

C57BL/6 생쥐에서 전해알칼리환원수가 호르텐스극구흡충 감염과 면역에 미치는 영향

김동희, 등영진, 김 단¹, 황학수², 최주봉, 김광용, 이규재*

연세대학교 원주의과대학 환경의생물학교실 · 기초의학연구소,

¹연변대학교 의과대학 면역병리생물학교실, ²연변대학병원

Effects of Electrolyzed Alkaline Reduced Water on *Echinostoma hortense* Infection and Immune Response in C57BL/6 Mice

Dong Heui Kim, Young Kun Deung, Dan Jin¹, Xue Zhu Huang²,
Xu Feng Qi, Kwang Yong Kim and Kyu Jae Lee*

Department of Environmental Medical Biology and Institute of Basic Medical Science,
Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju, Gangwon 220-701, Korea

¹Department of Immunology and Pathogenic Biology, College of Medicine, Yanbian University,
No. 1829, Juzi St. Yanji City, Jilin Prov.p.R. 133000, China

²Yanbian University Hospital, No. 1327, Juzi St. Yanji City, Jilin Prov.p.R. 133000, China

(Received December 14, 2007; Accepted March 8, 2008)

ABSTRACT

To examine the effect of the electrolyzed alkaline reduced water (ERW) on animal immunity, by employing *Echinostoma hortense* that is a parasite in the small intestine, the immune response of C57BL/6 was examined. To C57BL/6 mice, *Echinostoma hortense* metacercaria 15 per animal was in oculate dorsally, the worm was collected after 2 weeks, and the change of goblet cells and mast cells in the mucosa of small intestine was examined, and by using a protein chip, the change of cytokines in the serum was compared and observed.

As a result, average 8.3 worms were collected from the C57BL/6 mice infected with *E. hortense*, and in the group fed with the ERW, average 10 worms were collected. In regard to the examination of the change of goblet cells, in the experimental group infected with *E. hortense* and fed with the ERW, average 4.3 worms per villus were detected, hence, it was found that the expression of goblet cells was low ($p < 0.001$). Regarding the examination of the change of mast cells, similarly, in the group infected with *E. hortense* and fed with the ERW, average 11 worms per villus were detected, and it appears to be less than control group ($p < 0.001$). Regarding the expression of cytokines in mouse serum, in comparison of the experiment group infected with *E. hortense* and control group, in the expression of the Th1 cytokines IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , and IL-2, and the Th2 cytokines IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13, a significant difference was not detected. In our study, it was found that in the infection of *E. hortense*, the ERW mediates its effect on the number of

본 연구는 2004년 연세대학교 원주의대 학술연구비에 의해 이루어졌음 (YUWCM-2004-06).

* Correspondence should be addressed to Dr. Kyu Jae Lee, Department of Environmental Medical Biology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, W Gangwon 220-701, Korea. Ph.: (033) 741-0331, Fax: (033) 731-6953, E-mail: medbio@yonsei.ac.kr

goblet cells and mast cells in the intestinal mucosa, and simultaneously, the worm expulsion was delayed, and thus the conclusion that the ERW mediated its effect on the intestinal immunity of mice was obtained.

Keywords : Electrolyzed alkaline reduced water (ERW), *Echinostoma hortense*, Goblet cell, Mast cell, Cytokine

서 론

전해알칼리환원수 (electrolyzed alkaline reduced water: ERW)는 전해질이 포함된 물을 전기분해하여 음극에서 생성된 수소가 풍부한 물로서 생체 내에서 유해한 free radical의 축적을 억제시키고 환원시킴으로써 병적현상의 예방 또는 치료의 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Hanoaka, 2001). 특히 전해알칼리 환원수가 활성산소를 제거할 수 있고 (Huang et al., 2003; Saito et al., 2003) 혈당강하능이 있음이 확인된 바 있다 (Kim & Yokoyama, 1997). 그러나 알칼리 환원수가 생체 내 면역계에 미치는 영향에 대한 연구는 극히 제한되어 있으며 확인된 전해알칼리환원수의 다양한 효과는 활성산소 제거 외에도 면역반응이 작용할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 전해알칼리환원수가 호르텐스극구흡충에 감염된 C57BL/6 생쥐에서 충체의 배출 및 면역반응의 변화를 관찰하여 전해알칼리환원수가 동물의 장에서 어떠한 면역을 나타내며 전체적인 면역 조절과 관계되는 사이토카인과의 관계에 대하여 확인하고자 하였다. 본 실험에 사용된 감염원인 호르텐스극구흡충 (*Echinostoma hortense*)은 극구흡충과 (Echinostomatidae)에 속하는 기생충으로 1926년 Asada에 의해 처음 알려졌으며 국내외에서 지속적인 감염이 보고되는 소장기생 인수공통기생충이다 (Ahn et al., 1985; Seo et al., 1985; Lee et al., 1988; Ryang, 1990). 일부 장내 기생충들은 숙주의 반응에 의해 기생충의 성장이 저지되고 파괴되어, 일정 감염기간이 지나면 자연배출 (expulsion) 되는 특성을 보인다 (Chai et al., 1993; Wakelin et al., 1993). 이러한 과정에서 점막의 비만세포가 작용하며 (Crowle & Reed, 1981), 점막의 비만세포는 기생충의 항원성에 의하여 탈 과립을 하면서 숙주의 면역방어에 중요한 역할을 한다. 그러나 감염이 장기화되면 비만세포 수는 정상으로 돌아오는데 이로써 비만세포가 초기 기생충감염의 방어에 주로 영향을 미치는 것을 알 수 있다 (Barrett et al., 1988). 이러한 기전은 비만세포가 알러지성 과민반응에 관여하며 장내 이온수송에 의하여 영향을 받기 때문인 것으로 알려졌다 (Harari et al., 1987; Perdue et al., 1990). 또한 장내 기생충 감염에서 충체배출은 점막 내 배상세포 (goblet cell)의 과다증식 및 mucin의 생성과 분비의 증가와 밀접한 연관성이 있다는 것이 여러 연구에서 확인되었다 (Carroll et al., 1984; Grecis et al., 1991; Garside et al., 1992; Fujino et al., 1993; Khan et al., 1995, 2003; Ishikawa et al., 1997; Fal-

