

## 키토산이 Th1과 Th2 사이토카인 생성에 미치는 효과

김 광 혁\*

고신대학교 의과대학 의과학연구소, 미생물학교실

Received February 6, 2009 / Accepted March 9, 2009

**Effects of Chitosan on the Production of Th1 and Th2 Cytokines in Mice.** Kwang Hyuk Kim\*. *Department of Microbiology, Institute for Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan 602-703, Korea* - Chitosan is derived from chitin by a process of controlled deacetylation. In the present study, we investigated the effects of chitosan on the production of cytokines such as interleukin-2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin-4 (IL-4), and interleukin-10 (IL-10) in mice. The culture supernatants of splenocytes exposed with chitosan alone or chitosan plus cell stimulants, lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A (Con A), and phytohemagglutinin-P (PHA-P) were harvested to assay IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 production. IL-2, IFN- $\gamma$ , and IL-4 from splenocytes exposed to chitosan showed a greater increase compared to the PBS control group. IL-2 and IFN- $\gamma$  levels in the culture supernatants from splenocytes exposed to LPS+chitosan were higher than those of the groups exposed to LPS alone. IL-4 and IL-10 levels in the culture supernatants from splenocytes exposed to LPS+chitosan were lower than those of the groups exposed to LPS only. These findings demonstrate that chitosan upregulates the immune responses by Th1 cytokines (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) and downregulates those by Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) in LPS-associated immunity. These results show the potential of its usefulness for balancing the Th1/Th2 immune response, if more research results were accumulated.

**Key words** : Chitosan, cytokine, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, mice

### 서 론

키틴과 키토산은 자연에 풍부하게 존재하는 다당류이며 acetylglucosamine과 glucosamine을 함유하는 중합체이다. 키틴은 게, 새우 등의 갑각류 껍질, 연체류의 껍질과 근육, 곤충류, 버섯류, 그리고 일부 미생물의 세포벽 등에 널리 분포하고 있으며 알칼리 가수분해 되어 키토산으로 바뀐다[12]. 키토산이 식품에 첨가되었을 때 음식에 포함된 지질과의 결합능으로 인하여 키토산은 혈장내의 콜레스테롤과 트리글리세리드를 낮추는 효과를 보인다[12]. 키토산의 항균작용은 직접 적용되었을 때 상처부위의 감염을 차단하는 데에 이용되기도 하며 [6,7,20,21,23] 면역반응을 증가시킴으로서 항암활성을 나타내기도 한다[3-5,8-11,16-19,22,24,28].

T세포중의 T helper (Th) 세포에는 Th1세포와 Th2세포가 있으며 Th1 세포는 interleukin-2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 등의 사이토카인을, Th2 세포는 interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) 등을 주로 생성한다. 전자들은 지연형 과민반응에 깊게 관여하고 후자들은 항체생성에 관여한다. Th1 세포와 Th2 세포는 서로 배타적으로 작용하며 면역반응에서 이들이 생성하는 사이토카인이 중요한 역할을 담당하게 된다[15].

IL-2는 세포독성을 나타내는 T림프구를 상당기간 성장 유

지시킬 수 있기 때문에 림프구배양액에 존재하는 T세포성장인자(T cell growth factor, TCGF)로 불리었다. 그 후 유전자 재조합으로 만든 IL-2를 이용하여 T세포를 비롯하여 자연살해세포(natural killer cell, NK cell), lymphocyte-activated killer (LAK)세포, B세포성장인자, 단구계열세포의 자극인자 등의 활성을 보인다는 것이 밝혀지게 되었다[15].

IFN- $\gamma$ 는 산에 불안정한 인터페론인 II형 인터페론으로서 산에 안정된 인터페론인 I형 인터페론과는 구분되며 I형 인터페론은  $\alpha$ 와  $\beta$ 가 포함된다. IFN- $\gamma$ 의 생성은 T세포와 NK세포가 미토콘드리아, 항체, 혹은 항원에 의해서 자극을 받음으로서 나타난다. IFN- $\gamma$ 는 MHC항원 발현, 대식세포활성화, NK세포활성화, IgG 아이소타이프의 조절, 항바이러스활성, nitric oxide synthase (NOS) 유도 등에 관여한다[15].

