

## 다양한 Haptens 및 자극물질에 의한 마우스 골수 수지상세포의 활성산소종의 생성과 역할

연세대학교 의과대학 피부과학교실<sup>1</sup>, 피부생물학연구소<sup>2</sup>,  
두뇌한국21 의과학사업단<sup>3</sup>, 포천중문의과대학교 피부과학교실<sup>4</sup>

김대석<sup>1,2</sup> · 김동현<sup>4</sup> · Dashlkhumbе Bayamba<sup>1,2,3</sup> · 이태형<sup>1,2</sup> · 조영훈<sup>1,2</sup> · 이민걸<sup>1,2,3</sup>

### The Production and Functions of Reactive Oxygen Species in Mouse Bone Marrow-derived Dendritic Cells by Various Haptens and Irritants

Dae Suk Kim, M.D.<sup>1,2</sup>, Dong Hyun Kim, M.D.<sup>4</sup>, Dashlkhumbе Byamba<sup>1,2,3</sup>,  
Tae Hyung Lee, Ph.D.<sup>1,2</sup>, Young-Hun Cho, M.D.<sup>1,2</sup>, Min-Geol Lee, M.D.<sup>1,2,3</sup>

Department of Dermatology<sup>1</sup>, Cutaneous Biology Research Institute<sup>2</sup>, and Brain Korea 21 Project for Medical Science<sup>3</sup>,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Department of Dermatology,  
Pochon CHA University College of Medicine<sup>4</sup>, Seongnam, Korea

**Background:** Various allergens and irritants induced the production of reactive oxygen species (ROS) in the well-established mouse dendritic cell (DC) line XS106 and this production of ROS was inhibited by antioxidants.

**Objective:** To investigate the production and functions of ROS in mouse bone marrow-derived DCs (BM-DCs) by various haptens and irritants, we examined the production of ROS, the expression of surface molecules, and the production of interleukin-12 (IL-12) in mouse BM-DCs.

**Methods:** Six to eight-week-old female C57/BL6 mice were used in this study. Mouse BM-DCs were co-cultured with DNFB, DNCB, TNBS, hydroquinone, NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, thimerosal, SDS, and BKC. The production of ROS and the expression of surface molecules (CD40, CD80, CD86, and MHC-II) were measured by flow cytometry in chemical-treated mouse BM-DCs. In addition, the cells were pretreated with antioxidants to determine whether the production of ROS can be inhibited. The production of IL-12 was also measured in DNCB and SDS-treated mouse BM-DCs using ELISA.

**Results:** The production of ROS in mouse BM-DCs was induced by various allergens, including DNFB, DNCB, TNBS, hydroquinone, MnCl<sub>2</sub> and irritants like SDS, BKC. The expression of surface molecules was induced by various chemicals and NiSO<sub>4</sub> was the most potent inducer of surface molecules in mouse BM-DCs. The production of ROS in DNCB and SDS-treated mouse BM-DCs was partially inhibited by diphenylene iodonium, but not by rotenone, vitamin E, allopurinol, glutathione. The production of IL-12 was not detected in DNCB and SDS-treated mouse BM-DCs.

**Conclusion:** The production of ROS was induced in mouse BM-DCs by various allergens and irritants. The expression of surface molecules was also induced by various chemicals. The production of ROS was partially inhibited by DPI. The production of IL-12 was not detected. (*Korean J Dermatol* 2008;46(11):1470~1477)

**Key Words:** Dendritic cells, Haptens, Reactive oxygen species

<접수: 2008년 5월 30일 >

교신저자: 이민걸

주소: 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 의과대학 피부과학교실

전화: 02)2228-2085, Fax: 02)393-9157

E-mail: mglee@yuhs.ac

### 서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 외부에서 침입한 세균을 죽이는 역할뿐 아니라 염증반응에 관여하는 세포에서 secondary messenger로도 작용하며 다양한 염증반

을 매개한다는 사실은 잘 알려져 있다. 대표적으로는 자외선에 의한 세포 손상 및 노화에서 ROS의 역할에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다. 이외에도 ROS는 carbonylation과 단백질 결사슬의 변형과 같은 여러 가지 비효소성 단백질 변형에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>1</sup>. 최근에는 수지상세포의 항원전달 과정에서 ROS가 생성된다는 연구 결과가 보고된바 있다<sup>2</sup>. 대표적인 hapten 중 하나인 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)가 의해 수지상세포의 항원전달 과정에서 ROS 생성을 유도하여 carbonylation과 같은 세포내 산화성 손상을 발생시킨다는 연구도 보고되었다<sup>3,4</sup>. 저자들은 최근 마우스 수지상세포주인 XS106 수지상세포를 이용하여 TNBS에 의하여 XS106에서 ROS 및 myeloperoxidase (MPO), 인터루킨-12 (IL-12)의 생성 및 단백질 carbonylation이 일어나는 것을 확인하였고, 이러한 모든 과정이 항산화제인 glutathione (GSH)에 의해 억제되는 것도 확인하였다<sup>5</sup>. 상기 연구에서 저자들은 TNBS에 의해 carbonylation이 되는 단백질이 미토콘드리아 ATP synthase라는 것도 최초로 규명하였다<sup>5</sup>.