lon et al., 2000). 이러한 기생충배출과 관계된 장 내의 비만세포와 배상세포의 작용은 장 내 면역의 주요한 방어인자라 할 수 있으며 전체적으로 cytokine의 영향을 받는다. Cytokine의 면역반응은 숙주가 유도하는 양상에 따라 T helper 1 (Th1) 형과 T helper 2 (Th2) 형으로 나눌 수 있으며, 기생충 감염 시 나타나는 cytokine 반응에 대한 여러 연구에서 세포 내 기생충 감염은 대부분 Th1 형이 우세한 반응을 일으키는 것으로 알려져 있고 (Skeiky et al., 1995; Camargo et al., 1997), 세포 외 기생충 감염은 Th2 형이 우세한 반응을 일으킨다 (Li et al., 1996; Finkelman et al., 2000).

최근까지의 진행해 온 전해알칼리환원수에 대한 연구에서 일정부분 면역반응과 관계된 효과들이 확인되고 있어 특정 면역에 관여할 것으로 생각되며 Th1 또는 Th2의 한쪽에 대하여 강하게 작용하여 나타난 것이라 판단되어진다. 이러한 방향성에 대하여 원충과 장내기생충의 기생충감염은 어느 정도 구체적인 Th1과 Th2 면역의 구분을 나타내기 때문에 본 실험에서는 호르텐스극구흡충을 이용하여 전해알칼리환원수를 생쥐에 급이함으로써 지금까지 확인되지 않은 전해알칼리환원수의 면역기능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

생후 6주령의 C57BL/6 암컷 생쥐를 대한바이오링크 실험동물 센터에서 구입하여 사용하였다. 모든 생쥐는 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $56 \pm 5\%$ 에서 12시간 명암주기하에서 사육하였으며 먹이는 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. 일주일간 순화기간을 거친 후 마우스를 대조군 (control군), 일반정수를 급이하면서 호르텐스극구흡충 감염시킨 군 (E.h군) 및 전해알칼리환원수를 급이하면서 호르텐스극구흡충을 감염시킨 군 (ERW+E.h군)으로 각각 10마리씩 나누어 실험에 사용하였다.

2. 전해알칼리환원수의 투여 및 호르텐스극구흡충의 피낭유충 감염

알칼리환원수는 (주)바이오텍사의 전기분해방식의 이온수기 (BTM-700, Korea)를 이용하여 제조하여 (pH 10.0, ORP-100 mV 이하) 사용하였다. 생성된 알칼리환원수를 호르텐스

감염시키기 4주 전부터 실험이 끝날 때까지 급이하였다. 호르텐스극구흡충을 감염시킨 다른 한 E.h군은 이온수기를 통하여 전기분해하지 않고 정수된 물을 급이하였다.

호르텐스극구흡충감염은 미꾸리 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 조직에 감염된 피낭유충을 해부현미경으로 분리하여 생쥐 당 15개를 경구를 통하여 감염시켰다.

3. 총체확인

호르텐스극구흡충의 피낭유충을 감염시키고 14일 경과 후 생쥐를 희생시켜 소장을 3부분으로 나눈 후 0.85% 생리 식염수에서 소장을 절개하여 성충을 수집하였다.

4. Lectin histochemistry를 이용한 소장점막조직 내에서의 배상세포 (goblet cell) 관찰

소장 상부조직(위에서 1 cm 아래 약 1.5 cm 부분)을 자른 다음 각각 Carnoy's fluid에 고정하고 paraffin으로 포매하여 4 μm 두께로 잘랐다. Paraffin을 제거한 후 흡수하여 endogenous peroxidase activity 제거를 위해 0.3% H₂O₂가 함유된 methanol에 20분간 방치하였다. 0.01 M PBS (pH 7.4)에 세척한 후 비특이반응을 막기 위하여 1% BSA가 함유된 PBS에 10분간 incubation한 후 세척하였다. Moist chamber에서 25 μg/mL의 biotinylated HPA를 첨가시켜 2시간 동안 incubation한 후 PBS에 담긴 다음 streptavidin-HRP conjugate (ZYMED Laboratories INC, 2.5 mg/2 mL)을 처리하고 PBS (1 : 300)에 2시간 동안 incubation하였다. 발색을 위하여 Liquid DAB-plus substrate kit (ZYMED Laboratories INC)를 사용하였다. Kit 처리방법에 따라 reagent mixture에 실온에서 10분간 incubation한 후 DAB enhancer에 3분간 incubation하였다. Counter stain은 Mayer hematoxylin을 사용하였다. 모든 처리가 끝난 소장조직은 용모 10개 안에 포함되어 있는 배상세포수를 계수하였다.

5. 장 점막 내 비만세포 반응

비만세포를 보기 위해 면역 조직화학적 방법으로 c-kit 유전자 산물인 CD117을 염색을 하였다. 조직을 5 μm의 두께로 조직을 박절하여 poly-L-lysine (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA)으로 처리한 유리 슬라이드에 절편을 부착시킨 후 탈 파라핀하였다. 그리고 조직에 내재된 peroxidase를 제거하기 위하여 3% H₂O₂에 10분간 반응시켰다. Tris 완충액 (pH 7.6)에 5분간 방치하고, 구연산 완충액 (Citrate buffer, pH 6.0)에 넣어 전자레인지 (microwave oven)에서 5분간 3회 전 처리한 후 실온에서 냉각시키고 증류수로 세척하였다. Tris 완충액으로 5분간 2회 수세한 후 비특이반응을 제거하기 위하여 슬라이드를 5% 정상 토끼 혈청에 10

분간 반응시킨 후 1 : 200으로 희석한 goat anti-mouse CD117 (Santa Cruz Co., Santa Cruz, Ca., USA)로 1시간 동안 반응시켰다. Tris 완충액에 5분간 3회 세척한 후 biotin에 부착된 2차 항체 rabbit anti-goat IgG (DAKO, DK, Glostrup, Denmark)를 사용하여 20분간 반응시켰다. Tris 완충액에 5분간 3회 세척한 후 과산화효소가 부착된 streptavidin에 20분간 반응시킨 후 c-kit DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.5 mg/mL)로 발색시켰다. 음성대조 염색 (negative control)은 일차 항체를 배제한 후 동일 과정으로 진행되었다. 발색이 끝난 후 흐르는 물에 수세하였으며 Mayer's hematoxylin으로 10초 동안 배경 염색을 한 후 관찰하였다.