IL-4는 B림프구의 DNA합성을 자극할 수 있는 분자로 동정됨으로서 B 세포성장인자(B cell growth factor, BCGF)로 명명되었으나 IL-4분자가 휴지상태의 B세포의 MHC class II분자의 발현을 증가시킴이 발견되어 B세포자극인자-1(B cell stimulatory factor-1, BCF-1)로서 제의되기도 하였다. IL-4는 주로 T림프구, 비만세포, 호염기성세포에서 생성된다. IL-4는 B세포에서 여러 가지 표면분자발현, B세포증식, B세포분화, T세포활성의 조절 등의 다양한 활성을 보인다[15].

IL-10은 Th2 세포에서 생성되어 Th1 세포의 사이토카인 생성을 방해한다. 그래서 초기에는 이 분자를 사이토카인생성억제인자(cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF)라 하였다. 그러나 유전자 재조합 IL-10에 의해서 다양한 활성들이

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-990-6422, Fax : +82-51-990-3081

E-mail : ghkim@ns.kosinmed.or.kr

추가로 밝혀지게 되었다. IL-10은 Th2 세포, 대식세포, 활성화T세포, 비만세포 등 비교적 여러 세포들에서 생성되고 있다. 기능 또한 여러 가지 억제성활성과 자극성활성을 보여주고 있다[15].

본 연구에서는 키토산이 면역세포에 미치는 효과를 보기 위하여 마우스 비장세포에 키토산을 작용시켰을 때 Th1 사이토카인인 IL-2와 IFN- $\gamma$ , 그리고 Th2 사이토카인인 IL-4와 IL-10의 생성을 알아보려고 하였다. 또한 lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A (Con A), phytohemagglutinin P (PHA-P)와 같은 세포자극물과 키토산의 중복 노출에 따른 이들 사이토카인의 생성의 변화를 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물과 시약

암컷 Balb/C 마우스로서 생후 8주 내외, 체중 25 g 내외의 것을 대한바이오링크(충청북도 음성군)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 키토산은 수용성 고분자 키토산(우리바이오텍사, 경기도 포천)을 사용하였고, LPS는 *Escherichia coli* (serotype 026:B6)에서 분리 정제된 표준품(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo, USA)을 사용하였고 Con A는 Pharmacia사 제품(Pharmacia Fine Chemicals, Code 17-0450-01, Sweden)을, PHA-P는 CSL사 제품(CSL, Cat. 7471001, Australia)을 사용하였다. IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10을 측정하기 위한 시약은 Mouse IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)을 이용하였다.

### 비장세포배양 상층액

비장세포배양 상층액 준비는 미리 준비된 비장세포 부유액을 10% 가 되게 소 태아혈청을 가한 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 ml 당  $2 \times 10^6$  세포가 되도록 조절하여, 24 wells tissue culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에 1 ml 씩 분주한 후 키토산 3.0, 10.0, 30.0  $\mu\text{g}$ 을 각각 작용시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 또한 LPS 2.0  $\mu\text{g}$ 이나 Con A 2.0  $\mu\text{g}$  혹은 PHA-P 1.0  $\mu\text{g}$ 과의 복합작용도 함께 시험하였다. 대조군은 PBS액을 사용하였다. 배양시간은 상기의 조건에 24시간과 72시간으로 하였다. 배양이 끝난 후 전량 배양액을 수거한 다음 300 $\times$  g에서 10분간, 10,000 $\times$  g에서 30분간 원침 시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70°C에 보관하였다.

### IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 측정

미리 96 wells microplate에 mouse IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10에 대한 capture 항체를 coating buffer에 희석하여 100  $\mu\text{l}$  씩을 분주한 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 다음 날 plate를 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 assay diluent 250  $\mu\text{l}$  씩을 분주한

후 실온에서 1시간동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 plate의 각 well에 시료 100  $\mu\text{l}$  씩을 적하하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 이때 시료는 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 경우에는 72시간 배양 상층액을, IL-4와 IL-10의 경우에는 24시간 배양 상층액을 적용하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 detection 항체 100  $\mu\text{l}$  씩을 분주한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 avidin-horse-radish peroxidase 액 100  $\mu\text{l}$  씩을 적하하여 다시 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세척용 완충액으로 7번 세척한 후 tetramethylbenzidine이 포함된 기질액 100  $\mu\text{l}$  씩을 적하하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 stop액 50  $\mu\text{l}$  씩을 가하여 반응을 정지시켰다. Optical density는 microplate reader (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

