

마우스에서 2,4-Dinitrochlorobenzene을 이용한 아토피성 피부염 발현 관련 면역지표치 분석

이승혜¹ · 백성진² · 김형아³ · 허용¹

¹대구가톨릭대학교 자연대학 산업보건학과, ²주식회사 바이오톡스텍,
³가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실

2,4-Dinitrochlorobenzene-induced Atopic Dermatitis Like Immune Alteration in Mice

Seung Hye Lee¹, Seong Jin Baek², Hyoung Ah Kim³ and Yong Heo¹

¹Catholic University of Daegu, College of Natural Sciences, Dept. Occupational Health, Kyongsan si 712-702

²Biototech Co., Ltd., Cheongwon-gun, Chungbuk 363-883

³The Catholic University of Korea, College of Medicine, Dept. Preventive Medicine, Seoul 137-701 Korea

Received September 6, 2006; Accepted October 24, 2006

ABSTRACT. This study was undertaken to develop a reliable mice model demonstrating similar immunologic phenomena as human atopic dermatitis characterized with predominance of type-2 immune response. BALB/c mice and NC/Nga mice were sensitized twice with 100 μ l of 1% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) or vehicle (acetone : olive oil = 4 : 1 mixture) in a week and challenged twice with 100 μ l of 0.2% DNCB or the vehicle at the following week. Mice were sacrificed at 19 days following the second DNCB or vehicle challenge for NC/Nga mice and at 28 days following the second DNCB or vehicle challenge for BALB/c mice. Upregulation of plasma IgE, a hallmark of atopic dermatitis occurrence, was evident in the plasma obtained 4 day after the second DNCB challenge from BALB/c mice (approximately 4-fold) and NC/Nga mice (approximately 6-fold) treated with DNCB in comparison with that of the vehicle treated-control mice, and remain higher 3~4 week after the second challenge. Ratio of plasma IgG1 versus IgG2a concentration was significantly higher in the mice treated with DNCB than the control mice, which also implies the skewed type-2 reactivity in vivo. Ratio of interleukin-4 versus interferon gamma produced in the splenic T cell culture supernatants was approximately 3-fold higher in the both strains of mice treated with DNCB than their control mice, respectively. The DNCB-treated mice demonstrated atopic dermatitis-like skin lesions characterized with erythma, scaling, and hemorrhage, which was not observed with the control mice. Scratching on face or dorsal area was significantly more frequent (approximately 25-fold) in the DNCB-treated mice than the control at next day of the second DNCB challenge, and scratching frequency remains higher (approximately 4-fold) in the mice treated with DNCB than the control at 14 day following the second DNCB challenge. Overall, the mice model developed through sensitization and challenge with DNCB may be useful for research on atopic dermatitis and development of treatment materials for atopic dermatitis.

Keywords: Atopic dermatitis, Mice, 2,4-Dinitrochlorobenzene, IgE, IgG isotype

Correspondence to: Yong Heo, Dept. Occupational Health,
College of Natural Sciences, Catholic University of Daegu,
330 Kumrak 1 ri, Hayang eup, Kyongsan si, Kyongbuk 712-
702, Korea
E-mail : yheo@cu.ac.kr

List of abbreviations: DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; IL-4,
interleukin-4; IFN γ , interferon gamma; ELISA, sandwich
enzyme-linked immunosorbent assay

서 론

아토피성 피부염(atopic dermatitis)은 사람, 특히 어린 이들에게 빈발하는 면역과민반응으로 산업화와 더불어 지속적으로 발생이 증가하고 있는 알레르기성 질환이다. 일부 선진국에서는 전체 어린이들의 10% 정도가 아토피성 피부염을 유병하고 있는 것으로 보고되었고 우리나라에서도 일부 조사에서 초등학교생들의 경우 약 10%정도 본 질환을 앓고 있는 것으로 보고될 정도로 소아기에 주요한 질환이다(백도명 등, 2002; US Dept. Health and Human Services, 2003).

아토피성 피부염의 정확한 원인은 아직까지 밝혀져 있지 않지만 본 질환의 진행과 관련하여 나타나는 면역학적 특성으로는 혈중 IgE 항체의 수준이 유의하게 상승하고 interleukin-4(IL-4)의 발현 수준은 상승하는 반면 interferon gamma(IFN γ) 발현은 저하된다는 점이다(Boguniewicz and Beltrani, 2002; Abdel-Hamid, 2003). 또한 안면부 및 목부위, 팔꿈치 안쪽, 무릎 뒤쪽 등 접히는 피부 부위에 입과구, 단핵구, Langerhans 세포 등이 주로 침착되는 농양성·홍반성 구진이 발생된다. 이러한 type-2 helper T cell 활성도의 type-1 helper T cell에 대한 상대적 우세에 따른 type-2 response 편향화가 특징적인 아토피성 피부염 면역병리현상은 자연발생적으로 아토피성 피부염 유사 증상이 나타나는 실험동물 마우스 품종에서도 보고된 바 있다(Matsumoto *et al.*, 1999). 그러나 본 마우스 품종에서 자연발생적인 유사 아토피성 피부염 모형은 발생 확률이 매우 낮아 아토피성 피부염 기전 연구 혹은 치료 혹은 개선 약물 개발 목적으로 사용하기에는 제한 점이 있다.