본 연구에서는 마우스 수지상세포주인 XS106에서 규명한 위와 같은 결과들이 실제 마우스 수지상세포에서도 일어나는지를 확인하기 위해서 마우스 골수 수지상세포를 이용하여 여러 가지 화학물질에 의해 수지상세포의 ROS 생성, 표면 항원 발현, IL-12 생성 여부를 확인하고자 하였다. 또한, ROS 생성이 항산화제에 의해 억제되는지 여부도 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 마우스

수지상세포 배양에 6~8주령의 암컷 C57BL/6 마우스 (중앙실험동물, 서울, 대한민국)를 사용하였다.

### 2. 배지와 싸이토카인

수지상세포를 배양하기 위하여 RPMI 1640 (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 비동화시킨 우태아 혈청 10%, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES (Sigma, Saint Louis, MO, USA) 그리고 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma)을 첨가하여 사용하였다. 재조합 마우스 GM-CSF와 인터루킨-4 (Endogen, Woburn, MA, USA)는 10 ng/ml로 배양배지에 첨가하여 사용하였다.

### 3. 마우스 수지상세포의 분리 및 배양

약 6~8주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골로부터 골수세포를 수집하였다. 골수세포에 적혈구 용해 완충액을 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 적혈구가 용해된 골수세포를 37°C 배양기에서 3시간 방치하였다. 3시간 후 골수세포를 12 well 배양판에 1 ml ( $5 \times 10^5$ /ml)씩 나누어 분주하고 GM-CSF와 인터루킨-4를 10 ng/ml 농도로 첨가

한 후 배양하였다. 배양 2, 4, 6일째에 배지내에 떠 있는 과립구를 제거하고 같은 농도의 싸이토카인이 포함된 새로운 배지로 채워주었다. 배양 6일째 배지에 떠 있는 세포를 수집하여 본 실험에 사용하였다.

### 4. 화학물질의 준비

접촉감작물 질로는 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), NiSO<sub>4</sub>, MnI<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, TNBS, thimerosal, hydroquinone 그리고 이와 비교하기 위한 자극물질로는 SDS, benzalkonium chloride (BKC)를 사용하였다. 화학물질의 용매는 DNFB, DNCB는 DMSO, NiSO<sub>4</sub>, MnI<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, thimerosal, hydroquinone, SDS, BKC는 증류수를 사용하였다. 수지상세포의 viability가 95% 이상되는 각각의 화학물질 농도를 먼저 측정 후 사용하였다.

### 5. 화학물질의 첨가배양

6일간 배양된 수지상세포에 준비된 적당한 농도의 접촉감작 물질 및 자극물질을 각각 첨가하고 30분간 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 6. 항산화제의 첨가배양

대표적인 접촉감작물 및 자극물질인 DNCB와 SDS를 선택하여 항산화제를 첨가하여 배양하였다. 첨가배양한 항산화제는 diphenylene iodonium (DPI), rotenone, vitamin E, allopurinol, glutathione (GSH) 등을 이용하여 마우스 수지상세포의 ROS 생성이 억제되는지 여부를 확인하였다.

### 7. 활성산소의 측정

접촉감작물 및 자극물질 처리 후 수지상 세포를 세포막투과성 염색제인 5-(and 6-)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA, 이하 DCFDA)를 10 µM 농도로 첨가하고 37°C에서 15분간 반응시켰다. 15분 후 세포를 세척하고 세포내에서 DCFDA가 반응하도록 20분 동안 실온에서 방치하고 세척 후 FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 형광을 측정하였다.

### 8. 표면항원의 측정

1~2 × 10<sup>5</sup>개의 세포를 0.4% BSA/PBS (BSA/PBS)로 2회 세척한 후 Pharmingen (San Diego, CA, USA)으로부터 구입한 CD40, CD80, CD86, MHC-II에 대한 항체와 단클론 항체 배양액(anti-I-A<sup>bd.a</sup> & I-E<sup>dk</sup>)을 1차 항체로 첨가하고 30분 동안 4°C에 방치하였다. 동종형(isotype)은 Pharmingen의 hamster IgG와 rat IgG2a를 사용하였다. 30분 후 BSA/PBS로 2회 세척한 후 적정농도의 FITC-conjugated goat anti-rat Ig's (Biosource, Camarillo, CA, USA)과 FITC-conjugated anti-hamster IgG (Pharmingen)를 2차 항체로 첨가하고, 30분 동안 4°C에 방치하였다. 30분 후 BSA/PBS로 2회 세척하고 BSA/PBS 400 µl로 세포를 현탁시킨 후 FACS

Calibur (Becton Dickinson)을 이용하여 유세포계측을 시행하였다.

