

호르텐스극구흡충을 감염시킨 BALB/c  
마우스에서 Eosinophil의 면역반응과  
Ketotifen의 면역억제 효과

연세대학교 보건환경대학원  
의생명과학전공  
임 병 혁

호르텐스극구흡충을 감염시킨 BALB/c  
마우스에서 Eosinophil의 면역반응과  
Ketotifen의 면역억제 효과

지도 양 용 석 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 6월 일

연세대학교 보건환경대학원

의생명과학전공

임 병 혁

임병혁의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 보건환경대학원

2004년 6월 일

## 감사의 글

처음 시작은 미미하였으나 이렇게 좋은 결실을 맺게 해 주신 하나님께 감사드립니다.

이 논문이 나오기까지 부족한 저에게 지도와 격려를 아끼지 않으신 양용석 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 늦은 밤까지 가르침을 주시기 위해 애쓰신 오옥두 교수님, 김태우 교수님, 김종배 교수님, 박용석 교수님, 이해영 교수님께 감사를 드립니다.

대학원 생활을 같이 시작하며 위로와 격려가 되어준 원영 형님과 학사업무에 많은 도움을 주신 강혜영 선생님, 문병채 선생님께 감사를 드립니다. 또한 실험을 도와주신 김근하 선생님께도 감사를 드립니다.

때로는 자정을 넘기면서까지 정말로 열심히 공부하시던 신진수 선생님, 이채진 선생님, 정보영 선생님, 유경래 선생님, 구혜진 선생님, 사랑하는 친구 성기만 선생님, 그리고 한 학기 동안 같이 지낸 안병락 선생님, 이경철 선생님, 조용희 선생님, 이성덕 선생님께도 고마운 마음을 전합니다.

학과에서 때로는 친구처럼, 동생처럼 생활하며 많은 도움을 준 영삼, 홍성, 근식, 호중, 승주, 현석, 지영, 은숙, 정혁, 규상, 인수, 명민, 대식, 지은, 주환, 준호, 은아, 은주에게 고마운 마음을 전하며, 아울러 학과사무실에서 궂은일을 많이 도와준 시영, 경호, 성진에게도 고마움을 전합니다.

지금까지 저를 있게 해주시고, 늦게나마 공부하는 모습을 보여드릴 수 있었던 사랑하는 아버지, 어머니, 그리고 사랑하는 사람을 세상에 있게 하신 장모님, 장인 어른께 깊은 감사를 드리며, 항상 건강하시기를 기도합니다.

이제, 이 작은 결실을 항상 내 곁에서 기쁨과 슬픔을 같이하며, 인생의 동반자로 함께 하는 사랑하는 아내 향숙에게 전해드립니다. 아울러 우리의 사랑하는 아이들 해인, 해원에게 용기와 격려가 되기를 바랍니다.

2004년 6월

임 병 혁

## 목 차

|  |     |
|--|-----|
| 그림 및 표 차례                                      | iii |
| 약기호표   | iv  |
| 국문요약   | v   |
| 제1장 서론   | 1   |
| 제2장 연구재료 및 방법                                  | 3   |
| 1. 실험동물  | 3   |
| 2. 실험방법  | 3   |
| 1) Ketotifen 투여방법                              | 3   |
| 2) 호르텐스극구흡충의 피낭유충 감염                           | 3   |
| 3) 충체 회수율                                      | 3   |
| 4) 호산구 관찰을 위한 Lendrum's(1994) method           | 3   |
| 5) 장 용모 내의 Eosinophil 계측                       | 4   |
| 6) ELISA 검사를 위한 혈청 준비와 IgA, IgE, IgG1, IgG2 측정 | 4   |
| 7) ELISA를 이용한 혈청에서의 Cytokine 측정                | 5   |
| 제3장 결과   | 6   |
| 1. Ketotifen 투여와 충체 회수율                        | 6   |
| 2. Ketotifen 투여와 소장점막 조직 내 Eosinophil 발현       | 6   |
| 3. Ketotifen 투여와 혈청에서의 면역글로불린 항체가의 변화          | 6   |
| 1) IgA   | 6   |
| 2) IgE   | 7   |
| 3) IgG1  | 7   |
| 4) IgG2  | 7   |
| 4. ELISA를 이용한 혈청에서의 Cytokine의 발현               | 7   |
| 제4장 고찰   | 20  |
| 제5장 결론   | 24  |

|          |    |
|----------|----|
| 참고문헌     | 26 |
| Abstract | 32 |

## 그림 및 표 목차

|   |    |
|---|----|
| Table 1. mean worm recovery rates (%) after infection with <i>E. hortense</i> metarcercaria in BALB/c mice with ketotifen treatment . . . . . | 9  |
| Figure 1. worm recovery rate (%) of <i>E. hortense</i> infected BALB/c mice with ketotifen treatment . . . . .                                | 10 |
| Figure 2. Microphotographs of intestinal duodenum villi showing eosinophils in BALB/c mice . . . . .  | 11 |
| Figure 3. average number of eosinophilli in duodenum of ketotifen-treated BALB/c mice infected with <i>E. hortense</i> . . . . .              | 12 |
| Figure 4. IgA change in the serum of BALB/c mice infected with <i>E. hortense</i> by ketotifen treatment . . . . .                            | 13 |
| Figure 5. IgE change in the serum of BALB/c mice infected with <i>E. hortense</i> by ketotifen treatment . . . . .                            | 14 |
| Figure 6. IgG1 change in the serum of BALB/c mice infected with <i>E. hortense</i> by ketotifen treatment . . . . .                           | 15 |
| Figure 7. IgG2 change in the serum of BALB/c mice infected with <i>E. hortense</i> by ketotifen treatment . . . . .                           | 16 |
| Figure 8. IFN- $\gamma$ change in the serum of BALB/c mice infected with <i>E. hortense</i> by ketotifen treatment . . . . .                  | 17 |
| Figure 9. IL-12 change in the serum of BALB/c mice infected with <i>E. hortense</i> by ketotifen treatment . . . . .                          | 18 |
| Figure 10. IL-4 change in the serum of BALB/c mice infected with <i>E. hortense</i> by ketotifen treatment . . . . .                          | 19 |

## 약기호표

BSA : bovine serum albumin

DEX : dexamethasone

DEPC : diethyl pyrocarbonate

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

IFN : interferon

Ig : immunoglobulin

IL : interleukin

PBST : phosphate buffered saline-tween 20

TBE : Tris-borate/EDTA

WRR : worm recovery rate



## 국문 요약

### 호르텐스극구흡충을 감염시킨 BALB/c

### 마우스에서 Eosinophil의 면역반응과

### Ketotifen의 면역억제 효과

기생충 감염 시에 나타나는 특이적인 면역반응의 하나로 알러지 반응을 들 수 있다. 본 연구에서는 BALB/c 마우스에서 알러지 반응에 관여하는 호산구의 면역 반응을 알아보기 위하여 호르텐스극구흡충(*Echinostoma hortense*)의 피낭유충을 마우스에 경구 감염시키고 숙주 장 점막조직 내의 eosinophil의 면역반응 여부를 알아보려고 하였다. 또한 항 알러지 제제인 ketotifen을 경구적으로 정량투여 하면서 ketotifen이 호산구의 면역반응에 미치는 영향에 대하여 알아보았다.

BALB/c 마우스에 호르텐스극구흡충을 감염시키고, ketotifen을 투여한 군과 투여하지 않은 군에서의 총체 회수율을 비교한 결과 ketotifen 투여군에서 더 높았고, 총체가 좀 더 오래 생존하였다. 그러나 혈청에서의 면역글로불린(IgA, IgE, IgG1, IgG2) 항체가는 ketotifen을 투여하지 않은 군에서보다 ketotifen을 투여한 군에서 낮아지는 결과를 보였다. 특히 기생충이 감염되면 혈청 IgE의 급격한 상승과 조직 내 호산구의 발현이 더 높게 나타났는데, ketotifen 투여는 호산구를 활성화시켰으며, IgE 항체생산을 촉진하는 Th2 cytokine인 IL-4의 생성을 억제하였다. 그리고 ketotifen 투여는 IgG1, IgG2 항체의 생성을 억제함을 알 수 있었다.

이와 같이 ketotifen은 여러 가지의 면역글로불린과 cytokine 생성 및 면역세포인 호산구의 발현을 억제함으로써, 기생충감염에 의해 유도되는 알러지 반응에 영향을 주는 결과를 보였다.

