

LP-BM5 Leukemia Retrovirus 감염으로 유발된 Murine AIDS에서 Dehydroepiandrosterone Sulfate의 Th1/Th2 Cytokines의 발현 조절 및 산화적 스트레스 억제 효과 연구

이 정 민

남부대학교 식품영양학과

Dehydroepiandrosterone Sulfate Inhibited Immune Dysfunction Induced by LP-BM5 Leukemia Retrovirus Infection through Regulating Th1/Th2 Type Cytokine mRNA Expression and Oxidative Stress in Murine AIDS Model

Jeongmin Lee

Dept. of Food and Nutrition, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

Abstract

LP-BM5 murine leukemia retrovirus induces the excessive oxidative stress and immune dysfunction leading to B cell leukemia and murine AIDS with cytokine dysfunction. In the present study, the immune restoratory effect of antioxidant hormone dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) was investigated in the primary splenocytes from LP-BM5 retrovirus-infected C57BL/6 mice. DHEAS significantly increased T and B cell response to mitogen and normalized the unbalanced production of Th1/Th2 type cytokines. In particular, both protein and mRNA expression of IL-4, IL-6, and TNF- α were down-regulated by DHEAS treatment, whereas IL-2 and IFN- γ level were increased. This result suggests that DHEAS directly or indirectly regulates the gene expression of Th1/Th2 type cytokines in transcription level. In addition, DHEAS treatment decreased the hepatic lipid peroxidation and preserved vitamin E level in liver cells. These results suggested that DHEAS could effectively prevent immune dysfunction by regulating cytokine secretion and preventing the oxidative stress in murine AIDS.

Key words: DHEAS, T&B cell mitogenesis, murine AIDS, cytokines, oxidative stress

서 론

AIDS(acquired immune deficiency syndrome)는 HIV(human immunodeficiency virus)의 감염에 의해 총체적 면역 결핍, 기회감염과 혈액암인 림프종 등을 유발시켜 죽음에 이르게 되는 질병으로 알려져 있으며 HIV의 감염경로는 일반적으로 retrovirus의 gp120 당단백질과 CD4⁺ 표면항원의 결합을 통해 면역세포로 침투하여 감염을 일으키는 것으로 여겨지고 있다(1). 따라서 감염된 CD4⁺ 면역세포에서의 HIV 복제를 억제하기 위한 약물치료는 주로 역전사효소의 활성을 억제하는 것에 주된 목적을 두고 있다. 최근에 이르러 HIV 감염 및 복제, 그리고 AIDS로의 진행과정에 있어서 영양물질의 역할과 기작에 대한 연구가 여러 차례 진행되어 긍정적인 결과가 발표된 적이 있어 약물치료와 더불어 AIDS의 예방과 치료에 보조적인 역할이 강조되고 있다. 예를 들어 Lee 등(2)의 보고에 의하면 AIDS 동물모델에서 비

타민과 미네랄의 부족은 과도한 자유기(free radicals)의 생성을 유도하여 조기사망을 일으킨다고 하였다. 뿐만 아니라 AIDS 환자에게 나타나는 장내 영양물질 흡수 장애로 인한 영양부족 현상은 일반인과 달리 AIDS 환자들에 대한 기초 영양 요구성의 기준을 보다 높게 하여야 한다는 주장을 뒷받침하고 있는 것이다.

HIV의 감염과 AIDS로의 진행과정은 세포내에서 많은 변화를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 특히 nuclear factor- κ B(NF- κ B) 등의 전사인자 활성화로 인한 proinflammatory cytokine들의 발현증가를 들 수 있다(3). 이러한 cytokines의 변화는 궁극적으로 T helper 1(Th1) type cytokines과 T helper 2(Th2) type cytokines의 균형을 파괴시켜 IL-2와 interferon- γ (INF- γ) 같은 Th1 type cytokines은 감소시키고 IL-4, IL-6, 그리고 TNF- α 같은 Th2 type cytokines을 증가시키게 된다. 이렇게 형성된 cytokines의 불균형은 T와 B 임파구의 성장 및 활성을 감소시켜 질병에 대한 면역반응

을 억제시키는 결과를 초래하게 된다(4). 또한 과도한 산화적 스트레스가 AIDS로의 진행과정에서 형성되어 면역세포의 활성을 억제하고 자발적 세포고사(apoptosis)를 유발시킬 뿐만 아니라 되먹임 작용에 의해 AIDS로의 진전을 더욱 가속화시키게 된다(5). 따라서 항산화물질의 투여에 의한 산화적 스트레스의 제거는 AIDS로의 진전 및 증상을 다소 완화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