9. IL-12 측정

대표적인 접촉감작물질 및 자극물질인 DNCB, SDS를 첨가배양한 배양액의 부유물을 이용하여 IL-12의 분비량을 ELISA (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

결 과

1. 화학물질들의 적정 농도 결정

화학물질 첨가배양 24시간 후, 살아있는 세포의 비율이 95% 이상되는 농도를 측정하여 실험에 이용할 적절한 DNFB, DNCB, NiSO<sub>4</sub>, Mn<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, thimerosal, hydroquinone, TNBS, SDS, BKC의 농도를 결정하였다(Table 1).

2. 마우스 골수세포로부터 배양된 수지상세포에서 활성산소종 생성

접촉감작물질과 자극물질들을 30분 처리한 후 수지상세포에서 생성되는 활성산소종 생성 여부를 확인하였다. 유세포계측기로 확인한 결과 DNFB, DNCB, TNBS, hydroquinone, Mn<sub>2</sub> 등과 같은 접촉감작물질들과 SDS, BKC 등의 자극물질들에 의해서 활성산소종이 생성되었다. NiSO<sub>4</sub>, Mn<sub>2</sub>, thimerosal 등에 의해서는 활성산소종이 생성되지 않았다(Fig. 1).

3. 마우스 골수세포로부터 배양된 수지상세포의 표면항원

유세포계측기를 이용하여 CD40, CD80, CD86, MHC-II 등의 표면항원 발현 정도를 측정하였다. CD40의 경우 NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, thimerosal, TNBS에 의해 발현이 증가되었다(Fig. 2A). CD80은 NiSO<sub>4</sub>에 의해서만 발현도가 증가된 것을 관

찰할 수 있다(Fig. 2B). CD86은 NiSO<sub>4</sub>, Mn<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, TNBS에 의해서만 발현도가 증가하였다(Fig. 2C). MHC-II는 NiSO<sub>4</sub>, Mn<sub>2</sub>, thimerosal에 의해서 발현도가 증가하였다(Fig. 2D).

4. 항산화제에 의한 ROS 생성 억제

대표적인 접촉감작물질 및 자극물질인 DNCB, SDS와 마우스 수지상세포를 첨가배양하기 전에 DPI, rotenone, vitamin E, allopurinol, GSH 등을 전처리한 결과 대부분의 항산화제가 ROS 생성을 억제하지 못하였다. DPI에 의해서는 SDS, DNCB에 의한 ROS 생성이 부분적으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

5. IL-12 분비량

DNCB, SDS를 첨가배양한 배양액의 부유물을 이용하여 IL-12의 분비량을 ELISA 기법을 이용하여 측정한 결과 DNCB 및 SDS 모두 IL-12가 검출되지 않았다(data not shown).

고 찰

수지상세포의 항원전달 과정에서 ROS가 생성된다는 연구 결과가 최근에 밝혀진바 있다<sup>2</sup>. 본 연구자들은 마우스 수지상세포주인 XS106 수지상세포주에서 다양한 종류의 hapten 및 자극물질이 ROS를 합성함을 확인하였고, TNBS에 의해 합성된 ROS가 XS106 수지상세포주에서 IL-12를 분비하면서 접촉과민반응에 관여함을 확인하였다. 그래서 본 연구자들은 마우스 수지상 세포주에서 관찰할 수 있었던 반응이 마우스 수지상 세포에서도 나타나는지를 확인하고자 하였다. 즉 다양한 haptens 및 자극물질들에 의해 마우스 수지상세포의 ROS 생성, 표면 항원 발현, IL-12 분비 여부와 생성된 ROS가 항산화제에 의해 억제되는지 여부를 확인하고자 하였다.

실험에 사용할 여러 화학물질들의 적정 농도를 알아내기 위해서 마우스 골수 수지상세포에 화학물질들을 첨가하여 24시간 배양하였을 때 수지상세포의 생존율이 95% 이상되는 농도를 측정하였다. 이렇게 알아낸 적정 화학물질 농도를 이용하여 마우스 수지상세포에서 ROS가 생성되는지를 확인한 결과, hapten들 중에서는 DNFB, DNCB, TNBS, hydroquinone, Mn<sub>2</sub> 등에서 ROS가 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 반면 일상생활에서 알레르기성 접촉 피부염을 가장 흔하게 일으키는 대표적인 물질들인 NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, thimerosal의 경우 ROS를 생성하지 않았다. SDS, BKC와 같은 자극물질에 의해서는 두 가지 물질들 모두 ROS가 생성을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 유세포계측 결과상 DNFB, DNCB, TNBS 등과 같은 hapten에 비해서 그 양이 적은 것을 알 수 있다. 이처럼, hapten과 자극물질에서 ROS 생성량의 차이뿐만 아니라 hapten들 중에서도 ROS 생성의 차이가 있는 것에 대해서는 다음과 같은 원인들이 있을 수 있을 것으로 생각된다. 우선, 다 같은

Table 1. The concentrations of various chemicals at which the percentage of live mouse BM-derived DCs (Annexin V -/PI -) exceeded 95% when they were cultured with the chemicals for 24 hours

