

펄스자기장(PMF)을 이용한 대식세포와 T 세포의 염증활성도 변화추이에 대한 연구

김소진 · 이현숙*

상지대학교 보건과학대학 디지털헬스케어학과

A Study on the Change in Inflammatory Activity of Macrophages and T Cells Using Pulsed Magnetic Field

Sojin Kim and Hyunsook Lee*

Department of Digital Healthcare, Sangji University, Korea

(Manuscript received 2 August 2023 ; revised 2 October 2023 ; accepted 13 October 2023)

Abstract: Excessive inflammation in the body causes immune cells to release cytokines that damage normal tissues and cells, leading to rheumatoid arthritis and sepsis. Pulsed magnetic field(PMF) stimulation has many applications in the treatment of neurological, muscular disorders and pain. Therefore, in this study, we aim to investigate the effect of PMF stimulation on the regulation of excessive inflammation in the overall immune system. Macrophages, a primary immune cell, and T cells, a secondary immune cell, were co-cultured in the insert wells under the same conditions, and then inflammation was artificially induced. The changes in inflammatory activity following PMF stimulation were measured by pH and IL-6 concentration. After inflammation induction, both cells became more acidic and increased IL-6 expression, but after PMF stimulation, we observed improved acidification of macrophages and T cells and decreased IL-6 expression. Our results showed that infected macrophages activated T cells and that the recovery of excessive inflammatory response regulation after PMF stimulation proceeded more rapidly in macrophages. Therefore, this study suggests that PMF has a positive anti-inflammatory effect on the overall immune system and thus has the potential to be used as a non-invasive therapy for the treatment of chronic inflammatory diseases.

Key words: PMF, pH, IL-6, Anti-inflammatory, Immunocytes

I. 서 론

염증반응이란 외부 감염체가 인식되었을 때 체내에서 일어나는 일련의 방어 체계이다. 염증반응이 발생하면 백혈구, 대식세포와 같은 1차면역세포들이 병원체에 식균작용을 하고 T 세포, B 세포와 같은 2차면역세포들은 바이러스에 대한 특정 항체를 생성하여 체내 감염을 막는다. 이

러한 염증반응이 지나치게 반복되면 체내 정상적인 조직과 세포들까지도 손상된다. 또한 TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6와 같은 전염증성 사이토카인이 분비되어 면역세포를 과도하게 활성화시켜 만성염증질환인 패혈증, 류머티스 관절염이 발생된다.[1] 따라서 과도한 면역세포의 활성화에 대한 연구는 다양한 만성염증성 질환을 줄이는 중요한 지표가 되며 최근까지도 항염증에 관련된 연구가 활발히 진행 중이다[2].

선천 면역 시스템에서 대식세포는 감염원을 인식하고 세포 내 액포에서 병원체를 사멸시키는 식세포의 기능을 한다. 또한 병원체에 대한 직접적인 사멸과 동시에 병원체 각각의 특정 항원을 인식하여 2차면역세포들에게 제시함으로써 항체를 생성하는 데 도움을 주는 역할을 한다. 대식세포가 병

*Corresponding Author : Hyunsook Lee
Department of Digital Healthcare, Sangji University, Korea
Tel: +82-33-730-0416
E-mail: hslee@sangji.ac.kr
이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 이공분야 기초 연구사업 (NRF-2021R1F1A1060167)의 지원으로 수행한 결과이다.

원체에 감염되었을 때 호기성 해당작용인 PPP(pentose phosphate pathway) 활동을 증가시켜 포도당 6-인산 탈수소효소(G6PD)를 발현시킨다[3]. G6PD가 과도하게 발현됐을 경우 TNF- α , IL-2, IL-6와 같은 전염증성 사이토카인과 활성산소종이 증가한다. 병원체에 감염된 대식세포는 세포의 젖산 생산을 분비시켜서 세포의 산성화를 촉진시킨다고 알려져 있으며 감염 후 24h이 지난 시점에는 식균작용 후 생기는 대사산물이 생성되며 병원체의 해당 유전자를 발현하여 항원 제시 역할을 한다고 보고되었다[4].

