인간의 단핵구와 비만세포에서 다양한 아토피 유발물질이 사이토카인 유전자의 발현에 미치는 영향

박경숙·김경준 경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실

Effects of atopic dermatitis induced materials on the expression of cytokine genes in human monocytes and mast cells

Koung-Suk Park · Kyung-Jun Kim

Objectives: On an experimental basis, the effects of atopic dermatitis induced materials on the expression of cytokine genes in human monocytes (THP-1, U937) and mast cells were studied. This study was carried out to be considered a fundamental knowledge in the research on the good of oriental medicine.

Methods: After culturing THP-1, U937, and HMC-1, with the three different concentrations of LPS (1 $\mu g/ml$), DPE (10 $\mu g/ml$), and DNCB (1 $\mu g/ml$), atopic dermatitis induced materials were treated in the culture medium. To investigate cytokine genes expression patterns, with lysis buffer and separation reagent, total RNA was extracted from THP-1, U937, and HMC-1 at intervals of 0, 12, 24, and 48 hours. Both cytokine mRNA expression patterns by atopic dermatitis induced materials and change of cytokine genes expression patterns in relation to atopy by selenium were analyzed with RT-PCR. Also IL-4 and INF- γ , which were secreted in the HMC-1, were analyzed using ELISA method.

- **Results**: 1. After treating THP-1 and U937 with LPS, DPE, and DNCB, there was no significant change in cytokine genes themselves, but various cytokines (IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IFN-γ, IFN-a, MCP-1, B2-MG) were expressed.
 - 2. In the case of HMC-1, the expressions of IL-6 and IL-8 were significantly increased in the analysis of mRNA expression by dust mite allergens in DPE.
 - 3. As a result of ELISA method, it is certain that IL-4 and IFN- γ protein were secreted in the HMC-1 by DPE.
 - 4. Selenium, an essential trace element, decreased the IL-10 and IL-13 expression in the HMC-1 by DPE.

Conclusion: The results suggest that it is necessary to choose proper atopic dermatitis induced materials and suitable cultured cells in establishment of in vitro model of atopic dermatitis.

Key words: RT-PCR, ELISA, mRNA, IL-6, IL-4, IFN-γ

1. 서 론

인간의 혈액에 존재하는 림프구(lymphocyte), 단핵구(monocyte), 비만세포(mast cell) 등은 다양한 면역 반응을 통해 외부로부터 침입하는 세균, 독소, 진균, 바이러스, 이물질 등에 대한 방어기전을 만들어 인체의 항상성을 유지한다. 특히, 염증반응시에는 interleukin (IL)-1β, IL-4, IL-10, IL-13, interferon (INF)-γ, tumor necrosis factor (TNF)-α 등과 같은 다양한 사이토카인(cytokine)을 분비하여 효과적으로 감염 초기의 생체방어기전을 수행한다. 그러나 이러한 사이토카인들이 비정상적으로 과도하게 분비되는 경우에는 알레르기 또는 만성 염증과 같이 오히려 숙주의 손상을 초래할 수 있는 것으로 보고 되고 있다¹⁻⁴).

아토피는 그동안 특정 검사에 의한 진단이 아닌 환자의 문진 상 소견과 임상 증상을 위주로 한 진 단을 하여왔다. 그래서 환자의 객관적인 혹은 주관 적인 증상의 변화를 측정할 수 있는 평가 척도들 이 개발되어 왔고, 그 척도를 아토피 피부엮 진단 의 기준으로 삼아왔다. 임상적으로 아토피피부염은 특징적 증상을 갖고 있으며 주로 소아기에 발생하 고 일부 소수에서 성인기까지 진행한다. 이는 염증 을 동반하는 만성 재발성의 습진성 질환으로 주로 유아기 아토피 피부염이 발생하는 데에는 유적학 적 소인, 환경적 요인, 약리학적 이상, 면역학적 요인 등 여러 가지 인자간의 상호작용이 관여하는 것으로 알려져 있다. 한의학에서 아토피 피부염과 유사한 질환명 및 증상명을 찾아보면 胎斂瘡, 胎 癬, 奶癬, 四彎風, 浸淫瘡 등이 있다. 사만풍이란 사지굴곡부의 소양증을 특징으로 하는 피부 질환 을, 태선이나 내선은 영유아의 수유기에 얼굴에 삼출액이 흘러 판을 형성하고 잠을 제대로 자지 못할 정도로 소양감이 심한 피부 질환을 일컫는 것으로 현대의학에서의 영유아습진, 유아기 아토피 피부염과 유사하다. 근래의 아토피 피부염에 대한 연구들에서는 다양한 면역학적 이상과 관련이 있는 질환으로 보고 되고 있으며, 이러한 면역학적이상은 면역계 발달 과정 중 T helper (Th) 세포의 비정상적 성숙으로 인해 Th1과 Th2 세포의 불균형으로 Th2 반응에 치우침을 주된 기전으로 보고하고 있다⁵⁻⁷⁷.

Th 세포는 전구세포(progenitor)인 ThP로 존재 하다가 항원의 자극에 의해 미분화상태(naive)의 Th0으로 분화되고 항원과 면역반응의 방향성에 의 해 세포성 면역에 작용을 하는 Th1세포와 알레르 기 반응에 작용을 하는 Th2 세포로 분화된다. Th1 세포는 IL-1, INF- γ , TNF- α 등과 같은 사 이토카인을 분비하여 세포매개성 면역 작용을 활 성화시킨다. 반면에 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF 등과 같은 사이토카 인을 분비하는데, 이중 IL-4는 알레르기성 염증의 초기에 주요한 매개체로써 B 세포를 활성화 시키 고 형질 세포로 분화시켜 IgE를 생성하는데 작용 하여 염증성 화학 매개체를 분비하여 혈관투과성 의 증가, 혈관확장, 평활근의 수축 및 분비선 기능 항진과 같은 조기반응을 일으킨다. 또한 IL-4는 Th0세포가 Th2세포를 분화하는 것을 촉진하고, Th1 세포기능을 억제하는 역할을 한다⁸⁻¹²⁾. 현재까 지 알려진 다양한 사이토카인의 특성을 Table 1에 정리하였다.