6. Protein chip을 이용한 Th1/Th2 cytokine 발현

마우스 혈청 내의 Th1 및 Th2 cytokine들의 농도는 FAST@Quantkit (S & S Bioscience, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정방법은 Kit 사용방법에 근거하여 진행하였다. Spot intensity는 GenePixTM scanner (Axon Instrument, USA)를 사용하여 측정하였고 결과분석은 Array Vision TM-FAST@ software (S & S Bioscience, USA)를 사용하였다 (excitation wavelength: 649 nm; emission wavelength: 670 nm).

7. 통계적 분석

모든 결과는 평균 ± SEM의 값으로 표현하였고 둘 이상의 값을 비교할 때 Student's t-test법을 사용하였고 모든 통계 프로그램은 Prism program을 이용하였다.

결 과

1. 총체회수

E.h군 마우스에서 총체를 평균 8.3마리 회수하였고 소장의 상부에서 7.4마리, 소장의 중부에서 0.9마리, 하부에서는 총체가 발견되지 않았다. ERW+E.h군 생쥐에서는 총체를 평균 10마리 회수하였고 그 중에서 소장의 상부에서 8.6마리, 중부에서 1.4마리 회수하였고 하부에서는 총체가 회수되지 않았다 (Table 1). 두 군에서 회수한 총체는 형태적 차이가 발견되지 않았다 (Fig. 1).

2. 소장점막조직 내 배상세포 발현

소장 조직 1개당 용모 10개에서 lectin 염색된 배상세포의 수를 관찰한 결과는 다음과 같다 (Fig. 2). 호르텐스 감염시킨 군에서 평균 9.71개가 관찰되었고 이는 평균 5.51개 발현된 감염시키지 않은 대조군에 비해 증가한 경향을 보였

Table 1. Worm recovery each of *E. hortense* infected C57BL/6mice

| No | E.h | | | E.h+ERW | | |
|---------|-------|--------|-------|---------|--------|-------|
| | Upper | Middle | Under | Upper | Middle | Under |
| 1 | 6 | 0 | 0 | 11 | 2 | 0 |
| 2 | 9 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 11 | 3 | 0 |
| 4 | 9 | 2 | 0 | 7 | 2 | 0 |
| 5 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 6 | 5 | 1 | 0 | 11 | 1 | 0 |
| 7 | 10 | 1 | 0 | 14 | 0 | 0 |
| 8 | 15 | 0 | 0 | 8 | 1 | 0 |
| 9 | 8 | 5 | 0 | 8 | 5 | 0 |
| 10 | 11 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 |
| Average | 7.4 | 0.9 | 0 | 8.6 | 1.4 | 0 |

