

호르텐스극구흡충 감염마우스에서  
면역억제제 및 항히스타민제 투여에 의한  
소장 배세포와 면역반응에 대한 연구

연세대학교 보건환경대학원  
의생명과학전공  
조 용 희

호르텐스극구흡충 감염마우스에서  
면역억제제 및 항히스타민제 투여에 의한  
소장 배세포와 면역반응에 대한 연구

지도교수 양 용 석 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 6월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

조 용 희

조용희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 보건환경대학원

2006년 6월 일

## 감사의 글

잘 할 수 있을까를 되 뇌이며 늘 종종걸음으로 병원을 나섰지만, 학교로 향하는 마음에는 늘 기쁨과 기대감이 함께 하였습니다. 그것은 늘 열심히 지도해주시고, 격려를 아끼지 않으시는 여러 교수님들께서 함께 계셨기 때문입니다. 이 논문이 나오기 까지 처음부터 마무리 까지 지도와 격려를 아끼지 않으신 양용석 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 부족한 논문의 세심한 부분까지 지도해주신 김중배 교수님, 이규재 교수님을 비롯하여 늦은 밤까지 학문뿐 아니라 인생의 선배로서 여러 가지 지도편달을 아끼지 않으셨던 김태우 교수님, 오옥두 교수님, 박용석 교수님 그리고 이해영 교수님께 감사를 드립니다.

바쁜 와중에도 논문의 실험을 도와주신 혈액학 실험실 양은주, 임수정, 김정례 선생님과 맘 넓은 선배님으로 위로와 격려를 해주신 임병혁 선생님을 비롯하여 대학원 선 후배 선생님들께도 고마운 마음을 전합니다.

उन전조심하고 열심히 하라고 염려와 격려를 해주시던 강원대학교병원 실장님을 비롯하여 여러 선배, 후배 선생님들께도 감사드립니다.

그리고 오늘이 있기까지 한결같은 마음으로 믿고 지켜봐주신 형부와 언니, 오빠와 올케, 그리고 친구 같은 동생과 조카들에게도 깊은 사랑을 전합니다. 부족한 며느리를 항상 너그러운 마음으로 이해해주시고 기도해주시는 시부모님과 여러 시댁 가족들에게도 감사의 마음을 전합니다.

제가 힘들어 할 때마다 든든한 버팀목이 되어준 남편과 엄마 공부 열심히 하세요 하며 늘 꼭 안아주던 사랑하는 딸 예린, 당신들의 불편함을 감수하시면서도 사랑으로 지금까지도 저희를 돌봐주고 계신 고모님, 고모부님 덕분에 제가 여기까지 올수 있었습니다. 당신들의 사랑은 평생 제 맘속에 남아있을 겁니다.

끝으로 고생으로 자식들을 키우신 어머니와 하늘나라에 계신 아버지께 저의 작은 사랑을 드립니다.

2006년 6월

조 용희

# 차 례

그림 차례	iii
표 차례	iv
약기호표	v
국문 요약	vi
제1 장 서론	1
제 2 장 연구재료 및 방법	5
1. 실험동물	5
2. 약제 투여	5
3. 호르텐스극구흡충의 피낭유충감염	5
4. 충체 회수율	5
5. Total RNA 분리	6
6. RT-PCR을 이용한 cytokine mRNA 발현	6
7. PAS 염색과 배세포 관찰	8
8. Lectin 염색과 mucin 반응 관찰	8
9. 통계적 분석	9
제 3 장 결과	11
1. 충체 회수율	11
2. Cytokine mRNA의 발현	13
3. 소장 내 배세포의 반응	19
4. Lectin histochemistry의 결과	22
제 4 장 고 찰	25
제 5 장 결 론	29

참고 문헌	30
영문 요약	38

## 그림 차례

Figure 1. Worm recovery rates of <i>E. hortense</i> in control and drug treated C3H/HeN mice. . . . .	12
Figure 2. Comparison of TNF- $\alpha$ mRNA expression in spleen from control and drug treated C3H/HeN mice infected with <i>E. hortense</i> . . . . .	15
Figure 3. Comparison of IL-1 $\beta$ mRNA expression in spleen from control and drug treated C3H/HeN mice infected with <i>E. hortense</i> . . . . .	16
Figure 4. Comparison of IL-4 mRNA expression in spleen from control and drug treated C3H/HeN mice infected with <i>E. hortense</i> . . . . .	17
Figure 5. Comparison of TNF- $\alpha$ mRNA expression in spleen from control and drug treated C3H/HeN mice infected with <i>E. hortense</i> . . . . .	18
Figure 6. Comparison of mucosal goblet cells number per 10 villus-crypt unit(VCU) in the small intestine of control and drug treated C3H/HeN mice infected with <i>E. hortense</i> . . . . .	21
Figure 7. Comparison of HPA(helix pomatia agglutinin) positive cells number per 10 villus-crypt unit(VCU) in the small intestine of control and drug treated C3H/HeN mice infected with <i>E. hortense</i> . . . . .	24

## 표 차 례

Table 1. Cytokine primer sequences and expected amplified fragment sizes. . . . .	10
---	----



## 약기호표

BSA	: bovine serum albumin
CsA	: cyclosporin-A
DEPC	: diethyl pyrocarbonate
GCs	: goblet cells
H <sub>1</sub> R	: histamine H <sub>1</sub> -receptor
H <sub>2</sub> R	: histamine H <sub>2</sub> -receptor
HPA	: helix pomatia agglutinine
IL	: interleukin
MMP-9	: matrix metalloprotease-9
PAS	: periodic acid schiff
PBS	: phosphate buffed saline
RT-PCR	: reverse transcription polymerase chain reaction
SD	: standard deviation
TBE	: tris-borate/EDTA
TNF	: tumor necrosis factor
Tris	: tris(hydroxymethyl) aminomethane
VCU	: villus-crypt unit
WRR	: worm recovery rate

## 국문요약

### 호르텐스극구흡충 감염마우스에서 면역억제제 및 항히스타민제 투여에 의한 소장배세포와 면역반응에 대한 연구

호르텐스극구흡충 피낭유충을 C3H/HeN 마우스에 실험적으로 감염시키고 면역억제제인 cyclosporin-A(CsA)와 항히스타민제인 cimetidine과 hydroxyzine을 투여하여 피낭유충만 감염시킨 대조군과 약제를 투여한 실험군 간의 비장의 cytokine의 발현과 소장에서의 충체 회수와 장점막내 배세포 및 mucin의 변화를 살펴보았다. Cytokine은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 및 IL-5의 mRNA 발현을 보기 위해 RT-PCR을 시행하였으며, 소장에서 충체를 회수한 후, 배세포의 수와 mucin의 반응을 보기 위해 PSA와 lectin histochemistry를 시행하였다. 그 결과 대조군에 비해 CsA 투여군에서는 통계적으로 유의하게 높은 충체 회수율( $p < 0.01$ )과 Th1 type cytokine mRNA의 발현이 억제되었으며(TNF- $\alpha$  감염 후 3주 제외), 배세포수와 mucin의 반응은 대조군에 비해 유의하게 낮은 반응을 보였다( $p < 0.05$ ).

Cimetidine 투여군에서 충체 회수율은 유의하게 높았으며( $p < 0.05$ ), IL-1 $\beta$ 의 발현이 증가되었으나, 다른 cytokine들의 발현은 억제되었고, 배세포수와 mucin 반응은 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 그리고 hydroxyzine 투여군에서 충체 회수율은 유의하게 높았으며( $p < 0.01$ ), IL-4의 발현이 강하게 억제되었고, IL-5는 감염초기에 급격한 상승발현을 보이다가 감염 후반기에 감소되었으며, 배세포의 수와 mucin의 반응은 대조군에 비해 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 따라서 본 연구결과에 의하면 CsA는 감염초기에 Th1 type cytokine들의 발현억제로, 배세포의 수와 mucin 분비가 억제되어 충체 배출을 지연시켰다. 그러나 Th2 type cytokine인 IL-4가 강하게 억제되어 충체 배출에 영향을 준 hydroxyzine과 뚜렷이 억제된 cytokine이 없는 cimetidine은 약제에 의해 소장 내 배세포와 mucin 분비 활성보다 histamine

H<sub>1</sub>과 H<sub>2</sub> 수용체의 차단으로 장관 내 평활근상의 histamine 수용체의 결합이 억제되어 호르텐스극구흡충의 배출에 좀 더 중요하게 작용하였음을 알 수 있었다. 결론적으로 세 가지 약제모두 충체 배출을 유의하게 지연시켰으나 CsA 보다 항히스타민제들이 더 효과적이었으며, 항히스타민제 중 hydroxyzine 보다 cimetidine에 의한 지연효과가 더 뛰어남을 알 수 있었다.

## 제 1 장 서 론

호르텐스극구흡충(*Echinostoma hortense*)은 1926년 Asada(1)에 의하여 처음 알려졌으며, 인체감염의 예로는 1974년 Tani 등(2)에 의해 최초로 보고되었다. 우리나라에서는 1983년 서 등(3)에 의해 인체감염 예가 보고된 이후에 꾸준히 증가하여 현재 전국 하천유역에서 *Metagonimus yokogawai* Miyata 형과 함께 가장 감염율이 높은 장흡충이다.

호르텐스극구흡충은 중숙주의 소장 상부에 기생하며(1), 담수산 패류인 달팽이(*Lymnaea* sp.)가 제1중간숙주이며 미꾸리, 올챙이 그리고 버들치와 같은 담수어가 제2중간숙주로 알려져 있다(4-6). 또한 우리나라와 일본 및 동남아시아 지역에 주로 분포하며, 조류와 포유류 등의 중숙주(1,4,7) 또는 보유 숙주 등에 넓게 분포하고 있어 인체 감염기회가 증가하고 있다.

호르텐스극구흡충의 인체 감염 증상으로는 소화불량, 하복부 통증 및 설사 등을 일으키며 장기간 감염 시 만성 흡수장애를 초래한다는 보고와 십이지장궤양의 발생을 보고한 예도 있다(8,9).

*Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus braziliensis*, *Strongyloides ratti* 등과 같은 선충류와 *Metagonimus yokogawai*, *Neodiplostomum seoulense* 와 같은 장흡충류는 숙주 내에 기생충이 감염되면, 숙주에 기생충이 정착하기 전까지 숙주의 여러 장기를 이동하면서 다양한 발육단계로 성장을 하게 된다. 또한 기생충에 감염된 숙주는 지속적으로 병변을 보이지는 않는데, 이는 감염 후 일정기간이 지나면 숙주의 면역반응에 의해 충체의 자연배출 현상이 일어나기 때문이며(10,11), 이러한 배출기전에는 T 세포 의존성 기전과 T 세포 비의존성 기전이 복합적으로 작용한다.

T 세포 의존성 기전은 기생충 항원에 반응한 T 세포가 IL-4, IL-5를 증식시키고, 이들이 B 세포를 자극하여 항체생산을 유도한다. 그리고, 점막 비만세포(mucosal mast cell)의 증식과 IL-3, IL-4, IL-9 및 IL-10 등의 작용으로 배세포(goblet cell)의 증식을 야기 시킨다. 또한, 항체와 IgE에 감작된 비만세포가 분비

하는 histamine이 장상피세포의 투과성을 증가시켜 기생충에 손상을 주게 된다.

