

질트리코모나스에 대한 림포카인활성대식세포의 세포독성능

한양대학교 의과대학 기생충학교실

윤 경·류 재 숙·민 득 영

요 약 : 정상 BALB/c 마우스의 복강에서 분리한 대식세포를 조제 림포카인 및 재조합 림포카인 (rGM-CSF, rIL-2, rIL-4, rIFN- γ)으로 18 시간 반응시켜 활성화시키고 대식세포 1×10^5 개와 methyl-[3 H]-thymidine으로 표지된 질트리코모나스 1×10^4 개를 10 : 1 비율로 넣고 18 시간 동안 37°C, 5% CO $_2$ 항온습기에서 반응시킨 다음 상청액 100 μ l씩을 scintillation cocktail 2 ml에 넣어 방사능을 측정하여 세포독성을 관찰하고 nitrite 생산량을 측정하였다.

rIL-2 40U/ml나 rIFN- γ 100U/ml로 활성화시킨 대식세포는 대조군 보다 높은 세포독성을 보였으나 2개의 림포카인을 혼합시켰을 때 낮은 세포독성을 보였다. rIL-4를 rGM-CSF, rIL-2 및 rIFN- γ 와 각각 혼합시켰을 때 각 림포카인에 의한 대식세포의 세포독성은 감소되었다. 조제 림포카인에서 IL-2에 대한 항체는 세포독성을 현저히 감소시켰다. Nitrite 생산량은 rIFN- γ 및 rIL-4 각각으로 대식세포를 활성화시켰을 때 세포독성 정도와 비례되었고, rIL-2와 rIFN- γ 를 혼합시켰을 때 nitrite 생산량이 높고 증식이 억제되었으나 세포독성은 낮았다. 이러한 결과로 보아 rIL-2 및 rIFN- γ 는 각각 단독으로도 대식세포를 활성화시켜 질트리코모나스에 세포독성을 나타내며 rIL-4는 세포독성을 억제시키는 것으로 생각되며, nitrite 생산량은 세포독성과 반드시 비례하지 않으나 nitric oxide가 질트리코모나스의 증식을 억제하는 것으로 생각된다.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, macrophage, crude lymphokine, recombinant lymphokine, nitrite

서 론

대식세포는 인체방어기전의 최일선에서 작용하며 세포매개성 면역반응에서 중추적인 역할을 한다고 알려져 있다. 즉 항원 제시세포 (antigen-presenting cell, APC)로 작용하며, 여러 modulatory protein(즉 enzyme, interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor (TNF)등)을 분비하여 림프구 반응을 조정하며, 또한 여러 림포카인(IL-1, TNF, interferon- γ (IFN- γ))에 대한 수용기(receptor)를 가지고 있어 이 림포카인과 반응하면 활성화되어 여러 병원체(pathogen)에 대해 주효세포(effector cell)로 작용한다(Paul, 1989).

조제(粗製) 림포카인(crude lymphokine)에 노출된 마우스 대식세포는 *Leishmania*, *Candida*, *Trypanosoma cruzi*, *Rickettsia* 및 *Legionella*에 의한 감염에 대해 저항한다고 알려져 있다(Roitt et al., 1989). 질트리코모나스에 대해서는 柳 등(1990)이 조제 림포카인으로 활성화시킨 대식세포가 정상 대식세포보다 질트리코모나스에 대해 세포독성이 증가된다고 보고한 바 있다.

이 실험에서는 정상 마우스 복강내 대식세포를 여러 종류의 재조합 림포카인(recombinant lymphokine)으

로 활성화시켜 질트리코모나스에 대한 세포독성을 관찰하고 nitrite 생산량을 측정하여 세포독성 및 nitric oxide 생성과의 관계를 알아보고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 질트리코모나스의 배양

사용된 질트리코모나스는 한양대학병원 산부인과에 내원한 질염환자에서 분리한 HY-9주로 마우스 피하점종에 의해 병원성이 입증된 총주(strain)이다(신 등, 1990). 사용된 배지는 Diamond(1968)의 TPS-1배지로 배지의 처방은 다음과 같다.