한편 일부 화학물질들은 IFN γ 또는 interleukin-12 발현 수준 증가와 같은 type-1 response로의 편향화가 주요 배경 기전이 되는 접촉성 피부염을 유발하는 것으로 알려져 있다(Sikorski *et al.*, 1996; Wiemann *et al.*, 2002; Friedmann, 2006). 2,4-dinitrofluorobenzene, 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene, α -hexyl cinnamic aldehyde, 이염화니켈 등 피부감작물질로서 알려진 화학물질들을 이용한 접촉성 알레르기성 피부염 연구 실험동물 모형이 개발되어 사용됨으로써 접촉성 알레르기성 피부염의 발생 기전 및 치료제 개발에 많은 도움이 되고 있다. 반면 근교계 혹은 폐쇄군과 같이 연구자들이 쉽게 확보할 수 있는 품종을 이용한 아토피성 피부염 유발 실험동물 모형은 현재까지 보고된 바 없다. 이에 본 연구는 접촉성 알레르기성 피부염을 유도하는 화학물질 중 일부는 피부 도포 횟수나 농도에 따라 type-2 response의 우세와 연관된 cytokine의 발현이 유도될 가능성에 대해 토의된 보고에

근거하여(Kitagaki *et al.*, 1997; Cumberbatch *et al.*, 2005), 접촉성 피부염 유발 물질인 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)와 마우스를 사용하여 사람의 아토피성 피부염과 유사한 면역학적 특성이 유도되는 실험 모형을 개발하였기에 일차적인 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험동물

8주령의 특정병원체부재(specific pathogen free) 숫컷 BALB/c 마우스(대한바이오파밍) 및 12주령의 특정병원체 부재 숫컷 NC/Nga 마우스(일본 SLC)를 구입하여 무균적으로 관리하면서(사육실 온도: 25°C, 습도: 55%, 멸균 1차 증류수 공급) 실험하였다. 시험물질 도포 하루 전 실험동물의 등을 목에서부터 골반쪽으로 2×4 cm 되도록 제모하였고 이후 일주일 간격으로 제모하였다.

시험물질 조제 및 도포

1% DNCB(Sigma, St. Louis, MO)와 0.2% DNCB를 용매물질(acetone : olive oil = 4 : 1 혼합)에 녹여 제조하였다. 우선 1% DNCB 100 μ l를 일주일에 3일 간격으로 2회 등 부위에 도포하여 감작시켰다(sensitization). 다음 1주일 동안에는 0.2% DNCB 100 μ l를 3일 간격으로 2회 등 부위에 도포하였다(challenge). 이때 대조군 마우스에는 동량의 용매물질을 같은 방법으로 도포하였다. DNCB 도포 농도 및 주기는 서론에서 언급하였듯이 화학물질의 피부 도포 횟수나 농도에 따라 type-2 response의 발현이 유도될 가능성에 대해 토의된 선행 연구에서 설정한 농도를 참조하여 결정하였다(Kitagaki *et al.*, 1997; Plitnick *et al.*, 2002; Cumberbatch *et al.*, 2005). 매 실험시 DNCB 도포군으로 NC/Nga 마우스 및 BALB/c 마우스 각각 5마리, 용매물질은 각각 3마리를 사용하였고 2회 이상 반복실험하였다. 마우스는 DNCB 혹은 용매물질의 2번째 challenge가 끝난 19일 후(NC/Nga 마우스) 또는 4주 후(BALB/c 마우스) 희생부검하였다.

육안 임상 소견 관찰 및 장기 채취

일주일에 2회씩 피부에 나타나는 농양성 염증, 출혈, 습진, 홍반, 미란, 가피탈피 등의 아토피성 피부염 관련 증상을 관찰하였다. DNCB 또는 용매물질의 두 번째 challenge가 끝난 다음날과 2주후 마우스가 앞다리를 이용해 안면 혹은 등부위 피부를 긁는 횟수를 30분간 측정하였다. DNCB 혹은 용매물질을 최초 감작하기 5일전과 DNCB 또는 용매물질의 두 번째 challenge가 끝난 4일 후에 안와정맥총에서 채혈을 하였고 희생부검시 심장채혈

을 시행하였다. 희생 부검시 비장을 세포 배양을 위해 무균적으로 적출하였다. 혈액에서 분리된 혈장은 사용 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다.

혈장내 IgE 및 IgG 측정

혈장내 존재하는 IgE 수준을 대조군 마우스와 비교분석하기 위해 sandwich ELISA 방법에 의해 total IgE를 정량하였고, 또한 IgG의 isotype인 IgG1 및 IgG2a의 수준을 측정하기 위해서는 goat-anti mouse IgG1 및 IgG2a (Serotec, Raleigh, NC) capture antibody와 peroxidase conjugated anti-mouse IgG detection antibody를 사용하는 sandwich ELISA 방법을 이용하였다(김영옥 등, 2005).