T 세포 비의존성 작용은 TNF- $\alpha$ , IL-1 그리고 대식세포 등에 의해 비 특이적 염증분자를 분비한다. 이들은 배세포 증식과 배세포의 점액분비를 증가시켜 기생충을 숙주의 장으로부터 배출시킨다.

기생충의 인체감염 시 충체 배출 기전에 대한 연구보고를 보면 숙주 장점막내 비만세포, 배세포, 혈청내의 IgE, 조직 내 호산구의 침윤현상 그리고 여러 종류의 cytokine이 주된 작용을 한다고 하였다. 이러한 면역반응은 기생충의 종류와 숙주의 유전학적 배경에 따라 다른 양상들을 보인다(11,12). 특히 배세포(goblet cell)는 기생충감염 시 비특이적인 생체보호막 역할을 하여 기생충이 장 밖으로 배출되도록 기여하는데(13), 장점막내에서 mucin과 당단백의 생성을 증가시켜 기생충의 침투로부터 숙주를 보호하는 기능이 있다(14).

기생충감염 시 숙주의 T 세포는 세포성 면역반응의 주된 세포로서, 지연성 과민반응과 세포매개성 면역반응을 유도하는 T helper 1 type(Th1)과 알레르기 및 체액성 면역반응에 관여하는 T helper 2 type(Th2)으로 구별된다.

Th1 type은 IL-12, IL-2, interferon-gamma(INF- $\gamma$ ), tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ ), tumor necrosis factor-beta(TNF- $\beta$ ) 등의 proinflammatory cytokines를 분비하며, IgG2a 합성을 유도하고, 대식세포를 활성화 시켜 세포내 기생충을 죽이게 된다(15,16). 그 중 TNF- $\alpha$ 는 가장 전형적인 면역조절 cytokine으로 대식세포, 단구, 호중구, T 세포 및 NK 세포에 의해 유도되고 발현된다(17). 그리고 기생충감염 시 숙주의 염증반응에 대한 중심적 매개자로서 leukocyte trafficking을 강화하여 adhesion molecule의 발현을 활성화 시키며 백혈구들의 보강과 활성을 조절하여 2차적인 cytokine cascades의 발현에 영향을 준다(17,18). 그리고 IL-1은 숙주의 염증 시작과 지속에 관여하는 주된 cytokine으로, IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 두개의 단백질로 나타낼 수 있다. 이들은 서로 다른 아미노산 서열을 가지고 있어서 분리된 유전자에서 생성이 되지만, 같은 수용체를 가지고 있어서 비슷한 작용을 한다(19). 그중 IL-1 $\beta$ 는 31 kDa의 proIL-1 $\beta$ 인 전구체에서 합성이 되며, 본질적으로 생물학적인 효과가 부족하다. 그러나 이것이 활성화되어 특이적인 IL-1 $\beta$ -converting enzyme(ICE or caspase-1)이나 matrix metalloprotease-9

(MMP-9 or gelatinase B)와 같은 protease에 의해 proIL-1 $\beta$ 가 분해되어 성숙되고 활성화된 IL-1 $\beta$ 가 생성이 된다(19,20).

Th2 type은 IL-4, IL-5, IL-6를 분비하며, IgG1과 IgE 합성을 유도하여 즉시형 과민성반응(immediate-type hypersensitivity)을 유발한다(21,22). 그중 IL-4는 약 20 kDa의 단백질로 B 세포의 성장인자이며 B 세포 immunoglobuline의 class switch에 관여하는 분화인자이다. 또한, Th2 세포, 비만세포 및 대식세포의 활성화 인자로 작용하며(23,24), 조혈세포와 암세포 등 여러 가지 측면에서 작용을 하는 cytokine이다(25). 그리고 IL-5는 활성화된 CD4<sup>+</sup> T 림프구와 비만세포에서 합성되며, 호산구의 증식과 분화를 유도하고 성숙 호산구를 활성화 시키며, IL-2 및 IL-4와 함께 B 림프구 증식과 분화에 관련하면서, T 림프구의 활성화와 호산구 성 질환에서 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다(26-30).

또한, 여러 가지 약제투여에 의해 기생충의 배출기전과 관련된 연구들이 행해지고 있다. 그 중 면역억제제인 cyclosporin-A(CsA)는 기능적인 T 세포의 반응을 저해하고, 숙주의 장 점막의 비만세포의 증식을 억제한다(31). CsA를 이용하여 알레르기에 대한 동물실험 결과 평활근의 변화와 배세포 및 점막 내 mucin 분비선의 비후와 과증식을 보였으며, 상피세포에 호산구 침윤현상 등이 관찰되었다고 보고되었다(32). 또한 histamine은 아민에 반응하는 신경전달물질로 여러 가지 병태생리학적 작용을 조절하는 중요한 역할을 하고 있으며, 모든 인간조직에서 발견되어 allergy와 염증 또는 신경전달물질과 관련된 기전에 매개자로 작용한다고 보고되었다(33,34). Black(1972년) 등에 의해 처음으로 정의된 histamine H<sub>2</sub>-receptor(H<sub>2</sub>R)는 위산 분비물 내에 포함되어 있어서 cimetidine, ranitidine, famotidine 등과 같은 H<sub>2</sub>R 길항제들이 개발된 바 있으며, 임상적으로는 위산분비를 억제하는데 사용되고 있다(35). 이런 histamine H<sub>2</sub>R 길항제는 위십이지장의 궤양에 탁월한 치료효과를 보인다(36). 그리고 hydroxyzine과 같은 piperazine-class H<sub>1</sub>-antihistamine은 알레르기성 피부염과 같은 증상에 외용제나 크림처럼 국소적인 치료에 효과적으로 적용되어 왔다(37). 그러나 아직까지는 호르텐스극구흡충이 숙주에 감염되었을 때 숙주장조직의 배세포들에 대한 면역억제제나 histamine의 작용에 대하여는 연구된 바가 없는 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 기생충 감염에 대한 숙주의 소장점막 조직의 면역반응을 알아보기 위해 C3H/HeN 마우스에 호르텐스극구흡충의 피낭유충을 감염시키고, 면역억제제로 알려져 있는 cyclosporin-A(38)와 항히스타민제제로 H<sub>2</sub>R길항제인 cimetidine과 H<sub>1</sub>R길항제인 hydroxyzine(39)을 마우스에 정량적으로 경구투여하면서, 이런 약제들이 숙주의 면역반응과 충체 배출에 어떻게 영향을 미치는지 알아보려고 하였다.

## 제 2 장 연구재료 및 방법

### 1. 실험동물

주식회사 오리엔트바이오에서 생후 4 주령 된 SPF C3H/HeN 암컷 마우스를 구입하여 사용하였다. 실험은 대조군과 각각의 약제투여 실험군으로 나눈 다음 호르텐스극구흡충 피낭유충을 감염시켰으며, 각 그룹에 3 마리씩 실험하여 5 주 동안 실시하였다.

### 2. 약제 투여

약제투여 마우스는 cyclosporin-A(CsA), cimetidine 및 hydroxyzine을 투여하였다. CsA는 물에 잘 녹지 않으므로 소량의 ethanol로 희석한 다음 사용하기 직전에 물에 희석하여 7.5 mg/kg/day의 용량으로 경구투여 하였다. Cimetidine은 20 mg/kg/day dose로, hydroxyzine은 1 mg/kg/day dose를 물에 희석하여 실험이 끝날 때까지 매일 정량 투여하였다.

### 3. 호르텐스극구흡충의 피낭유충 감염

호르텐스극구흡충 피낭유충 30 개를 C3H/HeN 마우스에 경구 감염시켰다. 호르텐스극구흡충 피낭유충은 미꾸리(*Misgurnus anguillicaudatus*)의 항문 주위를 절단하여 슬라이드에 놓은 다음, 다른 슬라이드로 압평하여 항문 조직에 있는 호르텐스극구흡충의 피낭유충을 분리한 다음 경구적 투여하여 감염시켰다.

### 4. 총체 회수율

호르텐스극구흡충 피낭유충의 감염 후 1 주부터 5 주까지 대조군과 약제투여군 별로 각각 3 마리의 마우스를 경추 탈구법으로 희생 시킨 후 해부하여 소장을 적출하였다. 적출된 소장은 절개한 후 1 M PBS(phosphate buffered saline)에서 2 시간 동안 놓아둔 후 성충을 수집하여 회수율을 구하였다.



## 5. Total RNA 분리

대조군과 실험군의 마우스를 해부하여 비장을 적출한 후 cryotube에 넣어서 액체질소에 담근 후 바로 꺼내어  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 적출한 비장의 1/3(10 mg)을 Trizol(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) 1 ml에 넣고 70% ethyl alcohol/0.01% DEPC(Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 증류수로 전 처리한 homogenizer로 균등화시켰다. 그 후 실온에서 5분 동안 incubation 한 다음 200  $\mu\text{l}$  chloroform(Duksan Pure Chemical Co. Ltd., Ansan, Kyungki-Do, Korea)을 가하여 15 초 동안 vortexing을 하고 실온에서 3 분 동안 incubation 한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 13000 rpm 으로 15 분 동안 원심분리 하였다. 그 뒤 상층액 400  $\mu\text{l}$ 를 취하여 isopropanol(Duksan Pure Chemical Co. Ltd., Ansan, Kyungki-Do, Korea) 400  $\mu\text{l}$ 를 조심스럽게 혼합한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 13000 rpm 으로 10 분 동안 원심분리를 실시한 후 상층액을 제거하였다. 멸균한 0.01% DEPC 증류수로 조제한 70% ethanol 약 1 ml를 넣은 뒤  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 13000 rpm으로 5 분 동안 원심분리를 실시한 후 상층액을 완전히 제거하였다. 분리된 total RNA는 30  $\mu\text{l}$ 의 멸균된 0.01% DEPC 증류수로 용해시킨 뒤  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 분리된 total RNA의 확인은 0.5 $\times$  TBE buffer(Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer, pH 8.0)을 사용하여 1% agarose gel(Bioneer Co., Daejon, Korea)에 RNA 2  $\mu\text{g}$ 과 6 $\times$  loading buffer 1  $\mu\text{l}$ 를 섞어 100 V, 25 분 동안 전기영동을 실시하여 밴드를 확인하였다. 전기영동이 끝난 gel은 자외선 광원(Vilbert-Lourmat, Mame La Valle, France) 위에 두고 Polaroid film이 들어 있는 Photo-Documentation Camera(Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, U.S.A.)를 이용하여 254 nm에서 촬영하였다.

## 6. RT-PCR을 이용한 cytokine mRNA 발현

분리한 total RNA 4  $\mu\text{g}$ 과 200 pmole Oligo dT<sub>20</sub>(Bioneer Co., Daejon, Korea) 1  $\mu\text{l}$ 를 혼합한 mixture를  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분 동안 incubation한 후 AccuPower RT-PreMix(Bioneer Co., Daejon, Korea)와 혼합하였다. 그 다음 멸균된 0.01%

DEPC 증류수를 가하여 총량이 50  $\mu\text{l}$  가 되게 혼합하여 42°C에서 60 분, 94°C에서 5 분 동안 반응 시켜서 cDNA를 합성하였다.