### 통계학적 분석

실험성적은 평균 또는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냈으며 각 군간의 통계학적 검정에는 Student's t-test를 사용하고 P값이 0.05 미만일 때 유의 있는 차로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 키토산에 의한 IL-2 생성의 변화

정상마우스의 비장에서 분리된 세포부유액에 키토산을 작용시켰을 때 생성되는 IL-2의 양을 측정하였다. 키토산, 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 작용시켰을 때 IL-2가 127.52 pg/ml로 대조군의 114.57 pg/ml 보다 높게 나타나 유의한 증가효과를 보였으며, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 작용시켰을 때는 80.28 pg/ml을 나타내어 유의한 감소효과를 나타냈고 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 작용시켰을 때에도 89.04 pg/ml을 나타내어 유의한 감소효과를 나타냈다(Fig. 1). 마우스 비장세포에 LPS를 2.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-2의 생성은 198.74 pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 큰 상승을 보였으며 LPS 2.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 247.15 pg/ml으로 나타나 LPS 단독 작용시보다 유의하게 증가하였다(Table 1). 마우스 비장세포에 Con A를 2.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-2의 생성은 297.76 pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 큰 증가를 보였으며 Con A 2.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 287.83 pg/ml으로 나타나 Con A 단독 작용시와 유사하였다(Table 2). 마우스 비장세포에 PHA-P를 1.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-2의 생성은 71.65 pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 감소를 보였으며 PHA-P 1.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 105.90 pg/ml으로 나타나 PHA-P 단독 작용시보다 유의하게 증가하였다(Table 3). 따라서 정상 비장세포가 배지속의 성분들에 의해서도 자극을 받아 IL-2의 생성을 유도하였으며 배지 속에 키토산을 작용시켰을 시 낮은 농도에서 IL-2의 생성이 증가됨을 알 수 있고

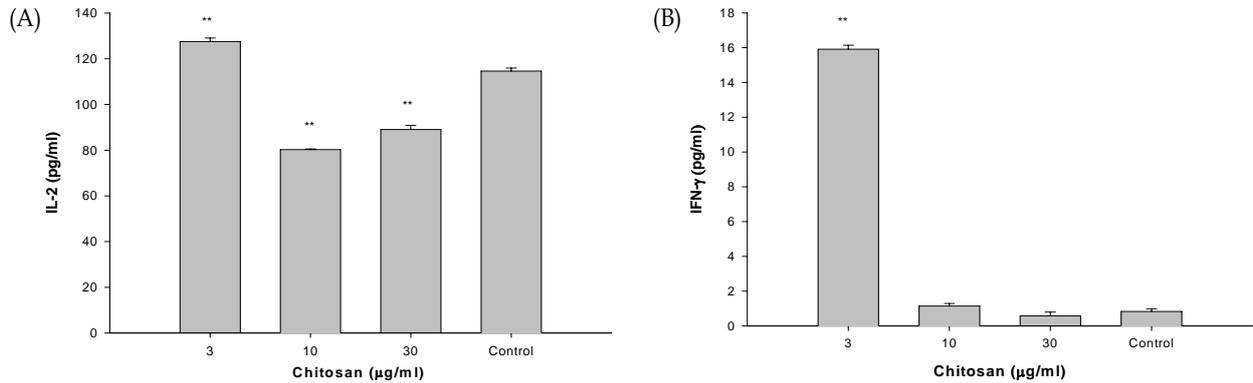


Fig. 1. Production of IL-2 (A) and IFN- $\gamma$  (B) by mice splenocytes exposed to chitosan. Splenocytes were cultivated with 3.0, 10.0, 30.0  $\mu\text{g}$  for 72 hr respectively. Control was exposed to PBS. Data shown are mean $\pm$ SD. \*\* $p$ <0.01 compared to the PBS control.