비장세포 배양액내 cytokine 수준 측정

IgE 및 IgG1의 isotype switching을 유도하는 IL-4를 중심으로 한 type-2 cytokine과 이 cytokine들의 역할에 길항작용을 미치는 IFN γ 등 type-1 cytokine들의 생산능력을 비교 분석하는 것은 세포면역능의 편향성을 평가하는 방법으로 고려되고 있다(Snapper and Paul, 1987; Heo *et al.*, 1996). 이를 위해 각 마우스에서 비장을 채취한 뒤 이 비장세포들을 24 well-culture plate에 분주한 뒤 CO $_2$ 배양기에서 48시간 배양하였다. 이 때 T 임파구의 *in vitro* 활성화를 위해 polyclonal stimulator로 immobilized anti-CD3 mAb($5\ \mu\text{g}/5\times 10^5$ cells, BD Pharmingen, San Jose, CA)을 사용하였고, 세포배양액내 cytokine 수준 정량은 sandwich ELISA 방법에 의하

였다(김영옥 등, 2005). 각 cytokine 별 lower detection limit는 다음과 같다: IL-4($4\ \text{pg}/\text{ml}$), IFN γ ($100\ \text{pg}/\text{ml}$).

통계처리

각 군간 측정치의 유의한 차이는 SigmaPlot 통계프로그램(SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 검토하였다. Single factor ANOVA와 Dunnett's *t*-test로 유의성을 검정하였다. 필요에 따라 Student's *t*-test 또는 Mann-Whitney test로 추가 유의성 검정을 시행하였고 p value가 0.05 미만일 때를 유의한 차이로 판정하였다. 그림에서 *는 $p < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

결 과

DNCB 도포에 따른 혈장 IgE 수준의 항진

혈청 혹은 혈장내 IgE 수준의 상승은 아토피성 피부염의 대표적 면역학적 지표치이다. 본 DNCB를 이용한 아토피성 피부염 관련 면역능 변화 유도시험에서 BALB/c 마우스와 NC/Nga 마우스 모두에서 DNCB를 두 번째 challenge한 지 4일 뒤 측정된 IgE 수준은 대조군에 비해 각각 4배(Fig. 1B), 6배(Fig. 1A)로 유의하게 항진되어 있었다. 이러한 IgE 수준 항진은 DNCB를 두 번째 challenge한 지 약 3~4주 지난 후까지도 유지되었는데 특히 BALB/c 마우스에서는 DNCB 두 번째 challenge 4일 후 측정된 IgE 수준과 비슷한 수준을 유지하였다(Fig. 1B).

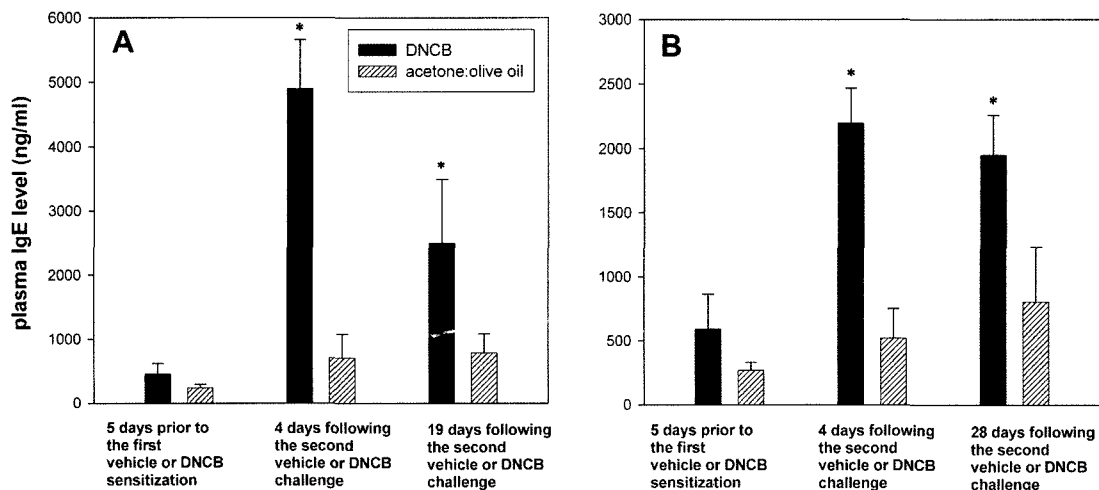


Fig. 1. Hyperregulation of plasma IgE level in the NC/Nga mice (A) and BALB/c mice (B) challenged with 0.2% DNCB following 1% DNCB sensitization. Mice were sensitized twice with $100\ \mu\text{l}$ of 1% DNCB or vehicle (acetone : olive oil = 4 : 1 mixture) in a week and challenged twice with $100\ \mu\text{l}$ of 0.2% DNCB or the vehicle at the following week. Mice were sacrificed at 19 days following the second DNCB or vehicle challenge for NC/Nga mice and at 28 days following the second DNCB or vehicle challenge for BALB/c mice.

