

알칼리 환원수가 *C57BL/6* 마우스의 소장과  
전신적 면역반응에 미치는 영향

연세대학교 보건환경대학원  
의생명과학전공  
이 용 규

알칼리환원수가 *C57BL/6* 마우스의 소장과  
전신적 면역반응에 미치는 영향

지도교수 양 용 석 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

이 용 규

이용규의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 보건환경대학원

2007년    월    일

## 감사의 글

많은 분들의 아낌없는 격려와 관심에 힘입어 졸업논문이 완성된 것에 감사드립니다. 이 논문을 위해 저에게 가르침과 많은 조언을 주신 양용석 지도교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 부족한 논문을 세심히 지도해 주시고 조언을 해주신 김종배 교수님과 이규재 교수님께도 감사드립니다. 또한 대학원 과정을 지내면서 많은 가르침을 주신 오옥두 교수님, 김태우 교수님, 박용석 교수님, 이해영 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 임상병리학과 교수님들께서는 부족한 저를 항상 깨우쳐 주시고, 따뜻하게 격려해주셨습니다. 훌륭한 교수님들과의 인연은 저에게 찾아온 또 하나의 소중한 선물입니다.

그리고 대학원 석사 과정을 하는 동안 함께한 동기 이정민과 동생 박성윤, 많은 도움을 주신 임병혁 선배님, 조용희 선배님, 안병락 선배님, 이지아 후배님, 박임희 후배님, 이진희 후배님 끝으로 부족한 저를 위해 물심양면으로 도와준 실험실 후배 정례에게 감사의 말씀을 드립니다.

대학원 생활과 회사 생활을 병행하는 동안 늘 옆에서 힘이 되어준 봉태형, 내 부탁을 늘 성실하게 들어준 한나와 묵묵히 지켜봐주신 의약평가실 독성팀 식구들에게 감사드립니다. 또 학업 중이라 자주 보지는 못했지만 응원을 해준 경호, 영석이, 순철이, 혜금이, 성희, 미영누나, 명규형과 형수님, 전자누나, 진영이에게도 감사한 마음을 전합니다.

제 모든 힘의 원천이며 살아가는 원동력인 사랑하는 부모님께 감사드립니다. 두분의 헤아릴 수 없는 사랑과 관심, 인내가 없었다면 지금의 저는 결코 있을 수 없었을 것입니다. 그 무엇으로도 다 표현할 수 없을 만큼의 헌신적인 두분의 사랑과 동생의 믿음 그리고 제가 사랑하는 아내의 내조로 이 자그마한 논문이 탄생되었습니다. 또한 장인어른과 장모님, 형님과 처형, 막둥이 동우와 다른 가족 분들께도 감사드립니다. 우리 가족의 사랑에 힘입어 항상 최선을 다해서 열심히 살아가겠습니다.

마지막으로, 내가 힘들 때 나의 눈물과 기도를 들으시고 지금도 하늘 보좌 우편에서 나를 위해 기도하시는 하나님께 감사드립니다.

이 외에 제가 미처 언급하지 못한 고마운 분들이 너무나 많습니다. 그 분들의 이름을 하나하나 되새기지 못함을 죄송하게 생각하며, 대신 제 깊은 감사의 말로 이 글을 말칠까 합니다. “모두들 감사드립니다.”

# 목 차

|  |     |
|--|-----|
| 그림 및 표 차례-----                               | ii  |
| 약기호표-----                                    | iii |
| 국문요약-----                                    | iv  |
| 제1장 서론-----                                  | 1   |
| 제2장 연구재료 및 방법-----                           | 3   |
| 1.알칼리환원수 준비-----                             | 3   |
| 2.실험동물-----                                  | 3   |
| 3.알칼리환원수 급이-----                             | 3   |
| 4.혈액 내 염증 및 면역세포 측정-----                     | 3   |
| 5.Serological parameter-----                 | 4   |
| 6.소장 내 cytokine의 발현 확인-----                  | 4   |
| 7.Total RNA 분리-----                          | 5   |
| 8.역전사중합효소반응을 이용한 비장 내 cytokine의 발현 확인-----   | 6   |
| 9.통계처리-----                                  | 7   |
| 제3장 결과-----                                  | 9   |
| 1.알칼리환원수 급이와 혈액 내 염증 및 면역세포 측정-----          | 9   |
| 2.Serological parameter 측정-----              | 11  |
| 3.알칼리환원수를 급이한 마우스의 소장 점막 내 cytokine의 발현----- | 13  |
| 4.비장 내 cytokine의 발현-----                     | 16  |
| 제4장 고찰-----                                  | 19  |
| 제5장 결론-----                                  | 22  |
| 참고문헌-----                                    | 23  |
| Abstract-----                                | 26  |

## *LIST OF TABLE AND FIGURES*

|  |    |
|--|----|
| Table 1. Cytokine primer sequences and amplified fragment size used in this study-----   | 8  |
| Table 2. Change of serological parameters-----   | 12 |
| Figure 1. Eosinophil, neutrophil, lymphocyte and monocyte count in blood of C57BL/6 mice-----  | 10 |
| Figure 2. Expression of (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-4, (C) IL-1 $\beta$ and (D) IL-5 expressed cell number per 10 villus-crypt unit (VCU) in the small intestine of all groups of C57BL/6 mice----- | 14 |
| Figure 3. Expression of (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-4, (C) IL-1 $\beta$ and (D) IL-5 expressed cells in the small intestine of control and ARW group C57BL/6 mice-----                              | 15 |
| Figure 4. Expression of IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ mRNA in control and ARW group C57BL/6 mice-----   | 17 |
| Figure 5. Expression of (A) IL-4, (B) IL-5, (C) TNF- $\alpha$ and (D) IL-1 $\beta$ mRNA expressed in control and ARW group C57BL/6 mice-----   | 18 |

## *ABBREVIATIONS*

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| ARW           | : | alkaline reduced water                          |
| ORP           | : | oxidation reduction potential                   |
| SOD           | : | superoxide dismutase                            |
| ROS           | : | reactive oxygen species                         |
| TNF- $\alpha$ | : | tumor necrosis factor-alpha                     |
| IL-1 $\beta$  | : | interleukin-1 beta                              |
| IL-4          | : | interleukin-4                                   |
| IL-5          | : | interleukin-5                                   |
| PBS           | : | phosphate buffered saline                       |
| RT-PCR        | : | reverse transcription polymerase chain reaction |
| mRNA          | : | messenger ribonucleic acid                      |
| cDNA          | : | complementary deoxyribonucleic acid             |
| VCU           | : | villus-crypt unit                               |
| DW            | : | distilled water                                 |
| SD            | : | standard deviation                              |