인체의 필수 미네랄인 셀레늄(selenium)은 미량으로 존재하지만, 결핍되는 경우에 다양한 질환을 유발할 수 있으며, 대부분은 토양에서 재배된 작물과 음식물에 의해 섭취되므로 식이의 변화에 따라결핍 현상이 나타날 수 있다¹³⁻¹⁵⁾. 이러한 셀레늄이 면역반응의 활성화와 관련이 있어 면역세포가 바

교신저자 : 김경준, 인천광역시 중구 용동 117번지 경원대학교 부속 길한방병원 한방안이비인후피부과 (Tel. 032-770-1215, E-mail : kkjo215@hanmail.net)

^{*} 이 논문은 2010년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행 되었음.

[•]접수 2010/07/09 •수정 2010/07/31 •채택 2010/08/03

Table 1. Characteristics of Various Cytokines

Cytokines	Producing cells	Target cells	
IL-1 α /IL-1 β	Monocytes, macrophages, B-cells, dendritic cells	Th cells, B cells, NK cells, various cells	
IL-2	Th1 cells	Activated T and B cells, NK cells	
IL-3	Th cells, NK cells	Mast cells, Stem cells	
IL-4	Th2 cells	Activated B cells	
IL-5	Th2 cells	Activated B cells	
IL-6	Monocytes, macrophages, Th2 cells, stromal cells	Activated B ells, plasma cells, stem cells, various cells	
IL-7	Bone marrow stroma, thymus stroma	Stem cells	
IL-8	Macrophages, endothelial cells	Neutrophils	
IL-10	Th2 cells	Macrophages, B cells	
IL-12	Macrophages, B cells	Activated Tc cells, NK cells	
INF-α	Leukocytes Various cells		
INF- β	Fibroblasts	Various cells	
INF-γ	Th1 cells, Tc cells, NK cells	Macrophages, activated B cells, Th2 cells, various cells	
MIP-1 α	Macrophages	Monocytes, T cells	
MIP-1 β	Lymphocytes	Monocytes, T cells	
TGF-β	T cells, monocytes	Monocytes, macrophages, various cells	
TNF- α	Macrophages, mast cells, NK cells	Macrophages	
TNF-β	Th1 and Tc cells	Macrophages	

이러스를 퇴치하는 능력을 증강시키고, 항체 생성을 증진하며, 염증반응을 일으키는 프로스타글란딘 생성을 억제하는 것으로 보고 된 바 있다¹⁶⁻¹⁹⁾.

본 연구에서는 이러한 아토피 피부염 관련 면역 반응의 기전 연구를 위한 병리 모델을 확립하기 위해 인간의 단핵구 세포주인 THP-1과 U937 그 리고 비만세포주(human mast cell line: HMC-1) 를 이용하여 아토피 유발 물질로 알려져 있는 박 테리아의 lipopolysaccharide (LPS), 먼지진드기 추 출물 Dermatophagoides pteronyssus crude extract (DPE), 화학물질 dinitrochlorobenzene (DNCB) 등을 처리하였다. 이러한 아토피 유발 물질에 의해 유발되는 염증 관련 사이토카인 유전자들의 발현 양상을 분석하여, 아토피피부염의 발생기작과 염증 관련 유전자의 발현 양상과의 관련성을 살펴보고자 하였다. 또한, 셀레늄을 아토피 유발 물질과 동시에 처리하였을 때 나타나는 면역반응의 변화 양상을 살펴보았다. 본 실험은 아토피피

부염에 관련된 병태모델을 설정함에 있어 아토피유발물질과 그에 적합한 세포주를 찾아내어 아토피 유발물질에 따른 적합한 아토피피부염 실험모델을 이용한 한방치료제의 효용성을 확인하는 연구들에 기초 자료로 삼기위한 것이며, 이번 실험에서 찾아낸 아토피피부염의 병태모델을 이용하여셀레늄이 아토피피부염에 어떤 영향을 끼치는지에대한 실험도 간단하게 진행하였다.

Ⅱ, 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 세포주와 세포 배양

실험에 사용한 인간 단핵구 세포주인 THP-1과 U937은 한국세포주연구재단(KCLB, Korea)에서 구입하였으며, RPMI 1640에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin과 100 ug/ml streptomycin을 첨가한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO2 조건의 배양기에서 배양하였다. 인간 비 만세포주인 HMC-1은 Iscove's media (Gibco/BRL) 에 10% FBS, 50 µM 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin 등을 첨 가한 배지를 사용하여 배양하였다. 배양액은 2일 마다 교환해 주었으며, 계대배양은 배양 중인 세포 들이 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 각 세포주 의 기본 배지로 수세한 후 새로운 플라스크에 분 주하였다. 계대배양 과정에서는 10% FBS 조건을 유지하였으며, 아토피 유발물질을 처리하는 과정에 서는 FBS 혈청 성분에 의한 영향을 배재하기 위 해 0.5% FBS 조건에서 실험을 진행하였다.