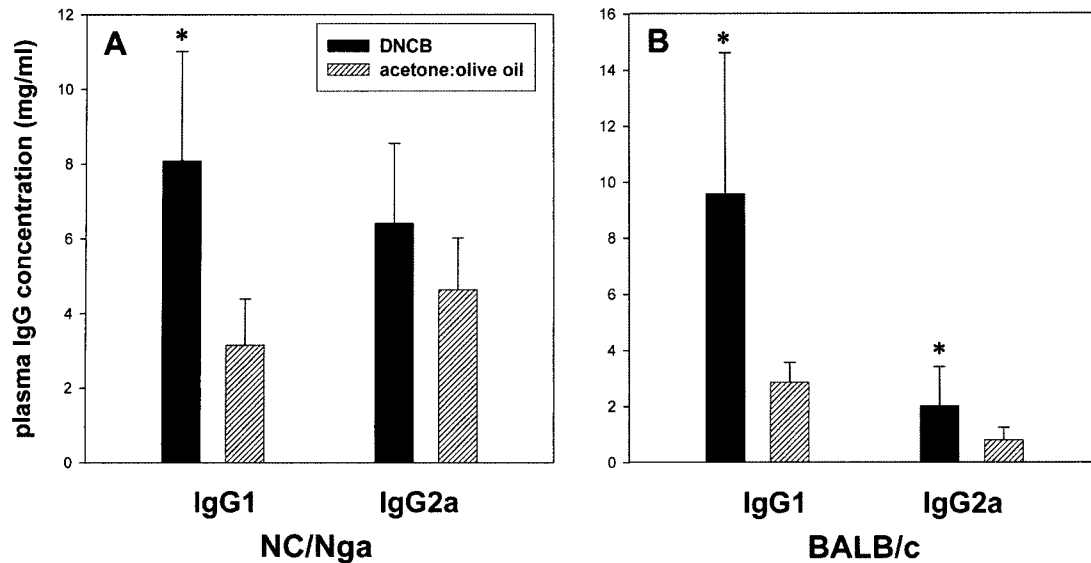


Fig. 2. Enhanced IgG1 level in the NC/Nga mice (A) and BALB/c mice (B) sensitized and challenged with DNCB compared with that of the control mice. Plasma for the measurement were obtained at the time of mice sacrifice.

DNCB 도포에 따른 혈장 IgG isotype 분포의 변화

마우스의 IgG isotype 중에서 IgG1은 IgE와 같이 IL-4에 의해서 isotype switching이 유도되고 IgG2a는 IFN γ 에 의해서 유도되는 것으로 밝혀졌다(Snapper and Paul, 1987; Kepron *et al.*, 1989). 이러한 이유에서 혈장내 IgG1과 IgG2a 수준의 상대적 변화에 대한 분석은 *in vivo*에서 type-1 response와 type-2 response간 항상성에 변화가 발생되었는지를 평가하는 지표치로 사용되기도 한다.

희생부검시 채취한 혈액에서 혈장을 분리한 뒤 IgG1과 IgG2a 수준을 측정하여 DNCB 도포군과 대조군간 비교를 하였다(Fig. 2). BALB/c 마우스의 경우 IgG1은 DNCB 도포군에서 9.6 ± 5.0 mg/ml으로 대조군 2.8 ± 0.7 mg/ml에 비해 약 3.4배 정도 유의하게 높았으며(Fig. 2B) NC/Nga 마우스의 경우도 DNCB 도포군에서 8.1 ± 3.0 mg/ml으로 대조군 3.2 ± 1.2 mg/ml에 비해 약 2.5배 정도 유의하게 높았다(Fig. 2A). 반면 IgG2a의 수준은 BALB/c mice에서는 DNCB도포군에서 1.9 ± 1.4 mg/ml으로 대조군 0.8 ± 0.4 mg/ml에 비해 약 2.4배 정도 증가하였고 NC/Nga 마우스에서는 DNCB 도포군에서 6.4 ± 2.1 mg/ml으로 대조군 4.6 ± 1.4 mg/ml에 비해 약 1.4배 정도 증가하였지만 유의한 차이는 아니었다. 이는 DNCB 도포 결과 IgG2a 수준에 비해 IgG1 수준이 상대적으로 증가 폭이 큰 type-2 response로의 편향성이 유도된 결과로 판단된다.

다음으로 동일 개체내 IgG1과 IgG2a 수준의 상대적 변화를 분석하기 위하여 동일 혈장내 IgG1수준을 IgG2a 수준으로 나눈 비를 계산하였다. BALB/c 마우스에서는 DNCB 도

포군에서 6.12 ± 3.15 로 대조군 3.97 ± 1.80 에 비해 상대적인 IgG1 수준 향진을 보였다($p = 0.058$). NC/Nga 마우스 역시 비슷한 경향을 보였는데 DNCB 도포군 1.32 ± 0.55 로 대조군 0.68 ± 0.21 에 비해 유의한 IgG1 수준 향진이 관찰되었다($p = 0.018$). 이러한 결과는 아토피성 피부염 발생시 면역체계 전반에 유도되는 type-2 response로 편향된 활성화가 DNCB 도포에 의해서도 진행되었음을 보여주는 결과로 여겨진다.