## 국문 요약

# 알칼리환원수가 C57BL/6 마우스의 소장과 전신적 면역반응에 미치는 영향

알칼리환원수(alkaline reduced water, ARW)를 급이하었을 때 동물 생체 내의 면역 및 소장에 미치는 영향을 알아보려고 본 연구를 시행하였다. C57BL/6 마우스에 6주 동안 알칼리환원수를 급이한 후 혈액 내 염증 및 면역세포, serological parameter, 소장 내 cytokine, 그리고 비장에서의 cytokine 발현 정도를 정수물을 먹인 대조군과 비교하였다. 혈액 내 염증 및 면역세포 수에서 호산구(eosinophil,  $p < 0.05$ )와 호중구(neutrophil,  $p < 0.001$ )는 대조군에 비해 ARW군에서 유의하게 감소하였고, 림프구(lymphocyte,  $p < 0.001$ )는 반대로 ARW군에서 유의하게 증가하였다. Serological parameter를 측정한 결과 glutamic pyruvic transaminase(GPT,  $p < 0.01$ ), creatine phosphokinase(CPK,  $p < 0.01$ ), blood urea nitrogen(BUN)과 creatinine( $p < 0.001$ )이 대조군에 비해 ARW군에서 유의하게 낮은 수치를 나타냈으며, Na과 Cl( $p < 0.001$ )은 대조군에 비해 ARW군에서 유의하게 높은 수치를 나타냈다. 또한 소장의 경우, ARW군의 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 발현 정도가 유의성은 없었지만 대조군에 비해 뚜렷하게 증가하였고 interleukin-4(IL-4,  $p < 0.05$ )의 발현이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 비장에서의 cytokine mRNA 발현은 대조군과 ARW군 사이에 변화를 보이지 않았다. 본 연구의 결과 알칼리환원수를 급이하었을 때 혈액 내 염증 및 면역세포와 혈청학적 정상 및 소장 점막에 작용하여 면역세포, 혈청학적 정상 및 cytokine 발현에 영향을 주었다.

이를 통해 알칼리환원수의 생체 내 면역반응과 장내 면역반응에 미치는 영향은 알칼리환원수의 효과에 대한 기전 규명과 함께 지속적인 연구가 필요함을 확인하였다.

핵심 되는 말 : 알칼리 환원수, C57BL/6 마우스, 소장, serological parameter, interleukin-4

## 제 1 장 서 론

알칼리환원수는 물을 전기분해 하였을 때 음극판이 설치된 전해조에서 생성되는 물로 알칼리성을 띠면서 환원성이 높다. 알칼리환원수가 만들어지는 동안 물속에는 용존 수소와 무기 미네랄이 많아지고 음극판으로 양이온이 모이게 되며, 음극판으로부터 전자(e-)를 받음으로써 전자의 양이 증가하여 그 결과 산화환원전위(oxidation reduction potential, ORP) 값이 낮아진다(1).

알칼리환원수에 포함된 활성수소는 superoxide dismutase(SOD)와 유사한 작용을 하며 과량의 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 제거함으로써 DNA의 파괴를 억제함이 실험적으로 증명되었고(2), 특정조건[gamma ray irradiation of (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si<sub>8</sub>O<sub>20</sub>]에서 수소원자로 수개월간 유지될 수 있음도 보고되었다(3). 알칼리환원수의 다양한 효과는 활성산소제거가 주요한 작용기전으로 알려져 있고(4-6), 활성산소는 생체에 산화적 스트레스(oxidative stress)를 일으켜 다양한 질병의 원인으로 작용한다고 보고되고 있으며, 암, 당뇨병, 아토피성 피부염, 고혈압, 심혈관 질환 등이 활성산소와 관련된 질환으로 알려져 있다(7-11). 알칼리환원수가 생체에 영향을 미치는 요인에는 pH, 산화환원전위, 수소원자 등이 있으며, 이 중 pH는 직접적인 작용요인으로서의 관련성이 적고, 높은 환원력을 나타내는 낮은 산화환원전위차와 수소원자가 활성산소 제거에 직접적인 요인으로 작용한다고 알려져 있다(2). 활성산소와 관련된 질병 이외에도 알칼리환원수는 체지방 비율 및 체중 감소, 장내 이상 발효 억제 그리고 당뇨병과 암에 대한 개선 효과가 있다고 보고되고 있다(12, 13). 또한 이러한 효과를 바탕으로 의료계와 식품 등 다양한 분야에서 알칼리환원수가 적용되고 있으며 그 활용 범위가 점점 넓어지고 있는 추세이다. 그러나 알칼리환원수가 생체 내 면역계에 미치는 영향에 대한 연구는 극히 적은 편으로, 보고된 바에 의하면 알칼리환원수는 활성산소 제거 외에도 일정부분 면역반응과 관련된 효과들이 확인되고 있으며(2), 이것은 특정 면역과 관련이 있을 것으로 추정되고 있다.

항체와 조직 내 면역세포의 변화는 다양한 cytokine에 의한 면역조절작용에 의

한 현상이다(14-16). 다양한 cytokine 중 림프구의 활성화, 증식 및 분화에 관여하는 IL-4와 면역반응을 결정하는 림프구 등이 다른 면역세포의 활성화 및 증식에 영향을 미칠 수 있다.

최근까지의 알칼리환원수에 대한 연구에서 일정 부분 면역반응과 관계된 효과들이 확인되고 있으며, 이는 특정 면역에 관여할 것으로 알려지고 있다. 본 연구는 알칼리환원수의 음용에 따른 소장 및 생체 내 면역(IL-4, 림프구)에 미치는 영향을 알아보고자 생후 4주령 된 C57BL/6 마우스에게 6주 동안 알칼리환원수를 급이한 후 생체 내 소장의 조직학적 변화와 혈액 및 비장에서 염증 및 면역세포의 변화를 관찰하였다.

## 제 2 장 연구재료 및 방법

### 1. 알칼리환원수 준비

전해알칼리환원수는 백금 전극을 이용하는 전기분해이온수기(BTM700, Biontech Co., Gunpo, Korea)로 제조하였다. ARW는 실험 직전에 제조하였으며, 제조한 직후에 pH 10, ORP -100 mV 이하의 값이 유지되도록 하였다.

### 2. 실험동물

생후 4주령 된 암컷 C57BL/6 마우스(Orient Bio, Sungnam, Korea)를 구입하여 사용하였다. 모든 마우스는 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 5\%$ 에서 12시간 명·암 주기를 유지하면서 사육하였으며 먹이는 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. 일주일간 순화기간을 거친 후 C57BL/6 마우스를 각각 정수물을 급이(feeding)한 그룹(대조군)과 알칼리환원수를 급이한 그룹(ARW군)으로 각각 13마리씩 총 26 마리로 나누어 6주간 실험하였다.

### 3. 알칼리환원수 급이

대조군에게는 같은 이온수기(BTM700)에서 생성되는 정수물을, ARW군은 pH 10, ORP -100 mV 이하의 전해알칼리환원수를 6주 동안 급이하였다. ARW는 12시간마다 교환하여 줌으로써 ORP 값을 유지시켜 주었다.

### 4. 혈액 내 염증 및 면역세포 측정

6주 후 대조군과 ARW군을 모두 경추탈골한 다음 C57BL/6 마우스의 안와정맥에서 혈액을 채혈하기 위해 heparinized capillary tube(Chase Scientific Glass, Meiningen, Germany)를 이용하여 혈액을 받은 후 혈액박층도말 표본을 만들었으며, 유핵세포를 중심으로 검경하였다.