2) 시약

아토피 유발물질로 알려져 있는 lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma (St Louis, USA)에서, 먼지진드기 추출물 Dermatophagoides pteronyssus crude extract (DPE)은 Cosmo Bio (Japan)에서, 화학물 질이 dinitrochlorobenzene (DNCB)은 Fisher (USA)에서 Scientific 구입하였다. 셀레늄은 soidum selenite (Sigma)를 증류수에 용해하여 사 용하였다. 세포들에서 total RNA는 All prep RNA/protein kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하였으며, 사이토카인 유전자들의 발현 양상을 확인하기 위한 RT-PCR primers 는 Table 2에 나 염기서열로 합성하였으며, 타낸 AccuPower RT-PCR PreMix는 Bioneer (Korea) 제품을 사용 하였다. 아토피 유발물질 처리 후 HMC-1 세포에 서 분비된 IL-4와 INF-γ 양을 측정하기 위한 ELISA kit은 Koma Biotech (Korea) 제품을 사용 하였다.

2. 실험 방법

1) 아토피 유발 물질의 처리

배양액의 FBS 농도를 0.5%로 낮추어 준비된 6-well plate에 각각의 세포주를 일정량(1×10⁶/ml) 접종한 후에 아토피 유발 물질을 각각 LPS (1 //g/ml), DPE (10 //g/ml), DNCB (1 //g/ml)의 농도로 처리하였다. 처리 농도는 기존의 연구 결과들을 참고하였다^{20, 21)}. 셀레늄은 0 ~ 30 ng/ml의 농도로처리하였다. 세포들에서 분비된 INF- 7 양을 측정하기 위해 아토피 유발 물질을 처리한 후 0, 12, 24, 48 시간에 배양 중인 배지를 수획하였으며, 각각의 처리 시간에 lysis buffer와 분리 시약을 이용하여 total RNA를 추출하였다.

2) 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

각각의 시료에서 추출된 total RNA의 양은 spectrophotometer로 정량하였으며, 그 상태는 2% agarose gel 전기영동 후 18s와 28s rRNA band 관찰을 통해 확인하였다. 추출한 total RNA 2 써을 reverse transcription mixture (5X

PrimeScript[™] Buffer, PrimeScript[™] RT Enzyme Mix I, 50 µM Oligo dT Primer, 100 uM Random 6 mers, RNase Free dH2O)에 혼합하여 37℃에서 30분 동안 반응시켜 RNA에 대한 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA 1 µ과 각각의 유전자에 대한 primers (Table 2.)를 PreMix PCR tube에 넣고 초기 denaturation (94℃에서 5분) 후에, 증폭을 위해 94℃에서 1분, 55~60℃에서 1분, 72℃에서 1분의 주기를 각각의 유전자의 특성에 따라 28~35 주기 시행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel 상에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한

후 UV light 하에서 densitometer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 relative intensity를 측정하였다. 비교정량적인 분석을 위하여 GAPDH 를 internal control로 사용하였으며, 각각의 유전 자들의 PCR 산물 intensity에 대한 GAPDH PCR 산물 intensity의 비율로 양적인 비교를 실시하였다.

Enzyme-linked immunosobent assay (ELISA)

각각의 시료에서 배양액으로 분비된 INF-γ을 측정하기 위해 실험 과정에서 배양액을 수획하여 측정 전까지 -70℃에서 보관하였다. INF-γ에 대

Table 2. Primers of RT-PCR for Various Cytokines

Name of genes	ame of genes Primer sequences (5'3')		Product size (bp)	
IL-8	F	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	292	
	R	TCTCAGCCCTCTTCAAAAACTTCTC		
INF-γ	F	AACTGTCGCCAGCAGCTAAA	560	
	R	GAAGCACCAGGCATGAAATC		
TCE 0	F	GCGGCAGCTGTACATTGACT	239	
TGF-β	R	CCACGTAGTACACGATGGGC		
TNF- α	F	TGGGATTCAGGAATGTGTGG	363	
ΠΝΓ- α	R	TACCCCGGTCTCCCAAATAA		
MCP-1	F	AATGCCCCAGTCACCTGCTGTTAT	427	
MCP-1	R	GCAATTTCCCCAAGTCTCTGTATC		
IL-4	F	CACCGAGTTGACCGTAACAGA	643	
IL -4	R	TCTGGTTGGCTTCCTTCACA		
IL-6	F	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC	628	
IL-0	R	GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG		
IL-10	F	ATCAAGGCGCATGTGAACTC	500	
IL-10	R	GTTGGCTCCCCAAAGAACAT	598	
IL-13	F	GAAACTTTTCGCGAGGGAC	584	
IL-13	R	TGGTGTCCACTGCTTTAGTGC	384	
β 2-MG	F	TGAATTCACCCCATTGAAA	137	
ρ 2-MG	R	CAAATGCGGCATCTTCAAAC		
GAPDH	F	ACTGCCAACGTGTCAGTGGT	320	
GAPDH	R	TGGTCCAGGGGTCTTACTCC		

한 mouse monoclonal antibody가 도포되어 있는 96-well plate에 시료를 처리하기 전에 비특이적인 반응을 억제하기 위해 0.05% Tween-20이 포함된 PBS를 사용하여 2번 수세하였다. 제조사의 사용방법에 따라 negative control과 positive control 그리고 시료를 96-well plate에 1 시간 동안 처리하였으며, 발색 반응 결과를 Genios ELISA reader (Tecan, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. INF- 7의 농도는 흡광도에 대한 표준농도곡선을 이용하여 계산하였다.