Dehydroepiandrosterone(DHEA)는 부신피질에서 주로 합성되는 androsterone의 유도체이며 황결합체인 DHEAS는 저장형으로 존재한다. 생체 내 DHEA의 합성은 모든 포유동물에서 노화의 진행과 더불어 감소하게 되며 T 임파구의 기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(6). 최근의 연구에 따르면 노화로 인해 산화적 스트레스가 과도하게 형성된 쥐에 DHEA의 투여는 다양한 림프조직으로부터 분리한 T 임파구의 기능을 정상화시킨 것으로 보고된 바 있다(7). 이러한 노화 억제 효과는 DHEA(S)의 강한 항산화적 역할에 기인하여 산화적 스트레스를 제거한 때문인 것으로 보고되었다. 또 다른 *in vitro* 연구에서는 DHEA(S)가 IL-2의 분비를 활성화시킨 반면 산화적 스트레스와 염증 관련된 IL-6의 생성은 억제하는 것으로 나타났으며(6) 또한 쥐의 T 임파구 활성화를 통해 *in vivo* IL-2의 생성을 자극하였는데 이것은 항산화 기능과 관련이 있는 것으로 보고되었다(8).

LP-BM5 leukemia retrovirus에 의해 유발되는 쥐 AIDS는 사람의 HIV 감염 및 AIDS로의 진행과정과 매우 유사한 증상 및 면역반응을 유발하는 것으로 알려져 있다(9). 이 AIDS 동물모델은 사람과는 달리 잠복기가 없이 매우 안정적인 AIDS 발현 빈도를 나타내는 장점을 지니고 있고 약 12주가 지나면 AIDS 증상을 나타내게 되는데 주로 비장비대증, 림프비대증, 그리고 항체과다생성을 유발시키고 더 진전하여 T와 B 임파구의 기능을 억제하여 성장을 저해할 뿐만 아니라 Th1/Th2 type cytokines의 불균형을 초래하게 된다. 따라서 본 연구에서는 쥐 AIDS 모델을 이용하여 AIDS 진행과정에서의 T와 B 임파구 및 Th1/Th2 type cytokines의 mRNA 발현에 미치는 DHEAS의 역할을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물군 분류, DHEAS 투여, 및 LP-BM5 바이러스 감염

6주령된 C57BL/6 쥐를 샘타코(경기도 오산시, Korea)로부터 구입하여 전남의과대학 동물사육실에서 스테인레스망이 있는 투명한 플라스틱 사육상자(3마리/cage)에 넣어 적응시켰다. 2주가 지난 뒤 C57BL/6 쥐를 정상대조군, DHEAS(Sigma, St. Louis, MO, USA) 투여군, LP-BM5 감염군, 그리고 LP-BM5/DHEAS 동시투여군으로 구분하여(6마리/실험군) 실험하였다. 실험식은 AIN93M synthetic

mouse diet(Dyets Inc. Bethlehem, PA, USA)를 사용하였고 DHEAS는 식수(drinking water)에 녹여 0.01% DHEAS 수용액으로 만들어 임의로 식수를 취하도록 한 후 LP-BM5 retrovirus 감염 직후 12주간 투여하였다. 사육실 온도는 20~22°C, 상대습도를 60~80%, 그리고 12시간 명암주기를 유지하도록 하였다. LP-BM5 retrovirus는 4.5 log₁₀ plaque forming unit(PFU)×10⁻³/L로 적정하여 쥐의 복강내에 0.1 mL을 접종하였다. 12주후 C57BL/6 쥐를 에테르로 마취시킨 후 간을 포함한 각 기관과 림프절을 취하여 -80°C에 냉동 보관하고 비장은 채취 즉시 비장세포를 제조하여 실험에 사용하였다.

T와 B 임파구의 mitogenesis

C57BL/6 쥐로부터 비장을 절개하여 핀셋으로 마쇄한 후 2 mM L-glutamine(Sigma, USA), 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin(BioWhittaker, USA)를 첨가한 DMEM으로 세척한 후 lysis buffer(0.16 mol/L ammonia chloride Tris buffer, pH7.2)로 적혈구를 용혈시키고 비장세포 부유액을 만들어 1×10⁵ cells/0.1 mL씩 96 well plate(Falcon 3072, Lincoln Park, NJ)에 분주하였다. T 임파구 활성화를 위해 10 µg/mL concanavalin A(ConA)를 첨가하여 5% CO₂ 배양기에서 20시간 배양하고 B 임파구 활성화를 위해 10 µg/mL lipopolysaccharide(LPS)를 넣고 5% CO₂ 배양기에서 44시간 배양한 후 ³H-thymidine 0.5 µCi/well을 첨가하여 DNA incorporation을 시켰다. 4시간 배양 후 cell sample harvester(Cambridge Technology, MA)로 세포를 모으고 5 mL의 scintillation cocktail을 혼합하여 liquid scintillation counter(Tri-Carb, Packard, CA)에서 수치를 측정하여 cpm(count per minute)으로 나타내었다.