PCR 반응은 합성한 cDNA 4  $\mu\text{l}$ 에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP(Intron Biotechnology, Sungnam, Kyungki-Do, Korea) 5  $\mu\text{l}$ 를 넣었다. 그리고 10× buffer(100 mM Tris-HCl, pH8.3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>)(Intron Biotechnology, Sungnam, Kyungki-Do, Korea) 5  $\mu\text{l}$ , primer set 100 pmol/ $\mu\text{l}$ (Bioneer Co., Daejon, Korea)를 각각 1  $\mu\text{l}$ , *Taq* polymerase(Intron Biotechnology, Sungnam, Kyungki-Do, Korea) 0.05 unit를 첨가하고, 멸균 증류수를 가하여 최종 반응하는 양이 50  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하여 Thermal cycler(GeneAmp PCR System 2700, Singapore)에서 증폭하였다. 사용된 primer중  $\beta$ -actin은 상용화된 제품(Bioneer Co., Daejon, Korea)을 사용했고, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 기존의 연구에서 사용된 것(Bioneer Co., Daejon, Korea)을 주문하여 RT-PCR을 실시했다(Table 1.).  $\beta$ -actin, IL-4, IL-5, IL-1 $\beta$ 의 경우는 94°C에서 5 분 동안 가온 한 후에 매 cycle당 94°C에서 30 초 동안 denaturation, 60°C에서 30 초 동안 annealing, 72°C에서 1 분 동안 extension 반응을 시행하여 35 cycle을 시행하였으며, 완전한 extension을 위해 72°C에서 7 분 동안 지속하였다. TNF- $\alpha$ 의 경우는 94°C에서 5 분 동안 가온 한 후에 매 cycle당 94°C에서 30 초 동안 denaturation, 65°C에서 30 초 동안 annealing, 72°C에서 40 초 동안 extension 반응을 시행하여 35 cycle을 시행하였고 완전한 extension을 위해 72°C에서 7 분 동안 지속하였다. 반응이 종료된 후에 0.5  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.)를 첨가한 2% agarose gel을 이용하여 100 V로 25 분 동안 전기 영동하여 cytokine의 발현을 확인하였고, 전기영동이 끝난 gel은 자외선 광원(Vilbert-Lourmat, Mame La Valle, France), Polaroid film이 들어 있는 Photo-Documentation Camera (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, U.S.A.)를 이용하여 254 nm에서 촬영하였다. 각각의 cytokine에 대한 정량적인 분석은 densitometer system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.)을 이용하였다.

## 7. PAS 염색과 배세포 관찰

C3H/HeN 마우스의 소장 윗부분을 약 3 cm의 길이로 절개하여 식염수에 2~3회 세척하였다. 그리고 Carnoy 고정액으로 고정시킨 다음 조직절편으로 제작하였다.

Periodic acid schiff(PAS)는 5 분 동안 1% periodic acid로 산화시킨 다음 색을 띤 최종 생산물을 발현시키기 위해 Schiff 시약으로 다시 실시하였다. 그리고 hematoxylin으로 대조 염색을 실시한 후 봉입하여 검경하였으며, 10 villus-crypt unit(VCU) 당 배세포의 개수를 측정하였다.

## 8. Lectin 염색과 Mucin 반응 관찰

마우스 소장 내에 활성화된 배세포의 기능적인 상태를 관찰하기 위해 helix pomatia agglutinin(HPA)을 이용하여 lectin histochemistry 염색을 수행하였다. HPA는 변화된 GC mucin 상에서 N-Acetyl-D-galactosamine을 특이적으로 인식하여 검사하는 것으로 Ishikawa(1994)에 의해 서술된 방법을 사용하였다(40,41). 방법을 간략히 기술하면, Carnoy 용액으로 고정된 소장조직을 4  $\mu$ m 두께의 파라핀조직 절편을 만들었고, paraffin oven에서 5 분 동안 slide상의 파라핀을 녹였다. 그리고 xylene에서 5 분 동안 탈 파라핀 한 다음, 100%, 90%, 80%, 70% ethanol에서 각각 1 분 동안 흡수하였다. 그 후 endogenous peroxidase activity 제거를 위해 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 함유된 methanol에 20 분 동안 방치하였고, pH 7.4 0.01 M PBS에서 3 번 수세하였다. 또한 비특이적 단백질의 결합을 예방하기 위해 1% BSA가 함유된 PBS에서 10 분 동안 배양하고 PBS로 수세한 후, 25  $\mu$ g/ml의 biotinylated HPA(Sigma Chemicals Co., St, Louis, MO, U.S.A.)를 첨가시켜 2 시간 동안 moist chamber에서 배양하고 PBS에서 수세하였다. Streptavidin-HRP conjugate(Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, U.S.A.)를 PBS(1:200)에 처리한 다음 2 시간 동안 배양하여 PBS에 수세하였다. 그리고 Liquid DAB-plus substrate Kit(Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, U.S.A.)

를 사용하여 발색을 시키고, 실온에서 시약 희석액에 10 분 동안 배양하였다. 그리고 증류수에 2~3 번 수세하고 Mayer's hematoxylin으로 10~20 초 동안 대조염색을 시행하였다. 그 다음 흐르는 물에서 수세하였고, 80%-95%-100%-100% ethyl alcohol에서 각각 1 분씩 탈수하였고, xylene-xylene에서 각각 3 분씩 청명 과정을 시행하였으며, Canada balsam 으로 봉입하였다. 이런 과정으로 염색된 세포들에서 10 VCU 당 HPA positive 세포의 수로서 나타내었다.

## 9. 통계적 분석

실험된 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 감염대조군과 약제 처리군 간의 배세포, HPA positive 세포 및 총체 회수율에 대한 유의성 검증은 paired-T test 를 이용하였으며, 모든 통계는 SPSS Version 13.0(SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.)에서 유의수준  $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

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

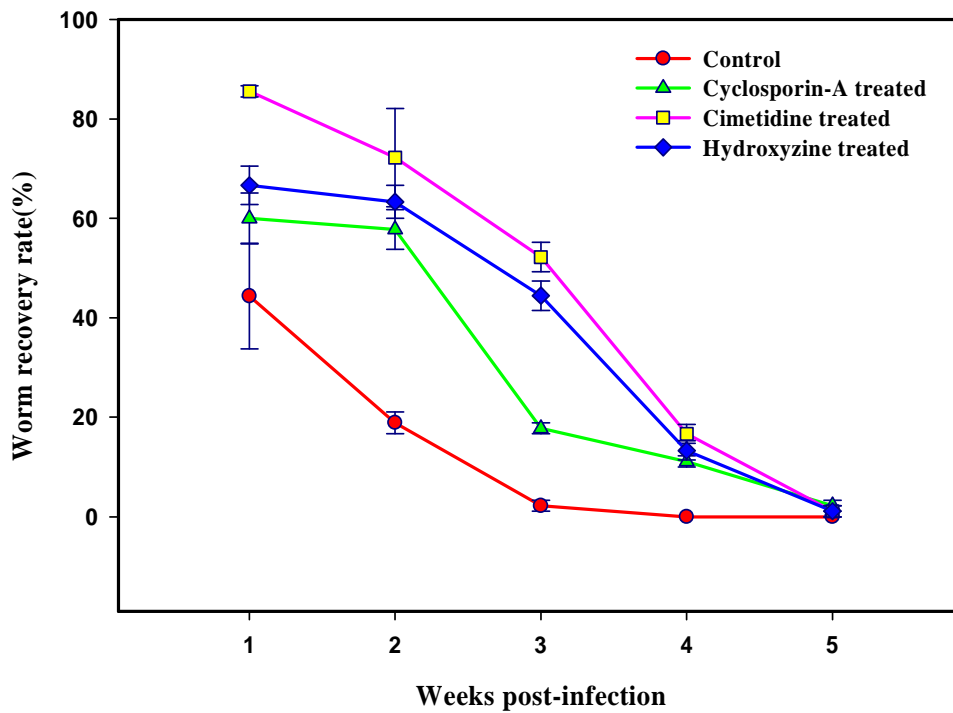
Cytokine	Primer sequence (5' → 3')		Expected amplified fragment size(bp)
<i>β</i> -actin	Sense	AGG CTG TGC TGT CCC TGT ATC C	395
	Antisense	ACC CAA GAA GGA AGG CTG GAA A	
TNF- <i>α</i>	Sense	ATG AGC ACA GAA AGC ATC CGC	692
	Antisense	CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC	
IL-1 $\beta$	Sense	GCT ACC TGT GTC TTT CCC GTG G	291
	Antisense	TTG TCG TTG CTT GGT TCT CCT TG	
IL-4	Sense	TCT CTA GAT CAT GGG CAT TTT GAA CGA GGT C	306
	Antisense	TGC ATG ATG CTC TTT AGG CTT TCC	
IL-5	Sense	ATG ACT GTG CCT CTG TGC CTG GAG C	243
	Antisense	CTG TTT TTC CTG GAG TAA ACT GGG G	

## 제 3 장 결 과

### 1. 총체 회수율

대조군과 실험군 C3H/HeN 마우스를 감염 주별로 희생시킨 후 소장 내에서 충체를 회수한 결과 대조군의 총체 회수율은 감염 1, 2, 3 주에 44.4±18.4, 18.9±3.8, 2.2±1.9%로 감염 후 3 주에 급격한 감소를 보였고 감염 후 4 주부터는 총체가 회수되지 않았다(Fig. 1).

투여 약제종류에 따른 총체 회수율을 살펴보면 다음과 같다. Cyclosporin-A (CsA)를 투여한 군에서는 1, 2, 3, 4, 5 주에 각각 60.0±8.8, 57.8±6.9, 17.8±1.9, 11.1±1.9, 2.2±1.9%의 성적으로 감염 후 3 주에 급격한 감소를 보였으며, 감염 후 2 주부터 4 주까지 대조군에 비해 유의하게 높은 회수율을 보였다( $p<0.01$ ). Cimetidine을 투여한 군에서는 1, 2, 3, 4, 5 주에 각각 85.6±1.6, 72.2±17.1, 52.2±5.1, 16.7±3.3, 1.1±1.9%의 성적으로 감염 후 4 주에 급격한 감소를 보였으며, 감염 후 2 주부터 4 주까지 대조군에 비해 유의하게 높은 회수율을 보였다( $p<0.05$ ). 그리고 hydroxyzine을 투여한 군에서는 1, 2, 3, 4, 5 주에 66.7±6.7, 63.3±5.8, 44.4±5.1, 13.3±3.3, 1.1±1.9%의 성적으로 감염 후 4주에 급격한 감소를 보였으며, 감염 후 2 주부터 4 주까지 대조군에 비해 유의하게 높은 회수율을 보였다( $p<0.01$ ). 전체적으로 대조군에 비해 약제를 투여한 실험군에서 총체 회수율이 두드러지게 높았고, 감염 후 5 주까지 총체가 회수되었으므로 숙주에서의 총체 배출기간이 약제에 의해 유의하게 지연되었음을 알 수 있었다(Fig. 1).