4) 통계적 검증

통계적 분석은 SPSS 10.0 program 을 이용하였고, 각각의 유전자 발현 양상과 INF- γ 의 분비 량에 대한 비교는 One-way ANOVA test를 시행하였고, 사후 검증으로 Turkey test를 사용하여 비교하였으며, 통계학적인 유의 수준은 p 〈 0.05로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 단핵구에서 아토피 유발 물질에 의한 사이토카 인 유전자의 발현 양상

인간 단핵구 세포주인 THP-1과 U937에 LPS (1 \(\mu_g/ml\), DPE (10 \(\mu_g/ml\), DNCB (1 \(\mu_g/ml\))를 처리하고 0, 2, 12, 24, 48 시간 후에 IL-6, IL-8, INF-\(\gamma\), MCP-1 사이토카인의 발현 양상을 살펴보았다. 전체적인 RT-PCR 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 전기영동 후 densitometry에 의한 반정량적인 비교를 위해 internal control인 GAPDH에 대한 각각의 사이토카인의 비를 계산하여 분석하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같았다.

본 연구에서 조사한 사이토카인들이 THP-1과 U937에서 일정량 발현되는 것을 관찰할 수 있었 지만, 정량적인 분석에서 아토피 유발물질의 처리 전·후에 대상 사이토카인들의 의미있는 변화를 관찰할 수 없었다.

2. 비만세포에서 아토피 유발 물질에 의한 사이토 카인 유전자의 발현 양상

인간 비만세포주인 HMC-1과 단핵구 세포주인 THP-1에서 LPS (1 μg/ml), DPE (10 μg/ml), DNCB (1 μg/ml)를 처리하고 0, 12, 24, 48 시간후에 IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, INF-γ, TNF-α, MCP-1, B2-MG 사이토카인의 발현 양상을 살펴보았다. 전체적인 RT-PCR 결과는 Fig. 3에 나타내었으며, densitometry에 의한 반정량적인 분석결과는 Fig. 4에 나타내었다. 단핵구 세포주인 THP-1에서는 앞의 결과와 유사하게 아토피 유발물질의 처리 전·후에 대상 사이토카인들의 의미 있는 변화를 관찰할 수 없었다.

그러나 비만세포주인 HMC-1에서는 LPS, DPE, DNCB 처리 후 24 시간과 48 시간에 IL-6의 발현이 처리 전에 비해 의미 있게 증가하였다. 또한, DPE와 DNCB 처리 후 24 시간과 48 시간에 IL-8의 발현양도 IL-6과 유사한 양상으로 증가하였다.

3. 아토피 유발 물질에 의한 IL-4와 INF-γ 분 비 양상

인간 비만세포주인 HMC-1에서 LPS (1 \(\mu_g/ml\), DPE (10 \(\mu_g/ml\), DNCB (1 \(\mu_g/ml\))를 처리하고 0, 12, 24, 48 시간 후에 수획한 배양액에서 IL-4와 INF-\(\gamma\) 단백질 분비량을 ELISA 방법으로 측정하였다. 전체적인 결과는 Fig. 5에 나타내었으며, 1,000~2,000 \(\mu_g/ml\) 정도의 IL-4와 INF-\(\gamma\) 단백질 이 분비됨을 확인할 수 있었다. IL-4와 INF-\(\gamma\) 에 대한 RT-PCR 결과에서는 아토피 유발물질 처리 전'후에 유의한 변화가 없었으나, 이와는 상이하게 ELISA 결과에서는 IL-4와 INF-\(\gamma\) 단백질 분비양이 아토피 유발물질 처리 후 증가하였다.

4. 아토피 유발 물질과 셀레늄 처리에 의한 사이 토카인 유전자 발현 양상

인간 비만세포주인 HMC-1에 DPE (10 μg/ml)와 셀레늄을 0, 3, 15, 30 ng/ml을 동시에 처리한 후 0, 12, 24, 48 시간 후에 시간 후에 IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, INF-γ, TNF-α, MCP-1, B2-MG

사이토카인의 발현 양상을 살펴보았다. 전체적인 RT-PCR 결과는 Fig. 6에 나타내었으며, densitometry에 의한 반정량적인 분석 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 셀레늄을 처리한 경우에 DPE에 의한 INF- γ 와 TNF- α 발현양은 변화가 없었지만, 셀레늄을 30 ng/ml로 처리한 경우에 DPE에 의한 IL-10과 IL-13의 발현양이 감소하였다.

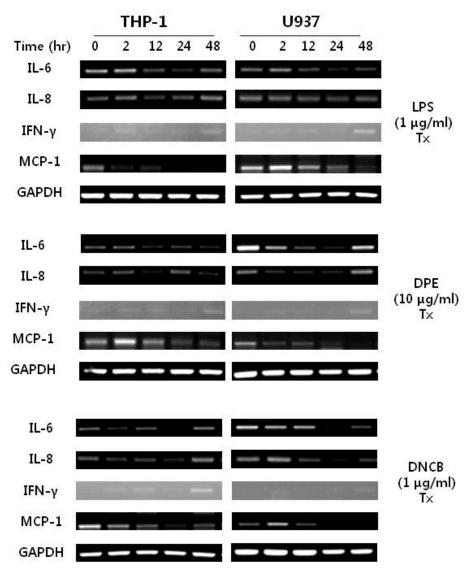


Fig. 1. Effects of LPS, DPE and DNCB on the mRNA expression of IL-6, IL-8, INF- γ and MCP-1 in THP-1 and U937 cells.