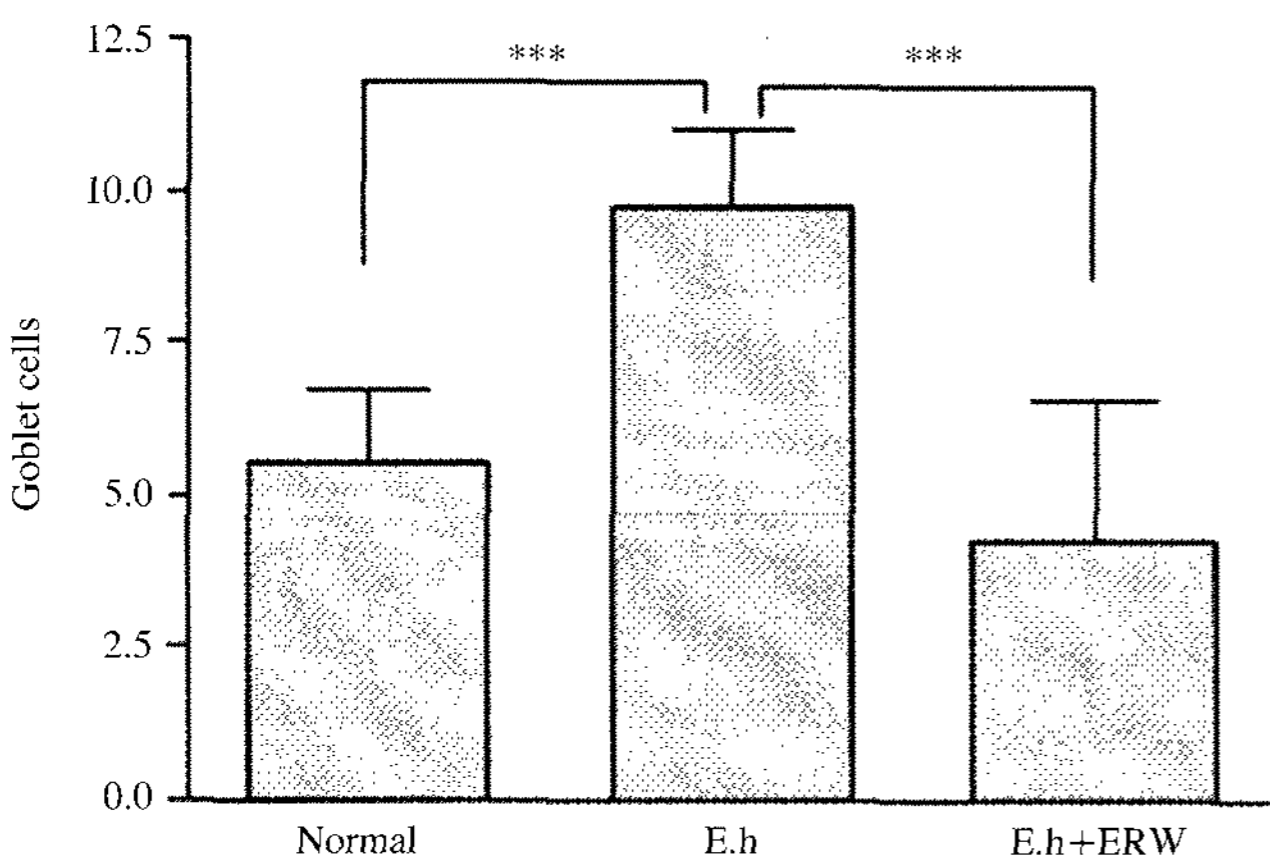


Fig. 3. Goblet cell count of intestinal duodenum villi showing in *E. hortense* infected C57BL/6mice (***) $p < 0.0001$).

다 ($p < 0.001$). 알칼리환원수 급이한 감염군에서는 평균 4.30개가 관찰되었는데 정수물 급이한 호르텐스 감염군에 비해 적게 나타났다($p < 0.001$, Fig. 3).

3. 장점막비만세포의 반응

비만세포 변화의 관찰은 소장 조직 1개당 용모 10개에서 anti-CD117로 염색된 세포의 수를 관찰하였다(Fig. 4). 그 결과 호르텐스 감염시킨 군에서 평균 15.5개가 관찰되었고 이는 평균 9.39개 관찰된 감염시키지 않은 대조군에 비해 증가한 경향을 보였다($p < 0.001$). 알칼리환원수를 급이한 감염군에서는 평균 11개 관찰되었는데 정수물을 급이한 호르텐스 감염군에 비해 적게 나타났다($p < 0.001$, Fig. 5).

4. Protein chip을 사용한 Th1 cytokine 발현

대조군에서 IL-6는 평균 285.5 ± 167.7 pg/mL, IL-1 β 는 495.2 ± 356.2 pg/mL, IFN- γ 는 228.1 ± 228.3 pg/mL, IL-2는 538.7 ± 336.7 pg/mL, TNF- α 는 286.1 ± 226.6 pg/mL의 발현

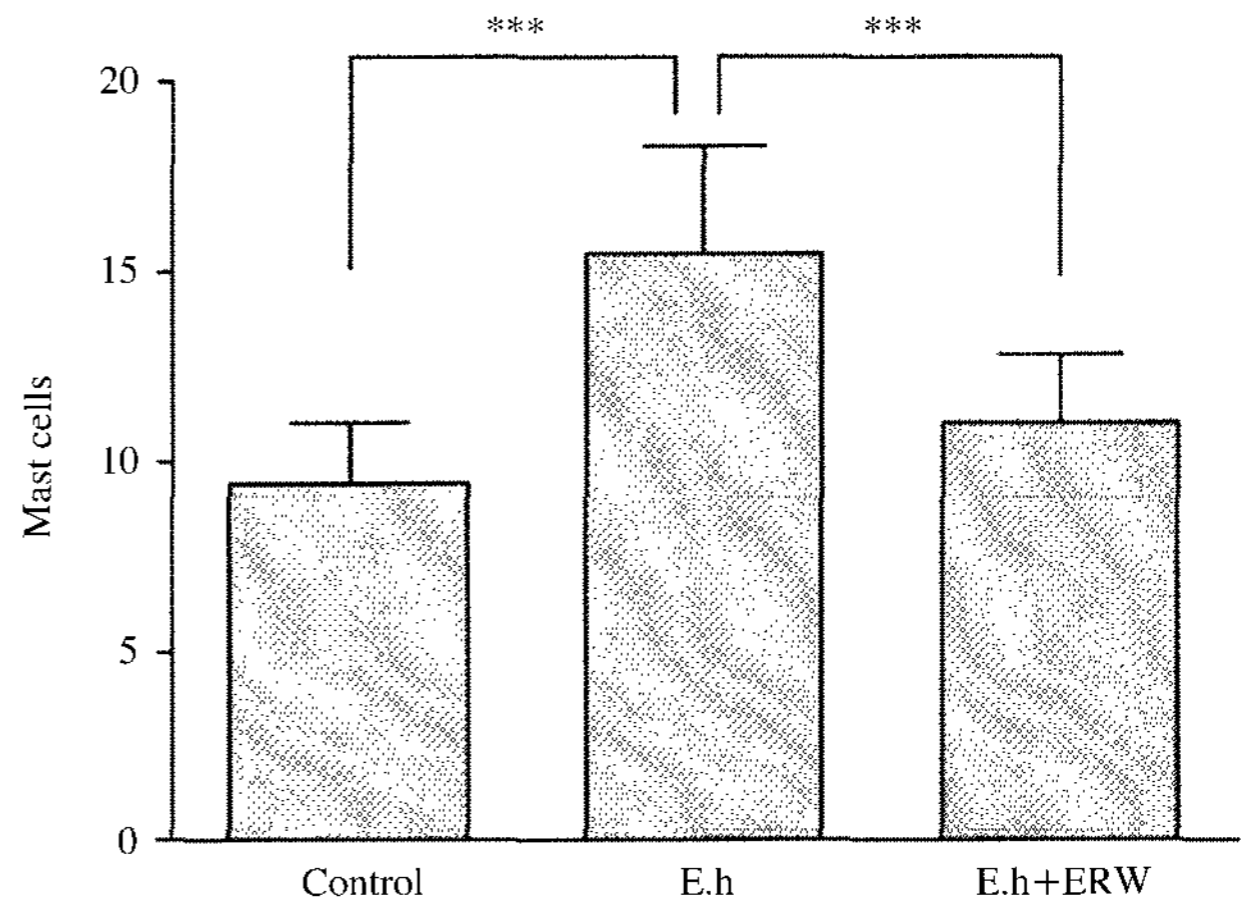


Fig. 5. Mast cell count of intestinal duodenum villi showing in *E. hortense* infected C57BL/6mice (***) $p < 0.0001$).