---

핵심 되는 말 : 호르텐스극구흡충, ketotifen, 면역글로불린, 호산구, BALB/c

## 제 1 장 서 론

기생충이 숙주에 감염되면 다양한 생활사를 거치면서 성충으로 성숙되고 정착한다. 그러나 일부 기생충들은 숙주의 면역반응에 의하여 기생충의 성장이 저지되고 파괴되어, 일정 감염기간이 지나면 자연배출(expulsion) 되는 특성을 보인다(chai, *et al.*, 1993; Wakelin, *et al.*, 1993).

다양한 면역반응 중 기생충의 감염에 대한 특이적인 면역반응의 하나로 알러지 반응을 들 수 있다. 즉, 기생충이 숙주 내로 들어오면 장 점막 조직 내에 호산구 발현이 나타나고(Kingger, 1997; Saito *et al.*, 1996) 혈청에서 IgE 항체가 현저하게 상승되는데(Kojima, *et al.*, 1972; Jarrette and Bazin, 1974; Ishizaka, *et al.*, 1976; Rouseaux-Prevost, *et al.*, 1979; Rihet, *et al.*, 1991) 이러한 IgE 매개성 제 1형 알러지 반응(Type I allergic reaction)은 숙주에 과민반응을 유발하는 항원이 들어올 때 그에 대한 세포친화성 항체가 만들어지기 때문이다.

장흡충 감염 시에 나타나는 면역반응은 조직 내에 호산구의 발현이나(Kingger, 1997; Saito *et al.*, 1996), 혈청 내 IgE 항체가의 상승 현상을 볼 수 있다(Hogarth-Scott *et al.*, 1969; Rosenberg *et al.*, 1970; Kojima *et al.*, 1972; Dessaint *et al.*, 1975; Ito and Sawada, 1976; Juhlin *et al.*, 1969). 이러한 호산구의 발현이나 면역글로블린의 변화는 cytokine과 직접적인 관련이 있는 것으로 분석되고 있다(Callard and Tunner, 1990; Calvert *et al.*, 1990; King *et al.*, 1990; Philips *et al.*, 1990; Lagente *et al.*, 1995).

항 알러지 약물로 오랫동안 널리 사용되고 있는 ketotifen은 세포막의 효소작용을 조절하고, histamine 수용체를 저지하며 면역계에 영향을 미친다(Grant, *et al.*, 1990). 이 약제는 Beta 수용체를 발현하고, 항원자극에 의해서 분비되는 매개물질의 분비를 저지한다(Castillo *et al.*, 1991; Cordoba, 1992). 또한 IgA 분비를 방해하며 림프구의 증식과 IgG1 및 IgG2반응을 방해한다(Kondo, *et al.*, 1994; Doligalska, 2000). 그리고 호산구 및 세포를 활성화하여 IgE 항체생산을 촉진하는 IL-4의 생산 억제와 항원의 장내 흡수를 감소시킨다. Ketotifen은 혈중 Th2

cytokine의 감소를 통해 IgA, PEG2, LTB 생산을 감소시키며, nitric oxide synthase(NOS) 활성도를 증가 시키는 작용으로 해서 천식과 알러지의 치료에 사용되고 있다(Konno *et al.*, 1994; Eliakim *et al.*, 1992; Karmeli *et al.*, 1991).

본 연구에서는 BALB/c 마우스에 호르텐스극구흡충의 피낭유충을 경구적으로 감염시키고 장 점막 내 호산구의 발현 유무를 알아보았다. 아울러 항 알러지 제제인 ketotifen을 경구적으로 정량 투여하면서, 알러지 반응에 관여하는 호산구의 장 점막조직 내 발현과 변화를 알아보았다. 그리고 마우스 혈청에서 ELISA 방법으로 ketotifen 투여 전·후의 면역글로불린 IgA, IgE, IgG1, IgG2 및 여러 가지 cytokine(IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4)을 측정하여 면역반응이 차이를 비교 분석함으로써 ketotifen이 면역계에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 하였다.

## 제 2 장 연구재료 및 방법

### 1. 실험동물

생후 6주령의 BALB/c 암놈 마우스를 대한바이오링크 실험동물 센터에서 구입하여 사용하였다. Ketotifen을 투여한 실험군과 투여하지 않은 대조군으로 나누어 각각 3마리씩 8주간 실험하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) Ketotifen 투여방법

마우스 체중에 비례하여 ketotifen을 생리식염수에 녹여, 존대를 사용하여 위장으로 직접 투여 하였으며(0.1 mg ketotifen/kg), 호르텐스극구흡층의 피낭유층을 감염시키기 1주전부터 거살 할 때까지 매일 정량 투여하였다.

#### 2) 호르텐스극구흡층의 피낭유층 감염

Ketotifen을 투여한 실험군과 그렇지 않은 대조군에 마리당 30개의 피낭유층을 경구 감염시켰다.

#### 3) 총체 회수율

호르텐스극구흡층의 피낭유층을 감염시키고 1주일에서 8주일 까지 실험군 별로 3마리씩 희생하여 감염 총체를 확인하였다. 마우스에 ethyl ether를 이용하여 마취 후 경추탈구법으로 희생시켜 소장을 여러 조각으로 자른 다음 0.85% 생리식염수에서 장을 절개한 다음, 장조직과 식염수를 Baermann's apparatus 위에 2시간 동안 놓아둔 후 성충을 수집한다. 마우스에 감염시킨 피낭유층수와 회수한 성충의 수를 비율(%)로 표현하였다.

#### 4) 호산구 관찰을 위한 Lendrum's(1994) method

소장조직을 상, 하부로 구별하여 이물질들을 제거하고 10% 중성 포르말린과

Carnoy's 고정액에 즉시 고정하였으며 Carnoy's 고정조직은 4°C 냉장 보관하였다. 고정된 조직은 paraffin 절편을 만든 다음 Mayer's Hematoxylin으로 30초간 핵을 염색하였다. 그리고 수세한 후 Carbol-chromotrope solution으로 30분 염색하였으며 봉입하여 검경하였다.

#### 5) 장 용모 내의 Eosinophil 계측

호산구 수는 BALB/c 마우스 장 점막조직을 구성하고 있는 용모(villi)를 무작위로 선정하여 현미경으로 계측하였다. 즉, 10개의 용모에서 각각의 세포수를 세어서 10 villus-crypt unit(VCU)를 계산하였다.

#### 6) ELISA 검사를 위한 혈청준비와 IgA, IgE, IgG1, IgG2 측정

Ketotifen을 투여한 투여군과 투여하지 않은 대조군 마우스의 안와정맥에서 혈액을 매주 채취하여 원심분리하여 혈청을 얻은 후 -70°C 이하에서 보관하였다.

ELISA는 Voller 등(1976)이 기술한 방법에 따라 호르텐스극구흡충의 조항원을 단백질 함량이 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer(15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6)로 희석했으며 polystyrene microplate(Nunc, Roskilde, Denmark)의 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 주입하여 37°C에서 1시간 반응시키고 microplate를 PBST로 3회 세척하였다. 3% BSA/PBST를 200  $\mu\text{l}/\text{well}$  씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켜 항원이 부착되지 않은 부위를 차단한 후 3회 세척하였다. 그리고 horseradish peroxidase-goat anti-mouse IgG1(Serotec, Kidlington, Oxford, 1 : 1,000), IgG2(Serotec, 1 : 1,000), horseradish peroxidase-goat anti-mouse IgA(Serotec, 1 : 2,000)와 horseradish peroxidase-rat anti-mouse IgE(Biosource, Camarillo, U.S.A)를 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  씩 분주하여 37°C에서 1시간 보관한 후 5분간 3회 세척하였다. 또한, *o*-phenylen diamine 0.5 mg과 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\mu\text{l}$ 를 0.1 M phosphate citrate buffer(pH 5.0) 50 ml에 녹인 기질액을 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  씩 첨가하여 실온 암실에서 1시간 처리하였다. 반응을 정지시키기 위하여 2.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하였고, ELISA reader((Molecular Devices, U.S.A)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7) ELISA를 이용한 혈청에서의 Cytokine 측정