DNCB 도포가 cytokine 생성에 미치는 영향

아토피성 피부염의 또다른 대표적 면역학적 지표치로 인용되고 있는 cytokine 생성 양상의 변화, 즉 IFN γ , IL-12와 같은 type-1 cytokine 생성에 비해 IL-4, interleukin-13과 같은 type-2 cytokine 생성의 상대적 향진(Leung *et al.*, 1999; Boguniewicz and Beltrani, 2002)을 본 실험에서도 평가하였다. 비록 통계적으로 유의한 차이는 아니었더라도 BALB/c 마우스의 비장내 T 임파구를 *in vitro*에서

Table 1. Interleukin-4 and interferon gamma production from splenic T cells of BALB/c or NC/Nga mice treated with DNCB or vehicle

Strain	Treatment	L-4 (pg/ml)	IFN γ (ng/ml)
BALB/c	DNCB	14.3 ± 3.2	69.3 ± 17.4
	Vehicle	7.5 ± 2.2	144.6 ± 100.2
NC/Nga	DNCB	36.3 ± 17.9	109.7 ± 75.6
	Vehicle	12.7 ± 8.0	91.1 ± 50.0

Splenic T cells (5×10^5 cells) were stimulated with immobilized anti-CD3 mAb (5 μ g) for 48 hours.

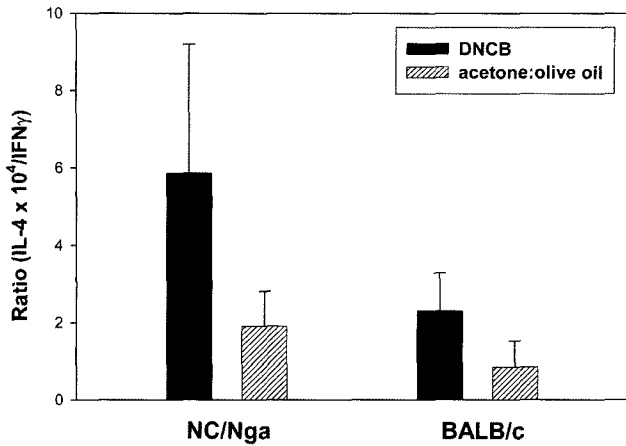


Fig. 3. Comparison of IL-4 versus IFN γ production from anti-CD3 stimulated splenic T cells between DNCB-sensitized/challenged mice and the control mice. 5×10^5 splenocytes were stimulated with $5 \mu\text{g}$ immobilized anti-CD3 mAb in a well of 24-well culture plate for 48 hours. Ratio was obtained through dividing the amount of IL-4 by the amount of IFN γ in the individual culture supernatants followed by 10^4 multiplication.

활성화시켰을 때 생성된 IL-4의 수준은 대조군에 비해 DNCB 도포군에서 높았으며(Table 1), 이러한 경향은 NC/Nga 마우스에서도 관찰되었다. 반면 IFN γ 생성은 BALB/c 마우스에서는 DNCB도포군에 비해 대조군에서 높았으며 NC/Nga 마우스에서는 대조군과 DNCB 도포군 간 주목할 만한 차이는 보이지 않았다.

다음으로 동일 배양액내 생성된 IL-4의 수준을 IFN γ 수준으로 나눈 생성비(생성 IL-4 수준 $\times 10^4$ /생성 IFN γ 수준)를 계산하였다(Fig. 3). DNCB 도포군에서 생성비는 BALB/c 마우스는 2.3 ± 1.0 였고 NC/Nga 마우스의 경우는 5.9 ± 3.3 으로 대조군 생성비(BALB/c 마우스, $0.8 \pm$

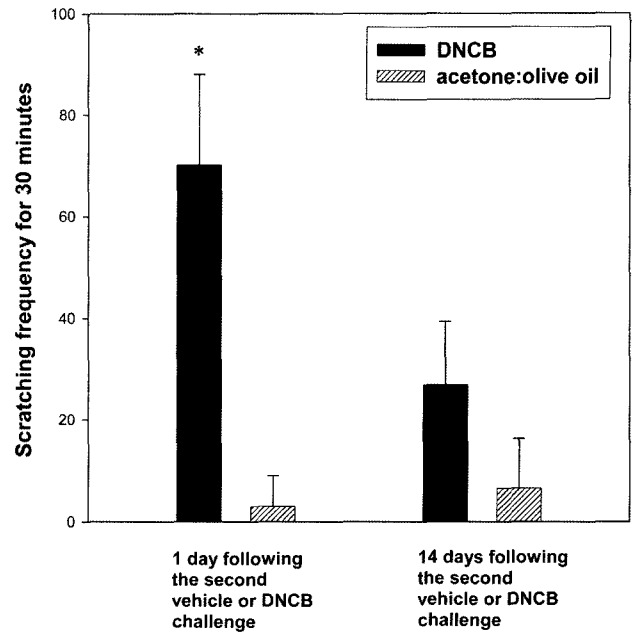
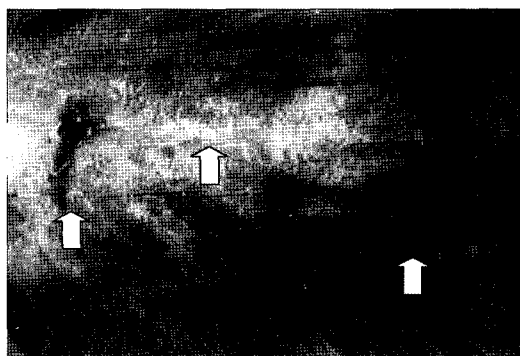


Fig. 4. Increased frequency of scratching in the DNCB-sensitized/challenged mice in comparison with that of the control mice. Mice were observed for 30 minutes at 1 day after the second DNCB or vehicle challenge and 14 day after the second DNCB or vehicle challenge.