Chemicals	Concentration
DNFB	60 uM
DNCB	150 uM
Ni	200 uM
Co	300 uM
Hydroquinone	15 uM
TNBS	200 uM
Thimerosal	0.5 uM
Mn	25 uM
SDS	200 uM
BKC	0.5 uM

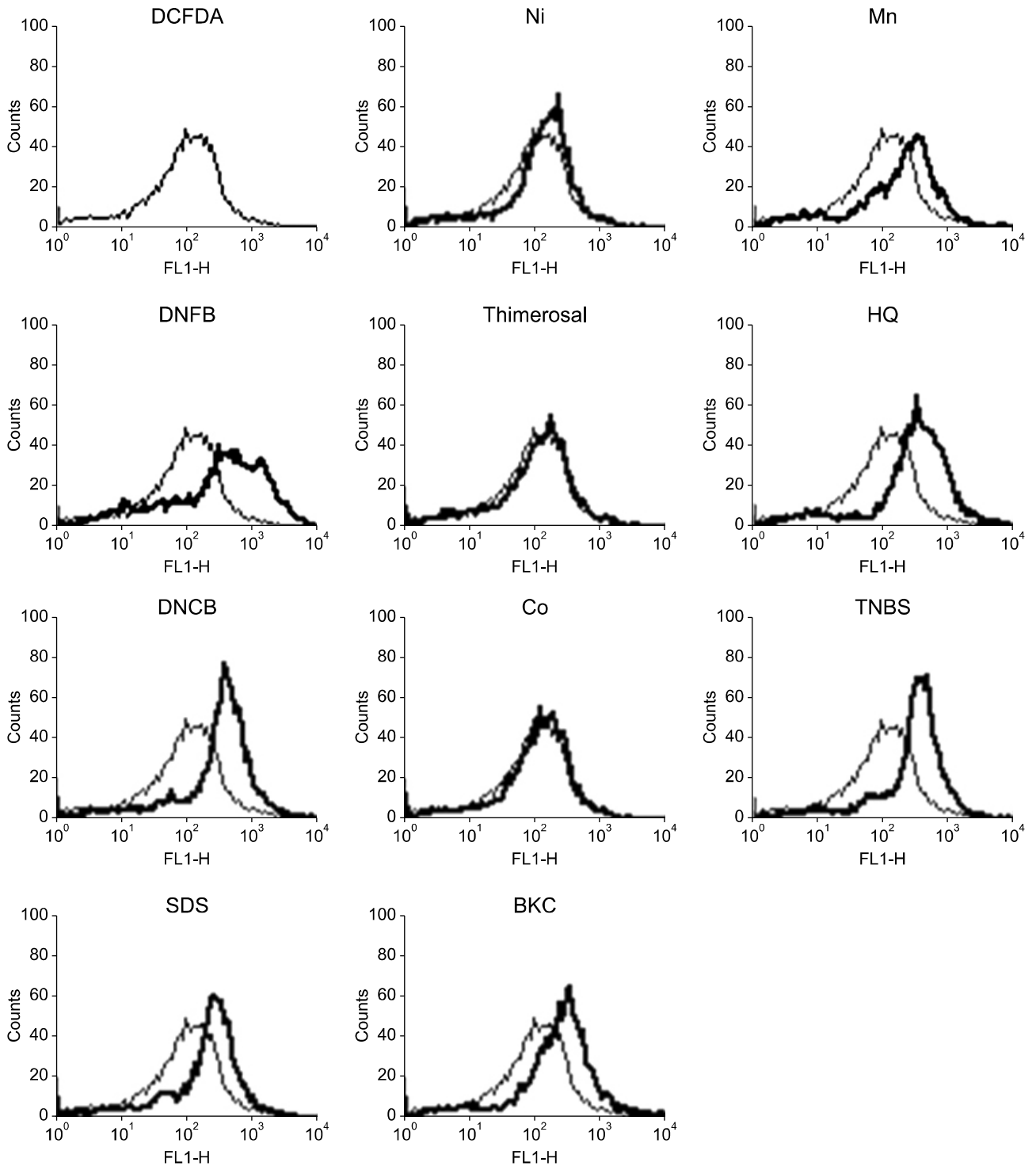


Fig. 1. Mouse BM-derived immature DCs produce ROS by chemicals, including DNFB, DNCB, TNBS, hydroquinone, Mn1<sub>2</sub> (allergens), SDS, BKC (irritants)

hapten 및 자극물질일지라도 수지상세포에 주는 영향이 다를 수 있을 것이다. Hapten과 자극물질 사이의 차이도 있을 수 있을 것이고, hapten으로 작용하는 물질들 안에서

이러한 차이가 있을 수 있을 것이다. 구체적으로는 생성되는 ROS의 차이가 있을 수 있을 것으로 생각된다. ROS는 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, OH<sup>·</sup>, RO<sub>2</sub><sup>·</sup>, HO<sub>2</sub><sup>·</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HOCl, O<sub>3</sub> 등 다양한 종류