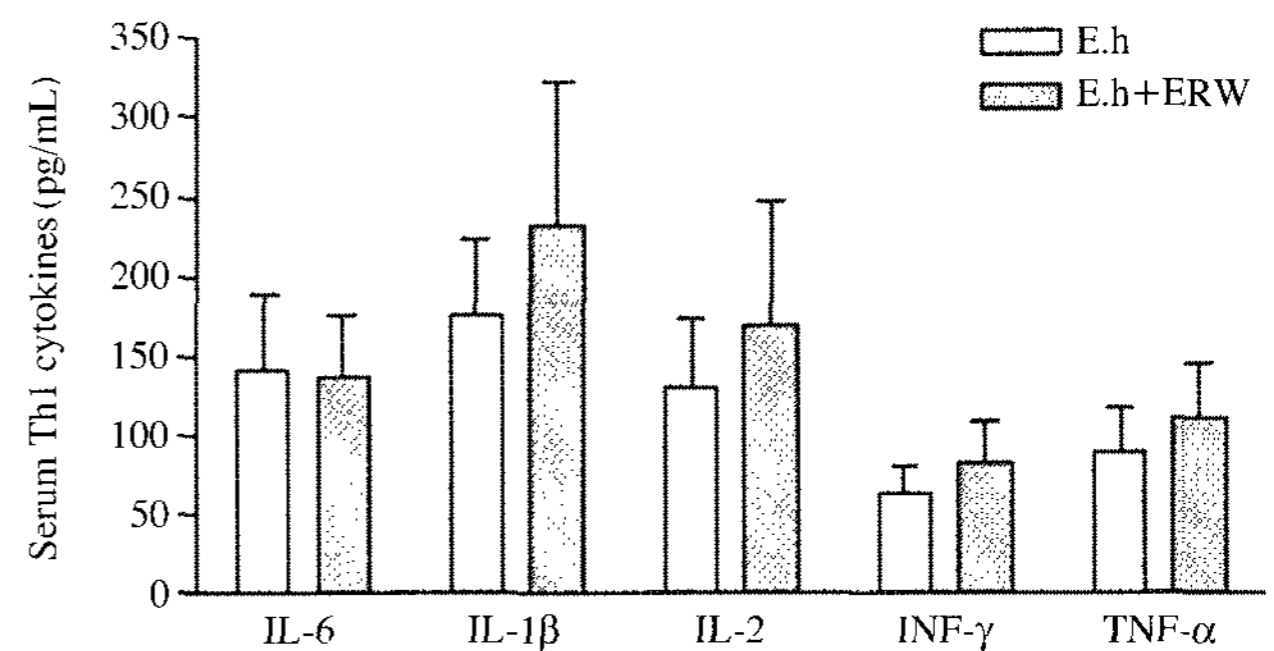


Fig. 6. Expression of Th1 cytokines in the C57BL/6 mouse serum.

을 나타냈다. E.h군에서 IL-6는 평균 141.6 ± 131.6 pg/mL, IL-1 β 는 175.6 ± 133.0 pg/mL, IFN- γ 62.9 ± 50.8 pg/mL, IL-2 130.3 ± 124.5 pg/mL, TNF- α 는 89.6 ± 78.4 pg/mL으로 발현되었고, ERW+E.h군에서 IL-6는 평균 137.8 ± 106.4 pg/mL, IL-1 β 는 231.2 ± 260.8 pg/mL, IFN- γ 는 82.4 ± 77.4 pg/mL, IL-2는 169.0 ± 222.1 pg/mL, TNF- α 는 111.9 ± 97.4 pg/mL의 발현을 보였다. 감염군 내 정수물과 알칼리환원수 급이군 간에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 6).

5. Protein chip을 사용한 Th2 cytokine 발현

대조군의 IL-10는 평균 $3,836.7 \pm 4,049.3$ pg/mL, IL-13는 $9,636.7 \pm 5,793.1$ pg/mL, IL-4는 401.0 ± 219.5 pg/mL, IL-5는 $1,839.1 \pm 623.2$ pg/mL의 발현을 보였으며, E.h군에서 IL-10는 평균 $1,472.8 \pm 3,158.5$ pg/mL, IL-13는 $4,216.6 \pm 1,910$ pg/mL, IL-4는 134.6 ± 110.8 pg/mL, IL-5는 784.4 ± 432.1 pg/mL의 발현을 보였다. 또한 ERW+E.h군에서 IL-10는 평균 $1,640.4 \pm 2,334.8$ pg/mL, IL-13는 $3,764.7 \pm 3,059.7$ pg/mL, IL-4는 179.7 ± 188.7 pg/mL, IL-5는 969.6 ± 787.4