## 5. Serological parameter

6주 후 대조군 및 ARW군의 경추탈골한 C57BL/6 마우스의 안와정맥에서 채취한 혈액을 원심분리하여 얻은 혈청으로 글루타민 옥살초산 전이효소(glutamic oxaloacetic transaminase, GOT), 글루타민 피루빈산 아미노 전이효소(glutamic pyruvic transaminase, GPT), 크레아틴 인산효소(creatine phosphokinase, CPK), 혈액 요질소(blood urea nitrogen, BUN), 크레아티닌(creatinine), 나트륨(sodium, Na), 칼륨(potassium, K) 그리고 염소(chloride, Cl)를 Toshiba-200FR(Toshiba Medical Systems Co. Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하였다.

## 6. 소장 내 cytokine의 발현 확인

### 1) 면역조직화학적 염색

마우스 소장의 용모에서 IL-1 $\beta$ 와 IL-5의 발현을 조사하기 위하여 냉동 보관된 마우스 소장을 동결 절편기를 이용하여 -20 $^{\circ}$ C에서 4  $\mu$ m로 박절하여 poly-L-lysine 이 코팅 된 slide에 부착시켰다. 공기 중에 1시간 건조시켜 phosphate buffered saline(PBS)에 세척한 후 acetone에 10분 동안 고정하였다. 이를 다시 PBS에 세척하고, 조직 안에 내재된 peroxidase를 제거하기 위하여 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 10분 동안 방치시킨 후 IL-4의 경우는 5% 정상토끼 혈청에, IL-1 $\beta$ , IL-5인 경우는 5% 정상 염소 혈청에 10분 동안 각각 반응시켰다. 일차항체인 rabbit anti-human IL-1 $\beta$ , rabbit anti-human IL-5(Santa Crus Biotechnology, Santa, U.S.A.)은 1:100으로 희석한 다음 슬라이드를 실온에서 1시간 반응시켰다. 그리고, 이차항체인 biotin이 부착된 rabbit anti-Rat IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)(1:200)와 goat anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)(1:200)에 30분 동안 반응시켰다. Peroxidase가 부착된 streptavidin(Dako, Carpinteria, CA, U.S.A.)에 20분 동안 반응시켜 PBS에 세척하고, 3,3'-diaminobenzidine(DAB)에 발색한 다음 Mayer's hematoxylin로 대조염색을 실시하였다. 그리고 광학 현미경으로 관찰하여 소장 조직 10 villus-crypt unit(VCU) 당 진한 갈색으로 발색된 세포 수를 측정하였다.

## 2) 면역형광 현미경 검사

마우스 소장 의 용모에서 IL-4, TNF- $\alpha$ 의 발현을 조사하기 위하여 냉동 보관된 마우스 소장을 냉동 절편기를 이용하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서  $4\ \mu\text{m}$ 로 박절하여 poly-L-lysine 코팅된 slide에 부착시켰다. 그 후 공기 중에 1시간 건조시켜 PBS에 세척한 후  $-20^{\circ}\text{C}$  methanol에 고정하였다. IL-4와 TNF- $\alpha$ 는 먼저 5% 정상 토끼 혈청을 가지고 20분 동안 비특이적인 반응을 제거하였다. 그리고, 일차항체인 monoclonal rat anti-mouse IL-4(PharMingen, San Diego, CA, U.S.A.)(1:30)와 rat anti-mouse TNF- $\alpha$ (PharMingen, San Diego, CA, U.S.A.)(1:30)에 슬라이드를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 biotin이 결합된 이차항체 rabbit-anti rat IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)(1:200)에 30분 동안 반응시킨 다음, fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합된 streptavidin(Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)에 30분 동안 반응시켰다. Glycerin jelly로 봉입한 후 형광 현미경 하에서 소장 조직 10 VCU 당 형광을 발현하는 세포수를 측정하였다.

## 7. Total RNA 분리

각각의 대조군과 ARW군에 정수물 및 알칼리환원수를 투여한지 6주 후 C57BL/6 마우스를 거살하여 비장을 적출한 뒤 cryotube에 넣어서 액체질소에 담근 후 바로 꺼내어  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 적출한 비장의 1/3을 TRIzol<sup>®</sup> reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)를 1 ml에 넣고 70% ethyl alcohol/0.01% dimethyl pyrocarbonate(DEPC)(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 증류수로 전 처리한 균질화기로 균등화시켰다. 그 후 실온에서 5분간 배양한 다음 chloroform(Duksan Pure Chemical, Ansan, Korea)  $200\ \mu\text{l}$ 과 혼합하여 15초 동안 와동하고 실온에서 3분간 배양해서 13000 rpm으로 15분간  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리 하였다. 그 뒤 상층액을  $400\ \mu\text{l}$  취하여 isopropanol(Duksan Pure Chemical, Ansan, Korea)  $400\ \mu\text{l}$ 를 조심스럽게 혼합한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 13000 rpm으로 10분 동안 원심분리를 실시한 후 상층액을 제거하였다. 멸균한 0.01% DEPC 증류수로 희석한 75% alcohol 1 ml을 넣은 뒤  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 13000 rpm으로 5분 동안 원심분리를 실시하였고

상층액을 완전히 제거하였다. 분리된 총 RNA는 30  $\mu$ l의 멸균된 0.01% DEPC 증류수로 용해시킨 뒤 -70°C에 보관하였다.

분리된 총 RNA의 확인은 0.5X TBE buffer(Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer, pH 8.0)을 사용하여 1% agarose gel(Bioneer Co., Daejeon, Korea)에 RNA 2  $\mu$ g과 6X loading dye 1  $\mu$ l를 섞어 100V, 25분 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 자외선 광원(Vilbert-Lourmat, Mame La Valle, France) 위에 두고 Polaroid film이 들어있는 photo-documentation camera(Fisher Scientific, Pittsburgh, Philadelphia, U.S.A.)를 이용하여 254 nm에서 촬영하였다.

## 8. 역전사중합효소반응을 이용한 비장 내 *cytokine*의 발현 확인

분리한 total RNA는 200 pmol oligo dT<sub>15</sub> primer(Promega, Madison, WI, U.S.A.) 1  $\mu$ l과 total RNA 4  $\mu$ g를 혼합하여 70°C에서 5분간 배양한 다음 AccuPower<sup>®</sup> RT-PreMix(Bioneer Co., Daejeon, Korea)와 혼합하였다. 그 다음 멸균된 0.01% DEPC 증류수로 총 부피가 50  $\mu$ l가 되게 첨가하여 혼합한 다음 42°C에서 60분, 94°C에서 5분 동안 반응시켜서 cDNA를 합성하였다.