Th1/Th2 type cytokines의 분비량 측정

쥐의 비장으로부터 분리된 비장세포 1×10⁵ cells/0.1 mL를 96 well plate에 분주하고 IL-2, IL-4, INF-γ의 생성을 위해 10 µg/0.1 mL의 ConA 100 µL를 각 well에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 IL-2는 24시간 후, IL-4는 48시간 후, 그리고 INF-γ는 72시간 후 상층액을 수거하여 실험 때까지 -80°C에 동결하여 보관하였다가 해동시킨 즉시 ELISA immunoassay 방법으로 정량하였다. ELISA kit는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. IL-6와 TNF-α의 측정에는 10 µg/0.1 mL의 LPS 100 µL를 각 well에 첨가하여 37°C, 5%CO₂에서 배양하여 24시간 이후에 상층액을 조심스럽게 분리하여 ELISA immunoassay 방법으로 정량하였다.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Th1/Th2 type cytokines을 측정하기 위해 처리한 비장세

Table 1. Primer sequences used for PCR amplification of cytokines

Cytokine and primer	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	PCR product (bp)
IL-2		
Sense	ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TC	502
Antisense	GGC TTG TTG AGA TGA TGC TTT GAC A	
IFN- γ		
Sense	GCA TCT TGG CTT TGC AGC TC	445
Antisense	CGA CTC CTT TTC CGC TTC CT	
IL-4		
Sense	ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT	339
Antisense	GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC	
IL-10		
Sense	ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA	237
Antisense	CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A	
TNF- α		
Sense	AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CCA A	446
Antisense	ACA CCC ATT CCC TTC ACA GAG CAA T	
GAPDH		
Sense	CGG ATT TGG CCG TAT TGG GC	518
Antisense	TGA TGG CAT GCA CTG TGG TC	

포를 수집하여 RNeasy extraction kit(Qiagen, Germany)를 구입하여 사용하였고 제조사의 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. cDNA의 합성을 위해 5 μ g의 total RNA에 200 unit의 MLV-RT 역전사효소와 500 ng oligo-dT primer를 첨가하여 42°C에서 60분간 수행하였다. PCR 반응을 위해 사용한 primer pair sequence는 Table 1에서 표기하였고 internal control로서 GAPDH를 이용하였다. PCR을 위한 혼합액은 2 μ L의 cDNA, 1.25 unit의 Taq DNA polymerase, 0.2 mM dNTP, 10 \times reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primers를 섞어 95°C에서 5분간 hot start 한 후 94°C에서 30초간, 55°C에서 1분, 72°C에서 30초간 35 cycling으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 polishing step을 거쳐 PCR 결과를 얻었다. 5 μ L PCR 결과를 0.8% 아가로스겔에서 전기영동하여 EtBr로 20분간 염색한 후 UV에서 밴드를 확인하였다.

간조직의 지질과산화 측정

간조직의 지질과산화는 K-Assay LPO-CC Assay kit (Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA)에 의해 측정하였다. 이 방법은 기존의 화학적 측정법보다 민감한 것으로 알려져 있다(측정범위: 2~300 nmol/mL)(10). 간단히 약 0.2 g의 간조직을 3 mL of CHCl₃/methanol(2:1, v/v)을 넣고 균질 마쇄시켰다. 0.6 mL의 0.9% NaCl을 첨가한 후 3000 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 CHCl₃을 포함하는 하층액을 모은 다음 N₂ gas로 증발시켰다. 지질잔류물을 용해시키기 위해 100 μ L의 isopropanol을 첨가한 후 20 μ L를 취하여 LPO kit로 lipid peroxides의 양을 675 nm에서 측정하였다. 지질과산화값(LPO)은 정상대조군에 대한 백분율(%)로 전환하여 표기하였다.

간조직의 vitamin E 양의 측정

0.1 g의 간조직을 1 mL의 DW에 넣고 균질마쇄하여 bu-

tylated hydroxytoluene을 넣고 pentane, ethanol, sodium dodecyl sulfate를 이용하여 vitamin E를 추출한 후 20°C에서 N₂ gas로 증발시키고 0.5 mL methanol에 다시 용해시켰다. C₁₈ column(NovaPak, Bedford, MA)을 이용하여 HPLC 상에서 vitamin E의 농도를 측정하였다(11). 이동상(mobile phase)은 methanol:sodium acetate의 비율을 98:2로 하였고, 유속(flow rate)은 1.5 mL/min으로 하였으며 vitamin E의 분출시간은 6.5분이었고 fluorescence detector(Millipore)는 290 nm excitation과 320 nm emission 파장으로 하였다.

통계처리

두 그룹간의 통계적 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였고 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였다 ($p < 0.05$). 모든 결과는 세 번 반복하여 얻어진 평균 \pm 표준편차로 표기하였다.