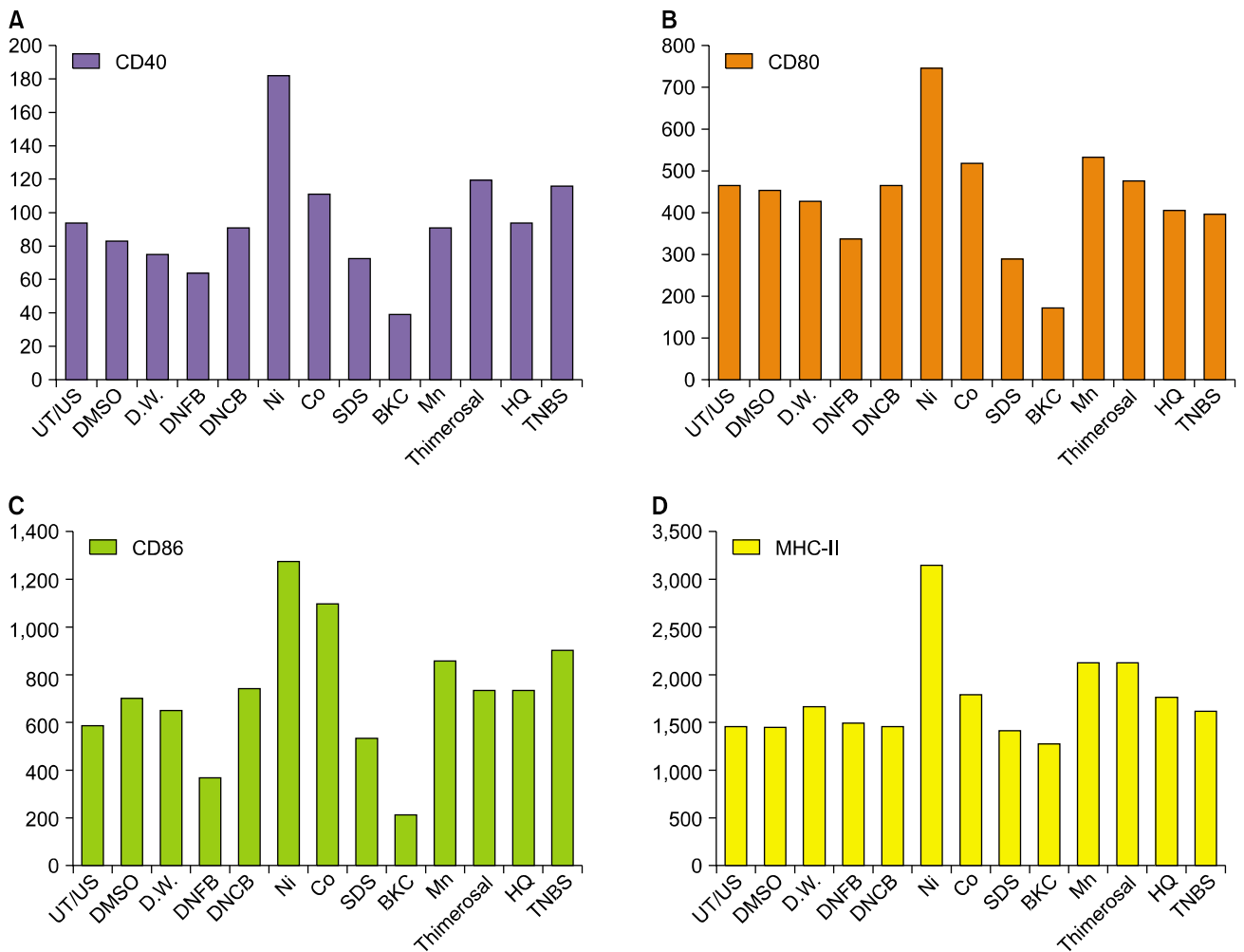


Fig. 2. (A) Expressions of CD40 on mouse BM-derived immature DCs by multiple chemicals. (B) Expressions of CD80 on mouse BM-derived immature DCs by multiple chemicals. (C) Expressions of CD86 on mouse BM-derived immature DCs by multiple chemicals. (D) Expressions of MHC-II on mouse BM-derived immature DCs by multiple chemicals

의 물질들을 종합해서 표현하는 용어이다<sup>6</sup>. 따라서 본 실험에서 사용한 여러 가지 hapten 및 자극물질들이 각각 다른 종류의 ROS를 생성했을 가능성도 배제할 수는 없을 것으로 생각된다. 다음으로 ROS를 측정하는 방법에 의해서 위와 같은 결과가 발생했을 수 있다고 생각한다. 본 실험에서 사용한 DCFDA는 세포막투과성 염색제로 ROS를 측정법 중 가장 보편적으로 많이 사용되고 있는 방법이다<sup>7</sup>. 하지만 이 측정법은 두 가지 큰 단점이 있는 것으로 알려져 있다. 첫 번째는 DCFDA가 매우 광과민성이 심하다는 것이다. DCFDA는 빛에 의해서 쉽게 자체적으로 산화되어서 유세포계측을 하였을 경우 잘못된 반응이 나타날 가능성이 높은 것으로 알려져 있다<sup>8</sup>. 두 번째로는 DCFDA를 이용한 ROS 측정법은 선택성(selectivity)이 없다는 것이다. DCFDA는 다양한 종류의 ROS와 반응을 할 수 있으나, ROS의 종류들을 구분할 수는 없는 것으로 알려져 있다<sup>9</sup>.