**Figure 1. Worm recovery rates of *E. hortense* in control and drug treated C3H/HeN mice.** Each mouse was infected with 30 metacercariae, and sacrificed at weeks 1-5 post-infection (PI). The worm recovery rates (WRRs) were significantly higher in drug treated groups than in control group at weeks 2-4 PI. (Cyclosporin-A :  $p < 0.01$ , cimetidine :  $p < 0.05$ , hydroxyzine:  $p < 0.01$ )

## 2. Cytokine mRNA의 발현

C3H/HeN 마우스에 호르텐스극구흡충의 피낭유충 30 개씩을 감염시킨 후 최초 감염 후 1 주부터 5 주까지 매주 마우스를 거살하여 비장을 분리한 다음 균등화하여 RT-PCR 방법으로 대조군과 약제투여 실험군 각각에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 그리고 IL-5의 mRNA에 대한 발현을 확인해 보았다.

TNF- $\alpha$ 의 경우는 호르텐스극구흡충 피낭유충을 감염시킨 대조군에서 감염 후 1 주부터 5 주까지 지속적인 발현을 보였으며, 감염 후 2 주에 최고치를 보인 후 서서히 감소하였다. 한편 CsA를 투여한 실험군에서는 감염 후 3 주까지 발현을 보였고, 감염 후 증가하여 3 주에 최고치를 보였다. 그리고 cimetidine을 투여한 실험군에서는 감염 후 5 주까지 지속적인 발현을 보였으며, hydroxyzine을 투여한 실험군에서는 감염 후 2 주에 최고치를 보인 후 점차 감소하여 감염 후 4 주까지만 발현을 보였다. 그리고 약제를 투여하지 않은 대조군에 비해 약제를 투여한 군에서는 CsA 투여군 중 감염 후 3 주의 결과를 제외한 나머지 결과에서 발현이 억제되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

IL-1 $\beta$ 의 경우 대조군에서는 감염 후에 mRNA의 발현이 증가하기 시작하여 감염 후 2 주에 최고치를 보이다 서서히 감소하여 감염 후 5 주까지 발현을 보였다. 한편 CsA를 투여한 실험군에서는 감염 후 2 주 까지 약간 증가하였다가 점차 감소하여 감염 후 4 주부터는 호르텐스극구흡충 피낭유충 감염 전에 비해 더 낮은 발현을 보였다. 그러나 cimetidine을 투여한 실험군에서는 감염 후 2 주에 최고치를 보인 후 감소하여 감염 후 5 주까지 비슷한 발현을 보였다. 그리고 hydroxyzine 투여군에서도 감염 후 2 주에 최고치를 보인 후 감소하였다. 그리고 약제를 투여하지 않은 대조군과 비교해 보면 cimetidine을 투여한 군에서만 전체적으로 높은 발현을 보였으며 CsA 투여군은 대조군에 비해 억제된 발현을 보였다. 그리고 hydroxyzine 투여군에서는 초기엔 대조군에 비해 약간 억제된 발현을 보였으나 감염 후 3 주부터는 대조군에 비해 증가된 발현을 보였다(Fig. 3).

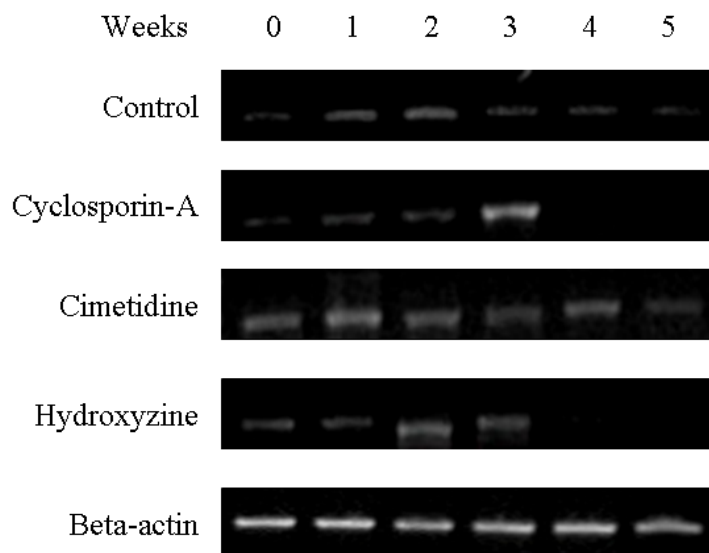
IL-4의 경우 대조군에서는 감염 후 증가하여 감염 후 2 주에 최고치를 보인



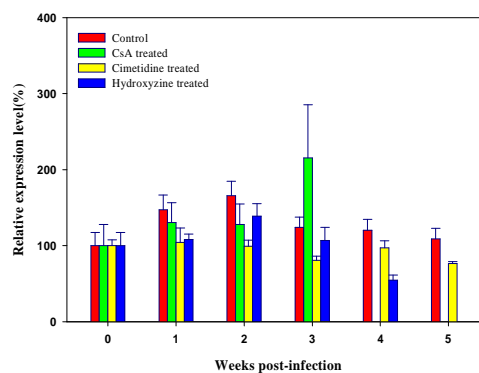
후 감소하기 시작하여 감염 후 5 주까지 발현을 보였다. 한편 CsA를 투여한 실험군에서는 감염 후 2 주에 최고치를 보인 후 점차 감소하여 감염 후 5 주에는 발현을 볼 수 없었다. 그리고 cimetidine을 투여한 실험군에서도 감염 후 2 주에 최고치를 보인 후 감소하여 감염 후 5 주까지 지속적인 발현을 보였다. 그러나 hydroxyzine을 투여한 실험군에서는 감염 후 1 주까지만 발현을 보였고, 그 후에는 발현양상을 관찰할 수 없었다. 또한 약제를 투여하지 않은 대조군에 비해 약제를 투여한 실험군이 전반적으로 낮은 발현양상을 보였으며 특히, hydroxyzine 투여에 의해 IL-4의 발현이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다(Fig. 4).

IL-5의 경우 대조군에서는 감염 후에 증가하기 시작하여 감염 후 5 주에 전반적으로 비슷한 발현 양상을 나타내었다. 한편, CsA를 투여한 실험군에서는 감염 후에 서서히 증가하여 감염 후 5 주까지 발현을 보였다. 그리고 cimetidine을 투여한 실험군에서는 감염 전과 비교해서 별다른 변화를 보이지 않았고, 감염 후 3 주에 약간 감소하다가 감염 후 4 주에 일시적으로 증가하였으며, 감염 후 5 주에 다시 감소하는 발현양상을 보였다. 한편 hydroxyzine을 투여한 실험군에서는 감염 후 1 주에 최고치를 보이다가 감소하여 감염 후 3 주부터 약한 발현을 보였다. 또한 약제를 투여하지 않은 대조군과 비교해보면 CsA 투여군은 감염 후 1 주에만 억제되고, 나머지 주에서는 비슷한 발현을 보였으며, cimetidine 투여군에서는 감염 후 대조군에 비해 전체적으로 낮은 발현을 보였다. 그리고 hydroxyzine 투여군은 감염 후 2 주까지 급격히 상승하여 강한 발현을 보이고 감염 후 3 주부터 다시 급격히 감소하여 거의 발현을 볼 수 없었다(Fig. 5).

(a)



(b)



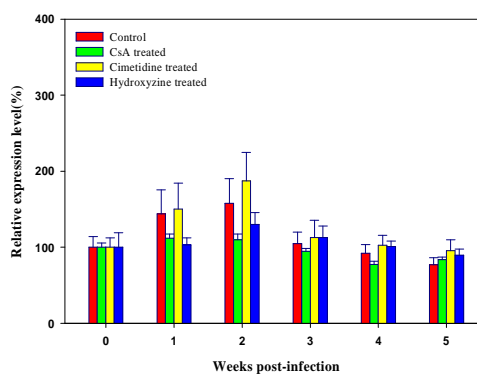
**Figure 2. Comparison of TNF- $\alpha$  mRNA expression in spleen from control and drug treated C3H/HeN mice infected with *E. hortense*.**

(a) Expression of TNF- $\alpha$  mRNA by RT-PCR (b) Mean data( $\pm$ SD) of relative mRNA expression levels, calculated the expression level at week 0 as 100%. Quantitative analysis of TNF- $\alpha$  mRNA was performed with Quantity One, computer-assisted imaging densitometer system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.).

(a)



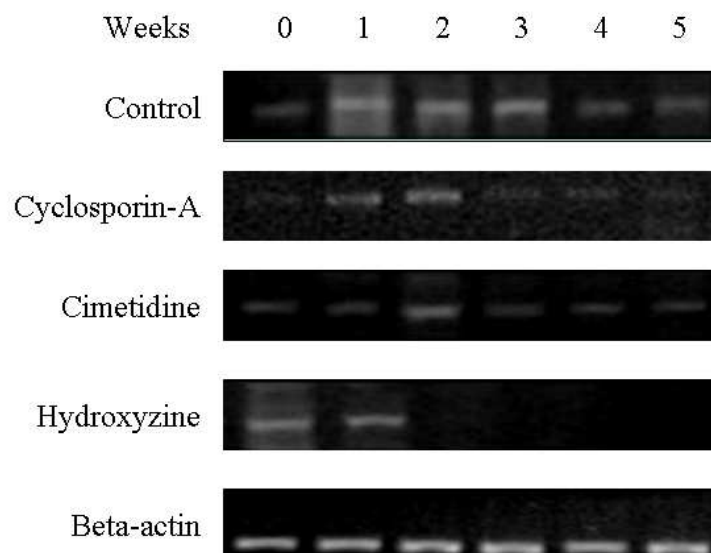
(b)



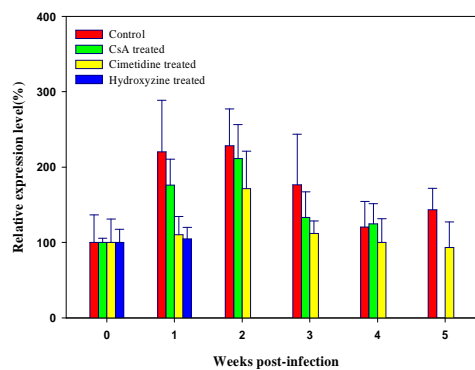
**Figure 3. Comparison of IL-1 $\beta$  mRNA expression in spleen from control and drug treated C3H/HeN mice infected with *E. hortense*.**

(a) Expression of IL-1 $\beta$  mRNA by RT-PCR (b) Mean data( $\pm$ SD) of relative mRNA expression levels, calculated the expression level at week 0 as 100%. Quantitative analysis of IL-1 $\beta$  mRNA was performed with Quantity One, computer-assisted imaging densitometer system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.).