Table 1. Production of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 in mice splenocytes exposed to LPS and chitosan

	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Chitosan	80.28 $\pm$ 0.28	1.15 $\pm$ 0.15	0.28 $\pm$ 0.09	ND
LPS	198.74 $\pm$ 4.00	125.83 $\pm$ 0.45	0.51 $\pm$ 0.23	3.07 $\pm$ 0.40
LPS+Chitosan	247.15 $\pm$ 7.44**	153.42 $\pm$ 2.73**	0.17 $\pm$ 0.08	2.51 $\pm$ 0.40
Control	114.57 $\pm$ 1.38	0.84 $\pm$ 0.15	0.23 $\pm$ 0.16	ND

Splenocytes were cultivated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of chitosan and 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of lipopolysaccharide (LPS) for 24 (for IL-4 and IL-10) or 72 (for IL-2 and IFN- $\gamma$ ) hr. Control was exposed to PBS. Culture supernatants were harvested. Data shown are Mean $\pm$ SD. ND, not detected. \*\* $P$ <0.01 compared to the LPS group.

Table 2. Production of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 in mice splenocytes exposed to Con A and chitosan

	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Chitosan	80.28 $\pm$ 0.28	1.15 $\pm$ 0.15	0.28 $\pm$ 0.09	ND
Con A	297.76 $\pm$ 6.55	318.42 $\pm$ 0.45	55.47 $\pm$ 3.88	4.19 $\pm$ 0.39
Con A+Chitosan	287.83 $\pm$ 0.21	319.10 $\pm$ 0.07	54.25 $\pm$ 2.90	5.30 $\pm$ 0.40*
Control	114.57 $\pm$ 1.38	0.84 $\pm$ 0.15	0.23 $\pm$ 0.16	ND

Splenocytes were cultivated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of chitosan and 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of concanavalin A (Con A) for 24 (for IL-4 and IL-10) or 72 (for IL-2 and IFN- $\gamma$ ) hr. Control was exposed to PBS. Culture supernatants were harvested. Data shown are Mean $\pm$ SD. ND, not detected. \* $P$ <0.05 compared to the Con A group.

Table 3. Production of IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 in mice splenocytes exposed to PHA-P and chitosan

	IL-2 (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
Chitosan	80.28 $\pm$ 0.28	1.15 $\pm$ 0.15	0.28 $\pm$ 0.09	ND
PHA-P	71.65 $\pm$ 1.73	0.63 $\pm$ 0.15	0.40 $\pm$ 0.08	ND
PHA-P+Chitosan	105.90 $\pm$ 4.41**	1.93 $\pm$ 0.07**	0.17 $\pm$ 0.08	ND
Control	114.57 $\pm$ 1.38	0.84 $\pm$ 0.15	0.23 $\pm$ 0.16	ND

Splenocytes were cultivated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of chitosan and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of phytohemagglutinin-P (PHA-P) for 24 (for IL-4 and IL-10) or 72 (for IL-2 and IFN- $\gamma$ ) hr. Control was exposed to PBS. Culture supernatants were harvested. Data shown are Mean $\pm$ SD. ND, not detected. \*\* $P$ <0.01 compared to the PHA-P group.

키토산의 농도를 증가시켰을 때는 그 생성이 억제되었다. 세균독소인 LPS를 비장세포에 작용시켰을 때는 예상대로 IL-2의 생성이 크게 증가함을 볼 수 있었고 LPS와 키토산을 함께 작용시키면 IL-2의 생성은 더욱 증가됨을 알 수 있다. 그러나

Con A의 경우에는 키토산에 의해서 변화를 보이지 않았으나 PHA-P의 경우에는 키토산에 의해서 IL-2의 생성이 증가됨을 알 수 있었다. 즉, 자극물의 종류에 따른 차이로 보여진다. 이러한 결과는 Baek 등[2]이 시도한 연구 결과와도 유사점을

보인다. 즉, 임상시험으로서 사람에게 키토산을 8주 동안 투여한 후 혈청 내에서의 IL-2를 측정하였을 때 증가를 보였으나 다른 생화학적 수치는 유의한 변화를 보이지 않아 안전성 면에서 아무런 문제가 발생되지 않았음을 보고하였다. Akbuga 등[1]은 IL-2를 발현하는 플라스미드가 키토산이 추가됨으로써 IL-2생성이 증가됨을 보고하였고 Li 등[13]은 마우스의 실험에서 키토산 나노입자가 포함된 시료의 투여에 의해서 마우스 IL-2 유전자 발현이 증가되고 면역 수준이 올라가 대장균 감염에 대한 저항성이 증가될 수 있음을 보고하였다. 키토산에 의한 Th1 사이토카인인 IL-2 생성의 증가는 IL-2와 관련을 갖는 대식세포나 자연살해세포 등의 성장과 활성화에 지대한 영향을 미칠 것으로 생각된다.