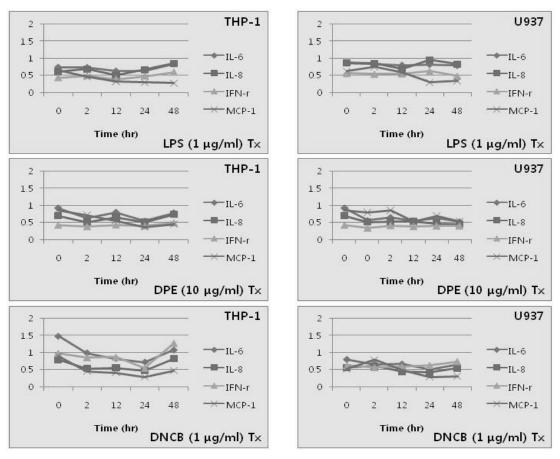


Fig. 2. Semiquantitative analysis of the mRNA expression of IL-6, IL-8, INF- γ and MCP-1 in THP-1 and U937 cells by treatments of LPS, DPE and DNCB.

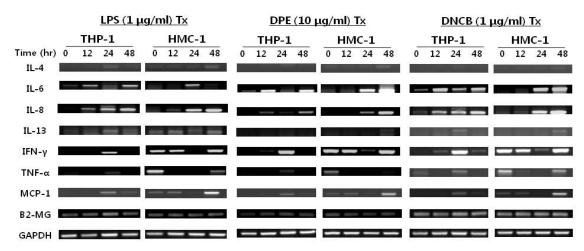


Fig. 3. Effects of LPS, DPE and DNCB on the mRNA expression of IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, INF- γ , TNF- α , MCP-1 and B2-MG in THP-1 and HMC-1 cells.

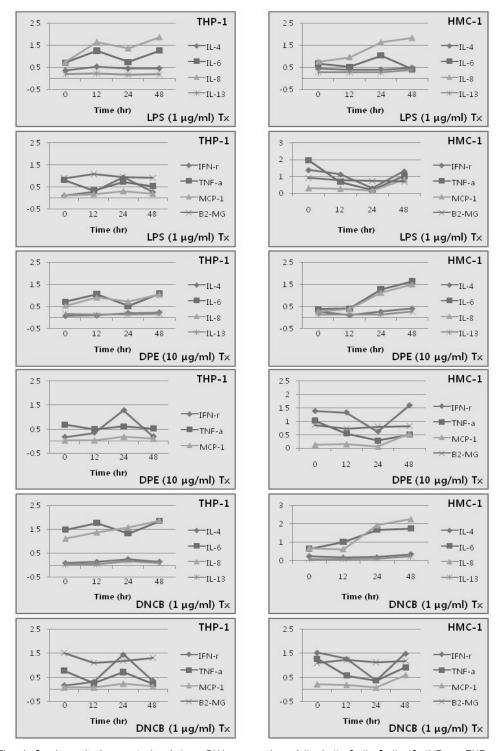


Fig. 4. Semiquantitative analysis of the mRNA expression of IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, INF- γ , TNF- α , MCP-1 and B2-MG in THP-1 and HMC-1 cells by treatments of LPS, DPE and DNCB.

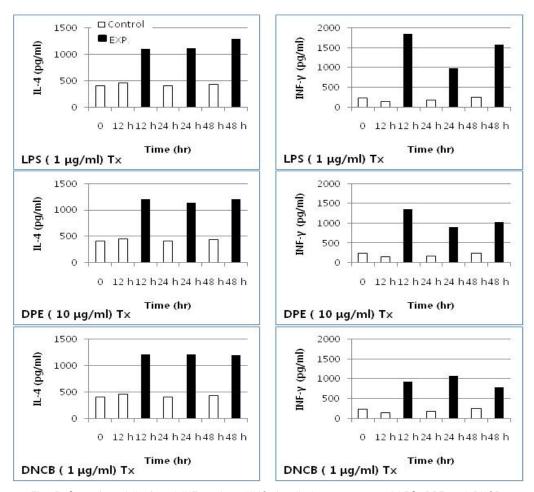


Fig. 5. Secretion of IL-4 and INF- γ from HMC-1 cells by treatments of LPS, DPE and DNCB.

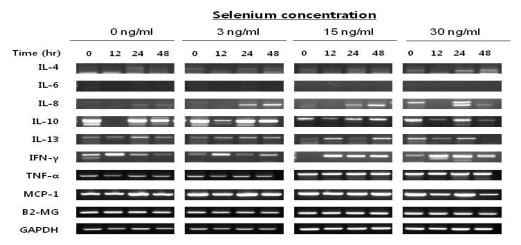


Fig. 6. Effects of selenium on the mRNA expression of IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, INF- γ , TNF- α , MCP-1 and B2-MG in DPE treated HMC-1 cells.

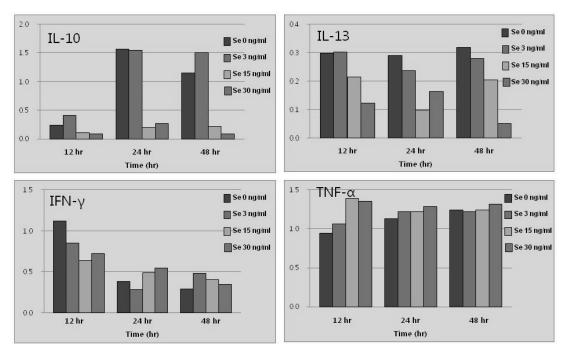


Fig. 7. Semiquantitative analysis of the mRNA expression of IL-10, IL-13, INF- γ , and TNF- α in DPE and selenium treated HMC-1 cells.