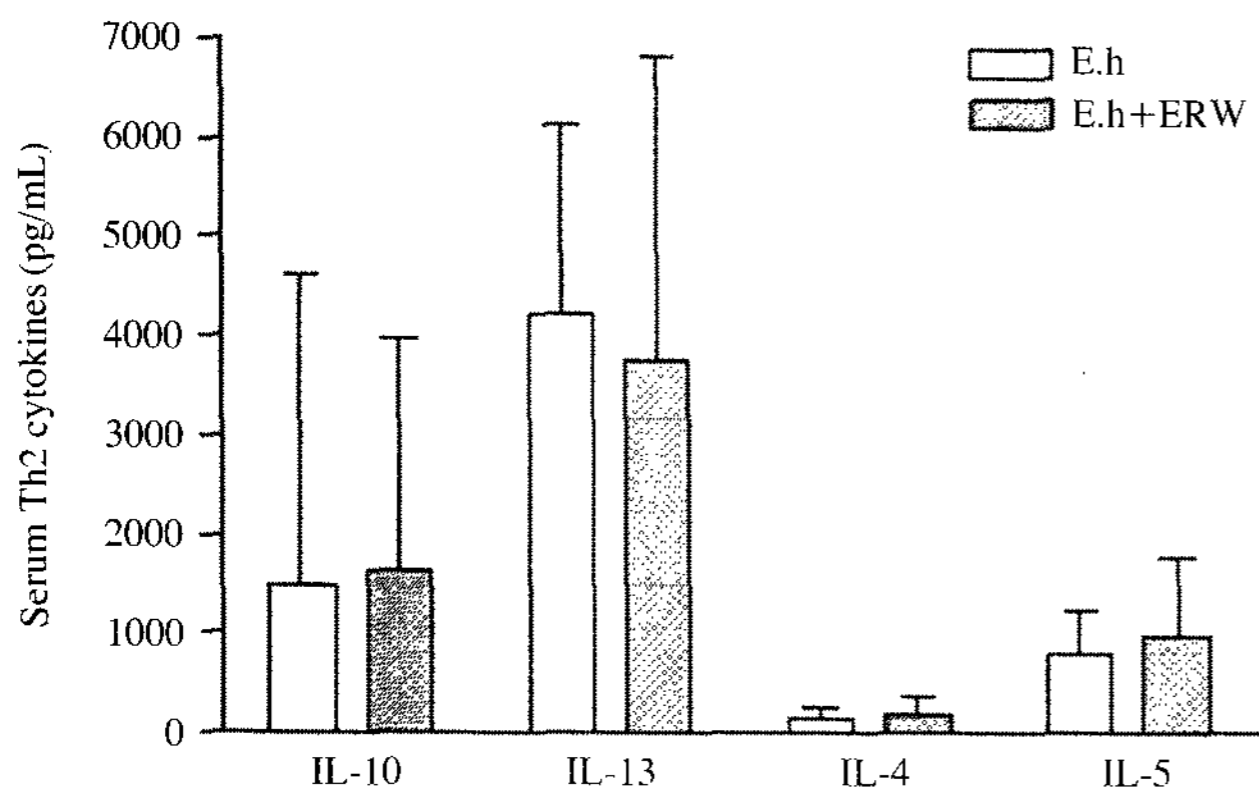


Fig. 7. Expression of Th2 cytokines in the C57BL/6 mouse serum.

pg/mL의 발현을 보였다. E.h군과 ERW+E.h군에서의 Th2 cytokine 역시 두 군 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 7).

고 찰

C57BL/6 생쥐에 호르텐스극구흡충을 감염시키고 알칼리 환원수가 충체배출에 주는 영향을 조사하였다. 호르텐스극구흡충을 14일간 감염시킨 후 장 내 성충을 회수하였는데 그 결과 일반정수 급이한 대조군에 비해 알칼리환원수를 급이한 군에서 성충이 더 많이 회수되었다. 이는 알칼리환원수가 충체배출을 억제했을 가능성을 나타내는 결과이며, 조직의 면역세포 또한 같은 결과를 나타내었다. 호르텐스극구흡충 피낭유충을 경구감염시킨 2주 후 소장점막조직을 lectin 조직화학염색법으로 배상세포의 변화를 관찰한 결과 E.h+ERW군에서 배상세포의 수가 정수물을 급이한 감염군에 비해 유의하게 적게 나타났다($p < 0.001$). 또한 비만세포 표면에는 c-kit 유전자 산물인 CD117분자가 있으므로 anti-CD117 IgG 항체가 면역조직화학법으로 비만세포를 관찰하는 데 사용되고 있다. 본 실험에서 ERW가 호르텐스극구흡충에 감염된 생쥐의 소장점막비만세포에 주는 반응을 관찰하기 위해 anti-CD117 IgG 항체를 사용하여 소장조직을 면역조직염색하였다. 그 결과 ERW+E.h군에서 비만세포의 수가 정수물을 급이한 감염군에 비해 유의하게 적게 나타났다($p < 0.001$). 이 결과 역시 ERW가 호르텐스극구흡충 감염된 장 내에서 소장점막에 있는 비만세포의 수를 감소시키며 이를 통해 충체배출을 지연하였음을 나타내는 자료이다.

기생충감염과 면역의 연구에서 기생충종류에 따라서 감염된 숙주가 나타내는 면역반응은 크게 두 가지로 나뉘어진다. 즉 세포 내에 기생하는 기생충으로 인한 감염 때에는 주로 Th1 형의 cytokine이 우세하게 발현하고(Skeiky et al.,

1995; Camargo et al., 1997), 세포 외에 기생하는 기생충 감염 때에는 주로 Th2 형의 cytokine이 우세하게 발현되는 것으로 알려져 있다(Finkelman et al., 2000). 또한 장 내 선충류나 흡충류 등의 감염에서도 주로 Th2 반응이 우세하며 아울러 Th2 형의 cytokine이 충체배출을 위한 장점막조직의 배상세포와 비만세포의 수를 증가시키고 또 배상세포의 mucin 분비의 증가를 유도한다(Garside et al., 1992). Khan et al. (2003) 연구에 의하면 선충류인 선모충(*Trichinella spiralis*)을 생쥐에 감염시킨 후 면역반응을 Th1쪽으로 기울게 하는 IL-12를 투여하면 충체배출을 감소시키고 따라서 장점막 배상세포의 수도 적게 나타났다고 보고하였다. 이는 장 내 기생충이 감염되었을 때 면역반응이 Th1쪽으로 기울게 되면 충체배출이 억제되며 충체배출에서 가장 중요한 역할을 하고 있는 배상세포의 수도 적어진다는 것을 알 수 있다. 본 연구의 결과에서 알칼리환원수를 급이한 군이 일반 정수물을 급이한 군에 비해 배상세포와 비만세포의 수 및 mucin terminal sugar의 변화가 감소하였고 이로 인해 충체배출이 적은 것으로 판단되고 있다. 이는 알칼리환원수를 호르텐스극구흡충에 감염된 마우스의 면역반응을 Th1쪽으로 기울게 한 것으로 추측되게 한다. 그러나 본 연구에서 확인된 혈청 내 Th1과 Th2 cytokine의 발현 결과는 두 그룹 간의 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 알칼리환원수가 생쥐의 면역반응에 영향을 미치지 않았음을 나타내는 지표라고 생각된다. 소장점막 배상세포 수의 차이가 나타난 것에 대한 명확한 기전에 대해 정확히 알 수 없지만 알칼리환원수가 장점막 층에 직접 영향을 미쳤을 것으로 판단된다. 알칼리환원수가 장점막 국소면역반응에 조절 작용을 하여 소장점막 국소면역반응을 Th1쪽으로 기울어지게 하거나 Th2 반응을 억제하여 점막조직의 배상세포와 비만세포의 증가와 mucin의 변화를 정상감염 때보다 낮게 유도하였으나 그 영향이 생쥐 체 내 전반 면역계에까지는 미치지 못한 것으로 판단된다.