(a)



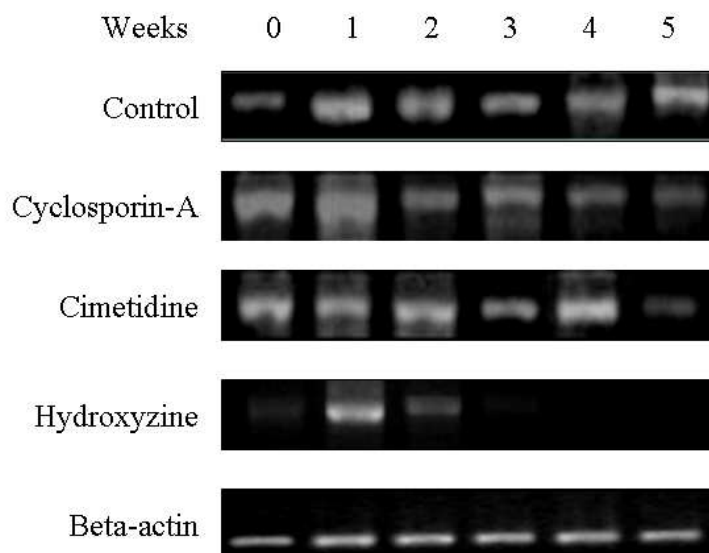
(b)



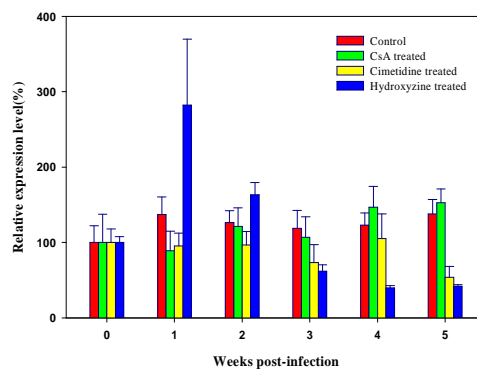
**Figure 4. Comparison of IL-4 mRNA expression in spleen from control and drug treated C3H/HeN mice infected with *E. hortense*.**

(a) Expression of IL-4 mRNA by RT-PCR (b) Mean data(±SD) of relative mRNA expression levels, calculated the expression level at week 0 as 100%. Quantitative analysis of IL-4 mRNA was performed with Quantity One, computer-assisted imaging densitometer system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.).

(a)



(b)



**Figure 5. Comparison of IL-5 mRNA expression in spleen from control and drug treated C3H/HeN mice infected with *E. hortense*.**

(a) Expression of IL-5 mRNA by RT-PCR (b) Mean data( $\pm$ SD) of relative mRNA expression levels, calculated the expression level at week 0 as 100%. Quantitative analysis of IL-5 mRNA was performed with Quantity One, computer-assisted imaging densitometer system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.).

### 3. 소장 내 배세포의 반응

C3H/HeN 마우스에 호르텐스극구흡충 피낭유충만을 감염시킨 대조군과 약제를 투여한 실험군을 각각 주일별로 거살한 다음 소장상부를 절단하여 Carnoy 고정액에 고정시키고 조직표본을 만들었다. 배세포를 관찰하기 위해 PAS로 염색을 실시한 다음 소장의 villi를 임의로 10 개를 선정하여 배세포의 수를 산정하였으며, 그 결과는 배세포의 수/10 VCU로 표기 하였다.

C3H/HeN 마우스에서 호르텐스극구흡충 피낭유충 감염 전(감염 0주)의 배세포의 발현은 대조군은  $98.7 \pm 3.2$  개이고, CsA 투여실험군은  $103.3 \pm 7.0$ , cimetidine 투여 실험군은  $94.7 \pm 6.4$ , 그리고 hydroxyzine 투여실험군은  $100.7 \pm 5.7$  개로서 대조군과 약제투여 실험군의 결과에 차이가 보이지 않았다. 그러나 호르텐스극구흡충 피낭유충을 감염시킨 다음 감염 후 각 주별로 배세포수의 발현이 증가하다 감소하였고, 투여한 약제에 따라 배세포의 발현에 차이가 났다. 호르텐스극구흡충 피낭유충을 감염시킨 대조군에서는 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $121.0 \pm 3.6$ ,  $148 \pm 7.0$ ,  $175.3 \pm 8.4$ ,  $148.3 \pm 8.0$ ,  $116.3 \pm 11.2$  개로 배세포(goblet cell)의 발현이 증가하다 감소하였는데, 충체 배출이 급격히 감소한 3 주째에 최고치를 보였으며 그 후에 감소하여 5 주에는 실험시작 시 정도의 배세포의 수만큼 감소하는 것을 알 수 있었다. 한편, 약제 투여 실험군에서의 배세포의 반응을 살펴보면 다음과 같다. CsA 투여군에서는 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $107.3 \pm 9.0$ ,  $127.3 \pm 9.6$ ,  $145.3 \pm 9.3$ ,  $128.3 \pm 9.1$ ,  $106.0 \pm 10.1$  개로 감염 후 3 주에 최고치의 반응을 보인 후 감소하였으며, 대조군에 비해 전체적으로 낮은 반응을 보였고, 특히 감염 후 3 주에 유의하게 낮은 반응을 보였다 ( $p < 0.01$ ). 이에 비해 cimetidine을 투여한 실험군에서는 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $136.3 \pm 4.7$ ,  $169.3 \pm 4.5$ ,  $242.7 \pm 5.7$ ,  $221.0 \pm 11.0$ ,  $124.0 \pm 8.7$  개로 감염 후 3 주에 최고치를 보인 후 감소하는 반응을 보였으며, 대조군에 비해 전체적으로 높은 반응을 유지하면서 감염 후 1, 3, 4 주째에 유의하게 높은 반응을 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 hydroxyzine을 투여한 실험군은 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $121.7 \pm 4.0$ ,  $165.7 \pm 5.9$ ,  $213.3 \pm 6.7$ ,  $159.0 \pm 10.1$ ,  $96.0 \pm 9.0$  개로 감염 후 3 주에 최고치를 보인 후 감소하였으며, 감염 후 2 주부터 4 주까지 대조군보다 높은 반응을 보였고, 특히,

감염 후 3 주째에 대조군에 비해 유의하게 높은 반응을 보였다( $p<0.01$ ).

이와 같은 결과로 보아 대조군에 비해 CsA를 투여한 실험군에서 배세포의 반응도 강하게 억제가 되었음을 알 수 있었고, cimetidine 투여군이 hydroxyzine 투여군보다 대조군에 비해 배세포의 반응이 좀 더 활성화 된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 6).

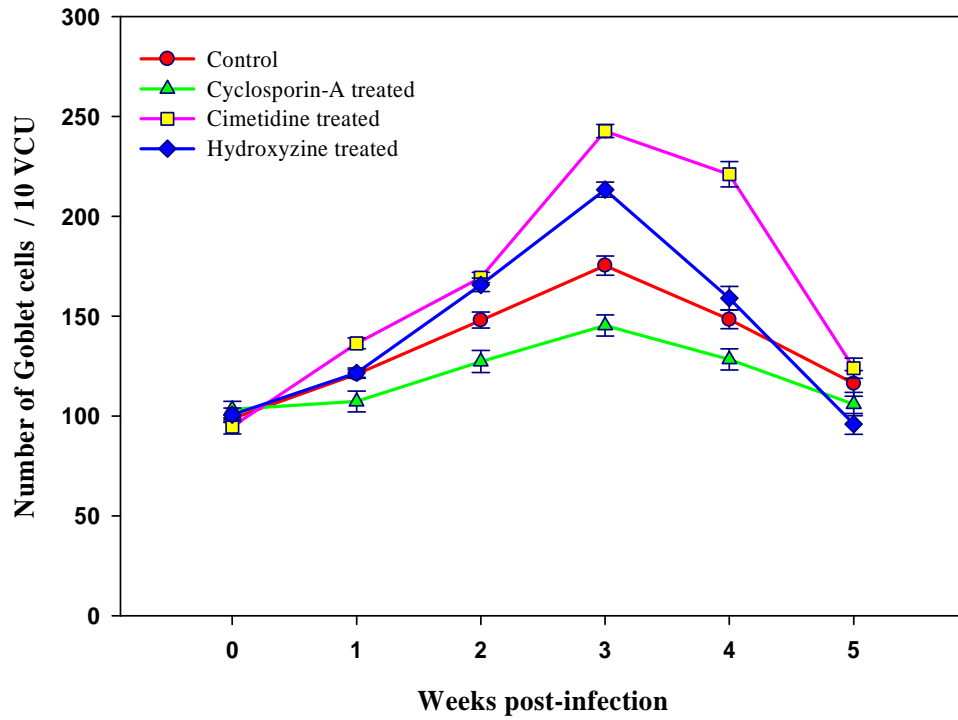


Figure 6. Comparison of mucosal goblet cells number per 10 villus-crypt unit (VCU) in the small intestine of control and drug treated C3H/HeN mice infected with *E. hortense*.



#### 4. Lectin histochemistry의 결과

C3H/HeN 마우스에 호르텐스극구흡충 피낭유충만을 감염 시킨 대조군과 약제를 투여한 실험군을 각각 주일별로 거살한 다음 소장상부를 절단하여 Carnoy 고정액에 고정시키고 조직표본을 만들었다. 배세포에서 mucin 분비를 관찰하기 위해 lectin histochemistry를 실시한 다음, 소장의 villi를 임의로 10 개를 선정하여 HPA(Helix pomatia agglutinine) positive 세포의 수를 산정하였으며, 그 결과는 HPA positive 세포의 수/10 VCU로 표기 하였다.

C3H/HeN 마우스에서 호르텐스극구흡충 피낭유충의 감염 전(감염 0주) HPA positive 세포의 발현은 대조군은  $11.0 \pm 3.0$  개이고, CsA 투여실험군은  $9.0 \pm 1.0$ , cimetidine 투여 실험군은  $10.3 \pm 1.5$ , 그리고 hydroxyzine 투여실험군은  $10.0 \pm 3.6$  개로 배세포 발현의 결과와 마찬가지로 대조군과 약제투여 실험군 결과간의 차이가 보이지 않았다. 그러나 호르텐스극구흡충 피낭유충을 감염시킨 다음 감염 후 각 주별로 HPA positive 세포수의 발현이 증가하다 감소하였고 투여한 약제에 따라 HPA positive 세포의 발현에 차이가 났다. 호르텐스극구흡충 피낭유충을 감염시킨 대조군에서는 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $82.3 \pm 9.3$ ,  $114.3 \pm 4.9$ ,  $145.7 \pm 5.7$ ,  $124.0 \pm 8.2$ ,  $42.3 \pm 5.7$  개로 HPA positive 세포수의 발현이 증가한 후 감소하였는데, 총체 배출이 급격히 감소한 감염 후 3 주째에 최고치를 보였다. 한편, 약제 투여 실험군에서의 HPA positive 세포수의 발현을 살펴보면 다음과 같다. CsA 투여군에서는 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $53.7 \pm 7.4$ ,  $83.0 \pm 10.8$ ,  $94.3 \pm 14.3$ ,  $54.3 \pm 13.6$ ,  $25.3 \pm 7.6$  개로 감염 후 3 주에 최고치의 발현을 보인 후 감소하였다. 그리고 대조군에 비해 전체적으로 낮은 발현을 보였으며, 감염 후 1~4 주에 걸쳐 모두 통계적으로 유의하게 낮은 발현을 보였다( $p < 0.05$ ). 이에 비해 cimetidine을 투여한 실험군에서는 감염 후 1, 2, 3, 4, 5주에  $101.0 \pm 9.0$ ,  $141.7 \pm 6.0$ ,  $177.3 \pm 7.6$ ,  $146.3 \pm 4.7$ ,  $67.7 \pm 5.9$  개로 감염 후 3 주에 최고치를 보인 후 감소하였다. 그리고 대조군에 비해 전체적으로 높은 발현을 유지하였고, 감염 후 2~3 주에 통계적으로 유의하게 높은 발현을 보였다( $p < 0.05$ ). 또한 hydroxyzine을 투여한 실험군은 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $81.3 \pm 9.0$ ,  $132.3 \pm 7.1$ ,  $163.7 \pm 5.7$ ,  $142.0 \pm 6.0$ ,  $78.7 \pm 14.3$  개로 다른 약제 투여군과 마찬가지로

가지로 감염 후 3 주에 최고치를 보인 후 감소하였다. 그리고 감염 후 2 주부터 5 주까지 대조군보다 높은 발현을 보였고, 감염 후 2 주에 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 발현을 보였다( $p<0.05$ ). 이와 같은 결과로 보아 소장 내 배세포의 발현결과와 마찬가지로 배세포 내 mucin의 발현도 대조군에 비해 CsA를 투여한 실험군에서 전체적으로 강하게 억제되었음을 알 수 있었고, cimetidine 투여군이 hydroxyzine 투여군보다 대조군에 비해 배세포 내 mucin의 발현이 좀 더 활성화된 것을 볼 수 있었다(Fig. 7).