Cytokine 발현 확인을 위한 혈청은 면역글로블린 측정방법과 동일한 방법으로 준비하였다. IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4는 sandwich법을 이용하여 측정하였다. monoclonal anti-mouse IFN- $\gamma$  antibody, monoclonal anti-mouse IL-12 antibody, monoclonal anti-mouse IL-4 antibody(R&D system, U.S.A)의 농도를 각각 250 ng/100  $\mu$ l가 되도록 PBS로 희석하여 polystyren microplate(Nunc, Roskilde, Denmark) 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣어 4°C에서 24시간 반응시켰다. 이 microplate를 PBST(phosphate buffered saline-0.05% Tween 20)로 3회 세척한 후 1% bovine serum albumin/PBS로 well당 200  $\mu$ l씩 분주한 후 실온에서 90분 동안 반응시켜 monoclonal anti-mouse antibody가 부착되지 않은 부위를 차단한 후 3회 세척하였다. 여기에 준비한 혈청을 100  $\mu$ l/well씩 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. Cytokine 대조 well의 경우 각각의 cytokine(R&D system, U.S.A)을 18.75 pg/100  $\mu$ l에서 1 ng/100  $\mu$ l로 1% BSA/PBS로 단계별로 희석하여 100  $\mu$ l/well씩 분주하였다. 이것을 PBST로 세척하고 anti-mouse IFN- $\gamma$  antibody, anti-mouse IL-12 antibody, anti-mouse IL-4 antibody의 농도를 각각 20 ng/100  $\mu$ l가 되도록 1% BSA/PBS로 희석하여 100  $\mu$ l/well씩 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 이것을 PBST로 3회 세척하고 horseradish peroxidase-rabbit anti-goat IgG(Sigma, St. Louis, U.S.A)와 PBST 1 : 3,000으로 희석하여 100  $\mu$ l/well씩 분주하여 37°C에서 30분간 방치한 후 3회 세척하였다. 기질액으로는 OPD(*o*-phenylene diamine) (Sigma, St. Louis, U.S.A) 8 mg과 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Fluka, St. Louis, U.S.A) 5  $\mu$ l를 0.1 M phosphate citrate buffer(pH 5.0) 12 ml에 녹였다. 이것을 100  $\mu$ l/well씩 첨가하여 실온에서 빛을 차단한 후 20분 동안 방치하였다. 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 100  $\mu$ l씩 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA 광량계(Molecular Device, U.S.A)를 사용하여 파장 490, 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 제 3 장 결 과

### 1. Ketotifen 투여와 총체 회수율

호르텐스극구흡충을 감염시킨 BALB/c 마우스에서 ketotifen 투여 여부에 따른 총체 회수율은 Table 1에서 보는바와 같이, ketotifen을 투여하지 않은 군은 감염 후 1주에 높았다가 2주부터 회수율이 감소하여 감염 4주 이후 회수되지 않았다. 그리고 ketotifen 투여군에서는 감염 후 1, 2주에서 높은 감염률을 보이다가 3주 이후 급격히 감소하였고 감염 후 4주까지만 회수되었다. 총체 회수율은 ketotifen 투여군에서 더 높은 회수율을 보였다(Fig. 1).

### 2. Ketotifen 투여와 소장점막 조직 내 Eosinophil의 발현

BALB/c 마우스에 호르텐스극구흡충을 감염시키지 않은 대조군에서는 Fig. 2에서와 같이 장 점막조직 내에 eosinophil이 거의 발현되지 않았다 그러나 *E. hortense* 피낭유충 감염시킨 다음 ketotifen 투여 여부에 따라서 eosinophil의 발현에 차이가 나타났다. 즉, 감염 후 2, 4, 6, 8주에 ketotifen 투여 군에서는 각각  $5.3 \pm 0.5$ ,  $16.7 \pm 1.5$ ,  $10.7 \pm 1.1$ ,  $4.7 \pm 0.5$ 로 나타났으며, ketotifen을 투여하지 않은 군에서는 각각  $8.3 \pm 1.1$ ,  $20.7 \pm 2.5$ ,  $18.7 \pm 1.1$ ,  $12.7 \pm 1.1$ 로 나타났다. 이 결과로 ketotifen 투여군에서는 투여하지 않은 군보다 eosinophil 발현정도가 비교적 낮아짐을 알 수 있었다.

소장 조직의 용모에서 eosinophil 개수는 ketotifen 투여여부와 관계없이 감염 4주에서 급격히 상승하여 최고치를 보였으나 이후 점차 감소하기 시작하였다. ketotifen 투여군보다 투여하지 않은 군에서 급격히 감소하였다(Fig. 3).

### 3. Ketotifen 투여와 혈청에서의 면역글로블린 항체가의 변화

#### 1) IgA

호르텐스극구흡충의 피낭유충을 감염시킨 BALB/c 마우스의 혈청 IgA의 흡

광도는 ketotifen 투여 여부에 관계없이 흡광도가 감염 후 7주에서 최고치를 보였는데 ketotifen 투여군은  $0.21 \pm 0.03$ 이며, 투여하지 않은 군은  $0.45 \pm 0.03$ 으로 나타났으며, ketotifen을 투여하지 않은 군에서는 전반적으로 계속 상승하여 최고치에 도달하였다. ketotifen 투여군에서 투여하지 않은 군에 비하여 낮은 항체가를 유지하였다(Fig. 4).

## 2) IgE

호르텐스극구흡충의 피낭유충을 감염시킨 BALB/c 마우스의 혈청 IgE 흡광도는 ketotifen을 투여하지 않은 군은 감염 후 4, 5주에서  $0.35 \pm 0.5$ 로 최고치를 보였고, 투여군은 4주에서  $0.3 \pm 0.05$ 와 6주에서  $0.3 \pm 0.01$ 로 최고치를 보였다. ketotifen 투여군과 투여하지 않은 군 모두 비슷한 발현양상을 보였으나 ketotifen 투여군에서 좀 더 낮은 항체가를 나타내었다(Fig. 5).

## 3) IgG1

호르텐스극구흡충의 피낭유충을 감염시킨 BALB/c 마우스에서 혈청 IgG1 항체가는 ketotifen을 투여하지 않은 군에서는 감염 후 3주에서  $1.2 \pm 0.02$ 까지 증가하다가 4주부터 점차 감소하였다. ketotifen 투여군에서는 감염 5주에  $0.9 \pm 0.04$ 로 최고치를 보였으며 이후 약간 감소하였다. IgG1의 경우 다른 면역글로불린에서 보다 비교적 높은 항체가를 보였다(Fig. 6).

## 4) IgG2

호르텐스극구흡충의 피낭유충을 감염시킨 BALB/c 마우스에서 혈청 IgG2 항체의 농도 변화는 다음과 같다. 즉, ketotifen을 투여하지 않은 군은 감염 후 4주에  $0.26 \pm 0.01$ 로 최고치를 보였으며, ketotifen 투여군에서는 감염 후 3주에  $0.19 \pm 0.08$ 로 최고치를 보였다. ketotifen을 투여하지 않은 군에서보다 ketotifen 투여군에서 더 낮은 항체가를 나타내었다(Fig. 7).

## 4. ELISA를 이용한 혈청에서 Cytokine의 발현



BALB/c 마우스에 ketotifen을 투여하지 않은 군과 투여군에서 cytokine 발현 양상을 관찰한 결과는 Fig. 8, Fig. 9 및 Fig. 10에서 보는 바와 같다. 즉, Th1 cytokine으로 알려진 IFN- $\gamma$ 는 ketotifen을 투여하지 않은 마우스의 경우 4주까지 비슷한 농도를 유지하다가 5주부터 감소하기 시작하였으며, ketotifen을 투여한 마우스에서는 1주부터 감소하기 시작하여 4주 이후부터는 일정수준을 유지하였다. 그리고 ketotifen 투여 마우스에서 IFN- $\gamma$ 의 농도가 더 낮게 발현하고 있음을 알 수 있다(Fig. 8). IL-12의 경우에는 다른 cytokine에 비하여 발현농도가 매우 낮았다. 그리고 ketotifen 투여 여부에 따른 차이는 나타나지 않았다(Fig. 9).

Th2 cytokine으로 알려진 IL-4는 ketotifen을 투여하지 않은 군에서 2주에 최고치를 보이며 이후 감소하기 시작하였다. ketotifen 투여군에서는 3주까지 증가하여 최고치를 보였으며, 4주 이후부터는 점차 감소하면서 매우 낮은 발현농도를 보였다. IL-4에서도 ketotifen 투여군에서 더 낮은 발현농도를 나타냈다(Fig. 10).