체내에서 대식세포는 감염으로부터 병원체의 유기체를 분해하는 과정에서 유래한 MHC class II 결합 펩타이드를 T 세포에 제시함으로써 적응면역시스템을 활성화한다[5]. 최근 항원 제시 역할을 하는 1차 면역세포와 2차 면역세포인 T 세포 사이의 상호작용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[6]. T 세포에 속해있는 LFA-1과 같은 접착 분자와 대식세포 내 접착 분자인 ICAM-1 사이에 물리적인 접촉을 시작으로 2차 면역세포의 활성화가 시작된다고 알려져 있으며 T 세포막에 발현되는 CD2, CD4와 같은 단백질은 대식세포의 관련 수용체를 결합하여 MHC-펩타이드 복합체에 특수 막 영역을 생성한다. 이러한 막이 형성되면 TCR(T cell antigen receptor)이 방대한 수의 MHC-펩타이드 복합체를 추출하여 T 세포를 활성화시킨다고 보고되었다[7,8].

자기장 자극은 인체 내 전류를 유도함으로써 비침습적으로 신경, 근육질환 및 통증 치료를 하고 세포의 에너지 생성 분야에서도 다양하게 쓰이고 있다[9,10]. 본 연구에서는 대표적인 비침습적 자기장 치료 기기 중 하나인 펄스자기장(Pulsed magnetic field: PMF)을 염증이 유도된 면역세포에 인가하여 면역세포들의 과도한 염증반응에 대한 억제효과를 확인하고자 한다. 선행 연구 결과에 따르면 대식세포와 T 세포의 전염증성 사이토카인인 TNF- α 를 관측함으로써 펄스 자기장의 과도한 염증반응 조절에 효과를 입증하였다[11]. 또한 LPS를 유도한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 자기장 자극을 가했을 때 사이토카인인 IFN- γ 가 줄어든 것을 확인한 연구도 보고되었다[12].

본 연구에서는 비특이적 방어와 특이적 방어에 걸친 전체적인 면역 시스템에서 과도한 염증 조절에 대한 펄스자기장 자극의 효과를 조사하고자 한다. 따라서 1차면역세포인 대식세포와 2차면역세포인 T 세포를 insert well에 같은 조건으로 동시 배양한 후 인위적으로 염증을 유도하여 두 세포 사이의 염증반응 활성도 변화를 관찰하고 펄스자기장 자극 전후의 염증 활성도 변화를 pH와 IL-6의 농도를 측정함으로써 펄스자기장 자극에 따른 면역 시스템의 변화를 연구하고자 한다.

II. 연구 방법

1. 펄스자기장 자극시스템

실험에서 사용된 펄스자기장의 코일은 두께 1.5 mm, 너비 3 mm의 평면 사각형의 단일 코일을 10번 감아서 만들어진 가로 12.0 cm, 세로 4.5 cm의 크기인 타원형 동심 코일로 제작되었다. 권선 저항을 코일과 직렬연결하여 시스템의 고출력 전압에서 나오는 전류의 값을 조절하였다. 펄스 자기장 자극 조건에 따른 pH 항상성 조절 효과 검증에 대한 선행연구의 결과에 따라 펄스자기장의 세기와 인가시간을 4700G와 3 min으로 고정하였다(Fig. 1)[11].

2. 세포 배양

체내 면역 시스템과 유사한 환경을 위해 반투과성 특성을 가지는 insert well을 이용하여 대식세포인 Raw 264.7과 T 세포인 EL4를 동시 배양하였다. 동결된 두 세포를 각각 37.5 °C의 water bath에서 녹인 후 conical tube로 옮겨 1500 rpm로 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 하층에 남아있는 세포(1.05×10^3 cells/ml)를 배양액과 혼합하여 insert well(SPL 36160)의 하단엔 부착 세포인 Raw 264.7을, 상단에는 부유 세포인 EL4를 넣어 배양시켰다. 배양액은 FBS 10%, penicillin 1%가 첨가된 DMEM을 사용하였으며, 37 °C의 incubator에서 CO₂ 5% 조건에서 24시간 배양하였다.

3. pH 측정

1차면역세포인 대식세포와 2차면역세포인 T 세포 사이의 염증반응 과정을 각 세포의 산성화 레벨로 확인하기 위해 LPS를 이용하여 대식세포에 인위적인 염증을 유도하였다. LPS(Lipopolysaccharide)는 세포에 염증을 유도하는 그람 음성 박테리아 세포막 성분이자 병리학적 반응을 일으키는 면역체계의 강력한 활성화제이다. LPS를 주입하기 전 insert well 하단에는 Raw 264.7, 상단에는 EL4를 각각 넣은 후 well 내 배양환경에서 세포들의 충분한 적응을 위하여 24h 동안 배양한 뒤 대식세포에만 LPS(1 μ g/ml)를 주입하였다. 시간 변화에 따른 대식세포의 산성화 정도와 대식세포에 의해 활성화된 T 세포의 산성화 정도를 pH meter(pH/Ion meter S220, METTLER TOLEDO)로 측정하여 두 세포 사이의 산-염기 활성도 변화 추이를 확인하였다. 또한 선행연구에서 염증 유도 후 세포의 활성화로 인한 길게 뻗어나가는 가지 모양을 관측함으로써 대식세포가 충분히 활성화되는 시간이 24h인 것을 확인하였다. 따라서 LPS 처리한 후 24h이 경과한 대식세포와 T 세포에 함께 펄스자기장을 인가하여 시간에 따른 대식세포와 T 세포의 pH를 측정하였다[13]. 계대배양 한 세포는 약 2-3일간 생존하기 때문에 Fig. 2처럼 실험 설