PCR 반응은 합성한 cDNA 4  $\mu$ l에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP(iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)를 5  $\mu$ l를 넣었다. 그 후 10X PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea) 5  $\mu$ l, primer set 100 pmole/ $\mu$ l (Bioneer Co., Daejeon, Korea)을 각각 1  $\mu$ l, *Taq* polymerase 0.05  $\mu$ l (0.025 unit) (iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)를 첨가하고, 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 50  $\mu$ l가 되도록 하여 PCR thermal cycler (GeneAmp PCR System 2700, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California, U.S.A.)에서 증폭하였다. 사용한 각각의 primer는  $\beta$ -actin의 경우 상용화된 제품(Bioneer Co., Daejeon, Korea)을 사용했고, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 기존의 연구에서 사용된 것(Bioneer Co., Daejeon, Korea)을 주문하여 reverse transcription-polymerase



chain reaction(RT-PCR)을 실시하였다(Table 1).  $\beta$ -actin, IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 경우는 94°C에서 5분 동안 가온한 후에 매 cycle당 94°C에서 30초간 변성(denaturation), 60°C에서 30초 동안 보합(annealing), 72°C에서 1분 동안 중합(extension)반응을 시행하여 35 cycle을 시행하였고 완전한 신장을 위해 72°C에서 7분 동안 지속하였다. IL-5는 94°C에서 5분 동안 가온한 후에 매 cycle당 94°C에서 30초간 변성, 62°C에서 30초 동안 풀림, 72°C에서 1분 동안 신장 반응을 시행하여 35 cycle을 시행하였고 완전한 신장을 위해 72°C에서 7분 동안 지속하였다. 반응이 종료된 후에 0.5  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide(Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, U.S.A.)를 첨가한 2% agarose gel을 이용하여 100 V로 25분간 전기 영동하여 cytokine의 발현을 확인하였고, 전기영동이 끝난 gel은 자외선 광원(Vilbert-Lourmat, Mame La Valle, France) 위에 두고 Polaroid film이 들어있는 photo-documentation camera를 이용하여 254 nm에서 촬영하였다. 각각의 cytokine에 대한 정량적인 분석은 Quantity One(Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, U.S.A.)을 이용하였다.

## 9. 통계처리

대조군과 ARW군 사이의 통계학적 유의성은 student's *t*-test를 사용하여 분석하였다. 조직표본의 경우 각 그룹마다 3개의 조직표본을 준비하였다. 유의수준은  $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

*Table 1. Cytokine primer sequences and amplified fragment size used in this study.*

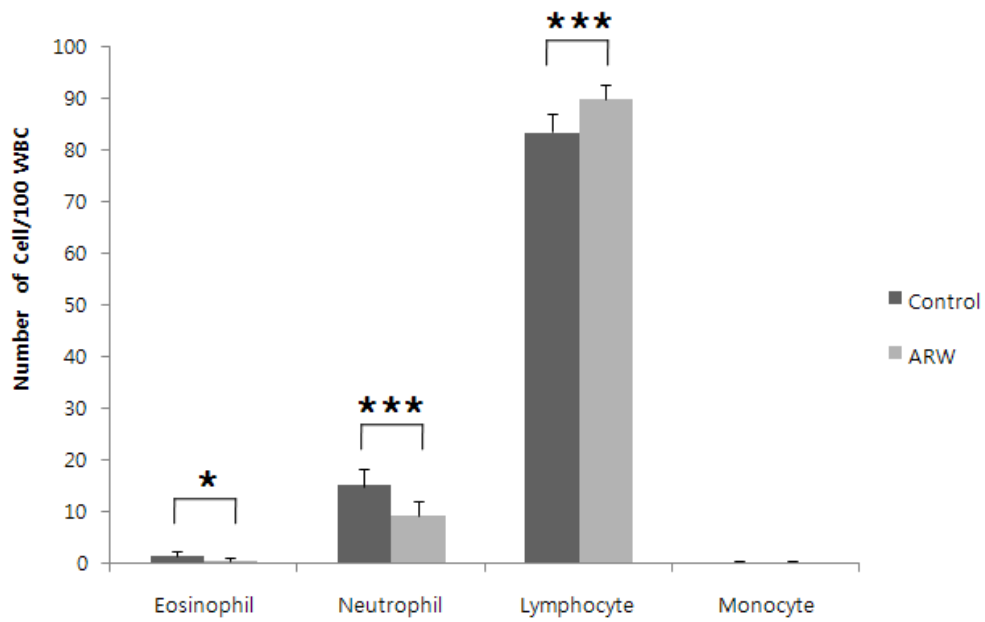
| Cytokine       | Primer sequence (5'→3') |  | Expected amplified fragment size (bp) |
|----------------|-------------------------|--|---------------------------------------|
| TNF- $\alpha$  | Sense                   | GGC AGG TCT ACT TTA GAG TCA TTG C        | 300                                   |
|                | Antisense               | ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G        |                                       |
| IL-4           | Sense                   | TCT CTA GAT CAT GGG CAT TTT GAA CGA GGTC | 306                                   |
|                | Antisense               | TGC ATG ATG CTC TTT AGG CTT TCC          |                                       |
| IL-1 $\beta$   | Sense                   | GCT ACC TGT GTC TTT CCC GTG G            | 291                                   |
|                | Antisense               | TTG TCG TTG CTT GGT TCT CCT TG           |                                       |
| IL-5           | Sense                   | ATG ACT GTG CCT CTG TGC CTG GAG C        | 243                                   |
|                | Antisense               | CTG TTT TTC CTG GAG TAA ACT GGG G        |                                       |
| $\beta$ -actin | Sense                   | AGG CTG TGC TGT CCC TGT ATG C            | 395                                   |
|                | Antisense               | ACC CAA GAA GGA AGG CTG GAA A            |                                       |

## 제 3 장 결 과

### 1. 알칼리환원수 급이와 혈액 내 염증 및 면역세포 측정

C57BL/6 마우스의 모든 군의 안와정맥에서 채취한 혈액을 도말하여 Wright 염색을 한 다음 100개의 백혈구 중 호산구, 호중구, 림프구 및 단구의 수를 계산하였다.

정수물을 급이한 대조군의 호산구는  $1.4 \pm 1.0$ , 호중구는  $15.0 \pm 3.4$ , 림프구는  $83.6 \pm 3.7$ , 단구는  $0.1 \pm 0.3$ 로 나타났다. ARW군은 호산구  $0.5 \pm 0.7$ , 호중구  $9.4 \pm 2.8$ , 림프구  $90.0 \pm 2.8$ , 단구  $0.2 \pm 0.4$ 로 나타났다. 대조군과 ARW군을 비교할 때, ARW군의 호산구( $p < 0.05$ )와 호중구( $p < 0.001$ )는 대조군에 비해 유의한 차이를 보이며 감소하였고, 림프구( $p < 0.001$ )는 대조군에 비해 ARW군에서 유의하게 증가하였다(Figure 1).



*Figure 1. Eosinophil, neutrophil, lymphocyte and monocyte count in blood of C57BL/6 mice.*

Blood was obtained from control and ARW groups. The blood was smeared on slide glass and the number of each leukocyte was monitored as Wright stain. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  are assessed as a significant difference.

## 2. Serological parameter 측정

C57BL/6 마우스의 모든 군의 안와정맥에서 채취한 혈액을 원심분리하여 얻은 혈청으로 GOT, GPT, CPK, BUN, creatinine, Na, K 및 Cl을 측정하였다.