또한 소장내의 배세포의 발현에 대한 HPA positive 세포의 발현에 대한 비율을 살펴본 결과는 다음과 같다. 감염 0주의 대조군에서  $11.2\pm 3.4\%$  정도였던 HPA positive 세포가 호르텐스극구흡충 피낭유충 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $68.0\pm 7.0$ ,  $77.3\pm 1.5$ ,  $83.1\pm 1.0$ ,  $83.9\pm 8.9$ ,  $36.9\pm 8.3\%$ 로 감염 후 증가하여 총체 배출이 거의 완료된 감염 후 3~4 주에 발현비율도 가장 높게 유지하였다가 감염 후 5 주에 급격히 감소한 것을 관찰할 수 있었고, 특히 감염 후 1~4 주에 통계적으로 유의하게 증가하였음을 알 수 있었다( $p<0.05$ ). 한편 약제투여 실험군의 결과는 다음과 같다. CsA 투여군에서는 감염 0 주에  $8.8\pm 1.6\%$ 에 비해 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $50.6\pm 11.0$ ,  $65.6\pm 12.0$ ,  $65.1\pm 11.2$ ,  $43.0\pm 13.5$ ,  $24.3\pm 9.0\%$ 로 대조군에 비해 전체적으로 낮은 발현율을 보였으며, 특히 감염 후 1~3 주의 결과가 감염 0주에 비해 유의하게 감소하였다( $p<0.05$ ). 그러나 cimetidine 투여군에서는 감염 0 주에  $11.0\pm 2.3\%$  인 것에 비해 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에  $74.0\pm 4.2$ ,  $83.7\pm 3.4$ ,  $73.1\pm 4.4$ ,  $66.4\pm 5.0$ ,  $54.6\pm 4.6\%$ 로 대조군과 비교 시 감염 후 2 주에 유의하게 높은 발현율을 보이며 그 이후에 서서히 감소하는 것을 알 수 있었다( $p<0.05$ ). 특히 감염 0 주에 비해서 감염 후 1~5 주 전체적으로 유의하게 높은 발현상태를 보임을 알 수 있었다( $p<0.01$ ). 또한 hydroxyzine 투여군에서는 감염 0 주에는  $10.1\pm 4.1\%$ 를 보였으나 감염 후 1, 2, 3, 4, 5 주에는  $66.8\pm 6.9$ ,  $80.0\pm 7.2$ ,  $76.8\pm 4.1$ ,  $89.4\pm 2.2$ ,  $81.8\pm 11.6\%$ 로 감염 후 2 주부터 5 주까지 대조군에 비해 높은 발현비율을 지속적으로 보였으며, 감염 0 주에 비해 감염 후 1~5 주에 전체적으로 유의하게 높은 발현상태를 보였다( $p<0.01$ ).

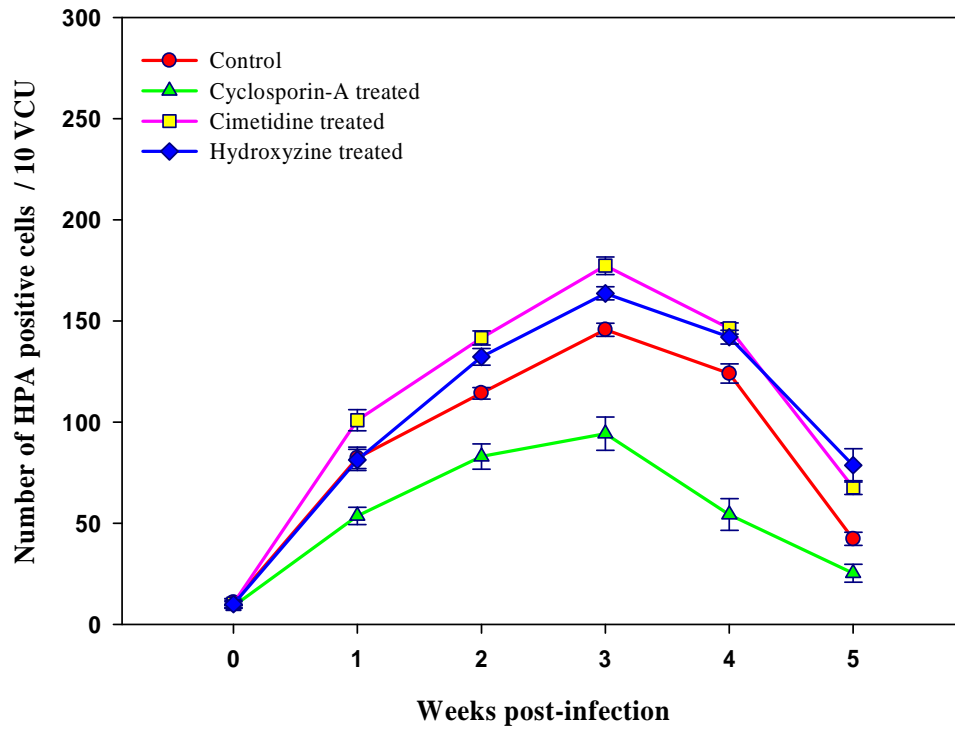


Figure 7. Comparison of HPA(helix pomatia agglutinin) positive cells number per 10 villus-crypt unit (VCU) in the small intestine of control and drug treated C3H/HeN mice infected with *E. hortense*.

## 제 4 장 고 찰

본 연구에서는 C3H/HeN 마우스에 호르텐스극구흡충의 피낭유충을 감염시키고, 면역억제제와 항히스타민제를 마우스에 정량적으로 경구 투여했을 때, 숙주의 cytokine의 발현과 소장 내 배세포와 mucin의 변화가 충체 배출에 미치는 영향에 대해 연구해 보았다.

C3H/HeN 마우스에 호르텐스극구흡충 피낭유충만 감염시킨 결과 cytokine의 발현은 감염 후 조사된 모든 cytokine에서 발현이 증가되었다. 특히, 충체 배출이 급격히 증가한 감염 후 2 주에 IL-4의 발현이 가장 강했으며 그 후에도 지속적인 발현을 보였다. 이렇게 발현된 cytokine들이 소장 점막 내 배세포와 mucin의 발현에 영향을 주어 감염 후 3 주에 최고치를 보이면서 숙주 내에서 충체 배출을 완료시키고 서서히 감소하였다.

한편, cyclosporin-A(CsA)를 투여한 실험군에서는 감염초기에 proinflammatory cytokine인 Th1 type의 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 발현은 Th2 type인 IL-4, IL-5에 비해 억제 되었다. 이로 인해 소장 점막 내 배세포와 mucin의 발현이 억제되어 숙주의 장내에서 호르텐스극구흡충이 더 오래 머무를 수 있게 되어 충체 배출이 지연되는 효과를 발생했다.

Cimetidine을 투여한 실험군에서 cytokine 발현은 TNF- $\alpha$ , IL-4 및 IL-5에서 지속적인 발현을 보였으나 대조군에 비해 강하게 억제되지 않은 반면, IL-1 $\beta$ 는 강한 발현을 보였다. 그리고 hydroxyzine 투여군에서는 Th2 type cytokine인 IL-4가 다른 cytokine들에 비해 강하게 억제되었다. 또한, Th1 type의 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 에서는 강하게 억제되지 못했으며, Th2 type중 IL-5는 감염초기에 강하게 발현이 되었으나 그 후 급격히 감소함을 알 수 있었다.

이로써 C3H/HeN 마우스에서 호르텐스극구흡충 감염 시 cytokine들의 활성이 감염 전반에 걸쳐 작용을 하여 배세포와 mucin 분비에 영향을 주어 충체 배출을 유도함을 알 수 있었다. 그 중 IL-1 $\beta$ 와 IL-5는 다른 cytokine들에 비해 항히스타민제에 저항력이 있는 것으로 보였다. 그리고 항히스타민제 투여군에서는 배세포와 mucin 분비의 활성과 상관없이 충체 배출이 지연된 결과를 보여 면역억제제를

투여한 실험군과 확연히 다른 결과를 나타냈다.

또한 충체 회수율에 있어서 cimetidine 투여군이 가장 높은 충체 회수율을 보인 것은 cimetidine의 고유기능인 위산분비조절로 인해 호르텐스극구흡충의 피낭유충이 소화기관을 지나는 동안 다른 약제를 투여한 숙주에 비해 소장내에 도달할 수 있는 수가 많았음을 의미하기도 한다. 그리고 항히스타민제 투여군이 CsA 투여군에 비해 좀 더 높은 충체 회수율을 보였는데, 이는 약제에 의한 histamine 수용체의 차단으로 평활근의 수축이 저해되어 호르텐스극구흡충의 충체 배출이 지연된 것으로 사료된다.

채 등의 보고에 따르면 면역이 억제 되지 않은 C3H/HeN 마우스에 *N. seoulense*가 감염 되었을 때 HPA positive 세포와 WRR(worm recovery rate)은 통계적으로 유의한 상관관계를 보이지는 않았으나, mucin은 감염된 기간 전반에 걸쳐 활성화된 양상을 보이고 있어 배세포의 과증식 등이 기생충의 제거에 중요한 역할보다는 국소적 면역반응에 관여한다고 보고되었다(42).

또한 배세포의 수적증가 보다 mucin을 분비하는 기능적 상태의 수가 증가하는 것이 장내 기생충 배출에 중요한 요소로 주목되어 Onah 등과 Ishikawa 등은 충체가 배출되는 동안의 배세포의 수 적인 증가 보다 mucin 말단의 당의 변화가 충체 배출에 더 필수적인 요인으로 작용한다는 것을 lectin histochemistry를 수행하여 증명하기도 하였다(43,44).

그러나 다른 보고에 따르면 rat에서는 *N. brasiliensis*의 충체 배출시기 부근에서 HPA positive spot의 증가가 관찰 된 것(41)에 비해 정상 C57BL/6 마우스의 경우에는 소장 내의 모든 배세포가 *N. brasiliensis* 에 감염되기 전에 이미 강한 HPA positive를 보임으로써 마우스에서는 GC mucin에 대한 HPA positive 세포가 충체 배출과는 유의성이 적음을 제안하기도 했다(45).