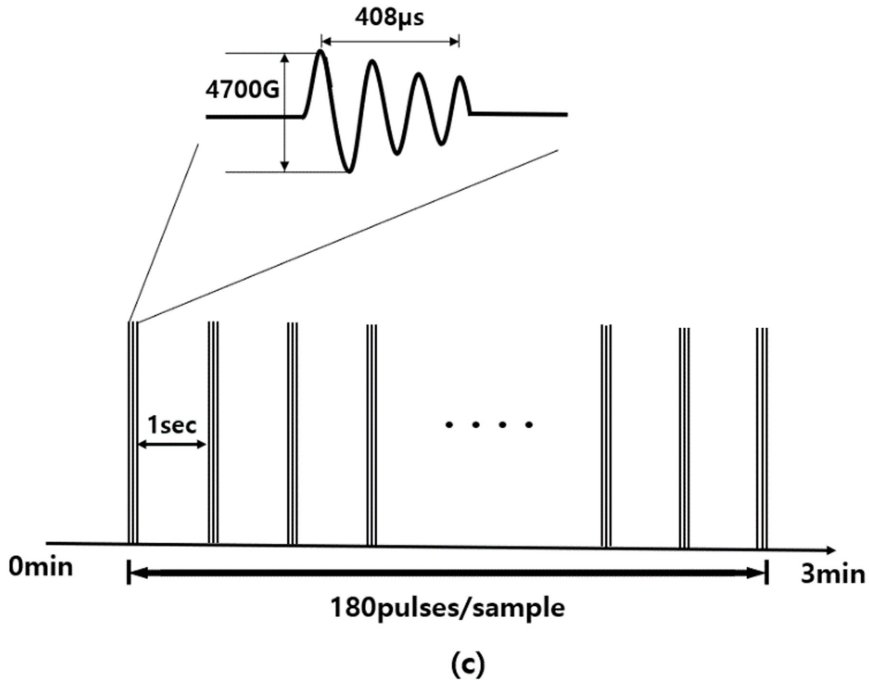
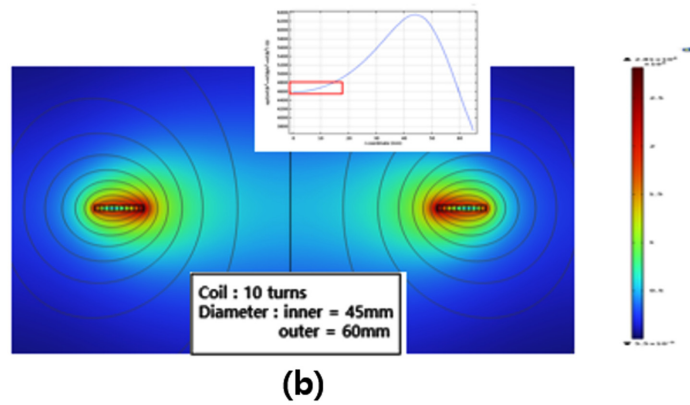
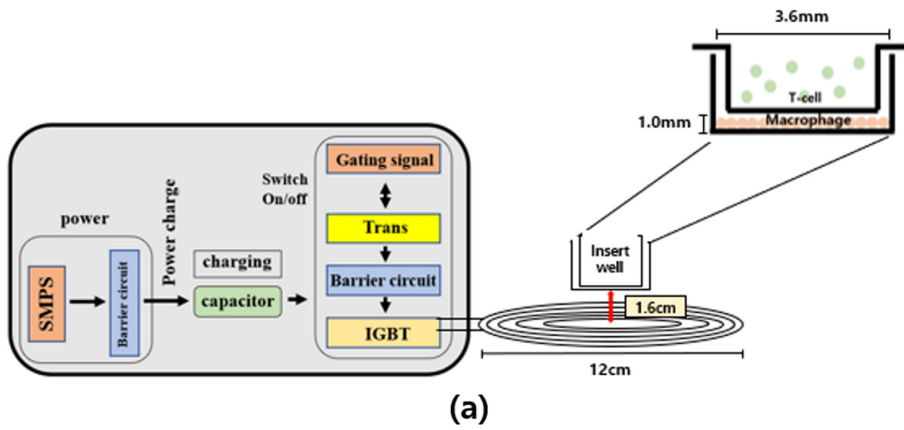


