 rIFN- γ 의 억제효과가 떨어지는 것으로 생각된다.

결 론

이 연구는 마우스에 폐흡충(*Paragonimus westermani*)을 감염시킨 후 IFN- γ 를 감염시기별로 주입한 후 IgE와 호산구수의 변동을 조사하여 IFN- γ 가 Th2 cytokine 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 수행되었다.

1) 폐흡충 감염 마우스에 IFN- γ 를 주입하였을 때 혈청내 IgE의 양은 감염 당일부터 14일까지 주사한 I 군과 감염후 5일부터 14일까지 주사한 II 군에서 각각 평균 8.5 μ g/ml, II 군은 7.3 μ g/ml로 측정되어 감염 대조군의 13.3 μ g/ml에 비해 감소되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 그러나 감염후 8일부터 14일까지 주사한 III 군은 평균 12.3 μ g/ml로 측정되어 rIFN- γ 를 주입하지 않은 감염 대조군의 것과 비슷하였다.

2) 폐흡충 감염 마우스에 IFN- γ 를 주입하였을 때 말초혈액내 호산구수는 감염 당일부터 14일까지 주사한 I 군과 감염 후 8일부터 14일까지 주사한 II 군은 각각 평균 339개/mm³ 및 333개/mm³ 측정되어 감염 대조군의 506개/mm³에 비해 감소되었으며 특히 I 군에서는 유의한 수준(p<0.05)으로 감소되었다. 그러나 rIFN- γ 를

감염 후 8일부터 14일까지 주사한 III군은 평균 478개/mm³로 측정되어 rIFN- γ 를 주입하지 않은 감염 대조군의 것과 비슷한 수준을 보였다.

결론적으로 폐흡충 감염 마우스에 rIFN- γ 를 감염 당일부터 주사하면 생체내에서 일어나는 Th2 cytokine 반응이 억제됨을 알 수 있었다.

References

- 1) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL : *Two types of murine helper T cell clone 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* *J Immunol* 1986 ; 136 : 2348-2357
- 2) Del-prete GF, Catli MD, Mastrotauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, et al : *Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vivo human T cells with stable and opposite (Type 1 T helper or Type 2 helper) profile of cytokine production.* *J Clin Invest* 1991 ; 88 : 346-350
- 3) Bottomly K : *A functional dichotomy in CD4⁺ T lymphocytes.* *Immunol Today* 1988 ; 9 : 268-273
- 4) Heinzl FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM : *Production of interferon γ , interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 7011-7015
- 5) Belosevic M, Finbloom DS, Van der meide PH, Slayter MV, Nacy CA : *Administration of monoclonal anti-IFN- γ antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with Leishmania major.* *J Immunol* 1989 ; 143 : 266-274
- 6) Else KJ, Grecnis RK : *Helper T-cell subsets in mouse Trichuriasis.* *Parasitol Today* 1991 ; 7 : 313-316
- 7) Gajewski TF, Fitch FW : *Anti-proliferative effect of IFN- γ in murine regulation. 1. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones.* *J Immunol* 1988 ; 140 : 4245-4252
- 8) King CL, Low CC, Nutman TB : *IgE production in human helminth infection : Reciprocal interrelationship between IL-4 and IFN- γ .* *J Immunol* 1993 ; 150 : 1873-1880
- 9) 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
- 10) Shin MH, 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) Hirano T, Yamakawa N, Miyajaki H, Maeda K, Takai S, Ueda A, et al : *An improved method for the detection of IgE antibody of defined specificity by ELISA using rat monoclonal anti-rat IgE antibody.* *J Immunol Methods* 1989 ; 119 : 145-150
- 12) Urban JF, Madden KB, Cheever AW, Trotta PP, Katona IM, Finkelman FD : *IFN inhibits inflammatory responses and protective immunity in mice infected with the nematode parasite, Nippostrongylus brasiliensis.* *J Immunol* 1993 ; 151 : 7086-7094
- 13) Finkelman FD, Madden KB, Cheever AW, Katona IM, Morris SC, Gately MK, et al : *Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites.* *J Exp Med* 1994 ; 179 : 1563-1572
- 14) Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, et al : *Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni.* *J Immunol* 1991 ; 146 : 1322-1327
- 15) 민득영 · 안명희 · 김경민 · 임미혜 · 박순용 : 폐흡충(*Paragonimus westermani*) 피낭유충에 대한 대식세포의 세포독성에 있어서 항체 및 보체가 미치는 영향. *기생충학잡지* 1990 ; 28 : 91-100
- 16) Gounni AS, Lamkhioed B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, et al : *High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in against parasites.* *Nature* 1994 ; 367 : 183-186
- 17) Else KJ, Finkelman FD, Maliszewski CR, Grecnis RK : *Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection.* *J Exp Med* 1994 ; 179 : 347-351