정수물을 급이한 대조군의 GOT는  $129.8 \pm 18.1$  IU/L, GPT는  $28.5 \pm 4.1$  IU/L, CPK는  $419.2 \pm 135.8$  IU/L, BUN는  $34.2 \pm 4.1$  mg/dl, creatinine는  $0.50 \pm 0.02$  mg/dl, Na는  $150.2 \pm 1.1$  mEq/L, K는  $6.9 \pm 0.0$  mEq/L, Cl는  $112.8 \pm 1.5$  mEq/L로 나타났다. ARW군은 GOT  $120.2 \pm 20.3$  IU/L, GPT  $25.5 \pm 2.8$  IU/L, CPK  $267.1 \pm 126.3$  IU/L, BUN  $25.7 \pm 2.5$  mg/dl, creatinine  $0.45 \pm 0.03$  mg/dl, Na  $152.0 \pm 0.8$  mEq/L, K  $6.5 \pm 0.4$  mEq/L, Cl  $115.6 \pm 1.2$  mEq/L로 나타났다. 대조군과 ARW군을 비교할 때, ARW군의 GPT( $p < 0.05$ ), CPK( $p < 0.01$ ), BUN과 Creatinine( $p < 0.001$ )이 대조군에 비해 ARW군에서 유의하게 낮은 수치를 나타냈으며, Na과 Cl( $p < 0.001$ )은 대조군에 비해 ARW군에서 유의하게 높은 수치를 나타냈다(Table 2).

*Table 2. Change of serological parameters.*

|                   | Control     | ARW           |
|-------------------|-------------|---------------|
| GOT(IU/L)         | 129.8±18.1  | 120.2±20.3    |
| GPT(IU/L)         | 28.5±4.1    | 25.5±2.8*     |
| CPK(IU/L)         | 419.2±135.8 | 267.1±126.3** |
| BUN(mg/dl)        | 34.2±4.1    | 25.7±2.5***   |
| Creatinine(mg/dl) | 0.50±0.02   | 0.45±0.03***  |
| Na(mEq/L)         | 150.2±1.1   | 152.0±0.8***  |
| K(mEq/L)          | 6.9±0.0     | 6.5±0.4       |
| Cl(mEq/L)         | 112.8±1.5   | 115.6±1.2***  |

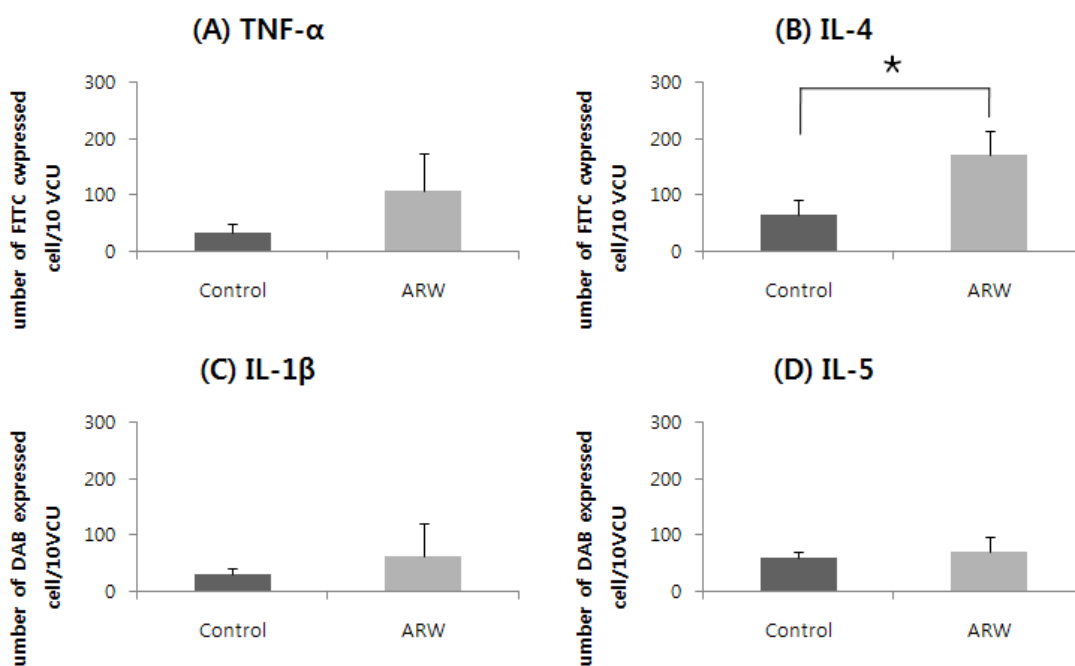
Data are expressed as mean ± SD.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$

### 3. 알칼리환원수를 급이한 마우스의 소장 점막 내 *cytokine*의 발현

C57BL/6 마우스의 모든 군의 소장상부에서 cytokines을 확인하기 위해 면역조직화학염색과 면역형광염색을 실시하여 10 VCU 중에 발현된 세포수를 계산하였다.

TNF- $\alpha$ 에서 대조군은  $32.5 \pm 17.1$ , ARW군은  $108.1 \pm 45.3$ , IL-4에서 대조군은  $65.3 \pm 26.4$ , ARW군은  $171.2 \pm 42.3$ , IL-1 $\beta$ 에서 대조군은  $30.5 \pm 11.2$ , ARW군은  $62.3 \pm 59.5$ , IL-5에서 대조군은  $60.2 \pm 11.0$ , ARW군은  $69.8 \pm 26.5$ 를 나타냈다. TNF- $\alpha$ 는 ARW군에서 크게 상승하였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. IL-4는 ARW군에서 IL-4( $p < 0.05$ ) 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. IL-1 $\beta$ 과 IL-5는 ARW군에서 증가는 하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Figure 2, 3).

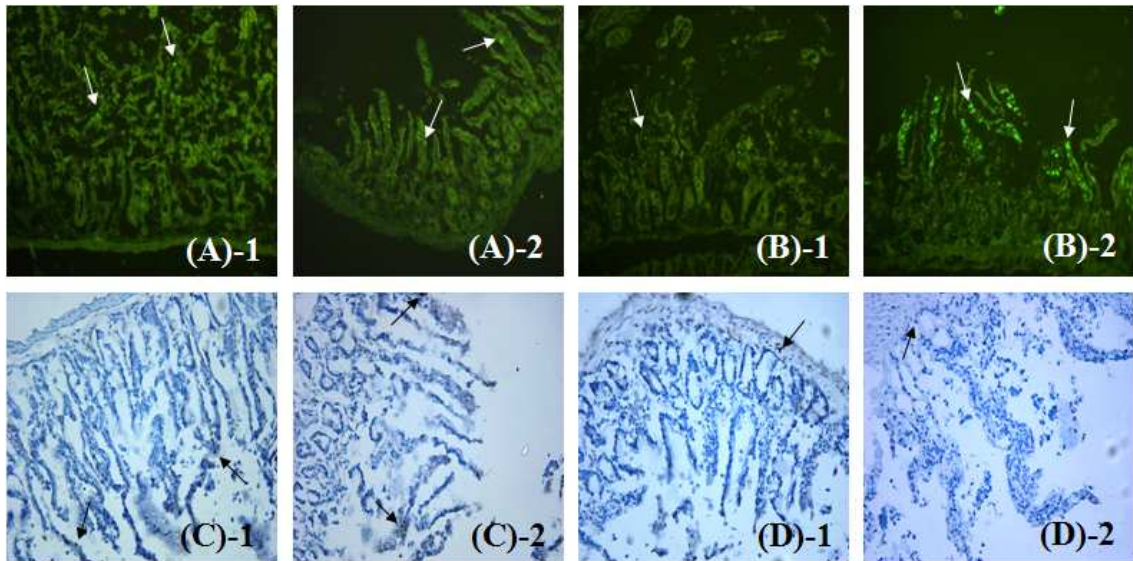


*Figure 2. Expression of (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-4, (C) IL-1 $\beta$  and (D) IL-5 expressed cell number per 10 villus-crypt unit (VCU) in the small intestine of all groups of C57BL/6 mice.*

Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

\* $p < 0.05$





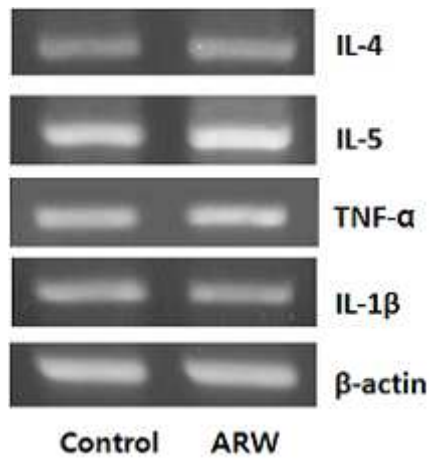
*Figure 3. Expression of (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-4, (C) IL-1 $\beta$  and (D) IL-5 expressed cells in the small intestine of control and ARW group C57BL/6 mice.*

DAB (diaminobenzidine) stain (C, D) and cytokines labeled FITC (fluorescein isothiocyanate)(A, B) were showed each cytokine expressed cells in small intestine villi of C57BL/6 mice(A; TNF- $\alpha$ , B; IL-4, C; IL-1 $\beta$  and D; IL-5. 1; control, 2; ARW group. Original magnifications: A, B, C, D: x200).

#### 4. 비장 내 *cytokine*의 발현

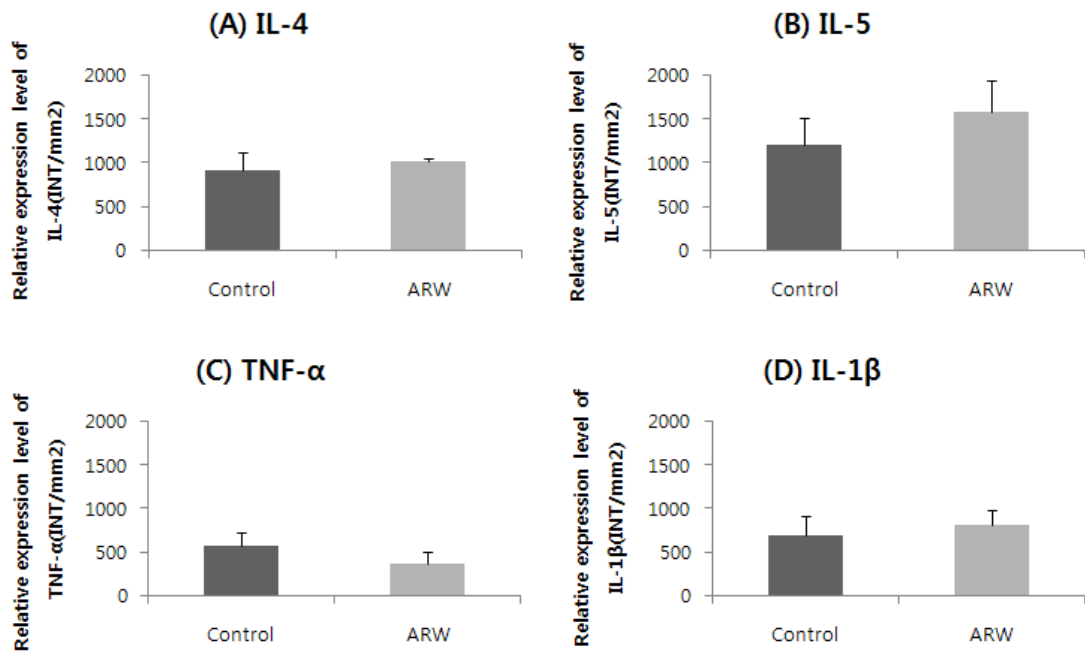
각각의 대조군과 ARW군에 정수물 및 알칼리환원수를 투여한지 6주 후 C57BL/6 마우스를 거살하여 비장을 분리한 다음 균등화하여 RT-PCR 방법으로 각 군별 *cytokine* mRNA에 대한 발현을 확인해 보았다.

IL-4에서 대조군은  $927.7 \pm 201.8$ , ARW군은  $1020.0 \pm 34.9$ , IL-5에서 대조군은  $1209.9 \pm 313.9$ , ARW군은  $1580.7 \pm 363.1$ , TNF- $\alpha$ 에서 대조군은  $570.5 \pm 162.7$ , ARW군은  $376.3 \pm 139.5$ , IL-1 $\beta$ 에서 대조군은  $702.1 \pm 225.5$ , ARW군은  $823.6 \pm 170.7$ 로 나타났다. IL-4는 각 군별로 큰 변화는 보이지 않았으며 유의한 차이도 보이지 않았다. IL-5는 ARW군에서 조금 증가하였으나 큰 변화는 보이지 않았으며 유의한 차이도 보이지 않았다. TNF- $\alpha$ 는 ARW군에서 감소하였으나 큰 변화는 보이지 않았으며 유의한 차이도 보이지 않았다. IL-1 $\beta$ 는 각 군별로 큰 변화는 보이지 않았으며 유의한 차이도 보이지 않았다(Fig. 4, 5).



*Figure 4. Expression of IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA in control and ARW group C57BL/6 mice.*

Total RNA was extracted from four spleens (splenocytes). Levels of IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA were analyzed by RT-PCR.



**Figure 5. Expression of (A) IL-4, (B) IL-5, (C) TNF- $\alpha$  and (D) IL-1 $\beta$  mRNA expressed in control and ARW group C57BL/6 mice.**

Total RNA was extracted from four spleens (splenocytes). Levels of IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA were analyzed by RT-PCR as described in the Materials and Methods section. Data was showed the level expressed by density (INT/mm<sup>2</sup>). Quantitative analysis of mRNA was performed with Quantity One, computer-assisted imaging densitometer system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.).

## 제 4 장 고 찰

본 연구에서는 생후 4주령의 C57BL/6 마우스에 알칼리환원수를 6주 동안 급이 한 후 거살하여 소장의 조직학적 변화와 cytokine의 발현, 혈액 및 비장에서의 염증 및 면역세포의 변화에 미치는 영향에 대하여 조사하였으며, 특히 IL-4, IL-5, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 cytokine과 림프구를 중점적으로 살펴보았다.