Table 1. mean worm recovery rates (%) after infection with *E. hortense* metacercaria in BALB/c mice with ketotifen treatment.

| Weeks after infection | BALB/c mouse        |                   |
|-----------------------|---------------------|-------------------|
|                       | ketotifen untreated | ketotifen treated |
| 1                     | 23.0±2.5            | 26.7±0.6          |
| 2                     | 10.0±1.0            | 20.0±1.0          |
| 3                     | 6.7±0.6             | 9.3±0.6           |
| 4                     | -                   | 3.3±0.6           |
| 5                     | -                   | -                 |
| 6                     | -                   | -                 |
| 7                     | -                   | -                 |
| 8                     | -                   | -                 |

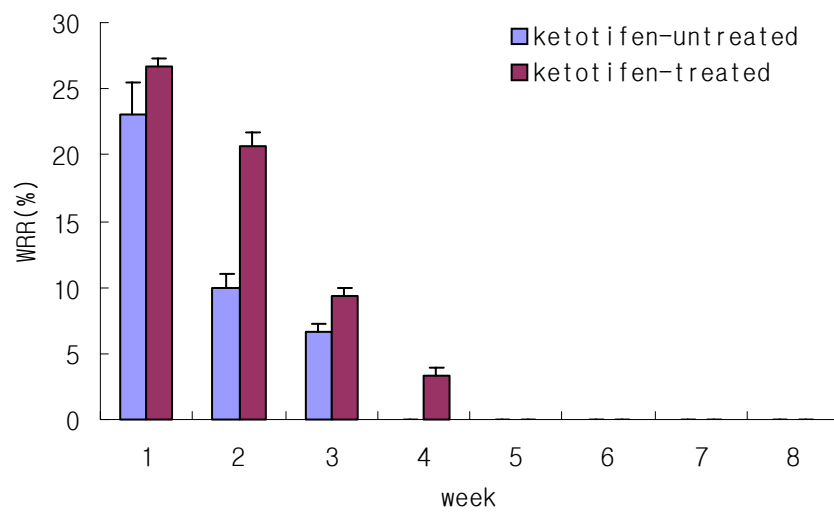


Figure 1. worm recovery rate (%) of *E. hortense* infected BALB/c mice with ketotifen treatment.

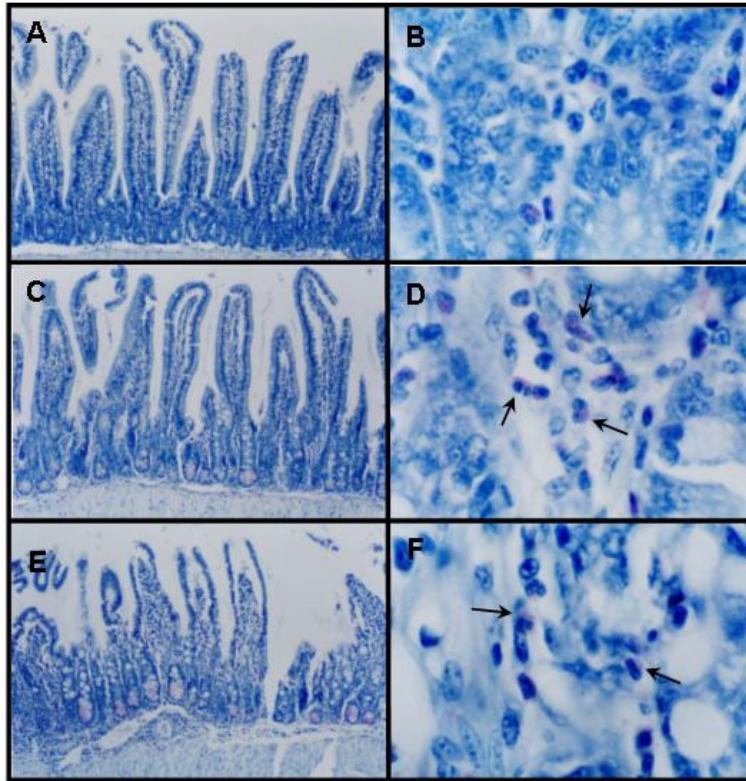


Figure 2. Microphotographs of intestinal duodenum villi showing eosinophils in BALB/c mice.

Lendrum's staining was performed to identify eosinophils in duodenum villi. A and B, *Echinostoma hortense*-non-infected experimental controls; C and D, *E. hortense* infection and ketotifen-untreated; E and F, *E. hortense*-infected and ketotifen treatment. Original magnifications: A, C and E, x 100; B, D and F, x 1000. Arrows indicate the eosinophils.

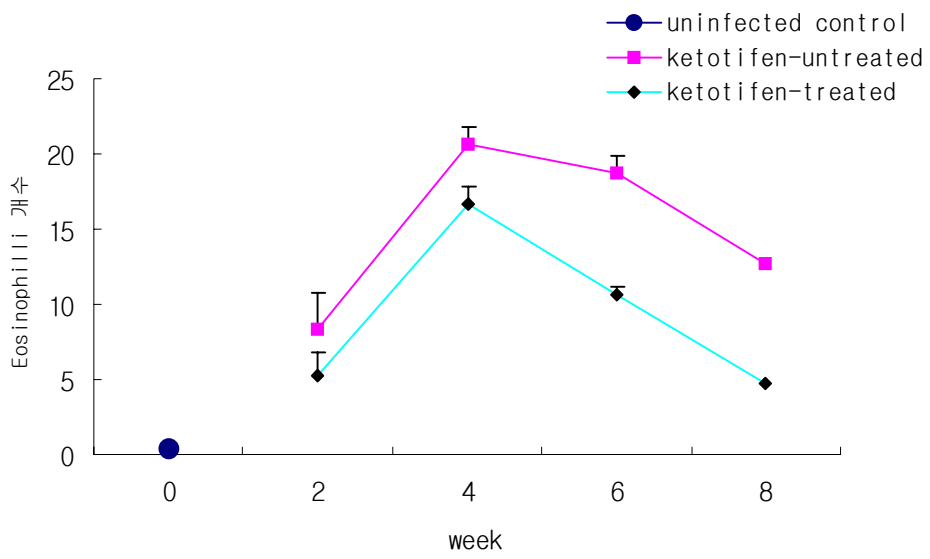


Figure 3. average number of eosinophilli in duodenum of ketotifen-treated BALB/c mice infected with *E. hortense*.

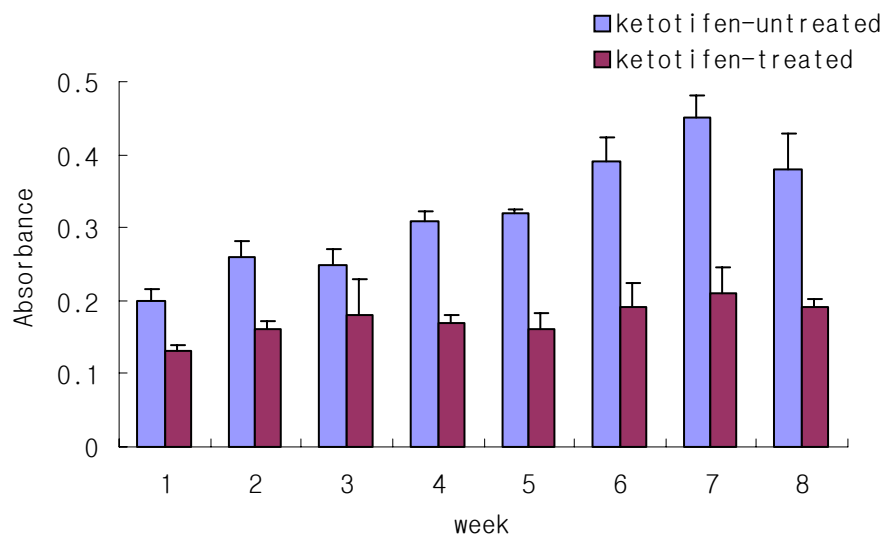


Figure 4. IgA change in the serum of BALB/c mice infected with *E. hortense* by ketotifen treatment.

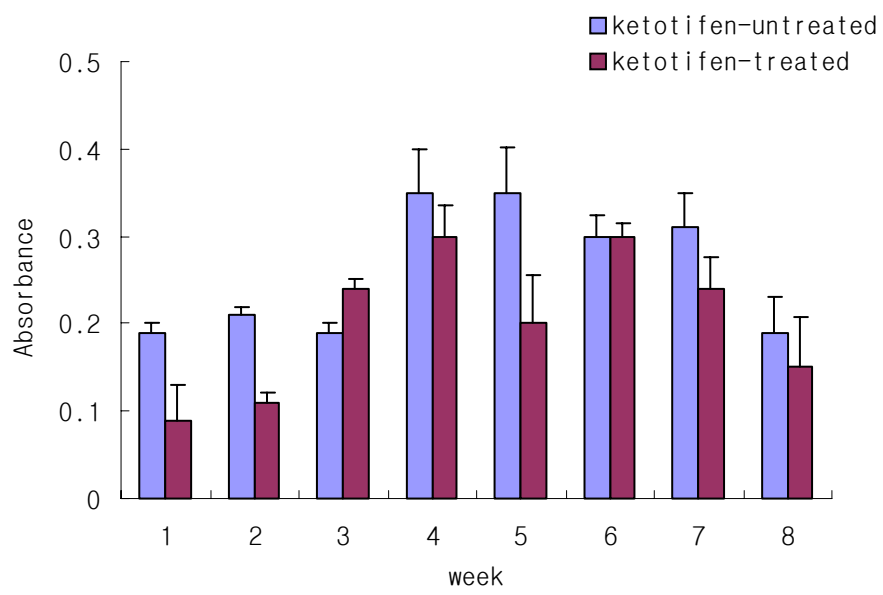


Figure 5. IgE change in the serum of BALB/c mice infected with *E. hortense* by ketotifen treatment.