키토산에 의한 IFN- $\gamma$  생성의 변화

비장세포부유액에 키토산을 작용시켰을 때 생성되는 IFN- $\gamma$ 의 양을 측정하였다. 키토산, 3  $\mu\text{g/ml}$ 을 작용시켰을 때 IFN- $\gamma$ 가 15.91  $\text{pg/ml}$ 로 대조군의 0.84  $\text{pg/ml}$  보다 높게 나타나 유의한 증가효과를 보였으며, 10  $\mu\text{g/ml}$ 을 작용시켰을 때는 1.15  $\text{pg/ml}$ 을 나타내었고 30  $\mu\text{g/ml}$ 을 작용시켰을 때에도 0.58  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군보다 감소하였다(Fig. 1). 마우스 비장세포에 LPS를 2.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IFN- $\gamma$ 의 생성은 125.83  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군에 비하여 큰 상승을 보였으며 LPS 2.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 153.42  $\text{pg/ml}$ 으로 나타나 LPS 단독 작용시보다 유의하게 증가하였다(Table 1). 마우스 비장세포에 Con A를 2.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IFN- $\gamma$ 의 생성은 318.42  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군에 비하여 큰 증가를 보였으며 Con A 2.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 319.10  $\text{pg/ml}$ 으로 나타나 Con A 단독 작용시와 유사하였다(Table 2). 마우스 비장세포에 PHA-P를 1.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IFN- $\gamma$ 의 생성은 0.63  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군에 비하여 감소를 보였으며 PHA-P 1.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 1.93  $\text{pg/ml}$ 으로 나타나 PHA-P 단독 작용시보다 유의하게 증가하였다(Table 3). 따라서 배지 속에 키토산을 작용시켰을 시 높은 농도에서 보다 낮은 농도에서 IFN- $\gamma$ 의 생성이 증가됨을 알 수 있다. 세균독소인 LPS를 비장세포에 작용시켰을 때는 IFN- $\gamma$ 의 생성이 크게 증가함을 볼 수 있었고 LPS와 키토산을 함께 작용시키면 IFN- $\gamma$ 의 생성은 더욱 증가됨을 알 수 있다. Con A의 경우에는 IFN- $\gamma$  생성의 가장 큰 상승을 보였으나 키토산의 추가 효과는 나타나지 않았다. PHA-P의 경우에는 IFN- $\gamma$ 의 생성이 대조군보다 감소하였지만 키토산에 의해서 IFN- $\gamma$ 의 생성이 증가됨을 알 수 있었다. Xie 등[27]도 마우스 위점막에서 키토산이 항 헬리코박터 작용을 보이며 IFN- $\gamma$  등의 사이토카인을 유의하게 증가시켜 Th1 반응을 상승시킬 수 있음을 보고하였다. 키토산에 의한 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$  생성의 증가는 IFN- $\gamma$  관련 면역 반응을 증강시킬 것으로 보인다.

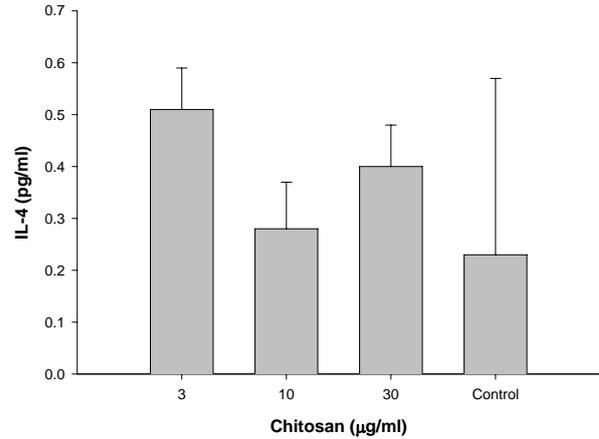


Fig. 2. Production of IL-4 by mice splenocytes exposed to chitosan. Splenocytes were cultivated with 3.0, 10.0, 30.0  $\mu\text{g}$  for 24 hr respectively. Control was exposed to PBS. Data shown are mean $\pm$ SD.