결과 및 고찰

DHEAS 섭취량 및 체중변화량

정상대조군의 체중은 12주간에 걸쳐 자연적 증가를 보였다. DHEAS 투여군의 경우 정상대조군에 비교해서 유의적인 체중의 변화는 없었고 적출한 장기의 무게도 큰 차이를 나타내지는 않았다(Table 2). 하지만 LP-BM5 retrovirus 감염군의 경우 정상대조군에 비해 체중이 유의성 있게 감소하였고 비장과 림프절의 무게는 유의성 있게 증가하였다. 이것은 LP-BM5 감염 후 쥐 AIDS로의 진행이 정상적으로 이루어졌음을 의미하는 것이다. LP-BM5/DHEAS 동시투여군의 경우 정상대조군에 비해 체중의 변화에서 유의적 차이가 나타나지 않았고 비장과 림프절의 무게도 LP-BM5 감염군에 비해 크게 감소한 것을 확인하였다. 0.01% DHEAS 투여군의 물의 섭취량은 정상대조군에 비해 유의적 차이가 없는

Table 2. Body and tissue weight in C57BL/6 mice with or without LP-BM5 infection

Treatment		Body weight (g)	Spleen (g)	Lymph node (g)	Water consumption (mL/day/mouse)
LP-BM5	DHEAS				
-	-	22.4±2.14	0.052±0.023	0.008±0.002	5.45±0.38
-	+	23.1±0.97	0.057±0.017	0.009±0.004	5.14±0.74
+	-	18.9±1.14 ^a	0.242±0.031 ^a	0.072±0.021 ^a	5.89±0.82
+	+	22.1±1.35 ^b	0.089±0.022 ^{ab}	0.029±0.017 ^{ab}	5.36±0.77

^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at $p<0.05$.

^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at $p<0.05$.

것으로 확인되었다. Jiang 등(12)의 노화된 쥐의 면역체계에 관한 연구결과에 의하면 C57BL/6 쥐에 0.05% 이상의 DHEAS를 투여할 경우에도 독성이 나타나지 않았는데 이 결과는 본 연구에서 사용된 0.01% DHEAS의 투여로 인한 결과들이 DHEAS 독성에 의한 결과가 아님을 확인시켜 주고 있다. 비록 LP-BM5 retrovirus 감염군에서 체중이 감소하였으나 다른 논문 결과에 비해 그 정도가 매우 작았던 원인은 실험을 수행한 기간과 관련이 있는 것으로 여겨지는데 Lee 등(2,4)의 쥐 AIDS 연구에 따르면 LP-BM5 retrovirus의 감염이 있을 경우 쥐의 체중은 감소하는 것으로 나타났으며 관련 논문의 경우 실험기간이 대체로 16~24주에 걸쳐 실험되었다. 따라서 본 연구에서 수행된 12주간의 실험은 면역체계파괴에는 적절하였으나 직접적인 체중감소를 유발시키기에는 다소 짧은 기간이라 여겨진다. 또한 DHEAS의 섭취량에 차이가 없는 것은 Jiang 등(12)의 보고와 일치하고 있다.

T&B mitogenesis

LP-BM5 retrovirus 감염에 따른 T와 B 림프구세포의 mitogenesis는 유의적으로 감소하였음을 방사선 동위원소인 [³H-thymidine]의 DNA incorporation을 통해 확인하였다(Fig. 1). 이것은 12주간의 실험기간 동안 쥐 AIDS로의

진전이 되었음을 나타내는 결과이다. DHEAS만을 투여한 쥐의 경우 T와 B 림프구의 mitogenesis가 유의적으로 증가하였으나 증가폭은 매우 낮은 것으로 나타났다. LP-BM5/DHEAS 동시투여군의 경우 T와 B 림프구의 mitogenesis는 감염대조군에 비해 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다($p<0.05$). 인체의 T와 B 림프구의 활성화는 항원제공세포(antigen presenting cell; APC)에 의해 활성화된 CD4⁺ T helper 세포에서 분비되는 cytokines에 의해 조절 받게 된다. LP-BM5 retrovirus는 B 림프구에 감염 시 B 림프구를 활성화시켜 일정기간 B 림프종 및 B 림프구와 관련된 Th2 type cytokines의 발현이 급증하게 되어 T 림프구 활성화에 필요한 Th1 type cytokines의 발현을 억제시키게 된다. 하지만 장기간에 걸쳐 쥐 AIDS가 진행되면 활성화된 B 림프구는 짧은 수명(life span)으로 인해 수적으로 감소하게 되고 mitogenesis 능력도 상실하게 된다(9). 쥐 AIDS 모델을 이용한 Lee 등(2)의 보고에서도 본 연구와 동일한 현상이 관찰되었다. 따라서 T와 B 림프구의 감소된 mitogenesis를 일정부분 회복시킨 DHEAS의 효과는 T helper 세포들의 cytokines 분비능력 및 쥐 AIDS 진행동안 발생된 산화적 스트레스 억제 조절능력과 관련이 있을 것으로 여겨짐에 따라 Th1/Th2 type cytokines 분비능력을 protein 및 mRNA 발현수준에서 측정하였으며 간조직에서의 산화적 스트레스 억제 효과에 대해 검토하였다.