0.7; NC/Nga 마우스, 1.9 ± 0.9)에 비해 약 3배 정도 높았다. IL-4와 IFN γ 수준 비교를 통한 type-2 cytokine 생성의 상대적 항진 여부를 평가한 결과 통계적인 유의성을 가지지는 못하였지만 DNCB도포가 type-2 response로의 편향성을 촉진하는 경향을 볼 수 있었다.

DNCB 도포가 마우스의 긁는 횟수에 미치는 영향

사람에게서 아토피성 피부염 증상 발현시 안면 혹은 팔



DNCB-sensitized/challenged mice



Vehicle (acetone:olive oil) administered mice

Fig. 5. Atopic dermatitis-like skin lesions were developed in the NC/Nga mice sensitized/challenged with DNCB. Arrows indicate with hemorrhage, scaling, or erythema. Pictures were taken 7 days after the second DNCB or vehicle challenge.

꿈치 안쪽, 무릎 뒤쪽 등피부가 접히는 곳을 심하게 긁는 것은 아토피성 피부염의 대표적인 임상증상이다. 이에 본 연구에서는 BALB/c 마우스에서 DNCB 또는 용매물질의 두 번째 challenge가 끝난 다음날과 2주후 안면 혹은 등 부위 피부를 긁는 횟수를 30분간 측정하였다(Fig. 4). challenge가 끝난 다음날의 경우 DNCB challenge 마우스의 긁는 빈도가 용매물질 도포 대조군에 비해 약 25배 정도로 유의하게 높았다. challenge 14일이 지난 후에는 DNCB 도포군과 대조군간 차이가 감소하였지만 아직도 DNCB 도포군 마우스가 4배 정도(DNCB 도포군, 26.8 ± 12.5 회; 대조군, 6.5 ± 9.7 회) 자주 피부를 긁음을 관찰하였다.

등 부위 피부의 육안 증상을 관찰한 결과 사람에서 아토피 피부염 발현시 피부에 발생하는 농양성·홍반성 구진, 가피탈피 증상을 DNCB를 도포한 BALB/c 마우스와 NC/Nga 마우스 모두에서 관찰할 수 있었으며 심한 경우는 출혈 소견도 있었다(Fig. 5). 대조군 마우스에서는 이러한 육안 증상을 희생부검시까지 관찰할 수 없었다.

고 찰

본 연구는 현재까지 명확한 원인이 밝혀져 있지 않고 이에 따라 근원적인 치료법 역시 부재함으로 인하여 어린 이들에게 심각한 건강 장애를 가져오는 것으로 알려진 아토피성 피부염에 대한 실험동물 모형을 개발하기 위하여 수행되었다. 국내외적으로 본 질환 발생에 대한 면역학적 배경 기전을 이해하고 이에 근거한 치료 약제 개발에 많은 관심을 가지고 있으나 적합한 실험동물 모형이 없어 어려움을 겪고 있는 현실이다. 일부 마우스 품종(NC/Nga 마우스)에서 사람에게서 발생하는 아토피성 피부염과 유사한 면역병리학적 이상이 자연적으로 발현되는 것이 보고되었으나(Matsumoto *et al.*, 1999), 본 NC/Nga 마우스를 사용해본 본 연구자나 국내의 타 연구자들의 의견을 종합해보면 보고된 바와 같은 사양조건에서 spontaneous atopic dermatitis 발현 확률이 지극히 낮다는 점은 NC/Nga 마우스의 실질적 사용을 재고하게 하고 있다. 본 마우스 품종을 이용한 연구가 타 연구진에 의해 재현된 사례를 찾을 수 없었던 것도 이러한 제한 점에 기인하는 것으로 판단된다.

현재까지 아토피성 피부염 발생과 원인적 연관성을 갖고 있는 것으로 확인된 물질이 부재한 상황이어서 본 연구에서는 접촉성 알레르기성 피부염을 유발하는 것으로 알려진 DNCB를 이용하여 사람에게서 발생하는 아토피성 피부염의 면역학적 이상과 유사한 과민반응 발현을 BALB/c 마우스 및 NC/Nga 마우스에서 유도할 수 있었다.