키토산에 의한 IL-4 생성의 변화

비장세포부유액에 키토산을 작용시켰을 때 생성되는 IL-4의 양을 측정하였다. 키토산, 3  $\mu\text{g/ml}$ 을 작용시켰을 때 IL-4가 0.51  $\text{pg/ml}$ 로 대조군의 0.23  $\text{pg/ml}$  보다 높게 나타났으며, 10  $\mu\text{g/ml}$ 을 작용시켰을 때는 0.28  $\text{pg/ml}$ 을 나타내었고 30  $\mu\text{g/ml}$ 을 작용시켰을 때에도 0.40  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군보다는 증가하였다(Fig. 2). 마우스 비장세포에 LPS를 2.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-4의 생성은 0.51  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군보다 높았으며 LPS 2.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 0.17  $\text{pg/ml}$ 으로 나타나 LPS 단독 작용시보다 감소하였다(Table 1). 마우스 비장세포에 Con A를 2.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-4의 생성은 55.47  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군에 비하여 큰 증가를 보였으며 Con A 2.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 54.25  $\text{pg/ml}$ 으로 나타나 Con A 단독 작용시와 유사하였다(Table 2). 마우스 비장세포에 PHA-P를 1.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-4의 생성은 0.40  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군보다 증가하였으며 PHA-P 1.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 0.17  $\text{pg/ml}$ 으로 나타나 PHA-P 단독 작용시보다 감소하였다(Table 3). 따라서 배지 속에 키토산을 작용시켰을 시 높은 농도와 낮은 농도에서 IL-4의 생성이 큰 차이를 보이지 않았다. 세균독소인 LPS를 비장세포에 작용시켰을 때는 IFN- $\gamma$ 의 생성이 크게 증가함을 볼 수 없었고 LPS와 키토산을 함께 작용시키면 IL-4의 생성이 오히려 감소하였다. Con A의 경우에는 IL-4 생성의 가장 큰 상승을 보였으나 키토산의 추가 효과는 나타나지 않았다. PHA-P의 경우에는 IL-4의 생성이 대조군보다 증가하였지만 키토산에 의해서 IL-4의 생성이 감소됨을 알 수 있었다. Xie 등[26]과 Wu 등[25]의 실험이 *in vivo*이긴 하지만 IL-4의 생성이 키토산에 의해서 증가된다는 결과와는 차이를 나타냈다. *in vitro* 실험인 본 실험 결과로서는 IL-4의 생성이 키토산 단독으로 작용되었을 때는 IL-4가 증가

되지만 LPS 등과 같은 자극물과 함께 작용되었을 시 감소되는 것을 보아서는 LPS 관련 Th2 반응이 저하될 가능성이 있다.

#### 키토산에 의한 IL-10 생성의 변화

비장세포부유액에 키토산을 작용시켰을 때 생성되는 IL-10의 양을 측정하였다. 키토산, 3, 10, 30  $\mu\text{g/ml}$ 을 작용시켰을 때 모두 그리고 대조군에서 IL-10이 검출되지 않았다. 마우스 비장세포에 LPS를 2.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-10의 생성은 3.07  $\text{pg/ml}$ 을 나타냈으며 LPS 2.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 2.51  $\text{pg/ml}$ 으로 나타나 LPS 단독 작용시보다 감소하였다(Table 1). 마우스 비장세포에 Con A를 2.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-10의 생성은 4.19  $\text{pg/ml}$ 을 나타내어 대조군에 비하여 증가를 보였으며 Con A 2.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때는 5.30  $\text{pg/ml}$ 으로 나타나 Con A 단독 작용시보다 증가하였다(Table 2). 마우스 비장세포에 PHA-P를 1.0  $\mu\text{g}$ 을 작용시켰을 때 IL-10의 생성은 대조군과 마찬가지로 검출되지 않았으며 PHA-P 1.0  $\mu\text{g}$ 과 키토산 10.0  $\mu\text{g}$ 을 함께 작용시켰을 때에도 검출되지 않았다(Table 3). McNeela 등[14]은 디프테리아 독소를 키토산과 함께 기니아피의 코에 투여하였을 시 키토산에 의해서 Th2 반응이 상승됨을 보고한 바 있으나 이는 실험조건에 따른 차이로 보이며 본 실험의 결과에서는 LPS 등과 같은 자극물과 함께 작용되었을 시 감소되는 것을 보아서는 LPS 관련 Th2 반응이 저하될 가능성이 있다.