마우스 혈액 내 염증 및 면역세포의 변화를 관찰한 결과 ARW군의 호산구( $p<0.05$ )와 호중구( $p<0.001$ )는 대조군에 비해 유의한 차이를 보이며 감소하였고, 림프구( $p<0.001$ )는 대조군에 비해 ARW군에서 유의하게 증가하였다(Figure 1). 호산구와 호중구는 염증반응에 관여하는 세포로서 어떤 원인에 의해 염증반응이 일어나게 되면 염증 부위로 침윤되는 현상을 보여준다. 또한 림프구는 면역반응에 관여하는 세포로서 T 림프구와 B 림프구로 나뉘어진다. T 림프구는 세포성 면역을 담당하는 세포로서 helper T 세포와 cytotoxic T 세포로 나눌 수 있으며 이 중 helper T 세포는 cytokine을 분비하여 면역반응을 조절하고 cytotoxic T 세포는 비자기항원을 지닌 세포를 직접 공격함으로써 중요한 면역기능을 담당한다. 반면 B 림프구는 체액성 면역을 담당하는 세포로 항원에 의해 자극을 받으면 항체를 생산하고 생산된 항체는 항원-항체 반응을 일으켜 항원을 제거한다(Silverstein et al., 1989)(17). 전해알칼리환원수의 음용에 따른 ICR mice의 생체 내 안전성에 관한 Yang 등의 논문에서도 마우스 혈액 내의 염증 세포와 면역세포의 변화를 관찰한 결과 호중구는 대조군에 비해 ARW군에서 유의성 있게 감소하였고, 림프구는 호중구와는 반대로 ARW군에서 유의성 있게 증가하였다.(18) 이와 같은 각 세포들의 기능을 고려해 볼 때 호산구와 호중구의 감소와 림프구의 증가는 ARW를 지속적으로 음용할 경우 ARW가 생체 내 염증 반응을 완화시키고 면역반응의 활성화에 부분적으로 영향을 미칠 수 있음을 시사해준다.

Serological parameter의 변화를 관찰한 결과 ARW군의 GPT( $p<0.05$ ), CPK( $p<0.01$ ), BUN과 Creatinine( $p<0.001$ )이 대조군에 비해 ARW군에서 유의하게 낮은 수치를 나타냈으며, Na과 Cl( $p<0.001$ )은 대조군에 비해 ARW군에서 유의하

게 높은 수치를 나타냈다(Table 2). 고지방 사료를 먹인 SD rat에 알칼리환원수가 미치는 영향에 대한 Jin 등의 논문에서는 GOT, GPT 수치가 ARW군에서 유의하게 감소하였고(19), OLETF rat에서 알칼리환원수의 항당뇨 효과에 대한 Jin 등의 논문에서도 GOT가 유의성 있게 감소하였다(20). 이는 알칼리환원수를 급이하였을 때 간질환과 관련이 있는 GOT, GPT 효소활성치가 낮아지는 것을 알 수 있다. K는 두 실험군 사이에 유의한 차이가 없었고 Na와 Cl은 ARW군에서 높게 관찰되었으나, Na/Cl 비율이 정상의 범주를 벗어나지 않는 것으로 보아 ARW가 전해질 평형에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다(Table 2).

ARW가 생체에 미치는 면역학적 영향을 관찰하기 위한 목적으로 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-5의 발현 정도를 알아보았다. Cytokine의 발현은 알칼리환원수 급이에 의해 일어난 소장 내 면역학적 변화를 부분적으로 보여준다. 면역조직화학염색과 면역형광염색을 통한 소장의 cytokine 발현 결과에 의하면 IL-4( $p < 0.05$ )를 제외하면 다른 cytokine들이 모두 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2, 3). IL-4는 B 세포 growth factor 및 B 세포 항체의 class switching에 관여하는 cytokine으로서 면역세포를 활성화시키는데 중요한 역할을 한다(21-22). 또한 IL-4는 면역조절 기능과 항염증 작용을 하며, 특히 Th1과 Th2 세포 사이의 균형을 유지함으로써 장내 면역에 중요한 역할을 한다. 그러므로 본 실험에서 소장 조직 내의 IL-4 증가는 알칼리환원수가 국소적인 면역의 활성화에 관여한다는 것을 말해주며, inflammatory bowel disease(IBD)에서 IL-4 level과 IL-4 mRNA가 감소되었다는 Karlstunnen 등의 실험결과는 이 결과를 뒷받침해준다(23). 그러나 소장에서의 국소면역과는 달리 mRNA를 통한 비장에서의 cytokine 발현은 두 그룹 간의 유의한 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 4, 5).

본 연구에서의 알칼리환원수의 특성을 관찰하여 보면 다음과 같은 가설로 결과를 해석할 수 있다. 즉 알칼리환원수의 어떠한 특성이 혈액 내 염증 및 면역세포와 혈청학적 성상 및 소장 점막에 작용하여 세포, 장기 및 cytokine에 영향을 주었다고 분석되는 것이다. 또한 이 가설은 알칼리환원수가 전체적인 면역반응에 관여하기 보다는 물이 접촉하는 소장의 점막에 작용하여 나타난 직접적인 결과로 이해할 수 있다. 본 연구에서 알칼리환원수를 급이한 군의 비장 내 cytokine의 변

화가 관찰되지는 않았으나 소화기관을 경유하여 흡수되는 과정에서 전신 면역계에 영향을 줄 수 있고, 이의 일부 결과로 혈액 내 염증 및 면역세포와 혈청학적인 정상 및 소장 점막 내 면역세포의 변화가 관찰되었을 것으로 판단된다.

본 연구의 결과, 알칼리환원수 급이 후 호산구, 호중구, GPT, CPK, BUN 및 creatinine이 유의하게 감소하였고, 림프구, Na 및 Cl이 유의하게 증가하면서 혈액 내 염증 및 면역세포 와 간장, 근육 및 신장 등과 같은 장기에서의 면역반응이 유도되었다. 또한 소장 점막의 IL-4 cytokine이 유의성 있게 증가한 것이 면역세포를 활성화 하는데 관계가 있음을 보여주었다. 이러한 세포 및 cytokine이 면역반응과 관계하여 생각해 볼 때, 알칼리환원수의 생체 내 국소면역과 장내 면역에 미치는 영향은 알칼리환원수의 효과에 대한 기전 규명과 함께 더 구체적인 연구가 필요하다고 하겠다.

## 제 5 장 결 론

알칼리환원수의 음용에 따른 소장 및 생체 내 면역에 미치는 영향을 알아보기 위하여 C57BL/6 마우스에게 6주 동안 알칼리환원수를 급이한 후 혈액에서의 염증 및 면역세포의 변화를 관찰하였으며, 혈청학적으로 간장, 근육 및 신장 등 관련 항목이 알칼리환원수와 어떠한 상관관계가 있는지 알아보았다. 또한, 소장 점막 내 국소면역 반응 등을 알아보기 위해 IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 발현 세포를 측정하였다. 그리고 RT-PCR을 통해 마우스의 비장 내 면역반응과 관련이 있는 IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 에 대해 분석한 결과는 다음과 같다.

1. Wright stain을 통해 대조군 및 ARW군 마우스의 혈액 내 백혈구의 수를 계산 결과 호산구의 경우 대조군보다 ARW군에서 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 또한 호중구의 경우 대조군보다 ARW군에서 유의하게 감소하였다( $p < 0.001$ ). 그리고 림프구의 경우에는 대조군보다 ARW군에서 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ).