Th1/Th2 protein 및 mRNA 발현

CD4⁺ T helper 세포는 크게 Th1 type과 Th2 type으로 구분되는데 Th1 세포에 의해 분비되는 IL-2와 IFN- γ 는 macrophage 및 T 림프구의 활성화에 관여하며 Th2 세포에 의해 분비되는 IL-4와 IL-10는 B 림프구를 활성화시킨다. 이러한 Th1/Th2 type cytokines의 발현은 IL-10과 IFN- γ 에 의해 상호보완적으로 조절하여 면역 균형을 유지하게 된다(13). LP-BM5 retrovirus의 감염으로 인한 쥐 AIDS에서는 면역조절 능력의 상실로 Th1 type cytokines은 감소하게 되고 Th2 type cytokines의 발현은 증가하게 되는 이전현상(shifting)이 일어나게 된다(13). 본 연구에서는 이전의 다른 보고와 마찬가지로 LP-BM5 retrovirus의 감염이 IL-2와 IFN- γ 의 발현을 억제시키고(Fig. 2) IL-4, IL-10 및 TNF- α 의 발현은 증가시킨 것으로 나타났다(Fig. 3). 반면, LP-BM5/DHEAS 동시투여군에서는 IL-2와 IFN- γ level이 감

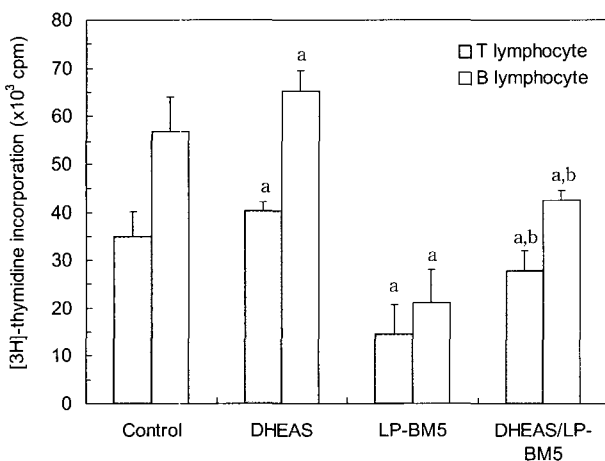


Fig. 1. Effect of DHEAS on T and B lymphocyte mitogenesis from primary splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection.

Data was mean±SD of triplicate. ^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at $p<0.05$. ^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at $p<0.05$.

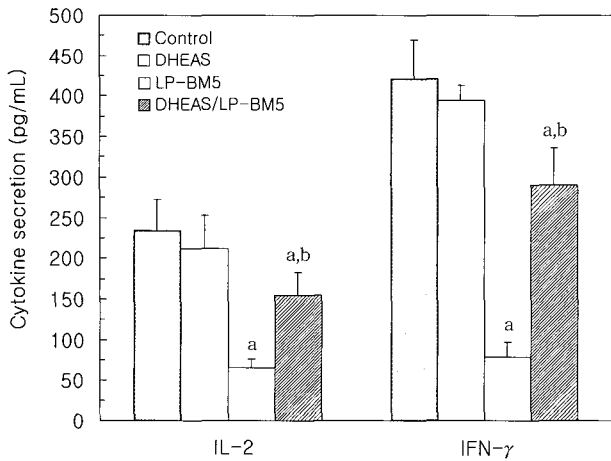


Fig. 2. Effect of DHEAS on Th1 type cytokine secretion from mitogen-stimulated splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection.

Data was mean ± SD of triplicate. ^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at p<0.05. ^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at p<0.05.

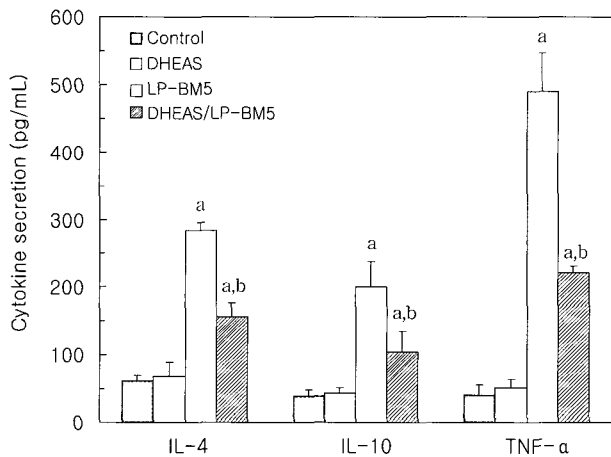


Fig. 3. Effect of DHEAS on Th2 type cytokine and TNF-α secretion from mitogen-stimulated splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection.

Data was mean ± SD of triplicate. ^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at p<0.05. ^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at p<0.05.