#### 요 약

본 연구에서는 키토산이 마우스에서 Th1과 Th2 사이토카인의 생성에 미치는 효과를 보기 위하여 키토산에 의한 IL-2 생성의 변화, 키토산에 의한 IFN- $\gamma$  생성의 변화, 그리고 키토산에 의한 IL-4 생성의 변화, 키토산에 의한 IL-10 생성의 변화를 시험관내에서 시험하였다. 또한 LPS, Con A, PHA-P와 같은 세포자극물과 키토산이 함께 작용되었을 때 상기 사이토카인의 생성의 변화를 관찰하였다. 키토산을 비장세포에 노출시켰을 때 Th1 사이토카인인 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생성이 크게 증가하였지만 고농도의 키토산에 의해서는 오히려 대조군에 비하여 감소하였다. LPS와 같은 세균독소, Con A와 같은 세포자극물을 비장세포에 노출시켰을 때 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생성은 큰 상승을 나타냈으며 LPS의 경우 키토산에 의해서 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생성이 증폭되었다. 키토산을 비장세포에 노출시켰을 때 Th2 사이토카인인 IL-4와 IL-10의 생성은 큰 증가를 보이지 않았다. LPS와 같은 세균독소에 의한 IL-4와 IL-10의 상승이 키토산에 의해서 억제되었다. 따라서 이러한 결과들로 부터 키토산이 LPS와 같은 세균독소가 존재하는 가운데 Th1 사이토카인을 증가시키고 Th2 사이토카인을 감소시킴에 따른 면역반응 환경이 이루어질 가능성이 높다 하겠다. 앞으로 키토산에 대한 더 많은 자료의 축적이 이루어지게 되면 임상에서

Th1/Th2 면역반응의 균형을 유지하는데 이용될 가능성도 있다 하겠다.

#### 감사의 글

본 연구는 고신대학교 의과대학 학술연구비의 지원에 의해 수행되었음(2007).

#### References

1. Akbuga, J., S. Ozbas-Turan, and N. Erdogan. 2004. Plasmid-DNA loaded chitosan microspheres for *in vitro* IL-2 expression. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 501-507.
2. Baek, K. S., E. K. Won, and S. Y. Choung. 2007. Effects of chitosan on serumcytokine levels in elderly subjects. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 1550-1507.
3. Chen, W. R., H. Liu, J. W. Ritchey, K. E. Bartels, M. D. Lucroy, and R. E. Nordquist. 2002. Effect of different components of laser immunotherapy in treatment of metastatic tumors in rats. *Cancer Res.* **62**, 4295-4299.
4. Chung, Y. S., K. H. Kim, Y. K. Jeong, and M. W. Chang. 2004. Effects of chitosan on anti-tumor activity in mice. *J. Life Sci.* **14**, 209-214.
5. Eroglu, M., S. Irmak, A. Acar, and E. B. Denkbass. 2002. Design and evaluation of a mucoadhesive therapeutic agent delivery system for postoperative chemotherapy in superficial bladder cancer. *Int. J. Pharm.* **235**, 51-59.
6. Howling, G. I., P. W. Dettmar, P. A. Goddard, F. C. Hampson, M. Dornish, and E. J. Wood. 2001. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro*. *Biomaterials* **22**, 2959-2966.
7. Iqbal, M., W. Lin, I. Jabbal-Gill, S. S. Davis, M. W. Steward, and L. Illum. 2002. Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice. Article in press. *Vaccine* **3585**, 1-8.
8. Kato, Y., H. Onishi, and Y. Machida. 2002. Efficacy of lactosaminated and intact N-succinyl-chitosan-mitomycin C conjugates against M5076 liver metastatic cancer. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 529-537.
9. Kato, Y., H. Onishi, and Y. Machida. 2001. Lactosaminated and intact N-succinyl-chitosans as drug carriers in liver metastasis. *Int. J. Pharm.* **226**, 93-106.
10. Kimura, Y. and H. Okuda. 1999. Prevention by chitosan of myelotoxicity, gastrointestinal toxicity and immunocompetent organic toxicity induced by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**, 765-774.
11. Kimura, Y., N. Sawai, and H. Okuda. 2001. Antitumor activity and adverse reactions of combined treatment with chitosan and doxorubicin in tumor-bearing mice. *J. Pharmacol.* **53**, 1373-1378.
12. Koide, S. S. 1998. Chitin-chitosan: properties, benefits, and risks. *Nutrition Res.* **18**, 1091-1101.
13. Li, H., R. Gao, M. Wu, M. Fu, K. Wu, Y. Yang, X. Wang,