또한 최근에는 심지어 DCFDA는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>과 반응하지 않는 것으로 받아들여지고 있다<sup>10</sup>. 이처럼 DCFDA의 광과민성 및 비선택성에 의해서 본 실험에서 hapten 및 자극물질들에 의한 ROS 생성의 차이가 발생했을 수 있다고 생각된다. 최근에는 DCFDA의 광과민성을 방지할 수 있는 방법 뿐만 아니라 ROS 종류에 따른 선택성이 있는 측정법들이 많이 연구 및 개발이 되고 있다<sup>8,10</sup>. 이와 같은 방법들을 이용한 추가적인 실험을 통하여 DCFDA의 광과민성을 방지하고 생성된 ROS의 종류에 따른 선택적인 측정이 필요할 것으로 생각된다.

표면 항원의 발현도는 CD40, CD80, CD86, MHC-II 화학 물질들에 따라 각각 다르게 발현이 유도된 것을 알 수 있다. 하지만, NiSO<sub>4</sub>의 경우 CD40, CD80, CD86, MHC-II의 발현을 모두 유도하고, 발현 정도도 다른 화학물질들에 비해서 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. NiSO<sub>4</sub> 이외에도

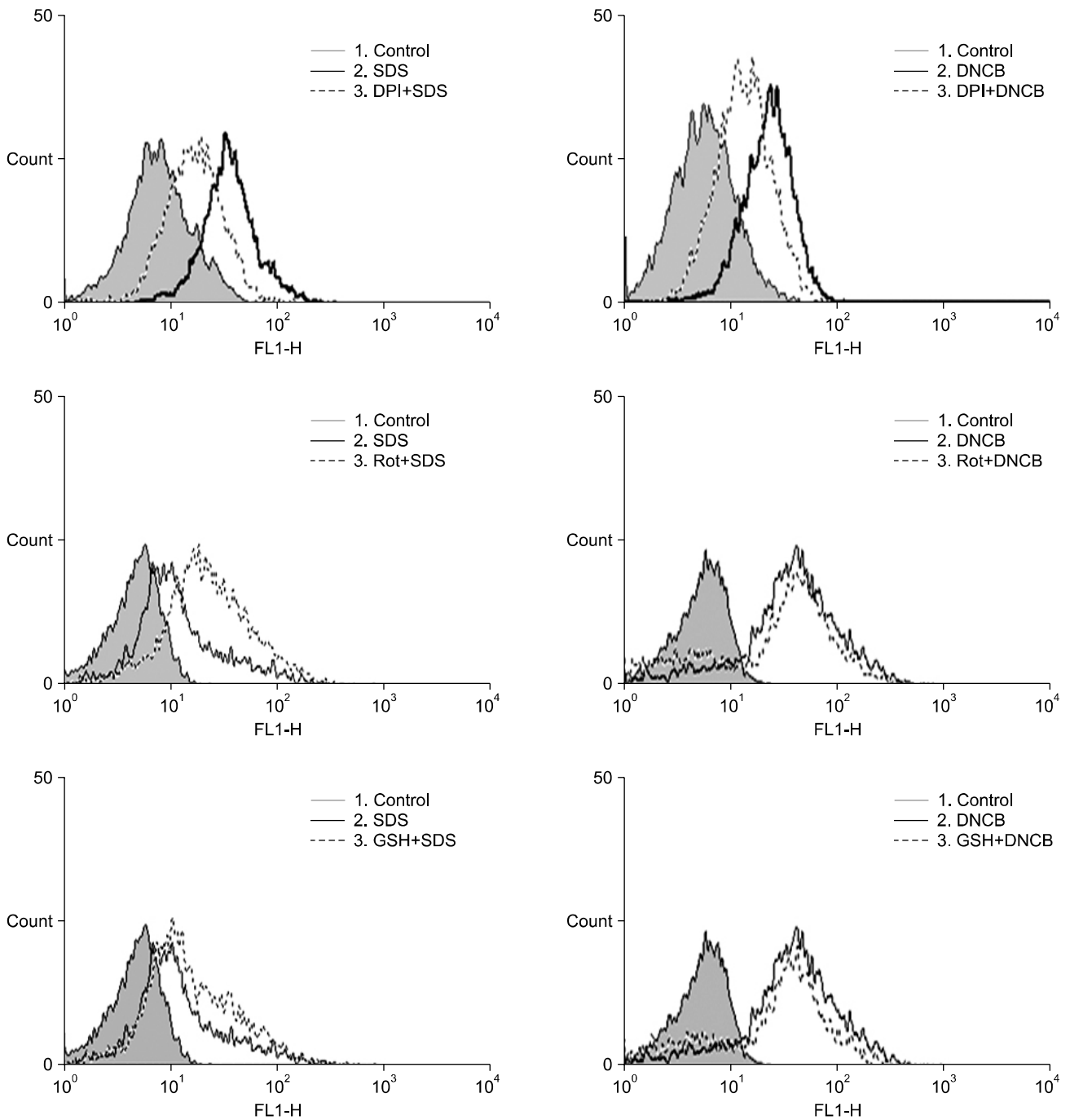


Fig. 3. Inhibition of ROS production of SDS and DNCB stimulated mouse BM-derived immature DCs by DPI.