염대조군에 비해 유의적 증가를 보였고 IL-4, IL-10 및 TNF-α의 발현증가가 억제되었음을 알 수 있었다. IL-2는 중요한 T 림파구의 활성화촉진 인자로 작용한다. 즉 IL-2의 감소는 CD3⁺/CD4⁺ T 림파구의 수와 기능에 영향을 미쳤을 것으로 생각됨으로 쥐 AIDS에서 T 림파구의 활성화감소는 당연한 결과로 여겨진다. 또한 IL-4는 B 림파구의 활성을 촉진하는 중요 인자로 알려져 있다. LP-BM5 감염으로 인한 IL-4의 증가는 B 림파구의 항체생성능력과 항원인지능력에 영향을 미쳤을 것으로 여겨지며 결론적으로 장기적인 쥐 AIDS 진행에 따른 B 림파구의 숫자를 감소시켜 면역반응의 민감성을 떨어뜨린 것으로 사료된다. 또한 AIDS에서 IL-4

의 역할은 IL-4 gene knockout mouse를 통해 알 수 있는데 IL-4 유전자 결핍으로 인한 Th2 type cytokines의 발현 억제는 쥐 AIDS의 진행 및 면역결핍현상을 지연시킨 것으로 나타났다(14). 또 다른 연구에서도 anti-IL-4를 투여할 경우에도 쥐 AIDS의 진행이 지연되는 유사한 결과를 확인하였다(15). 따라서 DHEAS 투여에 따른 Th1/Th2 type cytokine 이전현상의 억제는 쥐 AIDS로의 진행을 억제하는데 도움이 될 것으로 여겨진다. IFN-γ의 감소는 직접적으로 Th2 type cytokine인 IL-4와 IL-10의 증가를 유도하였을 것으로 여겨지며 cytotoxic T 림파구 등의 활성을 억제하여 면역저항성을 약화시키게 된다. 그러므로, DHEAS의 투여로 인한 IFN-γ의 증가는 Th1/Th2 type cytokine의 면역균형을 유지하는 데 역할을 할 것으로 생각된다.

LP-BM5 retrovirus에 의해 감염된 Th1/Th2 세포는 모두 TNF-α를 분비하여 감염의 징후로 증가하게 되는데 이것은 특히 탐식세포에 작용하여 nuclear factor-κB(NF-κB) 및 activator protein-1(AP-1)을 활성화시켜 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2) 등의 여러 가지 면역 관련 유전자의 발현을 조절할 뿐만 아니라 LP-BM5 retrovirus의 복제를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(16). 따라서 DHEAS의 cytokines 조절효능이 전사(transcription) 또는 번역(translation) 수준에서 조절을 받는 지 확인하기 위해 RT-PCR을 수행한 결과 mRNA의 발현이 단백질인 cytokines의 발현형태와 유사하게 나타났다(Fig. 4). 이것은 DHEAS의 조절능력이 cytokines의 분비경로 또는 번역 단계보다는 mRNA 전사 단계에 작용하는 것으로 여겨진다. 비록 본 연구에서는 NF-κB의 활성을 측정하지 않았지만 여러 다른 보고들을 비교할 때 NF-κB 활성화

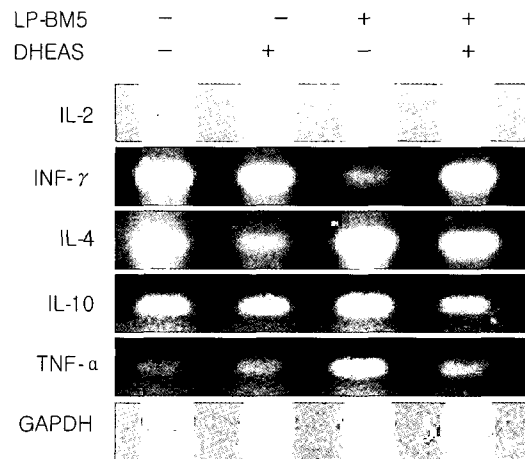


Fig. 4. Effect of DHEAS on mRNA expression of Th1, Th2 type cytokine, and TNF-α from mitogen-stimulated splenocytes prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection.

mRNAs were determined by RT-PCR and 1 μg of PCR product was applied for each lane on 0.8% agarose gel. DNA bands were visualized by EtBr staining after electrophoresis. GAPDH was used as an internal control.

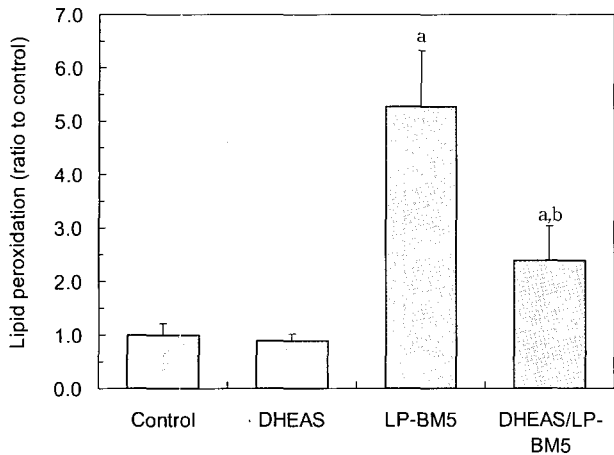


Fig. 5. Effect of DHEAS on lipid peroxidation in liver tissue prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection.

Data was mean \pm SD of triplicate. ^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at $p < 0.05$. ^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at $p < 0.05$.