그러나 본 연구결과에서는 호르텐스극구흡충 피낭유충에 감염되기 전에는 8-11% 정도였던 HPA positive 세포가 감염 후 68-83%로 유의하게 증가하였다가 충체 배출이 완료된 후에 감소하였으므로 배세포의 과증식 및 mucin 분비가 충체 배출에 대해 유의성이 있음이 관찰 되었다.

Chappell 등의 보고에 의하면 면역억제제로 알려져 있는 CsA는 malaria,

schistosomes, adult tape worms, metacestodes 그리고 filarial nematodes 등에는 명확한 구충효과를 내고 있으나, trypanosomes과 Giardia에 대해서는 면역조절제로서의 역할을 하며, toxoplasma, avian coccidiosis와 gastrointestinal nematode에서는 구충제와 면역 억제제로서 작용을 한다고 보고하였다(46).

또 다른 보고들에 의하면 CsA는 *Hymenolepis diminuta*에 대해 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 독성이 강하지 않으므로 마우스에서 면역을 억제를 시키는 용량 정도로는 90% 이상의 기생충이 성충이 될 때까지 생존하는 것으로 보아, 충체 배출을 완전히 막지는 않지만 어느 정도 지연시킨다는 것을 알 수 있었다(47-49). 그리고 마우스에서 CsA가 *T. spiralis*의 생존을 연장시켰으나(50), 면역억제 용량을 투여한 마우스에서 *N. brasiliensis*의 충체 배출에는 영향을 미치지 못했다는 보고도 있었다(51).

또한 소아와 성인, 개(dog)에 있는 아토피 피부염(AD, atopic dermatitis)에 있어서 CsA를 투여하였을 때 효과가 있음을 설명하는 보고들도 있다(52-54). 위와 같이 CsA는 실험동물에서 기생충감염 시 사용하는 강력한 면역억제제로서 감염과 관련된 약제적용 시기나 적용방법, 적용된 약제의 용량 등에 따라 다양한 결과들을 볼 수 있었다.

충체 배출에 있어 histamine의 중요성을 뒷받침하고 있는 보고로서 histamine은 수용체와 결합하여 장관 내 평활근의 수축을 증가시켜 충체 배출이 용이하도록 하는데(55), histamine은 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> 그리고 H<sub>4</sub> 수용체를 통해 그 자체의 효력을 발휘한다(56). 그중 histamine H<sub>2</sub>-receptor(H<sub>2</sub>R)는 여러 조직(예를 들면 brain, stomach, heart, gastric mucosa, lung)내에서 Gs-protein/adenylyl cyclase system에 결합하여 intracellular cyclic adenosine monophosphate(cAMP)를 생산하도록 한다(57). 신 등은 cimetidine과 hydroxyzine 같은 약제들이 *N. seoulense*에 감염된 rat의 장관 내 배세포상의 histamine 수용체에 영향을 주어 배세포의 작용을 억제 시켰을 것이라고 보고하였다(58).

Cimetidine은 1970년대 후반에 최초로 등록되어 위장관계 궤양질환의 치료목적으로 위산분비를 조절하는 histamin H<sub>2</sub>R 길항제로서 임상적으로 널리 적용된 약제이다(59). 또한 histamin H<sub>2</sub>R을 차단하여 histamine에 의해 야기되는 평활근의

수축을 방해하여 비만세포의 증가정도에 상관없이 충체 배출을 방해하는 것으로 알려져 있다(60). 그리고 histamine은 H<sub>2</sub>R의 자극을 통해 호흡기계의 배세포 분비를 유발하는데, 선택적 H<sub>2</sub>R 길항제인 cimetidine을 미리 투여함으로써 histamine에 의해 야기되는 배세포의 분비를 막을 수 있다(61). 최근에는 suppressor T cell을 차단하고 세포성면역을 촉진하는 등 면역조절효과를 가지고 있고, human keratinocytes에서 histamine에 의해 유발되는 IL-6, IL-8의 생성은 IFN- $\gamma$ 와 IL-4에 의해 서로 다르게 조절되는 것으로 보고되었다(62).

Histamine H<sub>1</sub>-receptor(H<sub>1</sub>R) 길항제는 human basophil에 의해 IL-4와 IL-13의 생성을 저해하는 것으로 보고되어 왔으며(63), 알레르기에 의한 호흡기 염증과 과민반응을 막는 것으로 보고되고 있다(64). 따라서 알레르기 반응이 일어나는 동안 국소적으로 분비되는 histamine은 항원에 대한 즉시형 과민성반응에 있어 중요한 단계로 여겨져 왔다. 혈관 확장, 평활근 수축, 조직 부종 그리고 염증성변화 등이 histamine과 그 자체의 수용체에 의한 효과로 기인한 결과이다. H<sub>1</sub>R 길항제 중 hydroxyzine은 H<sub>1</sub>R을 차단하여 histamine의 작용과 충체 배출을 방해하는 것으로 알려져 있다(55). 이와 비슷한 또 다른 H<sub>1</sub>R 길항제인 mepyramine은 guinea pigs에서 *Trichostrongylus colubriformis*의 배출을 방해한다는 보고도 있다(65).

그러므로 본 연구의 결과 호르텐스극구흡충이 감염된 C3H/HeN 마우스에 CsA, cimetidine 과 hydroxyzine을 투여하였을 때, 면역억제제 보다 항히스타민제들이 충체 배출을 지연시키는데 더 뛰어난 효과를 보였으며, 항히스타민제 중에서는 H<sub>2</sub>R 길항제가 H<sub>1</sub>R 길항제보다 더 뛰어난 지연 효과를 유발하는 것으로 관찰되었다. 이에 더 나아가 애완동물과의 접촉이 증가하고 있는 요즈음 아토피피부염이나 위염 및 다른 알레르기 질환의 치료목적으로 사용하는 CsA, cimetidine 그리고 hydroxyzine과 같은 약제들이 혹시 발생할지 모르는 숙주의 기생충 감염 시 면역반응을 억제시키고 histamine 수용체를 차단하게 되어 숙주의 충체 자연배출을 방해할 수 있다고 여겨지며, 이에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 제 5 장 결 론

C3H/HeN 마우스에서 호르텐스극구흡충의 피낭유충을 실험적으로 감염시키고, 면역억제제인 cyclosporin-A와 항히스타민제인 cimetidine과 hydroxyzine을 투여하였을 때 피낭유충만 감염시킨 대조군과 약제를 투여한 실험군에서 cytokine 발현과 배세포와 mucin의 반응이 충체 배출에 미치는 영향을 살펴보기 위해, 비장에서 total RNA 분리 및 RT-PCR을 시행하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 그리고 IL-5의 변화를 살펴보았으며, 소장에서 충체를 회수하였고, 소장을 고정한 paraffine 절편에서 PAS 염색과 lectin histochemistry를 시행하여 소장 내 배세포와 mucin 반응을 관찰하였다. 본 실험에서 얻은 결과는 다음과 같다.

Cyclosporin-A(CsA)는 감염초기에 Th1 type의 cytokine들의 발현을 억제시킴으로서 배세포의 수와 mucin 분비도 억제되어 충체 배출을 지연시켰다. 한편 항히스타민제인 cimetidine과 hydroxyzine은 각각 IL-1 $\beta$ 와 IL-5의 발현 증가가 배세포의 수 및 mucin 분비기능 활성을 유도하였음에도 불구하고 충체 배출을 지연시켰다. 이는 약제의 고유기능으로 말미암아 histamine H<sub>2</sub>R과 H<sub>1</sub>R이 차단되어 장관 내 평활근상의 histamine 수용체의 결합을 억제시킨 결과로 배세포와 mucin 분비 활성보다 충체 배출에 좀 더 중요하게 작용하였음을 알 수 있었다. 또한 cimetidine은 억제된 cytokine이 없이 약제 고유기능인 위산분비조절로 인해 피낭유충이 소화기관을 지나는 동안 다른 약제를 투여한 숙주에 비해 소장에 더 많이 도달됨을 알 수 있었다.

그러므로 CsA 보다는 항히스타민제들이 충체 배출 지연에 더 효과적이었으며, 실험한 항히스타민제 중에 H<sub>2</sub>R 길항제인 cimetidine이 H<sub>1</sub>R 길항제인 hydroxyzine 보다 충체 배출 지연에 더 효과적임을 알 수 있었다.



## 참 고 문 헌

1. Asada S (1926). On a new *Echinostomatide* trematode and its life history. *Trans K Jap Pathol Soc* **16**:293-294 (in Japanese).
2. Tani S (1976). The intermediate and final hosts in Akita Prefecture. *Trans K Jap Pathol Soc* **25**(6):461-467.
3. Seo BS, Hong ST, Chai JY, Lee SH (1983). A human case of *Echinostoma hortense* infection. *Korean J Parasitol* **21**(2):219-223.
4. Ryang YS, Ahn YK, Lee KY, Kim TS, Han MH (1985). Two cases of natural infection by *Echinostoma hortense* and its second intermediate host in Wonju area. *Korean J Parasitol* **23**(1):33-40.
5. Chai JY, Hong SJ, Sohn WM, Lee SH, Seo BS (1985). Studies on intestinal trematodes in Korea XVI. Infection status of loaches with the metacercariae of *Echinostoma hortense*. *Korean J Parasitol* **23**(1):18-23.
6. Ahn YK, Ryang YS (1985). *Echinostoma hortense* metacercariae naturally encysted in *Odontobutis obscura interrupta* (a freshwater fish) and experimental infection to rats. *Korean J Parasitol* **23**(2): 230-235.
7. Park JT (1938). A rat trematode, *Echinostoma hortense* Asada, from Korea. *Keijo J Med* **9**(4):283-286.
8. Tanaka Y, Nadano S, Koten J (1999). Case of echinostomiasis, *Nippon Naika Gakkai Zasshi* **88**(1):138-140.
9. Lee SK, Chung NS, Ko IH, Sohn WM, Hong ST, Chai JY, Lee SH (1988). An epidemiological survey of *Echinostoma hortense* infection in Chongsong-gun, Kyongbuk province. *Korean J Parasitol* **26**(3):199-206.

10. Chai JY, Kim TH, Kho WG, Chung SW, Hong ST, Lee SH (1993). Mucosal mast cell responses to experimental *Metagonimus yokogawai* infection in rats. *Korean J Parasitol* **31**(2):129-134.
11. Wakelin D, Rose ME, Hesketh P, Else KJ, Grecis RK (1993). Immunity to coccidiosis: genetic influences on lymphocyte and cytokine responses of infection with *Eimeria vermiciformis* in inbred mice. *Parasitol Immunol* **15**(1):11-19.
12. Nawa Y, Ishikawa N, Tsuchiya K, Horii Y, Abe T, Khan A, Bing-Shi, Itoh H, Ide H and Uchiyama F (1994). Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. *Parasite immunol* **16**:333-338.
13. Specian RD, Oliver MG (1991). Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J physiology* **206**:C183-C193.
14. Miller HRP, Nawa Y (1979). *Nippostrongylus brasiliensis*: intestinal goblet-cell response in adoptively immunized rats. *Experimental Parasitology* **47**:81-90.
15. Schmitt E, Hoehn P, Germann T, Rude E (1994). Differential effects of IL-12 on the development of naive mouse CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* **24**:343-347.
16. Wong CK, Ho CY, Ko FWS, Chan CHS, Ho ASS, Hui DSC, Lam CWK (2001). Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* **125**(2):177-183.
17. Beutler B (1995). TNF, immunity and inflammatory disease: Lessons of the past decade. *J Invest Med* **43**:227-235.
18. Brasier AR, Li J (1996). Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *J Hypertens* **27**(2):465-475.