Ⅳ. 고 찰

아토피 피부염은 근래에 발생빈도가 증가하여 소아의 10% 정도가 아토피피부염을 경험하며, 대기오염, 주거환경 변화로 인한 다양한 항원에 대한 노출의 증가, 모유 수유 감소, 소아기 감염질환의 감소 등이 원인으로 추측되고 있다²²⁾. 아토피 피부염의 원인과 발병기전은 아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않으며, 이 질환의 진단에 필요한 특정한 방법이나 검사법이 없기 때문에 대부분의 경우 임상 증상에 따라 진단이 시행되고 있다. 아토피피부염이 발생의 원인으로는 유전적 배경, 음식에 대한알레르기, 면역학적 이상, 피부장벽의 이상, 환경적요인 및 심리적 연관성 등이 제시되고 있다. 그중에서도 면역학적인 장애는 Th2 림프구의 활성화와 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 급성기에 피부림프구 항원을 높게 발현하는 Th2 세포의 현

저한 혈관주위 침윤, 병변부위의 Th2 사이토카인 의 분비 증가와 IL-4에 대한 말초혈액 단핵구의 고반응성 등을 특징적으로 나타낸다²³⁾. 일반적으로 아토피피부염 환자의 말초 혈액은 Th2 표현 세포 가 증가되어 있고, Th1 표현 세포는 감소되어 있 으며, IL-13의 표현이 증가되어 있어 전신적으로 Th2 우세 환경을 나타내게 된다²⁴⁾. 급성 피부 병 변에는 많은 수의 IL-4, IL-5, IL-13 발현 세포가 존재하지만 $INF-\gamma$ 이나 IL-12 발현 세포는 적은 편이다. 따라서 아토피피부역의 급성기에는 주로 Th2 사이토카인이 염증반응에 관여됨을 알 수 있 다²⁵⁾. 이러한 병태 기전에서 Th2 세포들은 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등과 같은 Th2 사이토카인을 지속적으로 분비하여 만성적인 면역반응 불균형을 초래하며, 특히, IL-4는 B-세포의 활성화와 IgE 항 체의 생성에 중요한 역할을 수행한다²⁶⁻²⁸⁾.

일반적으로 사용되는 LPS에 비해 본 연구에서

사용한 먼지 진드기 기원의 DPE는 아토피 피부염과 천식을 유발하는 보다 강력한 항원으로 알려져있으며, 이를 이용한 다양한 연구들이 진행되어져왔다²⁹⁾. 최근의 연구에서도 DPE에 의해 THP-1 세포주에서 IL-6, IL-8, MCP-1등의 발현이 증가되면 이것이 아토피 피부염과 같은 알레르기 질환의병태와 관련이 있을 것으로 보고 되었다²⁰⁾. 특히,면역 관련 질환에서 IL-6은 B-세포뿐만 아니라 피부 상피 및 진피의 다양한 세포들의 성장과 분화에 영향을 주며, 급성 면역 반응에서 만성 면역반응으로의 전환에도 관련이 있는 것으로 보고 되고 있다³⁰⁾.

알레르기성 염증 질환에서 비만세포(mast cell) 는 히스타민, 프로스타글란딘, 다양한 사이토카인 등을 분비하여 관련 질환의 진행에서 핵심적인 역 할을 수행하는 것으로 알려져 있다³¹⁻³³⁾. 이러한 비 만세포를 말초 혈액이나 조직에서 채취하는 것이 현실적으로 매우 어렵기 때문에 이를 대체할 수 있는 세포주인 HMC-1을 이용한 연구가 근래에 활 발하게 연구되고 있다. HMC-1 세포주를 이용한 알레르기 모델에서 가미당귀음자에 의해 히스타민 의 분비가 억제됨이 보고 되었고³⁴⁾, 최근에는 어성 초(Houttuynia Cordata) 추출물이 HMC-1 세포주 의 SCF에 의해 유도되는 이동과 Th2 면역반응을 억제할 수 있음이 보고되었다^{35,36)}. 또한, 꿀 풀과 속단(Phlomis Umbrosa)의 수용성 추출물에서도 HMC-1 세포주를 이용하여 비만세포 의존성 알레 르기 유발 사이토카인의 분비를 억제효과가 확인 되었다³⁷⁾. 따라서 본 연구에서 이용한 HMC-1은 아토피 피부염에 대한 연구모델로서 적합한 세포 주인 것으로 사료된다.

인체의 미량 필수 미네랄인 셀레늄의 아토피 피부염에 대한 직접적인 치료 효과는 명확하게 밝혀지지 않았지만, 근래의 연구에서 해양 심층수를 음용한 아토피 피부염 환자들의 상태가 호전되었고 모발의 미네랄 성분 분석에서 셀레늄의 양이 증가