그림 1. 펄스자기장 구동 시스템

Fig. 1. Schematic circuit diagram of a pulsed magnetic field (PMF) stimulator

계를 하여 총 4번의 실험을 반복하여 진행하였다. 각 실험에서 샘플 당 6번의 반복측정을 통하여 평균과 표본집단의 표준편차를 계산하여 결과를 분석하였다.

4. ELISA를 통한 IL-6

항체에 결합된 효소를 통해 항원-항체 반응을 확인하는 실험인 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)를

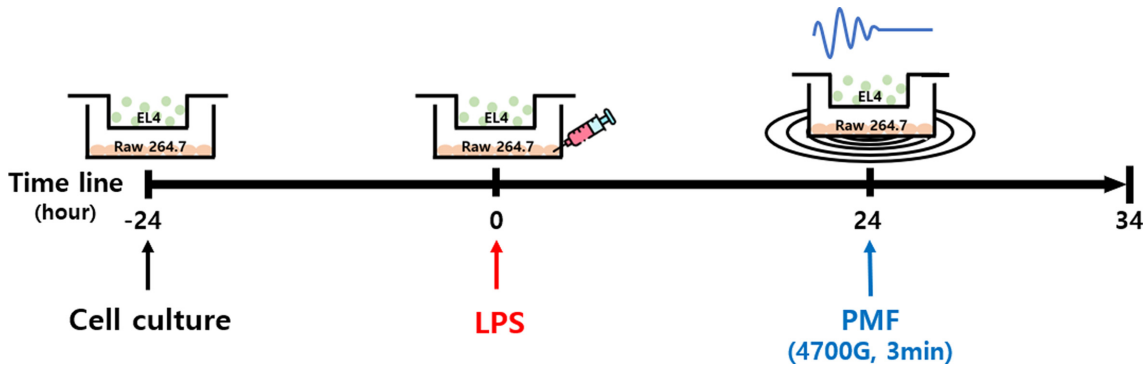


그림 2. 실험 설계 모식도
Fig. 2. Experimental time line

통하여 각 조건에서 시간에 따른 Raw 264.7과 EL4가 분비하는 전염증성 사이토카인인 IL-6의 농도를 측정하였다. ELISA 분석을 위한 샘플은 각 세포의 배양액으로부터 추출하여 1500 rpm로 3 min 동안 원심분리 후 Raw 264.7과 EL4 세포들을 모두 제거하여 사용하였다. ELISA kit(Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit; R&D Systems)의 과정을 따라 IL-6 항체가 모두 결합된 후 ELISA 96 well을 사용하여 흡광도 450 nm에서 측정되었다.

III. 연구 결과

Fig. 3는 LPS를 이용하여 염증이 유도된 Raw 264.7과 Raw 264.7에 의해 활성화된 EL4의 산-염기 항상성 조절을 관찰한 그래프이다. 어떠한 자극도 주어지지 않은 대조군의 pH는 정상 범위 내에 속해있다. 그러나 LPS를 주입한 직후의 pH는 Raw 264.7과 EL4 모두 정상 pH 범위 내에 있지만 시간이 지남에 따라 두 세포 모두 산성화가 진행되고

있음을 확인할 수 있었다. 이는 염증이 유도되면 면역세포의 젖산 생산으로 인해 산성화가 진행된다는 서론에 언급된 이론과 일치함을 알 수 있다. 또한 LPS 주입 후 급격히 산성화가 시작되는 시점인 6h과 12h 사이의 pH 감소율은 Raw 264.7이 8%, EL4가 3%로 Raw 264.7의 산성화 속도가 더 빠르다는 것을 알 수 있다. 이를 통해 1차 면역세포인 Raw 264.7이 LPS로 인해 염증반응이 먼저 활성화된 후 2차 면역세포인 EL4를 활성화시킨다는 것을 알 수 있다. LPS 주입 후 24h이 지난 뒤 펄스자기장을 인가한 결과 pH가 증가하는 것으로 보아 두 세포 모두 산성화가 개선되고 있음을 확인할 수 있었다. 염증반응으로 산성화된 면역세포들이 펄스자기장 자극으로 인해 정상 pH로 개선되는 이번 실험 결과로부터 펄스자기장이 염증 치료에 효과가 있다는 것을 입증할 수 있다.