19. Dinarello CA (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**:2095-2147.
20. Schonbeck U, Mach F, Libby P (1998). Generation of biologically active IL-1beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* **161**:3340-3346.
21. Blanchard DA, Auffredou M, Therese T, Vazquez A (1997). Modulation of the p27kip 1 cyclin-dependent kinase inhibitor expression during IL-4-mediated human B cell activation. *J Immunol* **160**:3054-3061.
22. Pinchuk GV, Alexander CM, Glas AM, Armitage RJ, Milner ECB (1996). VH repertoire in human B lymphocytes stimulated by CD40 ligand and IL-4: Evidence for positive and negative selection mechanisms coupled to CD40 activation. *Mol Immunol* **33**(17-18):1369-1376.
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1991). Cellular and Molecular Immunology. 1st ed. *WB Saunders Company. Philadelphia. USA* pp50.
24. 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.
25. Paul WE (1991). IL-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* **77**:1859-1870.
26. Yamaguchi Y, Suda T, Suda J, Eguchi M, Miura Y, Harada N, Tommaga A, Takatsu K (1988). Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med* **167**:43-56.
27. Leckie MJ, Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ and Barnes PJ (2000). Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyperresponsiveness and the late asthmatic response.

*Lancet* **356**:2144-2148.

28. Ishihara K, Satoh I, Mue S, Ohuchi K (2001). Possible participation of a JAK2 signaling pathway in recombinant rat interleukin-5-induced prolongation of rat eosinophil survival. *Biochimica et Biophysica Acta* **1536**:73-84.

29. Togawa M, Kiniwa M, Nagai H (2001). The roles of IL-4, IL-5 and mast cells in the accumulation of eosinophils during allergic cutaneous late phase reaction in mice. *Life Sci* **69**(6):699-705.

30. Tsuda K, Takashi M, Akira T, Yoshiya W, Eriko M, Hideaki E, Naoaki A, Shinji I, Toshiji S, Saburo O (2001). Eosinophil-induced liver injury: an experimental model using IL-5 transgenic mice. *J Hepatol* **34**(2):270-277.

31. Ryffel B (1993). Cyclosporin binding proteins. Identification, distribution, function and relation to FK binding proteins. *Biochemical Pharmacology* **46**:1-12.

32. Padrid PA, Cozzi P, Leff AR (1996). Cyclosporine A inhibits airway reactivity and remodeling after chronic antigen challenge in cats. *Am J Respir Crit Care Med*.Dec **154**(6Pt1):1812-1818.

33. Jutel M, Blaser K, Akdis CA (2005b). Histamine in chronic allergic responses. *J Investig Allergol Clin Immunol* **15**(1):1-8.

34. Jutel M, Blaser K, Akdis CA (2005a). Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol* **137**(1):82-92.

35. Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM (1972). Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. *Nature* **236**(5347):385-390.

36. Shibata S (2000). A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi* **120**(10):849-862.

37. Estelle F, Simons F (1999). H1-receptor antagonists: safety issues. *Ann Allergy Asthma Immunol* **82**:481-488.
38. Matsuzawa K, Nakamura F, Abe M, Okamoto K (1998). Immunosuppressive and antiparasitic effects of cyclosporin A on *Hymenolepis nana* infection in mice. *Int J Parasitol* **28**(4):579-588.
39. Simons FE, Sussman GL, Simons KJ (1995). Effect of the H2-antagonist cimetidine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the H1-antagonists hydroxyzine and cetirizine in patients with chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* **95**(3):685-693.
40. Hammarstrom S, Kobat EA (1969). Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. *Biochemistry* **8**:2696-2705.
41. Ishikawa N, Horii Y, Oinuma T, Suganuma T, Nawa Y (1994). Goblet cell mucins as the selective barrier for the intestinal helminths: T-cell independent alteration of goblet cell mucins by immunologically 'damaged' *Nippostrongylus brasiliensis* worms and its significance on the challenge infection with homologous and heterologous parasites. *Immunology* **81**:480-486.
42. Chai JY, Kim TK, Cho WH, Seo M, Kook J, Guk SM, Lee SH (1998). Intestinal mastocytosis and goblet cell hyperplasia in BALB/c and C3H mice infected with *Neodiplostomum seoulense*. *Korean J Parasitol* **36**:109-119.
43. Onah DN, Nawa Y (2000). Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean J Parasitol* **38**:209-236.
44. Ishikawa N, Horii Y, Nawa Y (1993). Immune-mediated alteration of the terminal sugars of goblet cell mucins in the small intestine of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. *Immunol* **78**:303-307.
45. Ishikawa N (1994). Histochemical characteristics of the goblet cell mucins

and their role in defence mechanisms against *Nippostrongylus brasiliensis* infection in the small intestine of mice. *Parasite Immunol* **16**:649-654.

46. Chappell LH, Wastling JM (1992). Cyclosporin A : antiparasite drug, modulator of the host parasite relationship and immunosuppressant. *Parasitol* **105** suppl:S25-40.

47. McLarchlan PE, Roberts H C, Loxton NJ, Wastling JM, Newlands GF, Chappell LH (1999). Mucosal mast cell responses and release of mast cell protease-I in infection of mice with *Hymenolepis diminuta* and *H.microstoma*: modulation by cyclosporin A. *Parasite Immunol* **21**:151-161.

48. Chappell LH, Wastling JM, Hurd H (1989). Action of cyclosporin A on the tapeworms *Hymenolepis microstoma*, *H. diminuta* and *Mesocestoides corti* in vivo. *Parasitol* **98**:291-299.

49. Wastling JM, Gerrard D, Walker J, Chappell LH (1990). Action of cyclosporin A on the tapeworm *Hymenolepis diminuta* in mice. *Parasitol* **101**:465-472.

50. Garside P, Grecis RK, Mowat AM (1992). T lymphocyte dependent enteropathy in murine *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol* **14**:217-225.

51. Lawrence RA, Gray CA, Osborne J, Maizels RM (1996). *Nippostrongylus brasiliensis*: cytokine responses and nematode expulsion in normal and IL-4-deficient mice. *Experimental Parasitol* **84**:65-73.

52. Sepp N, Fritsch PO (1993). Can cyclosporin A induce permanent remission of atopic dermatitis? *Br J Dermatol* **128**(2):213-216.

53. Lee SS, Tan AWH, Giam YC (2004). Cyclosporin in the treatment of severe atopic dermatitis: a retrospective study. *Ann Acad Med Singapore* **33**(3):311-313.

54. Olivry T, Rivierre C, Jackson HA, Murphy KM, Davidson G, Sousa CA (2002). Cyclosporine decreases skin lesions and pruritus in dogs with atopic dermatitis: a blinded randomized prednisolone-controlled trial. *Vet Dermatol* **13**(2):77-87.
55. Mycek JM, Harvey RA, Champe PC (2000). Antihistamines; Lippincott's illustrated reviews. In *Pharmacology*. pp: 420-421, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
56. Gutzmer R, Diestel C, Mommert S, Kother B, Stark H, Wittmann M, Werfel T (2005). Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **174**(9):5224-5232.
57. Alewijnse AE, Smit MJ, Hoffmann M, Verzijl D, Timmerman H, Leurs R (1998). Constitutive activity and structural instability of the wild-type human H2 receptor. *J Neurochem* **71**(2):799-807.
58. Shin EH, Kim TH, Hong SJ, Park JH, Guk SM, Chai JY (2003). Effects of anti-allergic drugs on intestinal mastocytosis and worm expulsion of rats infected with *Neodiplostomum seoulense*. *Korean J Parasitol* **41**(2):81-87.
59. Somogyi A, Gugler R (1983). Clinical pharmacokinetics of cimetidine. *Clin Pharmacokinet* **8**:463-495.
60. Scott RB, Maric M (1993). Mediation of anaphylaxis-induced jejunal circular smooth muscle contraction in rats. *Dig Dis Sci* **38**:396-402.
61. Tamaoki J, Nakata J, Takeyama K, Chiyotani A, Konno K (1997). Histamine H2 receptor-mediated airway goblet cell secretion and its modulation by histamine-degrading enzymes. *J Allergy Clin Immunol* **99**:233-238.
62. Kohda F, Koga T, Uchi H, Urabe K, Furue M (2002). Histamine-induced IL-6 and IL-8 production are differentially modulated by IFN-gamma and IL-4

in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 28:34-41.

63. Schroeder JT, Schleimer RP, Lichtenstein LM, Kreutner W (2001). Inhibition of cytokine generation and mediator release by human basophils treated with desloratadine. *Clin Exp Allergy* 31:1369-1377.

64. Bryce PJ, Geha R, Oettgen HC (2003). Desloratadine inhibits allergen-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness and alters T-cell responses in murine models of asthma. *J Allergy Clin. Immunol* 112:149-158.

65. Rothwell TL, Love RJ, Evans DP (1978). Studies on the role of histamine and 5-hydroxytryptamine in immunity against the nematode *Trichostrongylus colubriformis*. IV. Inhibition of the expulsion of worms transplanted into the duodenum of immune guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 56:457-462.



Abstract

**The alteration of cytokine mRNA expression and  
mucosal goblet cell responses by cyclosporin-A and  
histamine receptor antagonists in C3H/HeN mice with  
*Echinostoma hortense***

Jo, Yong Hee

Dept. of Biomedical Life Science

The Graduate School of Health and Environment

Yonsei University

The responses of intestinal mucosal goblet cells(GCs) and the GC mucin were followed during the course of laboratory infection of C3H/HeN mice with *Echinostoma hortense*. In this study, the alteration of cytokine mRNA(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-5) expression, intestinal worm recovery rate(WWR) and mucosal goblet cell responses were measured on every weeks from 0 to 5 post-infection(PI) in control and drug treated group, cyclosporin-A(CsA), hydroxyzine and cimetidine. Compared with the control group, T helper type 1(Th1) cytokine(TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ ) mRNA expression was down-regulated in CsA treated group, but equally expressed cytokines in cimetidine treated group, except IL-1 $\beta$  alone can act as a proinflammatory cytokine. IL-4 mRNA expression was down-regulated in hydroxyzine treated group. WWR was significantly increased in drug treated groups(CsA and hydroxyzine: $p<0.01$ , cimetidine: $p<0.05$ ). Mucosal GCs and GC mucin responses were significantly

decreased in CsA treated group( $p<0.01$ ), but significantly increased in cimetidine( $p<0.05$ ) or hydroxyzine treated group( $p<0.01$ ). These data suggest that CsA inhibits production of Th1 type immune cells necessary for the worm expulsion, histamine receptor antagonists that binding of histamine to its receptors on intestinal smooth muscles is more important than intestinal GCs and GC mucin activation for worm expulsion period of *E. hortense* from C3H/HeN mice.

---

Key Words : *Echinostoma hortense*, cyclosporin-A, cimetidine, hydroxyzine, worm recovery rate, goblet cell, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5