CoCl<sub>2</sub>, thimerosal 등과 같이 잘 알려진 hapten 들은 표면항원의 발현을 상대적으로 많이 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, thimerosal에 의해서는 ROS가 생성되지 않았던 점으로 미루어 표면 항원의 발현 정도는 ROS의 생성 여부와 상관 관계가 없는 것을 알 수 있다. 저자들의 XS106을 이용한 이전 실험에서 hapten에 의해 ROS

가 생성되고 IL-12 분비가 유도된다는 것으로 확인하였고, 이러한 반응들이 항산화제에 의해서 모두 억제되었다<sup>5</sup>. 또한, 쥐를 이용한 추가 실험에서는 임상적으로 항산화제에 의해서 접촉 피부염의 증상이 감소하는 것도 확인하였다. 위와 결과들을 종합해 볼 때 ROS가 접촉 피부염에 중요한 역할을 한다는 것을 유추할 수 있는데 본 실험의 표면 항

원 발현 결과는 ROS가 접촉 피부염의 병인에 중요한 역할을 하지 않는 것처럼 나타났다. 이는 앞에서 언급한 것과 마찬가지로 이와 같은 결과는 DCFDA에 의한 ROS 측정법으로 NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, thimerosal에 의한 ROS 생성이 적절히 측정되지 못해서 발생했을 수도 있을 것으로 생각된다. 따라서 ROS 종류에 따른 선택성이 있는 측정법을 이용한 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. 만약 추가적인 실험에서도 접촉 피부염과 연관이 없는 것으로 밝혀진다면 XS106 수지상세포의 경우와는 다르게 마우스 골수 수지상세포에서는 접촉피부염의 발생에 중요한 역할을 실제로 하지 않을 가능성도 배제할 수 없을 것이다. 이를 확인하기 위해서는 ROS 측정을 DCFDA를 이용한 방법뿐 아니라 여러 다른 방법으로 측정하는 실험을 통한 확인이 필요할 것으로 생각된다.

XS106 수지상세포를 이용한 저자들의 이전 연구에서는 TNBS에 의해서 생성된 ROS가 GSH와 같은 항산화제를 전처리하였을 경우에 완벽히 억제되었다<sup>5</sup>. 마우스 골수 수지상세포에서도 ROS 생성이 항산화제에 의해서 억제되는지 여부를 관찰하기 위해서 대표적인 hapten 중 하나인 DNCB와 자극물질인 SDS를 이용하여 실험하였다. 항산화제는 DPI, rotenone, vitamin E, GSH, allopurinol 등을 이용하였다. 그 결과 DNCB, SDS에 의한 ROS 생성은 항산화제에 의해 대부분 억제되지 않았고, DPI에 의해서만 부분적으로 억제되는 것을 확인하였다. XS106 수지상세포와는 다르게 마우스 골수 수지상세포에서는 항산화제에 의해서 ROS 생성이 억제되지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 차이점 또한 위에서 언급한 것과 마찬가지로 생성된 ROS의 종류가 차이가 있어서 발생했을 가능성이 있다. DPI, rotenone, allopurinol은 각각 NADPH oxidase, 미토콘드리아 전자사슬, xanthine oxidase 등을 억제한다<sup>11,12</sup>. 이처럼 항산화제도 다양한 종류의 ROS 및 여러 단계의 ROS 생성 단계를 억제한다. 따라서 본 실험에서 수지상세포에서 발생한 ROS가 hapten 및 자극물질에 따라 각각 다르고, 이를 억제하는 항산화제도 각각 다를 수 있기 때문에 정확한 실험을 위해서는 각각 발생하는 ROS에 맞는 항산화제를 이용한 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

XS106 수지상세포를 이용한 실험에서는 TNBS에 의해서 IL-12의 생성이 증가되고, GSH에 의해서 IL-12 생성이 억제되는 것을 확인하여 ROS가 접촉피부염의 병인에 관여한다는 것을 알 수 있었다<sup>5</sup>. 하지만, 본 실험에서는 DNCB와 SDS에 의해 수지상세포가 IL-12를 생성하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 ROS가 접촉피부염에 직접적으로 관여할 안 할 가능성도 생각해볼 수 있을 것이다. 이는 추가적인 실험을 통하여 확인을 할 필요가 있을 것으로 생각된다. 그 외 생각해볼 수 있는 것은 생성되는 DNCB 및 SDS가 생성한 ROS가 TNBS가 생성한 것과 다를 가능성이 있다. 따라서 다양한 종류의 hapten 및 자극물질을 이용한 연구와 앞에서 언급했듯이 각각 어떤 종류의 ROS가 생성되는지를 우선적으로 확인하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

그리고 ROS의 종류에 적합한 측정법을 이용하여 정확한 ROS 측정이 필요할 것이다. 또한, ELISA 기법을 이용하는 것뿐만 아니라 세포내 IL-12 발현을 유세포계측으로 측정하는 것을 병행하여 하는 것이 도움이 될 것으로 생각된다.