하고 수은과 납의 농도는 감소하는 것과 관련이 있다는 보고가 있었다³⁸⁾. 또한, 최근에 셀레늄을 함유하고 있는 단백질들이 항산화작용을 통해 T-세포의 면역반응을 조절한다는 보고도 있었다³⁹⁾. 본 연구에서는 이러한 가능성을 세포 수준에서 살펴보았는데, 비만세포주인 HMC-1에서 DPE에 의해 유발되는 IL-10과 IL-13의 발현양이 셀레늄 처리 시에 감소되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 비만세포에서 발현되는 IL-13이 아토피 피부염 발생 부위에서 질환의 진행에 중요한 역할을 한다는 연구 결과와 관련하여⁴⁰⁾, 셀레늄이 아토피 피부염에 대한 치료제로 사용될 수 있는 가능성을 시사하는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 인간의 단핵구 세포주인 THP-1 과 U937 그리고 비만세포주인 HMC-1을 사용하여 아토피 피부염을 유발한다고 알려져 있는 LPS, DPE, DNCB 등을 처리한 후 사이토카인의 발현 양상을 살펴보았다. 단핵구 세포주인 THP-1과 U937 세포는 처리한 아토피 유발 항원들에 반응 하는 정도가 미약하였으나, 비만세포주인 HMC-1 에서는 먼지 진드기 기원의 DPE (10 µg/ml)와 화 학물질인 DNCB (1 μg/ml) 처리 후 Th2 면역반응 을 유발하는 IL-6의 mRNA 발현양과 중성백혈구 의 염증반응과 관련이 있는 IL-8의 mRNA가 의미 있게 증가함을 확인하였다. 또한, Th1 면역반응을 유도하는 INF-γ와 Th2 면역반응을 유도하는 IL-4 단백질의 분비량이 아토피 유발물질 처리 후 에 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 사이토카인의 분비와 mRNA 발현 양상의 관련성은 추후 지속적 인 연구가 필요한 부분으로 생각된다. 결론적으로 아토피 피부염에 대한 실험 모델을 설정함에 있어 적절한 아토피 유발물질과 적합한 세포주를 선정 하는 것이 필요함을 알 수 있었다. 본 연구의 결 과는 향후 아토피 유발물질에 따른 적합한 아토피 피부염 실험 모델을 이용한 한방치료제의 효용성 을 확인하는 연구들에 기초자료로서 활용될 수 있 을 것으로 사료된다.

V. 결 론

인간의 단핵구와 비만세포에서 다양한 아토피 유발물질이 사이토카인 유전자의 발현에 미치는 영향에 대한 실험을 통해 아래와 같은 결과를 얻 을 수 있었다.

- 1. 인간의 단핵구 세포주인 THP-1과 U937에 아 토피 피부염을 유발한다고 알려져 있는 LPS, DPE, DNCB 등을 처리하였을 때 사이토카인 들이 일정량 발현되는 것을 관찰할 수 있었지 만, 아토피 유발물질의 처리 전·후에 대상 사이 토카인들의 의미 있는 변화를 관찰할 수 없었 다. 이러한 결과에 대한 이유로는 본 연구에서 사용한 THP-1과 U937 세포주가 계속되는 계 대배양 과정에서 전형적인 단핵구 세포주로서의 특성을 상실하였거나, 처리한 아토피 유발물질 의 농도가 면역반응을 유발하기에는 낮았기 때 문으로 생각되며, 추후 이에 대한 확인이 필요 할 것으로 생각된다.
- 2. 비만세포주인 HMC-1에서는 LPS, DPE, DNCB 처리 후 IL-6의 발현이 처리 전에 비해 의미 있게 증가하였다. 또한, DPE와 DNCB 처리 후 IL-8의 발현양도 IL-6과 유사한 양상으로 증가하였다. 이러한 결과는 HMC-1 세포들이 아토피 유발물질에 의해 면역반응이 유발되었고, 특히 IL-6은 대표적인 Th2 사이토카인으로 아토피 피부염에서의 Th2 편향적인 만성 알레르기 반응과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다.
- 3. 비만세포주인 HMC-1에서 Th1 면역반응을 유도하는 INF-γ와 Th2 면역반응을 유도하는 IL-4 단백질의 분비량이 아토피 유발물질 처리

후에 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. IL-4와 INF-γ에 대한 RT-PCR 결과에서는 아토피 유발물질 처리 전·후에 유의한 변화가 없었으나, 이와는 상이하게 ELISA 결과에서는 IL-4와 INF-γ 단백질 분비양이 아토피 유발물질 처리 후 증가한 것은 아토피 유발물질 처리 전에 비만세포가 가지고 있던 IL-4와 INF-γ 단백질을 분비하였거나, 이들 단백질 합성의 조절이 mRNA 전사 조절과 상이하게 진행될 가능성과 관련이 있는 것으로 생각된다.

4. 인간 비만세포주인 HMC-1에 아토피 유발물질 인 DPE와 인체 필수 미량 미네랄인 셀레늄을 동시에 처리하였을 때, DPE에 의해 유발되는 IL-10과 IL-13의 발현양이 감소하였다. 아토피 피부염의 병변에서 발현이 높은 IL-13의 발현을 억제하는 셀레늄의 효과에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 연구결과 인간의 단핵구 세포주인 THP-1과 U937에서는 아토피 유발물질에 의해 아토피 피부염이 잘 유발되지 않았고, 비만세포주인 HMC-1에서는 아토피 유발물질에 의해 면역반응이 유도되고 있음을 알 수 있다. 결론적으로 아토피 피부염에 대한 실험 모델을 설정함에 있어 적절한 아토피 유발물질과 적합한 세포주를 선정하는 것이 중요한 요소임을 알 수 있었다.

참고문헌

- Mc daniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 1996;211:24-32.
- Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T.
 Cytolytic mechanism of activated

- macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. J Immunol, 1990;144:1425-31.
- Corbett JA, and Mac Daniel ML. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide syntheses. J Exp Med. 1995;181:559-68.
- 4. Cetkovic-Cvrlje M and Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. Cytokine, 1994;6:399-406.
- 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아 토피피부염. 대한피부과학회지. 2003;41(6): 687-9.
- 6. 안성구. COMMON SKIN DISEASE. 서울: 퍼시픽출판사. 2003:68.
- 7. 박용민. 아토피피부염 병태생리에 대한 최신지견. 소아알레르기 및 호흡기. 2006;16(3): 189-96.
- Borich L. Allergic rhinitis: Systemic inflammation and implications for management, J Allergy Clin Immunol, 2002:60-2,
- Yang SH, Hong CY, Yu CL. Decreased serum IgE level, decreased IFN- γ and IL-5 but increased IL-10 production, and suppresed cyclooxygenase 2 mRNA expression in patients with perennial allergic rhinitis after treatment with a new mixed formula of Chinese herbs. Int Immunopharmacol, 2001;1(6):1173-82.
- 10. Chrousos GP. Stress, chronic inflammation,