경로를 통해 cytokines의 mRNA 발현에 관여하였을 것으로 생각되며(17) NF- κ B 활성화에 관여하는 상위 신호전달체계 가운데 I- κ B kinase(IKK) 또는 MAPK(mitogen activated protein kinase) 등의 신호전달체계를 통하는 지 여부를 확인하는 것은 차후 연구의 주제가 되리라 생각된다.

DHEAS의 지질과산화 억제 효과

활성화 산소로 인한 산화적 스트레스는 생리학적 및 병리학적인 변화를 유발시켜 세포의 사멸에 중요한 역할을 한다. 따라서 산화적 스트레스 억제를 위한 수많은 연구가 진행되고 있는데 특히 식품 또는 영양물질 중 항산화기능을 가진 것들이 주로 주목을 받고 있는 현실이다. 항산화 호르몬으로 알려진 DHEAS는 쥐를 이용한 실험에서 노화로 인한 활성산소의 증가로 파괴된 면역체계를 회복시키는데 효과가 있음이 보고된 바 있다(18). 본 연구에서는 retrovirus 감염과정에서 과도하게 형성되는 산화적 스트레스에 대한 DHEAS의 역할을 간조직의 지질과산화를 통해 확인하였다(Fig. 5). Lee 등(4)과 Liang 등(9)에 의해 보고된 바와 같이 LP-BM5 retrovirus의 감염은 간조직에서 지질과산화를 527.4% 증가시킨 것으로 나타났으며 DHEAS의 투여는 지질과산화를 239.6%로 감소시켰다. 이러한 결과는 조직내에서 vitamin E 함량과도 관련이 있는데 조직내에서 발생한 활성화 산소는 간조직의 vitamin E를 고갈시키는 역할을 한다. 따라서 vitamin E의 함량은 조직내 산화적 스트레스 정도의 간접적 지표가 된다. LP-BM5 retrovirus의 감염은 간조직에서의 vitamin E의 함량을 유의적으로 감소시켰고 DHEAS의 투여는 vitamin E의 함량을 거의 정상치의 수준으로 상승시켰다(Fig. 6). 이러한 결과는 DHEAS 투여가 조직내에서 발생한 산화적 스트레스를 억제하는데 도움을 주어 vitamin E의 함량을 증가시켰을 것으로 여겨진다. 한편, 활성화 산소는

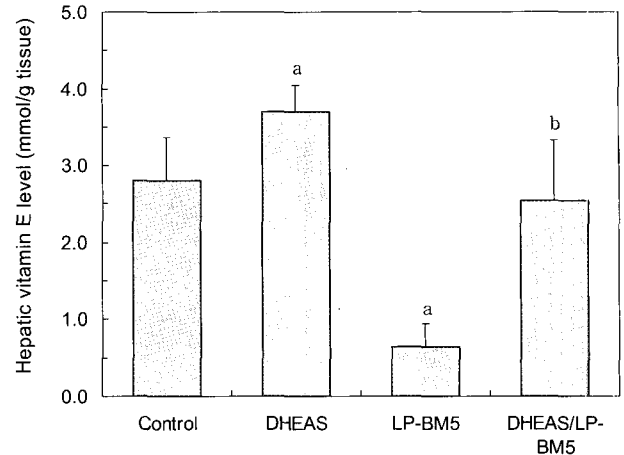


Fig. 6. Effect of DHEAS on vitamin E level in liver tissue prepared from C57BL/6 mice with or without LP-BM5 retrovirus infection.

Data was mean \pm SD of triplicate. ^aSignificantly different in comparison with uninfected control group at $p < 0.05$. ^bSignificantly different in comparison with LP-BM5 infected group at $p < 0.05$.

NF- κ B를 활성화시켜 LP-BM5 및 HIV의 복제를 증가시켜 AIDS로의 진행을 가속화시키는 것으로 보고된 바 있다(16). NF- κ B의 활성화는 cytokines의 불균형을 초래할 뿐 아니라 retrovirus의 CD4⁺ 면역세포내로의 투입을 용이하게 하는 표면 단백질의 발현에도 관여하고 있기 때문에 산화적 스트레스의 억제는 쥐 AIDS의 진행을 지연시키는 역할을 하게 된다. 최근 DHEAS가 치매의 완화에 도움을 주는 것으로 보고된 바 있는데(19) 뇌조직에서의 산화적 스트레스의 발생을 억제시키는 것과 NF- κ B의 활성을 억제시켜 염증관련 cytokines의 발현을 저해한 것으로 여겨진다. 이러한 보고는 본 연구의 결과들과 비교할 때 DHEAS가 세포내에서 작용하는 기작이 거의 유사한 형태를 나타내는 것으로 생각된다.