Matsue 등<sup>3</sup>은 비록 본 실험에서 사용한 접촉감작물질 및 자극물질이 아닌 LPS와 같은 항원을 사용하여 항원전달과정에서 수지상세포가 ROS를 생성한다는 것을 규명하였다. 이러한 ROS 생성 및 표면항원발현, 싸이토카인 분비는 항산화제에 의해서 억제되었다<sup>3</sup>. Bruchhausen 등<sup>13</sup>은 강력한 감작물질들에 의해 수지상세포의 항원전달과정에서 일어나는 tyrosine 인산화가 여러 가지 항산화제에 의해서 억제되는 것을 밝혀냈다. 위와 같은 결과들 및 저자들의 연구 결과 ROS가 수지상세포의 항원전달과정에서 중요한 면역학적 반응의 매개체로 작용을 한다는 것을 알 수 있다. 따라서 접촉과민반응의 항원전달과정에서 ROS의 정확한 역할과 항산화제의 억제 작용 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구에서 저자들은 마우스 골수 수지상세포 연구에 이용할 DNFB, DNCB, NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, thimerosal, Mnl<sub>4</sub>, hydroquinone, TNBS, SDS, BKC 등의 화학물질들의 viability (95% 이상)를 유지하는 적정 농도를 결정하였다. 그리고, 이러한 화학물질들을 이용하여 DNFB, DNCB, Mnl<sub>4</sub>, TNBS, SDS, BKC, hydroquinone 등에 의해서 마우스 골수 수지상세포에서 ROS가 생성되는 것을 확인하였다. 하지만, XS106 수지상세포와 다르게 항산화제에 의해서 ROS 생성이 완벽히 억제되지 않았다. 또한, CD40, CD80, CD86, MHC-II와 같은 표면항원들이 여러 화학물질들에 의해서 각각 다르게 발현이 유도된다는 것을 확인하였고, NiSO<sub>4</sub>가 가장 표면항원을 강력하게 유도한다는 것도 알 수 있었다. 마우스 수지상세포에서 표면항원들의 발현 양상은 ROS 합성 여부와는 일치하지 않았다. IL-12의 합성은 본 실험에서 관찰되지 않았다.

화학물질의 종류에 따른 ROS 생성과 표면 항원의 발현 여부가 서로 일치하지 않는 것은 ROS가 DCFDA만으로 측정되지 않는 ROS가 있을 수 있고, 생성되는 것이 ROS, RNS, RCS 등으로 종류가 다를 수 있기 때문에 다양한 ROS를 측정할 수 있는 선택적인 ROS 측정법과 각각의 ROS를 적절히 억제할 수 있는 항산화제를 이용한 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. 그리고 추가적으로 ROS가 마우스 골수 수지상세포에서 면역학적, 비면역학적으로 어떤 역할을 하는지에 대한 연구와 궁극적으로는 사람의 수지상세포를 이용한 연구를 향후 시행할 예정이다.

## 참 고 문 헌

1. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. Science 1992;

257:1220-1224

2. Tatla S, Woodhead V, Foreman JC, Chain BM. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic Biol Med* 1999;26:14-24
3. Matsue H, Edelbaum D, Shalhevet D, Mizumoto N, Yang C, Mummert ME, et al. Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J Immunol* 2003;17:3010-3018
4. Mizuashi M, Ohtani T, Nakagawa S, Aiba S. Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2005;124:579-586
5. Je JH, Lee TH, Kim DH, Cho YH, Lee JH, Kim SC, et al. Mitochondrial ATP synthase is a target for TNBS-induced protein carbonylation in XS-106 dendritic cells. *Proteomics* 2008;8:2384-2393
6. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med* 2005;33:498-501
7. LeBel CP, Ishiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;5:227-231
8. Afzal M, Matsugo S, Sasaki M, Xu B, Aoyama K, Takeuchi T. Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:619-624
9. Yoshida Y, Shimakawa S, Itoh N, Niki E. Action of DCFH and BODIPY as a probe for radical oxidation in hydrophilic and lipophilic domain. *Free Radical Res* 2003;37:861-872
10. Soh N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem* 2006;386:532-543
11. Xia C, Meng Q, Liu ZZ, Rojanasakul Y, Wang XR, Jiang BH. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2007;67:10823-10830
12. Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 2004;264:85-97
13. Bruchhausen S, Zahn S, Valk E, Knop J, Becker D. Thiol antioxidants block the activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *J Invest Dermatol* 2003;121:1039-1044