- and emotional and physical well-being: Concurrent effects and chronic sequelae, J Allergy Clin Immunol 2000;106:S275-91.
- Friedmann PS, Tan BB, Musaba E, Pathogenesis and management of atopic dermatitis. Clin. Exp. Allergy. 1995;25: 799-806.
- 12. Koreck AI, Csoma Z, Bodai L, Ignacz F, Kenderessy AS, Kadocsa E, Szabo G, BorZ, Erdei A, Szony B, Homey B, Dobozy A, Kemedy L. Rhinophototherapy: A new therapeutic tool for the management of allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 2005;115:541-7.
- Brown KM, Arthur JR, Selenium,
 Selenoproteins, and human health: a
 review. Public Health Nutrition 2001;
 4:593-9.
- 14. Navaro-alarcon N, Lopez-Martinez MC. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different disease. Sci Total Environ 2000;249:347-71.
- 15. 이명희. 셀레늄 영양과 건강. 대한암예방학회 지 2003;8:36-44.
- 16. Perez A, Neve J, Desmedt J, Duchateau J, Dramaix M, Famaey JP. Lymphocytes response is enhanced by supplementation of elderly subjects with selenium enriched yeast. Am J Clin Nutr 1991;53;1323-8.
- Kiremidjian-Schmacher L, Roy M, Wishe HL, Cohen MW, Stotzky G. Supplementation with selenium and human immune cell functions. Biol Trace Elem Res 1994;41:115-27.
- 18. Kiremidjian-Schmacher L, Roy M, Wishe HL, Cohen MW, Stotzky G, Supplementation

- with selenium arguments the functions of natural killer and lymphokine activated killer cells. Biol Trace Elem Res 1996;52:227-39,
- Heinle K, Adam A, Gradl M, Wiseman M, Adam O. Selenium concentration in erythrocytes of patients with rheumatoid arthritis. Clinical and laboratory chemistry infection markers during administration of selenium. Med Klin 1997;Suppl 3:29-3.
- Lee JS, Kim IS, Ryu JS, Yun CY. House dust mite, Dermatophagoides pteronissinus increases expression of MCP-1, IL-6, and IL-8 in human monocytic THP-1 cells. Cytokine, 2008;42:365-71.
- 21. Kim DB, Kim JH, Kwon SH, Kim YJ, Lee SH, Lee YH, Seo JN, Park CS, Park KL, Kwon HJ. Regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression in response to 2,4-dinitrofluorobenzene in RAW264.7 cells. 2008;41(4):316-21.
- 22. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 개정4판 피부과학. 서울:여문각. 2001:161-6.
- 23. 나영호. 아토피피부염 발병기전에서 케모카인의 역할. 소아알레르기 및 호흡기학회지.2005;15(3):238-41.
- 24. 김정희. 아토피피부염의 최신 지견. 소아알레르기 및 호흡기학회지. 2004;14(1):12-23.
- Qgawa H, Yoshiike T. A speculative view of atopic dermatitis: barrier dysfunction in pathogenesis. J Dermatol Sci. 1993;5: 197-204.
- Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. Blood 1991;77:1859-70.
- 27. Heijink IH, Van Oosterhout AJ, Targeting

- T cells for asthma, Curr Opin Pharmacol 2005;5:227-31.
- 28. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. J Allergy Clin Immunol 2006;118:178–89.
- 29. Arlian LG, Platts-Mills TA. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2001;107:S406-S413.
- Bellanti JA. Cytokines and allergic diseases: clinical aspects. Allergy Asthma Proc 1998;19:337–41.
- 31. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2000;105:847–59.
- 32. Theoharides TC, Cochrane DE, Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress, J Neuroimmunol 2004;146:1-12.
- 33. Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. Curr Opin Pulmon Med 2005;11:35-42.
- 34. Na HJ, Shin HY, Kim NH, Kwon MW, Park EJ, Hong SH, Kim NI, Kim HM. Regulatory effects of cytokine production in atopic allergic reaction by Gammidanguieumja, Inflammation 2004;28:291-8.
- 35. Kim IS, Kim JH, Kim JS, Yun CY, Kim DH, Lee JS. The inhibitory effect of *Houttuynia cordata* extract on stem cell factor-induced HMC-1 cell migration. J Ethnopharmacol 2007;112(1):90-5.

- 36. Lee JS, Kim IS, Kim JH, Kim JS, Kim DH, Yun CY. Suppressive effects of *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) extract on Th2 immune response. J Ethnopharmacol 2008;117(1):34-40.
- 37. Shin TY, Kim SH, Kim DK, Leem KH, Park JS. *Phlomis umbrosa* root inhibits mast cell-dependent allergic reactions and inflammatory cytokine secretion. Phytotherapy Res 2008;22:153-8.
- 38. Hataguchi Y, Tai H, Nakajima H, Kimata H. Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/

- dermatitis syndrome. Eur J Clin Nutr 2005;59:1093-6.
- 39. Shirmali RK, Iron RD, Carlson BA, Sano Y, Gladyshev VN, Park JM, Hatfield DL. Selenoproteins mediate T cell immunity through an antioxidant mechanism. J Biol Chem 2008;283:20181-5.
- 40. Obara W, Kawa Y, Ra C, Nishioka K, Soma Y, Mizoguchi M. T cells and mast cells as a major source of interleukin-13 in atopic dermatitis. Dermatology 2002;205: 11-7.