요 약

AIDS로의 진행과정은 단순히 몇몇 기작에 의한 것이 아니라 여러 경로를 거쳐 발생하며 그 진행속도도 개개인에 따라 다양하게 나타나고 있다. 본 연구에서는 쥐 AIDS 모델을 이용하여 항산화호르몬으로 알려진 DHEAS의 면역조절 효과를 확인하고자 하였다. DHEAS의 투여는 LP-BM5 retrovirus 감염으로 인한 T와 B 임파구의 mitogenesis를 증가시켰으며 Th1/Th2 type cytokines의 발현에도 영향을 미쳤는데 주로 전사수준에서 작용한 것으로 생각된다. 또한 retrovirus 감염으로 인한 간조직의 지질과산화 유발을 억제하여 조직 내의 항산화제인 vitamin E의 함량을 유지시킴으로 NF- κ B의 활성화를 통한 retrovirus의 복제를 억제시켜 Th1/Th2 type cytokines의 불균형적인 발현을 저해하였을 것으로 여겨진다. 따라서 쥐 AIDS 모델에 있어서 DHEAS의 면역조절 효과를 확인한 본 연구는 향후 HIV 감염 이후

AIDS로의 진행 과정 시 항산화제의 역할과 기작 규명에 대한 가능성을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

문 헌

1. Gasparis AP, Tassiopoulos AK. 2001. Nutritional support in the patient with HIV infection. *Nutrition* 17: 981-982.
2. Lee J, Park CS, Chung MY, Cho DH, Watson RR. 2005. Reduced micronutrient intake accentuates premature death caused by immune dysfunction in leukemia retrovirus-infected C57BL/6 mice. *Nutr Res* 25: 401-412.
3. Lee YW, Hirani AA, Kyprianou N, Toborek M. 2005. Human immunodeficiency virus-1 Tat protein up-regulates IL-6 and IL-8 expression in human breast cancer cells. *Inflamm Res* 54: 380-389.
4. Lee J, Jiang S, Liang B, Inserra P, Zhen Z, Solkoff D, Watson RR. 1998. Antioxidant supplementation in prevention and treatment of immune dysfunction and oxidation induced by murine AIDS in old mice. *Nutr Res* 18: 327-339.
5. Gulow K, Kaminski M, Darvas K, Suss D, Li-Weber M, Krammer PH. 2005. HIV-1 tansactivator of transcription substitutes for oxidative signaling in activation-induced T cell death. *J Immunol* 174: 5249-5260.
6. Khorram O, Vu L, Yen SS. 1997. Activation of immune function by dehydroepiandrosterone (DHEA) in age-advanced men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52: M1-7.
7. Sakakura Y, Nakagawa Y, Ohzeki T. 2006. Differential effect of DHEA on mitogen-induced proliferation of T and B lymphocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 99: 115-120.
8. Aragno M, Tamagno E, Boccuzzi G, Brignardello E, Chiarpotto E, Pizzini A, Danni O. 1993. Dehydroepiandrosterone pretreatment protects rats against the pro-oxidant and necrogenic effects of carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 46: 1689-1694.
9. Liang B, Jiang S, Zhang G, Inserra P, Lee J, Solkoff D, Watson RR. 2001. Anti-inflammatory effects of theophylline: modulation of immune functions during murine leukemia virus infection. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23: 307-317.
10. Ohishi N, Ohkawa H, Miike A, Tatano T, Yagi K. 1985. A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivatives. *Biochem Int* 10: 205-211.
11. Burton GW, Webb A, Ingold KU. 1985. A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids* 20: 29-39.
12. Jiang S, Lee J, Zhang Z, Inserra P, Solkoff D, Watson RR. 1998. DHEA synergizes with antioxidant supplements for immune restoration in old as well as retrovirus-infected mice. *J Nutr Biochem* 9: 362-369.
13. Parasad AS. 2000. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J Infect Dis* 182: s62-s68.
14. Kanagawa O, Vaupel BA, Gayma S, Koehler G, Kopf M. 1993. Resistance of mice deficient in IL-4 to retrovirus-induced immunodeficiency syndrome (MAIDS). *Science* 262: 240-242.
15. Wang Y, Ardestani SK, Liang B, Bechham C, Watson RR. 1994. Anti-IL-4 monoclonal antibody and interferon-gamma administration retards development of immune dysfunction and cytokine dysregulation during murine AIDS. *Immunol* 83: 384-389.
16. Solerte SB, Ferrari E, Cuzzoni G, Locatelli E, Giustina A, Zamboni M, Schifino N, Rondanelli M, Gazzaruso C, Fioravanti M. 2005. Decreased release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in Alzheimer's disease: recovering effect with insulin and DHEA sulfate. *Dement Geriatr Cogn Disord* 19: 1-10.
17. Sappinton RM, Calkins DJ. 2006. Pressure-induced regulation of IL-6 in retinal glial cells: involvement of the ubiquitin/proteasome pathway and NF- κ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 3860-3869.
18. Dillon JS. 2005. DHEA, DHEAS and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 377-385.
19. Victoriano AF, Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Barzaga NG, Okamoto T. 2006. Inhibition of HIV-1 replication in latently infected cells by a novel I- κ B kinase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 547-555.

(2006년 10월 12일 접수; 2006년 11월 28일 채택)