Fig. 4는 대조군, 인위적으로 염증 유도한 LPS 군, 그리고 LPS 유도 후 자기장을 자극한 LPS+PMF 군에 대해 시간에

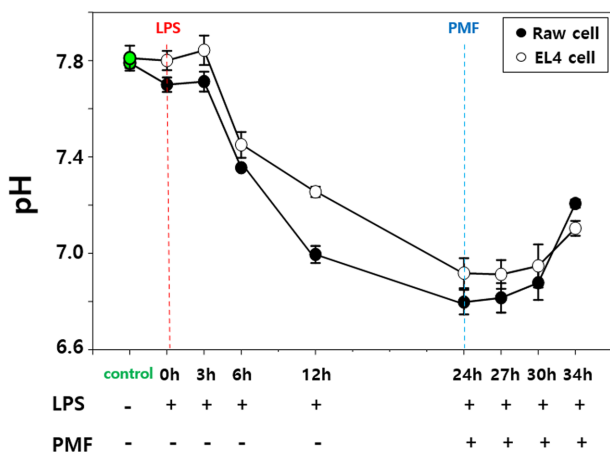


그림 3. LPS주입과 PMF인가에 따른 Raw 264.7과 EL4의 pH 변화
Fig. 3. pH change of Raw 264.7 and EL4 according to LPS injection and PMF stimulation.

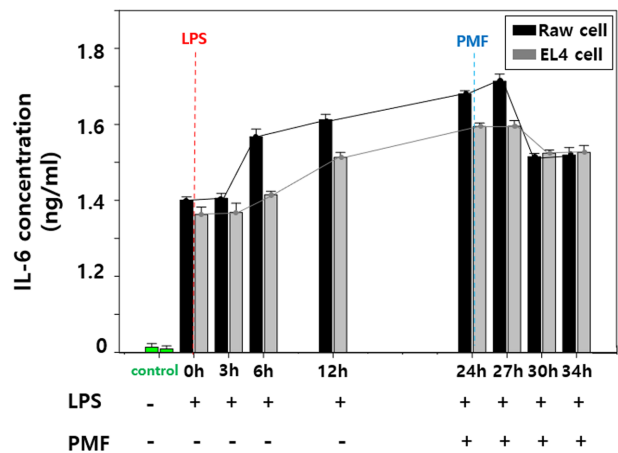


그림 4. LPS주입과 PMF인가에 따른 Raw 264.7과 EL4의 IL-6 발현량
Fig. 4. IL-6 expression of Raw 264.7 and EL4 according to LPS injection and PMF stimulation

따른 전염증성 사이토카인인 IL-6의 농도로 염증 활성도 변화 추이를 관찰한 그래프이다. 대조군의 Raw 264.7과 EL4는 전염증성 사이토카인인 IL-6의 발현량이 현저하게 적은 것으로 나타나 두 세포 모두 비활성화 상태인 것을 알 수 있다. 하지만 LPS 군에서는 두 세포 모두에서 IL-6의 발현량이 대조군에 비해 증가하였다. 이는 LPS를 직접 주입한 Raw 264.7은 시간이 경과함에 따라 2차면역세포인 EL4를 활성화시켜 EL4 또한 활성화되었다는 것을 의미한다. 그리고 LPS 주입 후 6h이 경과한 후 Raw 264.7의 IL-6 발현량이 EL4보다 더 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 염증이 유도되었을 때 면역세포가 분비하는 사이토카인의 발현량으로 유추해보면 EL4보다 Raw 264.7이 염증에 먼저 반응했다고 판단된다. 또한 LPS의 주입 후 24h이 경과한 후 펄스자기장을 자극하였을 때 3h이 지난 후부터 전염증성 사이토카인인 IL-6의 발현량이 감소되었다. 펄스자기장 자극에 대한 반응에서도 대식세포가 더 빠르게 반응하고 자기장 인가 후 6h이 지나면 효과가 더 크게 나타났다. 이 결과로부터 펄스자기장 자극이 염증에 의한 Raw 264.7과 EL4의 과활성화를 개선했다는 점에서 pH 측정결과와 일치한다. 이는 서론에 언급된 바와 같이 산화 환원 상태에 의해 조절되는 탈수소효소인 G6PD에 따라 전염증성 사이토카인의 발현량이 결정되기 때문에 pH 측정 결과와 IL-6의 발현량 결과가 일치한다고 생각된다.