최근까지의 연구에서도 다양한 알칼리환원수의 효과에 비하여 그 기전과 생체 내 작용에 대하여는 학문적으로 알려진 바가 적다. 이 연구의 결과에서 전해알칼리환원수가 장 내의 면역에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었으며 특정 성분을 포함하지 않으면서 산도나 환원력 같은 물의 성상 변화에 의하여 동물의 장 내 면역에 영향을 끼친 것으로 이해되어진다. 오랜 기간 동안 전해알칼리환원수는 장 내의 이상발효와도 관련되어 효과를 나타내고 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 당뇨병에도 효과가 있는 것으로 확인되고 있으며 아직까지 학문적인 검증은 부족하나 아토피성피부염의 증상개선과 치료에도 효과가 있는 것으로 개인적인 경험을 통하여 확인되고 있다. 이러한 효과의 기전에는 특정 면역반응이 관계되어 있을 것으로 추측된다.

본 연구와 전해알칼리환원수의 특성을 관찰하여 보면 두

가지 가설로 결과를 해석할 수 있으며 일정부분 Th2 면역을 억제하는 경향이 있는 것으로 판단되어진다. 우선적으로 전해알칼리환원수의 어떠한 성상이 장점막에 직접적으로 작용하여 비만세포와 배상세포에 영향을 미쳐 충체배출에 관여하였다는 것이다. 이 가설은 전해알칼리환원수가 전체적인 면역반응에 관여하기 보다는 물이 접촉하는 소장점막에 작용하여 나타난 직접적인 결과로 이해할 수 있다. 그러나 전해알칼리환원수의 응용과도 관계되어 알려져 있는 아토피성피부염과 같은 면역질환에서의 효과 등과 관계되어 판단한다면 국소면역 외에도 전체적인 체 내의 면역에 영향을 미칠 수도 있을 것으로 판단되어진다. 이번 연구에서 감염군들 사이에서 혈중 사이토카인의 변화가 관찰되지는 않았으나 소화기관을 경유하여 흡수되는 과정에서 전체적인 면역에 영향을 미칠 수 있고 이의 일부 결과로 장점막의 면역세포의 변화가 관찰되었을 수도 있을 것으로 판단되어진다. 또한 본 연구의 결과와 상관된 알칼리환원수의 생체 내 면역반응과 장 내면역에 미치는 영향은 전해알칼리환원수의 효과에 대한 기전 규명과 함께 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Ahn YK, Ryang YS, Chung PR, Lee KT: *Echinostoma hortense* metacercariae naturally encysted in *Odontobutis obscura interrupta* (a freshwater fish) and experimental infection to rats. *Kisaengchunghak Chapchi* 23(2) : 230-235, 1985.
- Barrett KE, Neva FA, Gam AA, Cicmanec J, London WT, Phillips JM, Metcalfe DD: The immune response to nematode parasites: modulation of mast cell numbers and function during *Strongyloides stercoralis* infections in nonhuman primates. *Am J Trop Med Hyg* 38(3) : 574-581, 1988.
- Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Gazzinelli RT: Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol* 158 : 5890-5901, 1997.
- Carroll SM, Mayrhofer G, Dawkins HJ, Grove DI: Kinetics of intestinal lamina propria mast cells, globule leucocytes, intraepithelial lymphocytes, goblet cells and eosinophils in murine strongyloidiasis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 74(4) : 311-317, 1984.
- Chai JY, Kim TH, Kho WG, Chung SW, Hong ST, Lee SH: Mucosal mast cell responses to experimental *Metagonimus yokogawai* infection in rats. *Korean J Parasitol* 31 : 129-134, 1993.
- Crowle PK, Reed ND: Rejection of the intestinal parasite *Nippostrongylus brasiliensis* by mast cell-deficient W/W^v anemic mice. *Infect Immun* 33(1) : 54-58, 1981.
- Fallon PG, Smith P, Richardson EJ, Jones FJ, Faulkner HC, Van Snick J, Renauld JC, Grecis RK, Dunne DW: Expression of interleukin-9 leads to Th2 cytokine-dominated responses and fatal enteropathy in mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Infect Immun* 68 : 6005-6011, 2000.
- Finkelman FD, Morris SC, Orekhova T, Mori M, Donaldson D, Reiner SL, Reilly NL, Schopf L, Urban JF Jr: Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 164(5) : 2303-2310, 2000.
- Fujino T, Fried B, Tada I: The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: worm kinetics and intestinal cytopathology in conventional and congenitally athymic BALB/c mice. *Parasitology* 106(Pt3) : 297-304, 1993.
- Garside P, Grecis RK, Mowat AM: T lymphocyte dependent enteropathy in murine *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol* 14 : 217-225, 1992.
- Grecis RK, Hultner L, Else KJ: Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunology* 74(2) : 329-332, 1991.
- Hanaoka K: Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride. *J Applied Electrochem* 31 : 1307-1313, 2001.
- Harari Y, Russell DA, Castro GA: Anaphylaxis-mediated epithelial Cl-secretion and parasite rejection in rat intestine. *J Immunol* 138(4) : 1250-1255, 1987.
- Huang KC, Yang CC, Lee KT, Chien CT: Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. *Kidney Int* 64 : 704-714, 2003.
- Ishikawa N, Wakelin D, Mahida YR: Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 113 : 542-549, 1997.
- Khan WI, Abe T, Ishikawa N, Nawa Y, Yoshimura K: Reduced amount of intestinal mucus by treatment with anti-CD4 antibody interferes with the spontaneous cure of *Nippostrongylus brasiliensis*-infection in mice. *Parasite Immunol* 17: 485-491, 1995.
- Khan WI, Richard M, Akiho H, Blennerhasset PA, Humphreys NE, Grecis RK, Van Snick J, Collins SM: Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect Immun* 71(5) : 2430-2438, 2003.
- Kim JM, Yokoyama K: Effects of alkaline ionized water on spontaneously diabetic GK-rats fed sucrose. *Korean J Lab Anim Sci* 13 : 187-190, 1997.
- Lee SK, Chung NS, Ko IH, Ko HI, Sohn WM: A case of natural human infection by *Echinostoma cinetorchis*. *Kisaengchunghak Chapchi* 26 : 61-64, 1988.
- Li J, Scott P, Farrell JP: In vivo alterations in cytokine production following interleukin-12 (IL-12) and anti-IL-4 antibody treatment of CB6F1 mice with chronic cutaneous Leishaniasis. *Infect Immun* 64 : 5248-5254, 1996.
- Perdue MH, Marshall J, Masson S: Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum, Involvement of mast cells and nerves.