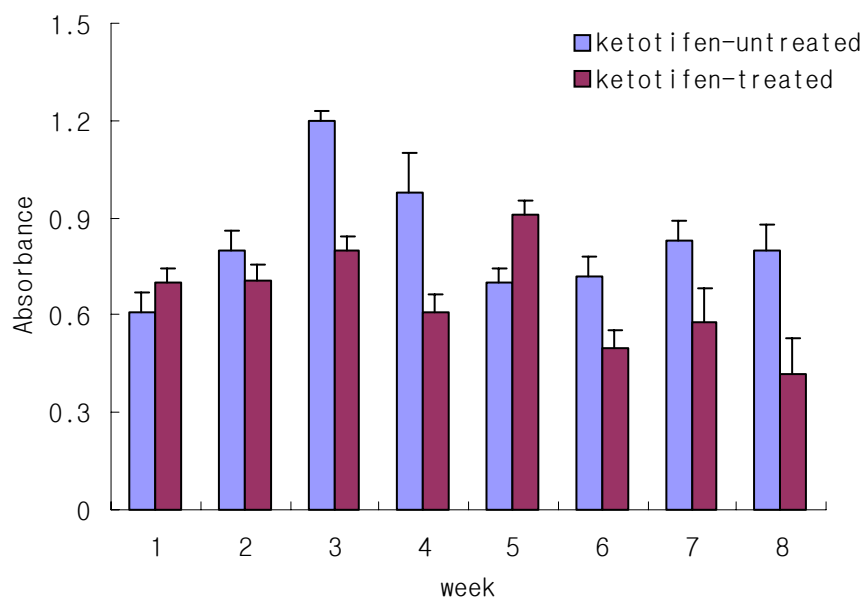


Figure 6. IgG1 change in the serum of BALB/c mice infected with *E. hortense* by ketotifen treatment.



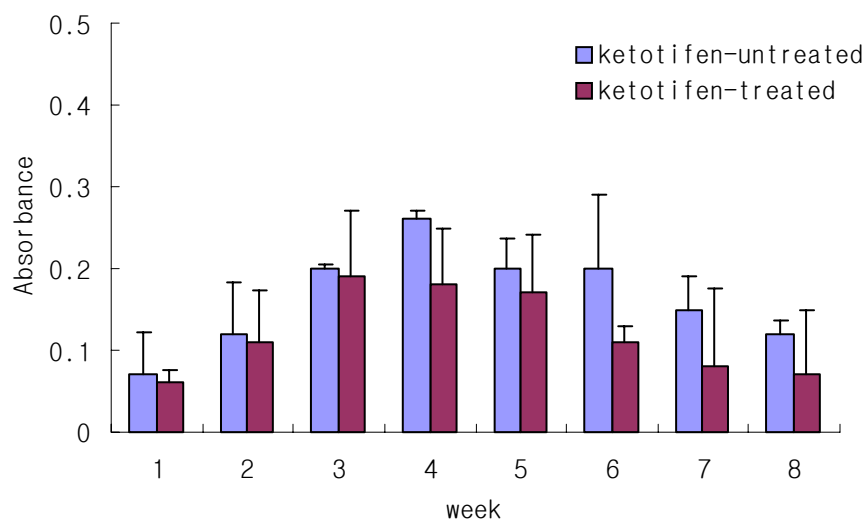


Figure 7. IgG2 change in the serum of BALB/c mice infected with *E. hortense* by ketotifen treatment.

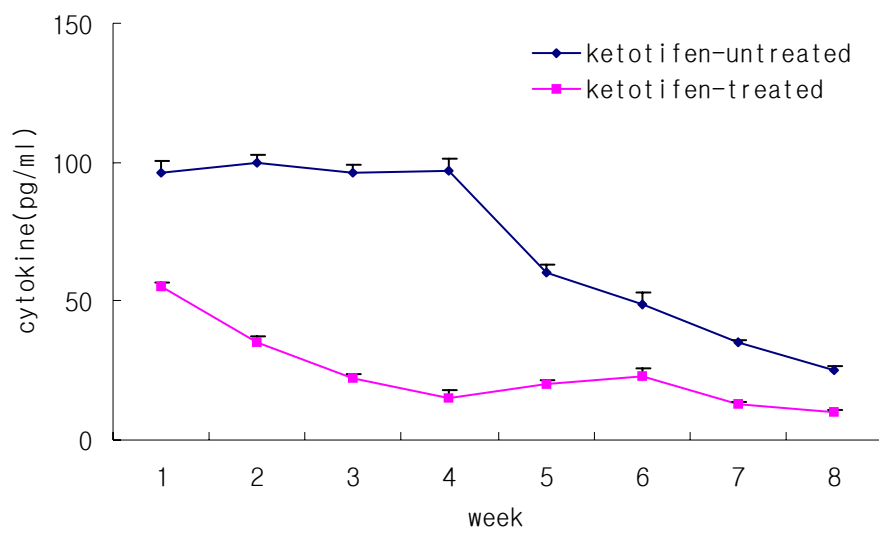


Figure 8. IFN- $\gamma$  change in the serum of BALB/c mice infected with *E. hortense* by ketotifen treatment.

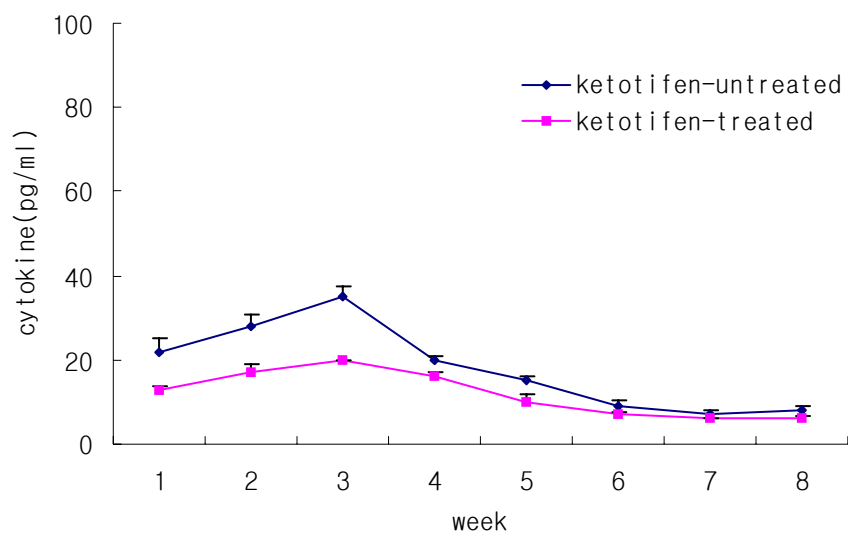


Figure 9. IL-12 change in the serum of BALB/c mice infected with *E. hortense* by ketotifen treatment.

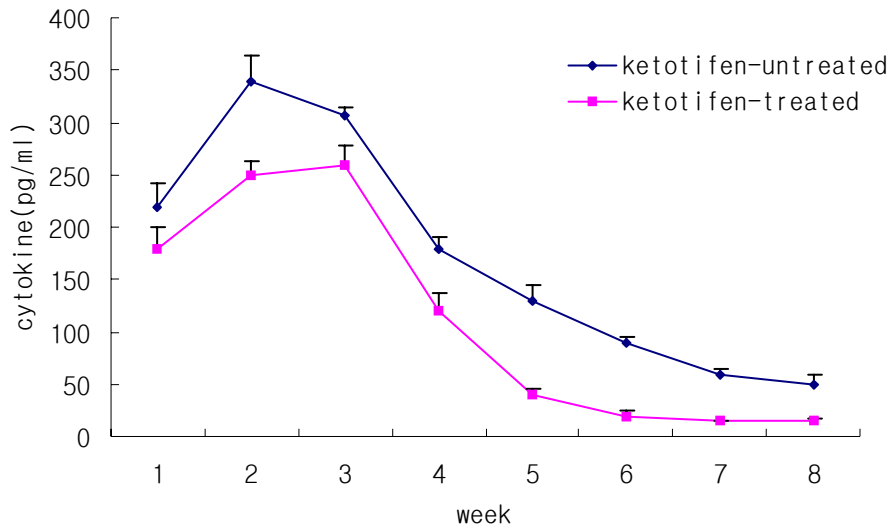


Figure 10. IL-4 change in the serum of BALB/c mice infected with *E. hortense* by ketotifen treatment.