DNCB를 도포한 마우스에서 아토피성 피부염의 대표적인 면역학적 지표인 혈장내 IgE 수준이 대조군 마우스에 비해 유의하게 항진되었고, type-1 response에 비해 상대적으로 우세한 type-2 response 활성화가 유도되었다. 즉, IL-4에 의해 isotype switching이 유도되는 IgG1 수준이 IFN γ 에 의해 isotype switching되는 IgG2a 수준에 비해 유의하게 증가된 것과 비장 T 림파구를 *in vitro*에서 활성화시켰을 때 IFN γ 에 비해 상대적으로 항진된 IL-4의 생성을 DNCB 도포 마우스에서 관찰할 수 있었다. 본 실험동물 모형이 사람의 아토피성 피부염에 대한 각종 연구를 수행하기 위한 모형으로서 확립되기 위해서는 병변이 발생한 피부조직에서 비만세포(mast cell), 랑게르한스 세포, 임파구 등 아토피성 피부염 발생 관련 면역세포들의 침착여부 및 활성화 정도에 대한 추가적인 정보가 필요할 것이다(Kiekens *et al.*, 2001). 아울러 아토피성 피부염이 진행되고 있는 사람에게서 발현이 증가되는 것으로 보고된 interleukin-13 및 interleukin-10과 같은 type-2 cytokine에 대한(Ohmen *et al.*, 1995; Tsunemi *et al.*, 2002) 추가 연구도 필요할 것이다. 또한 본 연구에서 관찰된 type-2 response의 상대적 항진이 어느 시기까지 유지될 수 있는지를 평가하기 위한 시계열적 실험이 보충 되어야할 것이다.

본 실험동물 모형에서 아토피성 피부염의 배경이 되는 type-2 response로의 편향화가 유도된 기전에 대한 연구도 순차적으로 진행되어야 할 것이다. 고농도(1%)의 DNCB로 2회 감작한 뒤 저농도(0.2%)로 2회 challenge 함으로써 어떻게 type-2 response의 우세가 유도되었는지 현재로서는 명확하게 설명하기 어렵다. 동일 항원이라 하더라도 투여하는 양, 횟수, 부위가 type-1 혹은 type-2 면역반응 중 어느 한쪽으로 치우치게 되는데 영향을 미칠 수 있다는 점이 보고된 바 있다(Mueller *et al.*, 1989; Goutet *et al.*, 2005; Friedman, 2006). 이를 고려하면 type-1 response의 우세를 배경으로 하는 접촉성 알레르기성 피부염을 유도하는 것으로 알려져 있는 DNCB라 하더라도 DNCB 농도와 투여 횟수, 그리고 투여 부위에 따라 아토피성 피부염의 특성인 type-2 response 면역기능 항진을 가져올 가능성이 있을 것이다. 접촉성 알레르기성 피부염 유도에 사용되는 DNCB의 경우 마우스에서 연구마다 비슷하게 감작시에는 1% DNCB를 50~100 μ l 정도로 평균 2회 4~5일 간격으로 옆구리에 도포하고 challenge시에는 감작시 농도의 1/2~1/8로 낮춰서 평균 3회 매일 귀에 도포한다(Plitnick *et al.*, 2002; Cumberbatch *et al.*, 2005; Goutet *et al.*, 2005). 이들 연구와 본 저자들의 연구를 비교해볼 때 감작/challenge 방법 상 가장 큰 차이점은 challenge시 귀가 아닌 감작부위와 동일한

등 부위를 선택하였다는 점과 challenge 도포를 매일하지 않고 3일 간격으로 시행하였다는 점이다. DNCB를 이용하여 사람에게서 접촉성 알레르기성 피부염 감각능력을 평가하였을 때 도포한 물질 총량보다는 단위 피부 면적당 도포한 DNCB의 농도가 감각 효율을 결정하는 중요한 인자라는 최근 한 연구 결과를 고찰하면(Friedmann, 2006), 본 연구에서 challenge시 2×4 cm 등부위에 DNCB를 도포함으로써 기존 DNCB를 이용한 접촉성 피부염 유도시 선택하는 귀 부위(약 1×1 cm) 보다 8배 정도 넓은 면적에 도포함으로써 단위 피부면적당 DNCB challenge 농도를 저하시켰던 것이 type-2 response가 우세한 면역 반응을 유도했을 가능성을 생각해 볼 수 있겠다. 이러한 관점에서 피부를 통해 항원이 침투하였을 때 이후 면역 반응을 선택적으로 type-1 response 혹은 type-2 response 중 어느 한쪽으로 진행시키는데 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진(Hilkens *et al.*, 1997; Caron *et al.*, 2001) 표피에 있는 수지상세포인 랑게르한스 세포의 활성화에 미치는 다양한 단위 피부면적당 도포 DNCB 농도의 영향을 평가하는 실험 수행은 중요하다고 판단된다.

결론적으로 본 연구는 마우스에 DNCB를 피부도포함으로써 전반적인 면역반응을 type-2 response로 유도하는 모형을 제시하였다. 이러한 면역반응 편향성에 대한 기전 규명 등 추가적으로 필요한 연구가 있지만 본 실험 모형은 아토피성 피부염 관련 여러 형태의 연구에 적절한 *in vivo* 모형으로 이용될 수 있음에 그 가치를 찾을 수 있겠다.