- Gastroenterology 98(3) : 561-567, 1990.
- Ryang YS: Studies on *Echinostoma* spp. in the Chungju reservoir and upper streams of the Namhan River. Kisaengchunghak Chapchi 28(4) : 221-234, 1990.
- Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R: In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. Biochem Biophys Res Commun 276(2) : 767-772, 2000.
- Seo BS, Hong ST, Chai JY, Lee SH: Studies on intestinal trematodes in Korea: VIII. A human case of *Echinostoma hortense* Infection. Kisaengchunghak Chapchi 21(2) : 219-223, 1983.
- Seo BS, Lee SH, Chai JY, Hong SJ: Studies on intestinal trematodes in Korea XX. four cases of natural human infection by *Echinochasmus japonicus*. Kisaengchunghak Chapchi 23(2) : 214-220, 1985.
- Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaro R, Trinchieri G, Reed SG: A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. J Exp Med 181 : 1527-1537, 1995.
- Wakelin D, Rose ME, Hesketh P, Else KJ, Grecis RK: Immunity to coccidiosis: genetic influences on lymphocyte and cytokine responses to infection with *Eimeria vermiformis* in inbred mice. Parasite Immunol 15(1) : 11-19, 1993.

< 국문초록 >

전해알칼리환원수가 동물의 면역에 미치는 영향을 알아보고자 본 실험을 수행하였다. 소장에서 기생하는 호르텐스극구흡충(*Echinostoma hortense*)을 이용하여 C57BL/6 생쥐 소장과 혈액에서의 면역반응을 관찰하였다.

C57BL/6 생쥐에 호르텐스극구흡충 피낭유충을 마리 당 15개 경구감염 시킨 후 2주 경과하여 충체를 회수하였고 소장 점막의 배상세포와 비만세포의 변화를 관찰하였으며 protein chip을 이용하여 혈청 내 cytokine의 변화를 비교 확인하였다. 그 결과 호르텐스극구흡충을 감염시킨 군에서는 평균 8.3마리, 알칼리환원수를 급이한 군에서는 평균 10마리의 충체를 회수하였다. 배상세포 변화의 관찰에서는 호르텐스극구흡충을 감염시키고 전해알칼리환원수를 급이한 실험군이 용모 당 평균 4.3개 관찰되어 배상세포의 발현이 적은 것으로($p < 0.001$) 나타났다. 비만세포 변화의 관찰에서도 호르텐스극구흡충을 감염시키고 전해알칼리환원수를 급이한 실험군에서 용모 당 평균 11개 관찰되었고 정수물을 급이한 호르텐스 감염 대조군에 비해 적게 나타났다($p < 0.001$).

마우스 혈청 내에서의 cytokine 발현에서 호르텐스극구흡충에 감염된 실험군과 대조군의 비교에서 Th1 cytokine인 IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-2 등과 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등의 발현은 모두 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 본 연구에서 전기분해 알칼리환원수가 호르텐스극구흡충의 감염에 있어 C57BL/6 마우스에서 장점막조직의 배상세포 수 및 mucin terminal sugar의 변화를 억제하고 아울러 이로 인해 충체배출이 지연되며, 알칼리환원수가 호르텐스극구흡충에 감염된 C57BL/6 마우스에서 혈청 내 cytokine의 변화에는 큰 영향을 미치지 않는다는 결론을 얻었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Microphotographs of *Echinostoma hortense* adult worm in carmine stain. A: E.h group, B: E.h+ERW group.
- Fig. 2.** Microphotographs of intestinal duodenum villi showing goblet cell(arrows) in *Echinostoma hortense* infected C57BL/6mice. Lectin staining was performed to identify goblet cell in duodenum villi. A: Control group, B: E.h group infected group, C: E.h+ERW group.
- Fig. 4.** Microphotographs of intestinal duodenum villi showing mast cell in *E. hortense* infected C57BL/6mice. Immunohistochemical staining of CD117 in intestinal duodenum villi. A, C and E: toluidine blue staining, B, D and F: immunohistochemical staining for anti-CD117. The mast cells showed brown color. A and B: Control group, C and D: E.h group infected group, E and F: E.h+ERW group.