## 제 4 장 고 찰

기생충 감염에 의한 숙주의 장 점막 조직 내의 면역반응을 알아보기 위하여 BALB/c 마우스에 호르텐스극구흡충의 피낭유충을 감염시키고 다음과 같은 면역 반응을 연구하였다. 즉, 천식 등 알러지 치료제로 사용(Konno *et al.*, 1994; Eliakim *et al.*, 1992; Karmeli *et al.*, 1991)되며, 면역글로불린과 사이토카인의 분비를 억제(Kondo *et al.*, 1994; Doligalska, 2000)시키는 작용을 하는 것으로 알려진 ketotifen을 마우스에게 정량적으로 경구 투여하면서, ketotifen이 숙주의 면역 반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다.

연구 보고에 의하면 인체 기생충들은 숙주의 면역반응에 따라서 다양한 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Wakelin *et al.*, 1993; Chai *et al.*, 1984). 기생충 감염으로 인한 숙주의 IgE 증가는 *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Schistosoma japonicum*, *Wuchereria bancrofti*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*와 같은 기생충에서 관찰된다(Juhlin *et al.*, 1969; Hogarth *et al.*, 1969; Ito *et al.*, 1976; Kojima *et al.*, 1972). 실험동물에게 기생충을 감염시킨 후 관찰한 연구에서도 IgE의 증가 현상이 나타나고 있다. 즉, *Toxocara cati*를 개에게 감염시킨 결과 숙주 혈청 내의 IgE 항체가가 상승하였다고 보고 하였으며(Rouseaux-Prevost *et al.*, 1977; 1979), 또한 마우스에게 *Paragonimus westermani*를 감염시킨 후 관찰한 결과에서도 숙주 혈청 내에 IgE 항체가가 상승을 보고한 바 있다.(Min and Soh, 1980).

Fischel *et al.*,(1952)과 Germuth *et al.*,(1952)이 밝힌 바에 의하면, 기생충을 마우스에게 감염시키면서 면역 억제제인 corticosteroides를 마우스에 투여한 경우 비 투여군에 비하여 장내 기생충의 감염이 더 높게 감염된다고 하였다. 그리고 Chai *et al.*,(1984)은 *Metagonimus yokogawai*를 마우스에게 감염시킨 결과, 면역 억제제인 prenosolone을 처리한 마우스는 대조군에 비하여 충체 회수율이 현저하게 증가 하였을 뿐만 아니라, 충체가 숙주에 기생하는 기간이 더 길었다고 보고하였다. 또한 Ito 와 Kamiyama(1987)는 *Hymenolepis nana*를 nude 마우스에게 감염

시킨 경우 cortisone을 처리한 nude 마우스가 비 처리된 nude 마우스에서 보다 배출되는 총란의 수가 더 증가하였다고 밝힌 바 있다. Fujino *et al.*,(1997)에 의하면 C<sub>3</sub>H/HeN 마우스에 Dexametasone(DEX)을 처리한 후 *Echinostoma trivolvis*를 감염시켜 총체 회수율은 구한 결과, DEX를 처리하지 않은 군에서는 감염초기(5~8일)에 총체 회수율이 증가하였다. 그리고 감염 후 15일에는 총체가 회수되지 않았으나, DEX를 처리한 마우스는 감염 후 30일까지도 총체가 회수된 것으로 보아 DEX에 의한 면역억제로 기생충이 증가되었음을 알 수 있었다고 하였다. 본 연구에서도 BALB/c 마우스에게 *E. hortense* 피낭유충을 감염시키고, 주일별로 마우스를 거살한 다음, 총체 회수율을 관찰한 결과 ketotifen 투여군에서는 감염 후 1주에 26.7 마리로 ketotifen 비 투여군에서의 23.0 마리보다 더 높게 회수되었다. 그리고 감염기간도 ketotifen 투여군에서는 감염 후 4주까지 회수되었고, 비 투여군에서는 감염 후 3주까지 회수되었다. 그러나 ketotifen은 항 알러지 제제로서 숙주의 eosinophil을 중심으로 한 복합적인 면역반응 결과로 분석되어야 할 것으로서, 과연 어떠한 면역인자와 기전에 의한 것인지가 의문으로 남는다.

Podleski *et al.*,(1984)에 의하면 면역억제제인 ketotifen은 히스타민 길항작용과 비만세포의 막 안정제로 작용하며, 비만세포막에서의 탈 과립현상을 막고 T 세포의 이동을 감소시킴으로써 호산구의 조직 내 발현을 억제하기 때문으로 설명하였다. Doliglska *et al.*,(2000)에 의하면, ketotifen은 IL-5의 분비를 저지하고 IgA와 호산구의 반응을 감소시킨다고 하였으며, 또한 ketotifen은 항 알러지 약물로서 *Trichinella spiralis*에 감염된 BALB/c 마우스에서 호산구와 관계된 반응과 IgG1, IgG2에 영향을 주는 것으로 밝힌 바 있다.

기생충은 숙주에게 면역글로불린(IgA, IgE, IgG, IgM) 항체의 변화를 야기시키고(Ito *et al.*, 1976; Kojima *et al.*, 1972), 조직 내에서 호산구의 발현 증가를 볼 수 있다고 하였다(Ratnatunga *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1996).

본 연구에서도 BALB/c 마우스 숙주 혈청 내의 면역글로불린(IgA, IgE, IgG1, IgG2)의 항체가를 측정해 본 결과 ketotifen을 투여한 마우스에서 면역글로불린이 전반적으로 감소하였으며, 특히 IgA는 감염 후 큰 폭으로 감소하였음을 알 수 있었다. 이 결과는 ketotifen은 호르텐스극구흡충 감염 BALB/c 마우스에서 호산구의

면역반응에 깊이 관련되어 있다고 분석되어지며, 이미 기생충의 감염에 의한 숙주의 면역글로블린과 호산구의 변화는 사이토카인과 직접적인 연관이 있다고 보고한 바 있다.(Callard *et al.*, 1990 ; King *et al.*, 1990).

Sasaki *et al.*,(1993)와 Korenaga *et al.*,(1994)은 각각 *Angiostrongylus cantonensis*를 마우스에게 감염시키고 관찰한 결과, 호산구 및 IL-5가 증가하였으며, 이것은 Th2 사이토카인이 호산구의 활성을 유도하여 기생충 감염 시 호산구가 중요한 면역작용을 담당하는 것으로 연결되었다. 그리고 Miller(1990)는 *Hymenolepis diminuta*를 숙주에게 감염시켰을 때 호산구의 증가는 IL-5와 관계가 있으며, IgG1의 생성은 IL-4, IL-5와 연관되어 있으며 또한 IgA는 IL-5와 IgE는 IL-4와 면역학적인 연관성이 있다고 주장한 바 있다.

IL-5는 호산구의 활성화를 유도하고, T 림프구의 활성화와 호산구성 질환에 관여하며(Leckie *et al.*, 2000 ; Togawa *et al.*, 2001), 기생충 감염 및 알러지성 질환 환자에서 호산구의 역할이 규명되고 있으며, 조직 내의 호산구의 발현현상이 밝혀져 있다(Dombrowicz and Capron, 2001; Moqbel *et al.*, 1990; Gounni *et al.*, 1994).

숙주에게 기생충이 감염되면 혈청 내에 IgE 상승(Juhlin *et al.*, 1969)과 함께 숙주의 장 점막조직 내의 호산구도 특이적으로 발현되며(Saito *et al.*, 1996), 이러한 특징은 항체의 변화나 조직 내 호산구의 발현과 사이토카인이 연관되어 있다고 밝혀졌다.(Lagente *et al.*, 1995). 그리고 Tepper *et al.*,(1990)는 기생충과 관련되어 나타나는 숙주의 호산구와 IgE 항체의 변화는 주로 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5가 관계한다고 하였다. 또한 IgE와 사이토카인과의 상관성은 IL-4의 농도와 IgE가 비례하였으며, Kuhn *et al.*,(1991)은 유전적으로 IL-4가 결핍된 쥐는 IgE를 생산하지 못한다고 보고 하였다.