- Z. Wang, and S. Liu. 2004. Effects of entrapment of murine interleukin-2 gene with chitosan nanoparticles on expression of mL-2 gene and on regulation of immune response in mice. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* **21**, 947-952.
14. McNeela, E. A., D. O'Connor, I. Jabbal-Gill, L. Illum, S. S. Davis, M. Pizza, S. Peppoloni, R. Rappuoli, and K. H. Mills. 2000. A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM(197)) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery. *Vaccine* **19**, 1188-1198.
  15. Mire-Sluis, A. R. and R. Thorpe. 1998. *CYTOKINES*. pp. 19-400, Academic Press. San Diego, California.
  16. Pae, H. O., W. G. Seo, N. Y. Kim, G. S. Oh, G. E. Kim, Y. H. Kim, H. J. Kwak, Y. G. Yun, C. D. Jun, and H. T. Chung. 2001. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leuk. Res.* **25**, 339-346.
  17. Peluso, G., O. Petillo, M. Ranieri, M. Santin, L. Ambrosio, D. Calabro, B. Avallone, and G. Balsamo. 1994. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials* **15**, 1215-1220.
  18. Seferian, P. G. and M. L. Martinez. 2001. Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine* **19**, 661-668.
  19. Shikata, F., H. Tokumitsu, H. Ichikawa, and Y. Fukumori. 2002. *In vitro* cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **53**, 57-63.
  20. Takashi, M., O. Masahiro, M. Mitsunobu, U. Keisuke, T. Seiichi, O. Yoshiharu, M. Sabro, and F. Toru. 1997. Effect of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials* **18**, 947-951.
  21. Ueno, H., T. Mori, and T. Fujinaga. 2001. Topical formulation and wound healing applications of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 105-115.
  22. van der Lubben, I. M., G. Kersten, M. M. Fretz, C. Beuvery, J. C. Verhoef, and H. E. Junginger. 2002. Chitosan micro-particles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. Article in press. *Vaccine* **3600**, 1-9.
  23. van der Lubben, I. M., J. C. Verhoef, G. Borchard, and H. E. Junginger. 2001. Chitosan for mucosal vaccination. 2001. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 139-144.
  24. Westerink, M. A. J., S. L. Smithson, N. Srivastava, J. Blonder, C. Coeshott, and G. J. Rosenthal. 2002. ProJuvant (Pluronic F127 /chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine* **20**, 711-723.
  25. Wu, K. Y., M. Wu, M. L. Fu, H. Li, Y. Yang, H. Zhang, C. Cheng, Z. Z. Wang, X. Y. Wang, X. B. Lu, D. G. Liu, H. Li, and R. Gao. 2006. A novel chitosan CpG nanoparticle regulates cellular and humoral immunity of mice. *Biomed. Environ. Sci.* **19**, 87-95.
  26. Xie, Y., N. J. Zhou, S. Y. Xiong, J. Chen, Y. F. Gong, N. H. Lu, and C. W. Wang. 2007. Anti-helicobacter pylori effect and regulation of T helper response of chitosan. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **46**, 220-223.
  27. Xie, Y., N. J. Zhou, Y. F. Gong, X. J. Zhou, J. Chen, S. J. Hu, N. H. Lu, and X. H. Hou. 2007. Th immune response induced by H pylori vaccine with chitosan as adjuvant and its relation to immune protection. *World J. Gastroenterol.* **13**, 1547-1553.
  28. Yermak, I. M., V. N. Davidova, V. I. Gorvach, P. A. Luk'yanov, T. F. Solov'eva, A. J. Buwitt-Beckman U, E. T. Rietschel, and Y. S. Ovodov. 2005. Forming and immunological properties of some lipopolysaccharide-chitosan complexes. *Biochimie* **88**, 23-30.