참고문헌

- Abdel-Hamid, K.M. (2003): Atopic dermatitis in *Allergy, Asthma, and Immunology Subspecialty Consult* (B.C. Jost, E. Friedman, K.M. Abdel-Hamid, A.L. Jani, Ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 66-73.
- Boguniewicz, M. and Beltrani, V.S. (2002): Atopic dermatitis and contact dermatitis in *Manual of Allergy and Immunology* (D.C. Adelman, T.B. Casale, J. Corren, Ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 165-186.
- Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Bonnefoy, J.Y., Pestel, J. and Jeannin, P. (2001): Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J. Immunol.*, **167**, 3682-3686.
- Cumberbatch, M., Clelland, K., Dearman, R.J. and Kimber, I. (2005): Impact of cutaneous IL-10 on resident epidermal Langerhans' cells and the development of polarized immune responses. *J. Immunol.*, **175**, 43-50.
- Friedmann, P.S. (2006): Contact sensitization and allergic contact dermatitis: Immunobiological mechanisms. *Toxicol. Lett.*, **162**, 49-54.
- Goutet, M., Pepin, E., Langonne, I., Hugué, N. and Ban, M. (2005): Identification of contact and respiratory sensitizers using flow cytometry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **205**, 259-270.
- Heo, Y., Parsons, P.J. and Lawrence, D.A. (1996): Lead differentially modifies cytokine production *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **138**, 149-157.
- Hilkens, C.M., Kalinski, P., de Boer, M. and Kapensberg, M.L. (1997): Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood*, **90**, 1920-1926.
- Kepron, M.R., Chen, Y.W., Uhr, J.W. and Vitetta, E.S. (1989): IL-4 induced the specific rearrangement of gamma 1 genes on the expressed and unexpressed chromosomes of lipopolysaccharide-activated normal murine B cells. *J. Immunol.*, **143**, 334-339.
- Kiekens, R.C.M., Thepen, T., Oosting, A.J., Bihari, I.C., van de Winkel, J.G.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M. and Knol, E.F. (2001): Heterogeneity within tissue-specific macrophage and dendritic cell populations during cutaneous inflammation in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.*, **145**, 957-965.
- Kitagaki, H., Ono, N., Hayakawa, K., Kitazawa, T., Watanabe, K. and Shiohara, T. (1997): Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J. Immunol.*, **159**, 2484-2481.
- Leung, D.Y.M., Tharp, M. and Boguniewicz, M. (1999): Atopic dermatitis in *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine* (I.M. Freedberg, A.Z. Eisen, K. Wolff, K.F. Austen, L.A. Goldsmith, S.I. Katz, T.B. Fitzpatrick Ed.). McGraw-Hill, New York, pp. 1464-1480.
- Matsumoto, M., Ra, C., Kawamoto, K., Sato, H., Itakura, A., Sawada, J., Ushio, H., Suto, H., Mitsuishi, K., Hikasa, Y. and Matsuda, H. (1999): IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol.*, **162**, 1056-1063.
- Mueller, D.L., Jenkins, M.K. and Schwarz, R.H. (1989): Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Ann. Rev. Immunol.*, **7**, 445-480.
- Ohmen, J.D., Hanifin, J.M., Nickoloff, B.J., Rea, T.H., Wyzykowski, R., Kim, J., Jullien, D., McHugh, T., Nassif, A.S., Chan, S.C. and Modlin, R.L. (1995): Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. *J. Immunol.*, **154**, 1956-1963.
- Plitnick, L.M., Loveless, S.E., Ladics, G.S., Holsapple, M.P., Selgrade, M.J., Sailstad, D.M. and Smialowicz, R.J. (2002): Cytokine profiling for chemical sensitizers: Application of the ribonuclease protection assay and effect of dose. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **179**, 145-154.
- Sikorski, E.E., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Miller, C.M. and Ridder, G.M. (1996): Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. *Fund. Appl. Toxicol.*, **34**, 25-35.
- Snapper, C.M. and Paul, W.E. (1987): Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype pro-

- duction. *Science*, **236**, 944-947.
- Tsunemi, Y., Saeki, H., Nakamura, K., Sekiya, T., Hirai, K., Kakinuma, T., Fujita, H., Asano, N., Tanida, Y., Wakugawa, M., Torii, H. and Tamaki, K. (2002): Interleukin-13 gene polymorphism G4257A is associated with atopic dermatitis in Japanese patients. *J. Dermatol. Sci.*, **30**, 100-107.
- US Dept. Health and Human Services (2003): Atopic dermatitis (A type of eczema). NIH publication No. 03-4272, Bethesda, USA.
- Wiemann, C., Berthold, K., Heusener, A., Kruger, N., Seeberger, A. and Stropp, G. (2002): Joint positive control testing in guinea pig skin sensitization tests. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, **35**, 14-22.
- 김영옥, 김광호, 박현지, 박영철, 박성욱, 허용 (2005): 마우스를 이용한 송화분 섭취의 면역원성과 안전성 탐색. *한국독성학회지*, **21**, 235-240.
- 백도명, 박두용, 허용, 성주현, 김호 (2002): 우리나라 환경오염으로 인한 건강영향의 특성과 그 규모 파악. 보건 의료기술연구개발사업 보고서, 보건복지부.
- 허용, 김광호 (2002): 백신 접종후 발생할 수 있는 전신적과민증 예측을 위한 아급성 실험동물 모형 개발과 관련 면역독성학적 지표치 평가. *한국독성학회지*, **18**, 205-213.