본 연구에서도 BALB/c 마우스에게 호르텐스극구흡충을 감염시키고 혈청 내의 cytokine IL-4의 농도를 측정해 본 결과 ketotifen을 투여한 마우스에서의 최고치는  $260 \pm 18.0$  pg/ml으로, ketotifen을 투여하지 않은 마우스에서의 최고치  $340 \pm 22.9$  pg/ml 보다 낮은 농도를 나타냈다. 이 결과는 Ketotifen의 투여는 혈청 내 IL-4의 억제 작용을 나타내며, 호르텐스극구흡충 감염에 대한 숙주의 면역반응이

억제된 것으로 분석된다.

이상의 연구결과를 종합하면 BALB/c 마우스 숙주에게 호르텐스극구흡충을 감염시키고 항 알러지 제제인 ketotifen을 투여한 결과, 숙주의 면역반응이 억제되는 결과를 확인하였다. 즉, 총체 회수율에 영향을 주었으며, 면역글로불린 및 사이토카인의 분비작용에 영향을 미친 결과를 나타냈다. 그리고 숙주의 장 점막조직에는 호산구의 발현이 저하되는 현상을 관찰할 수 있었다. 숙주에게 ketotifen의 투여는 숙주 면역반응에 영향을 줌으로서 면역글로불린, 사이토카인 및 호산구의 발현을 억제하였으며, BALB/c 마우스 숙주에게 호르텐스극구흡충이 감염되어 유도되는 알러지 반응에 영향을 미치는 것으로 분석되었다



## 제 5 장 결 론

BALB/c 마우스에 호르텐스극구흡충의 피낭유충을 경구적으로 감염시키고 항알러지 제제인 ketotifen을 경구 투여한 실험군과 ketotifen을 투여하지 않은 실험군으로 나누어, eosinophil을 중심으로 면역반응 여부를 실험하였다. 즉, 마우스 장점막 조직 내에서 호르텐스극구흡충 감염 및 ketotifen 투여에 따라서 나타나는 감염 총체 회수율과 eosinophil 발현의 차이를 알아보았다. 그리고 마우스 혈청내의 면역글로블린 IgA, IgE, IgG1, IgG2와 사이토카인 IL-4의 증감여부를 감염기간에 따라 측정하여 비교 분석하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. BALB/c 마우스에게 호르텐스극구흡충을 경구적으로 감염시키고, ketotifen 투여한 군과 투여하지 않은 군에 대하여 총체 회수율을 비교하였다. 그 결과 ketotifen을 투여한 마우스에서는 감염 1주에 총체가 26.7마리로 최고의 감염률을 보이다가 점점 감소하여 감염 후 5주부터는 총체가 나타나지 않았다. Ketotifen을 투여하지 않은 군에서는 감염 1주에 23.0마리로 최고의 감염률을 보이다가 점차 감소하여 감염 후 4주부터는 총체를 발견할 수 없었다.

2. 마우스 장 점막 내에서 발현되는 eosinophil을 Lendrum's(1994)의 면역학적인 염색방법으로 염색한 후 관찰한 결과 *E. hortense*를 감염시키지 않은 대조군에서는 용모 10개당 평균 0.4개로 나타났다. 그러나 *E. hortense*를 감염시키고 ketotifen을 투여하지 않은 군에서는 감염 후 4주에 평균 20.7개로 나타나 최고치를 보였으며, ketotifen을 투여한 군에서는 감염 후 4주에 평균 16.7개로 최고치를 나타내었다. 이상의 성적에서와 같이 ketotifen 투여가 eosinophil 발현을 억제하였다.

3. 감염 마우스 혈청 IgA, IgE, IgG1, IgG2 면역글로블린에 대한 항체를 ELISA를 이용하여 흡광도를 측정한 결과는 다음과 같다. 즉, IgA의 성적은

ketotifen을 투여하지 않은 군은 감염 7주일에서 평균 0.45이고, 투여군에서는 감염 7주일에서 평균 0.21로 최고치를 나타내었다. IgE는 ketotifen을 투여하지 않은 군은 감염 4주에서 평균 0.35로 최고치를 보였고, 투여군은 감염 4주에서 평균 0.3이었다. IgG1의 경우 ketotifen을 투여하지 않은 군에서는 최고치가 감염 3주에서 평균 1.2이며, 투여군에서는 감염 5주에서 평균 0.9이었다. IgG2는 ketotifen을 투여하지 않은 군에서는 최고치가 감염 4주에서 평균 0.26이었고, 투여한 군에서는 감염 3주에서 평균 0.19로서 최고치를 보였다. 이러한 결과는 ketotifen을 투여하지 않은 군에 비하여 투여군에서 면역글로불린의 항체가가 낮게 나타났다.

4. 혈청에서 ELISA를 이용한 cytokine 측정은 ketotifen을 투여하지 않은 군보다 투여군에서 낮은 농도로 발현되었다. 즉, IL-4는 감염 후 2, 3, 4 및 5주에서 볼 때, ketotifen을 투여하지 않은 군에서는 각각 340, 306, 180 및 130으로 측정되었고, ketotifen을 투여한 군에서는 250, 260, 120 및 40으로 측정되었다.

이상의 결과를 볼 때, 항 알러지 제제인 ketotifen을 투여한 군에서 총체 회수율이 증가하고, 면역글로불린 항체가 및 사이토카인 발현이 낮아지는 결과와 장 점막 내 eosinophil 발현 또한 낮아지는 결과를 보였다. 이것은 ketotifen이 마우스의 면역반응에 영향을 주어 면역글로불린 항체의 생성을 저하시키고, 사이토카인의 발현을 저하시켜 이 영향을 받는 호산구의 조직 내 발현을 억제한 것으로 판단되며, 이와 같은 면역 억제 작용으로 인하여 기생충 감염에 따른 알러지 반응을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Callard RE and Turner M. W(1990). Cytokines and Ig switching: evolutionary divergence between mice and humans. *Immunol Today*, 11(6):200-203.
- Calvert JE, Johnstone R and Duggan-Keen MF(1990) Immunoglobulin G subclasses secreted by human B cells *in vitro* in response to interleukin-2 and polyclonal activator. *Immunol* 70(2):162-167.
- Castillo JG, Oehling A, GAMboa PM(1991). Mechanism of ketotifen action in hypersensitivity reactions. Its effect on cellular enzymatic activities. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1: 315-323
- Chai JY, Hong SJ, Shon WM, Lee SH, Seo BS(1985). Studies on intestinal tematodes in Korea XVI. Infection status of loaches with the metacercariae of *Echinostoma hortense*. *Korean J Parasit.*23(1):18-23.
- Chai JY, Seo BS, Lee SH(1984). Study on *Metagonimus yokogawai*(katsurada, 1912) in Korea VII. Susceptibility of various strains of mice to *Metagonimus* infection and effect of prenisolone. *Korean J Parasitol* 22:153-160.
- Cordoba H, Fernandez M, Santos F, Oehling A(1992). Variations of intracellular histamine basophil levels after treatment with ketotifen. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2:187-190.
- Dessaint JP, Capron M, bout D and Capron A(1975). Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosomiasis(*S. mansoni* or *S. haematobium*). *Clin Exp immunol* 20:427-436.
- Doligalska M(2000). Immune response to *Trichinella spiralis* larvae after treatment with the anti-allergic compound ketotifen. *Parasitol Res* 86:232-238.

- Dologalska M, Laskowska M(2000). Inhibition of the protection IgA response by ketotifen is related to the inflammatory reaction in the peritoneal cavity and intestinal mucosa of BALB/c mice infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res* 86:480-485.
- Dombrowicz D and Capron M(2001). Eosinophils, allergy and parasites. *Cur Immunol* 13: 716-720.
- Eliakim R, Karmeli F, Okon E, Rachmilewitz D(1992). Ketotifen effectively prevents mucosal damage in experimental colitis. *Gut* 33(11):1498-503.
- Fischel EE, Vaughan JH, Photopoulos C(1952). Inhibition of rapid production of antibody by cortisone; study of secondary response. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 81:344-348.
- Fujino T, Ichikawa H, Fried B, Fukuda K(1997). The expulsion of *Echinostoma trivolvis*: worm kinetics and intestinal reactions in C3H/HeN mice treated with dexamethasone. *J Helminth* 71:257-259.
- Germuth FG Jr, Ottinger B, Oyama J.(1952). Influence of cortisone on experimental hypersensitivity and circulating antibody in the guinea pig. *Preceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 80(2):188-191.
- Gounni AS, Lamkhioued B, Delaporte E, Dubost A, Kinet J, Capron A and Capron M(1994). The high-affinity IgE receptor on eosinophils from allergy to parasites or from parasites to allergy?. *J Allergy and Clinic Immunol* 94(6):1214-1216.
- Gounni AS, Lamkhioued B, Ochiai K, Tanaka Y, Delaporte E, Capron A, Kinet JP, Capron M(1994). High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367(6459):183-186.
- Grant SM, Goa KL, Fitton A, Sorkin EM(1990). Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs* 40:412-448.