IV. 고찰 및 결론

본 연구에서는 대식세포와 T 세포를 동시 배양 한 후 대식세포에 인위적으로 염증을 유도하고 이로 인해 활성화된 T 세포 모두에게 펄스자기장을 인가하여 자기장 자극에 따른 두 세포의 pH와 IL-6 발현량의 변화를 측정함으로써 면역 시스템의 활성 변화 추이를 조사하였다.

대식세포에 LPS 처리한 후 시간에 따른 pH 측정을 통해 세포의 산성화를 확인함으로써 대식세포 뿐만 아니라 T 세포에서도 염증이 유도되었음을 알 수 있었으며 선천성 면역세포인 대식세포가 후천성 면역세포인 T 세포보다 산성화 진행속도가 빠르다는 것을 확인하였다. 전염증성 사이토카인인 IL-6의 발현량을 관찰한 결과 염증반응으로 인해 IL-6의 발현량이 증가한 것은 pH 결과와 동일하였다. 이러한 전염증성 사이토카인의 증가는 면역세포에서 염증 활성화를 의미하는데 대식세포에서 IL-6의 발현량이 먼저 증가한 것으로 보아 서론에서 언급했듯이 대식세포가 만들어낸 MHC class II 펩타이드 조각이 T 세포에 영향을 주어 T 세포를 활성화시킴으로써 대식세포에서 염증반응이 먼저 나타나는 것을 알 수 있다.

LPS 처리 후 24h이 경과한 후 펄스자기장을 인가하였을

때 대식세포와 T 세포 모두에서 산성화가 개선되었을 뿐만 아니라 IL-6의 발현량도 감소하였다. 이때 대식세포에서 펄스자기장 자극의 효과가 먼저 나타난 것을 확인함으로써 1차 면역세포인 대식세포가 과도한 염증 활성도 회복에 먼저 반응하는 것을 알 수 있다. 이를 통해 펄스자기장 자극은 산-염기 항상성 조절 효과 및 항염증 효과를 가지는 것으로 판단된다.

따라서 본 연구의 결과를 바탕으로 만성염증질환치료를 위해 약물의 부작용이 없는 비침습적인 자기장 치료 기기 개발에 기초를 마련하고자 한다. 또한 연구의 확장을 위해서는 세포 내 소기관 내에서 펄스자기장의 항염증 작용 기전을 알아보기 위해 세포 내 호흡을 담당하는 미토콘드리아의 활성도를 측정할 필요가 있다고 생각된다.

References

- [1] Edward M. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: What is the role of the antigen presenting cell? *Autoimmunity*. 2008;7:305-308.
- [2] Guzik TJ, Korb R, Guzik TA. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003;54:469-487.
- [3] Arvand H. Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: the process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:164.
- [4] Haschemi A, Kosma P, Gille L, et al. The sedo-heptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* 2012;15(6):813-26.
- [5] MM, Boniface JJ, Reich Z, et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1998;16:523-544.
- [6] David M, Underhill, Michael B, et al. Dynamic Interactions of Macrophages with T Cells during Antigen Presentation. *J. Exp. Med.* 1999;190:1909-1914.
- [7] Dustin ML, Shaw AS. Costimulation: building an immunological synapse. *Science*. 1999;283:649-650.
- [8] Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y, et al. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*. 1999;283:680-682.
- [9] Kanje M, Rusovan A, Siskin B, Lundborg G. Pretreatment of rats with pulsed electromagnetic fields enhances regeneration of the sciatic nerve. *Bioelectromag.* 1993;14:353.
- [10] Cotter DJ. Overview of transcutaneous electrical nerve stimulation for treatment of acute postoperative pain. *Med. Instrum.* 1983;17:289.
- [11] Lee HS, Lee BR, Kim SJ. Effect of pulsed magnetic field in murine T lymphoma EL4 Cells. *AIP Advances*. 2023;13: 025344.
- [12] J. Kaszuba, et al. Magnetic field anti-inflammatory effects in Crohn's disease depends upon viability and cytokine profile of the immune competent cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2008 Mar;59(1):177-187.
- [13] Kim SJ, Lee SS, Lee HS. Effects of Pulsed Magnetic Field on Macrophage. *Journal of the Korean Magnetics Society*. 2022;32(3):1-5.