2. Serological parameter를 측정한 결과 GPT의 경우 대조군보다 ARW군에서 유의하게 감소하였고( $p < 0.05$ ), CPK의 경우 대조군보다 ARW군에서 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 또한 BUN과 Creatinine의 경우 대조군보다 ARW군에서 유의하게 감소하였다( $p < 0.001$ ). 그리고 Na과 Cl의 경우 대조군보다 ARW군에서 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ).

3. 마우스의 소장 점막 내 IL-4의 경우 대조군보다 ARW군에서 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ).

4. 마우스의 비장 내 cytokine 발현 결과 각 군당 별다른 유의적 차이가 없었다.

이상의 연구를 종합해 본 결과 알칼리환원수를 음용하면 생체 내 면역반응과 장내 면역반응에 일부 영향을 미치는 것으로 분석되었다.



## 참고문헌

1. Park SK, Kim DH, Deung YK, Yang EJ, Ryang YS, Kim HW, Lee KJ. (2004) The change of pH and oxidation-reduction potential(ORP) of alkaline reduced water. *The Newest Med J*, **47** : 24-30.
2. Shirahata S, Kabayama S, Nakano M, Miura T, Kusumoto K, Gotoh M, Hayashi H, Otsubo K, Morisawa S and Katakura Y. (1997) Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun*, **234** : 269-274.
3. Waro N, Takashi N, Satoko H, Takahiro S and Norihiro T. (1994) Atoms-in-Molecules Analysis of Extended Hypervalent Five-Center, Six-Electron (5c-6e) C(2)Z(2)O interactions at the 1,8,9-Positions of Anthraquinone and 9-Methoxyanthracene Systems. *Chemistry - A European J*, **13**(1) : 255-268.
4. Feig DI, Reid TM and Loeb LA. (1994) Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res*, **54** : 1890s-1894s.
5. Reid TM, Loeb LA. (1992) Mutagenic specificity of oxygen radicals produced by human leukemia cells. *Cancer Res*, **52** : 1082-1086.
6. Chen K, Thomas SR and Keaney JF. (2003) Beyond LDL oxidation : ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med*, **35** : 117-132.
7. Eid HM, Lyberg T, Larsen J, Arnesen H and Seljeflot I. (2002) Reactive oxygen species generation by leukocytes in populations at risk for atherosclerotic disease. *Scand J Clin Lab Invest*, **62** : 431-439.
8. Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, Reckelhoff JF and Granger JP. (2003) Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension*, **42** : 806-810.

9. Kagawa Y, Cha SH, Hasegawa K, Hamamoto T and Endo H. (1999) Regulation of energy metabolism in human cells in aging and diabetes : FoF(1), mtDNA, UCP and ROS. *Biochem Biophys Res Commun*, **26** : 662-676.
10. Cai H and Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress. *Circ Res*, **87** : 840-844.
11. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, **114** : 1752-1761.
12. Park SK, Lee KJ, Yang EJ, Lim SJ, Ryang YS, Jin D, Kim HW, Deung YK, Kim DH. (2004) Effect of mineral-induced alkaline-reduced water : scavenging of reactive oxygen species, B16BL6 metastasis and blood glucose concentration. *Autumn Meeting of The Korean Society of medical Biochemistry and Molecular Biology : International Symposium on Current Topics in Biomedicine*, (Seoul) #M-15
13. Lee KJ, Park SK, Sung JS, Kim DH, Deung YK, Kim MC, Yang EJ, Lim SJ, Ryang TS, Kim HW. (2004) Effect of electrolyzed-reduced water : *in vivo* and *in vitro* examination and clinical trials. *The 3rd Asia Pacific Conference on Evidence-Based Medicine*, (Hong Kong) #93
14. Callard RE and Turner MW. (1990) Cytokines and Ig switching : evolutionary divergence between mice and humans. *Immunol Today*, **11** : 200-203.
15. Mosmann TR, Sad S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets : Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, **17** : 138-146.
16. Laqente V, Pruniaux MP, Junien JL and Moodley I. (1995) Modulation of cytokine-induced eosinophil infiltration by phosphodiesterase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*, **151** : 1720-1724.

17. Silverstein AM. (1989) A history of the immunology. Academic Press, Sandiego
18. Yang EJ, Lim SJ, Ryang YS, Yoo YM, Kwon KR, Kim DH, Deung YK, Park SK, Lee KJ. (2005) The study on the safety of alkaline reduced water for drinking in ICR mice. *The Newest Med J*, **48** : 11-17.
19. Jin D, Park SK, Lee YM, Yoon YS, Kim DH, Deung YK, Lee KJ. (2006) Effect of mineral-induced alkaline reduced water on sprague-dawley rats fed on high-fat diet. *J Exp Biomed Sci*, **12** : 1-7.
20. Jin D, Ryu SH, Kim HW, Yang EJ, Lim SJ, Ryang YS, Chung CH, Park SK, Lee KJ. (2006) Anti-diabetic effect of alkaline reduced water on OLETF rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70** : 31-37
21. Urban JF Jr, Katona IM, Paul WE, Finkelman FD. (1991) Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc Natl Acad Sci*, **88** : 5513-5517.
22. Elenkov IJ, Lezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP. (2005) Cytokine Dysregulation, Inflammation and Well-Being. *Neuroimmunomodulation*, **12** : 255-269.
23. Karttunen R, Breese EJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. (1994) Decreased mucosal interleukin-4(IL-4) production in gut inflammation. *J Clin Pathol*, **47** : 1015-1018

## *Abstract*

### *Effect of Alkaline Reduced Water on Small Intestine and Systemic Immune Responses in C57BL/6 Mice*

Lee, Yong Gyu

Department of Biomedical Laboratory science

The Graduate School

Yonsei University

In this study, the effects of alkaline reduced water on small intestine and systemic immunity of a mouse were investigated. C57BL/6 mice were fed with conventional water (control group) or ARW (ARW group) for 6 weeks. Then the numbers of peripheral blood leukocytes, serological parameters and cytokine mRNA expression levels in small intestine and spleen of C57BL/6 mice were examined.

Among the peripheral blood leukocytes, the numbers of eosinophils ( $p < 0.05$ ) and neutrophils ( $p < 0.001$ ) were decreased and those of lymphocytes ( $p < 0.001$ ) number were increased in the ARW group. In case of serological parameters, GPT ( $p < 0.01$ ), CPK ( $p < 0.01$ ), BUN ( $p < 0.001$ ) and creatinine ( $p < 0.001$ ) levels were decreased in ARW group, but Na and Cl levels were increased in the ARW group ( $p < 0.001$ ). In small intestine, the mRNA expression of IL-4 was significantly increased in the ARW group and the mRNA expression of TNF- $\alpha$

was also clearly induced compared with normal control group. To the contrary, the mRNA expressions of cytokines (IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) in spleen were not significantly changed.

In conclusion, when ARW was fed on mice, it is observed that it affects to blood components, intestinal mucosa and the cells related to immune system, serological parameters, and expression of cytokine. Further study is necessary about functional effects of ARW on small intestine and systemic immune response including mechanism identification.

---

Keywords : alkaline reduced water, C57BL/6 mouse, small intestine, serological parameter, interleukin-4