- Hogarth-Scott RS, Johnsson SGO, Bennich H(1969). Antibodies to *Toxocara* in the sera of visceral leishmaniasis patients: the significance of raised levels of IgE. *Clin Exp Immunol* 5:619-625.
- Ishizaka K, Urban JF, Taggart M and Ishizaka K(1976). IgE synthesis in the rat following infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Am Soc Exp Biol* 35:675.
- Ishikawa N, Goyal PK, Mahida TR, Fli K, Wakelin D(1998). Early cytokine response during intestinal parasitic infections. *Immunol* 93:257-263.
- Ito A and Kamiyama T(1987). Corticosterone-sensitive, innate resistance to *Hymenolepis nana* infection in congenitally athymic nude rats. *J Helminth* 61:124-128
- Ito K, Sawada T(1976). Increased serum IgE level in individuals infected with *S. haematobium*, *W.bancrofti* or hook worm and the changes of treatment in schistosomiasis. *Japan J Exp Med* 42:115-123.
- Jarrett E, Bazin H(1974). Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature* 251(5476):613-614.
- Juhlin L, Johansson GO, Bennich H, Hogman C, Thyresson N.(1969). Immunoglobulin E in dermatoses. Levels in atopic dermatitis and urticaria. *Arch Derm.* 100:12-16.
- Kameli F, Eliakim R, Okon E, Rachmilewitz D(1991). Gastric mucosal damage is mediated by substance P and prevented by ketotifen. *Gastroenterology* 100:1206-16
- King C. L., Ottesen E. A. and Nutman T. B.(1990). cytokine regulation of antigen-driven immunoglobulin production in filarial parasite infections in humans. *J Clin Invest* 85(6):1810-1815.
- Kingger MH(1997). Platelet and inflammation. *Anat Embryol* 196(1):1.
- Kojima S, Yokogawa M, Tada T(1972). Raised levels of serum IgE in human helminthiasis. *Am J Trop Med Hyg* 21:913-918.

- Kondo N, Fukutomi O, Kameyama T, Hishida T, LIGP, Agata H, shinbara M, Shinoda S, Yano M, Orri T(1994). suppression of proliferative responses of lymphocytes to food antigen by an anti-allergic drug, kototifen fumarate, in patients with food-sensitive atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 103:234-238.
- Konno S, Asano K, Okamoto K, Adachi M(1994). Inhibition of cytokine production from human peripheral blood leukocyte by anti-allergic agent *in vitro*. *Eur J Phamacol* 264(3):265-268.
- Korenaga M, Hitoshi Y, Takatsu K, Tada I(1994). Regulatory effect of anti-interleukin-5 monoclonal antibody on intestinal worm burden in a primary infection with *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Int J Parasitol.* 24(7):951-957.
- Kuhn R, Rajewsky K, Muller W(1991). Generation and analysis of interleukin-4-deficient mice. *Science* 254:707-710.
- Lagente V, Pruniaux MP, Junien JL, Mddley I(1995). Modulation of cytokine-induced eosinophil infiltration by phosphodiesterase inhibitors. *Am J Respir Crit Care Med* 151(6):1720-1724.
- Leckie Margaret J, Khan Jamey, O'Connor Brian J, Hansel Trevor T, Chung K Fan, Diamant Zuzana, Djukanovic Peter J and Holgate Stephen T(2000). Effects of an interleukin-5 bloking monoclonal antibody on eosinophils, air way hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The lancet*, 356(9248):2144-2148.
- Miller HR(1990). Immunity to intestinal parasite. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epi-aooties* 9:301-313.
- Min DY and Soh CT(1980). Serum IgE level in *Clonorchis sinensis* infected rats and isolation of th allergen. *Yonsei Medical J* 13:94-105.
- Moqbel R and Pritchard ID(1990). Parasites and allergy: evidence for a "Cause and effect" relationship. *Clinical and Experimental Allergy: J Brit*

- Soc Clinic Immunol*, 20(6):611-618.
- Namgoong MK, Jung SH, Hong SW, Cho MY(1999). Effect of ketotifen on an Experimental Model of IgA Nephropathy. *The J. of Wonju college of Medicine* 12(1):53-60.
- Phillips JO, Everson MP, Moldoveanu Z and Lue C(1990). Synergistic effect of IL-4 and IFN-gamma on the expression of polymeric Ig receptor(secretory component) and IgA binding by human epithelial cells. *J Immunol* 145(6):1740-1744.
- Podleski WK, Panaszek BA, Schmidt JL, Burns RB(1984). Inhibition of eosinophils degranulation by Ketotifen in a patient with milk allergy, manifested as bronchial asthma--an electron microscopic study. *Agents Actions*. 15(3-4):177-81.
- Ratnatunga N, Wijesundera MS(1999). Histopathological diagnosis of subcutaneous Kirofilaria repens infection in jumans. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30(2):375-8.
- Rihet P, Demeure CE, Bourgeois A, Prata A and Dessein AJ(1991). Evidence for association between human rsistance to Schistosomiasis and high anti-laval IgE levels. *Eur J Immunol* 21(11):2679-2689.
- Rosenberg EB, Whalen GE, Bennich H, Johansson SG(1970). Increased circulating IgE in a new parasites disease-human intestinal capillariasis. *New Eng J Med* 283(21):1148-1149.
- Rouseaux-Prevost R, Bazin H, Capron A(1977). IgE in experimental schistomiasis I. Serum IgE levels after infection by *Schistosoma mansoni* in various strains of rats. *Immunol* 33:501-505.
- Rouseaux-Prevost R, Bazin H, Capron A(1979). Serum IgE levels in rats infected with Dipetalonema viteae larvae. *Clin Exp Immunol* 38:389-393.
- Saito S, Hamada A, Watanabe N, Obata T, Katakura K and Otomo H(1996). Eosinophil chemotactic activity in *Leishmsnia amazonisis* promastigotes.

*Parasitol Res*, 82(6):485-489.

Saski O, Sugaya H, Ishida K, Yoshimura K(1993). Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasite Immunol.* 15(6):349-354.

Tepper RI, Levinson DA, Stanger BZ, Campos-Torrer J, Abbas A and Leder P (1990). IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cells development in transgenic mice. *Cell* 62:457.

Togawa M, Kiniwa M and 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 sciences*, 69(6):699-705.

Wakelin D, Rose ME, Hesketh P, Else KJ, Grecis RK(1993). Immunity to coccidiosis: genetic influences on lymphocyte and cytokine response of infection with *Eimeria vermiformis* in inbred mice. *Parasite Immunology* 15(1):11-19.



## Abstract

### Inhibition of eosinophil infiltration and humoral immune reaction by ketotifen in BALB/c mice infected with *Echinostoma hortense*

Lim, Byung Hyuk

Dept. of Biomedical Life Science

The Graduate School of Health and Environment

Yonsei University

There is an allergy reaction among specific immune reactions when infected with parasites. To examine the immune reaction by eosinophils which is related with the allergy reaction in BALB/c mice, were infected mice with *Echinostoma hortense*'s metacercaria, and then treated with ketotifen orally, an anti-allergy drug, to identify its effect on eosinophil immune reaction in villi of host intestine.

The rate of worm recovery was higher in mice treated with ketotifen than in mice untreated and worms in the treated mice lasted longer than that of the untreated control mice. However, the antibody titer in serum of the ketotifen-treated mice is lower. Especially, *E. hortense* infection induced a sharp increase of IgE in blood and eosinophil infiltration into villi of mouse intestine. This data indicated that ketotifen treatment suppressed eosinophil

infiltration to the infected area and inhibited IL-4 expression. The reduced IL-4 expression maybe related to the reduction of IgE expression and inhibited expression of IgG1 and IgG2.

In summary, ketotifen has an resulting from inhibiting eosinophil infiltration effect on allergy reaction, induced by parasite infection and expression of immunoglobulin and cytokine.

---

Key Words : *Echinostoma hortense*, ketotifen, Immunoglobulin, Eosinophil, BALB/c