TP(Trypticase and Panmede) broth pH. 7.0	435ml
Bovine serum	50ml
TC medium 199(Difco)	15ml
Penicillin G	500,000IU
Streptomycin	0.25g

2. 질트리코모나스의 표지(labeling)

1×10^4 개의 질트리코모나스를 5 ml TPS-1 배지에 넣어 2 일간 배양한 후 RPMI 1640 배지로 세척하여 1×10^6 개를 10% 우태아 혈청을 함유한 2 ml RPMI-TPS-1

(RPMI 배지 : TSP-1 배지 = 80 : 1)에 부유시키고, 100 μ Ci methyl-[³H]-thymidine(specific activity 84Ci /mmol, Amersham, UK)을 넣고 37°C, 5% CC₂ 항습함온기에서 24시간 배양한후 RPMI 배지로 두번 세척하여 표적세포로 사용하였다.

3. 마우스 복강내 대식세포의 분리

사용된 마우스는 BALB/c로 마우스를 경추탈구에 의해 희생시킨후 마우스의 복부표피를 벗기고 주사기를 이용하여 복강내로 RPMI 배지 10 ml를 주입하고 마사지한 후 복강세포를 채취하여 세척한 후 10% 우태아 혈청이 들어있는 RPMI 배지 ml당 5 × 10⁶ 개로 세포를 부유시켜 100 mm 직경을 가진 플라스틱 페트리 접시에 넣은 후 2시간 동안 37°C, 5% CC₂ 항습함온기에서 배양하였다. 플라스틱 표면에 붙지 않는 세포를 미리 37°C로 데운 RPMI 배지로 세척하여 제거한후 플라스틱 접시에 붙은 세포는 rubber policeman 으로 배어 복강대식세포로 사용하였다.

4. 림포카인

a) 조제 림포카인(crude lymphokine)의 제조

림포카인의 제조를 위해 6~8 주된 BALB/c 마우스의 비장을 꺼내어 잘게 부순 후 세포부유액을 만들었다. 0.17 M Tris-NH₄Cl 완충액(pH 7.2)을 첨가하여 적혈구를 용혈시키고 RPMI 1640 배지로 2~3 회 세척한 후, RPMI 배지 ml당 5 × 10⁶ 개로 세포를 부유시킨후 concanavalin A [Con A, Sigma, St. Louis, Missouri]를 5 μ g/ml로 배지에 넣고 5% CC₂ 항습함온기에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 상청액을 수거하였다. 소공이 0.45 μ m 크기인 여과지를 통과시킨후 원액 및 1/10, 1/100, 1/1,000 및 1/10,000으로 희석하여 조제 림포카인으로 사용하였다.

b) 재조합 림포카인(recombinant lymphokine) 및 항체

실험에 사용한 재조합 림포카인으로는 mouse Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor(rGM-CSF: 1.5 × 10⁷ U/mg, Genzyme, Boston, Massachusetts), mouse Interferon- γ (rIFN- γ : 4.5~9 × 10⁶ U/mg, Genzyme), mouse Interleukin-4(rIL-4: 2 × 10⁷U/mg, Genzyme) 및 human Interleukin-2(rIL-2: 2 × 10⁴ U/ml, Lot. Y1008, KIST, Korea)였고 rGM-CSF는 10% 우태아혈청이 든 RPMI 1640 배지 ml 당 3, 30, 100 및 300 U가 들어가도록 희석하였으며 rIL-2는 10, 40, 80 및 200 U로 rIFN- γ 는 25, 50, 100 및 1,000 U, rIL-4는 2, 20 및 100 U로 희석하여 사용하였다. 사용한 림포카인에 대한 항체로는 hamster anti-mouse-IFN- γ monoclonal antibody(Genzyme)와 rat anti-mouse-IL-2 monoclonal antibody(CRI, Bedford, Massachusetts)였다. 림포카인에 대한 단세포군 항체의 농도는 IFN- γ 를 5 μ g/ml 농도로, IL-2에 대해서는 18 μ g/ml 농도가 되도록 희석하여 사용하였다.

5. 대식세포의 활성화

분리한 복강 대식세포 6 × 10⁵ 개를 각각의 림포카인이 들어있는 10% 우태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 1 ml에 넣어 37°C, 5% CC₂ 항습 함온기에서 18 시간 내지 24 시간 반응시켰다. 림포카인을 넣지 않은 대조 대식세포도 실험군과 같이 반응시켰다.

6. 세포독성 측정

림포카인을 처리한 대식세포는 RPMI 배지로 두 번 세척한 후 U-bottom microwell plate에 well당 1 × 10⁵ 개의 대식세포가 100 μ l의 10%의 우태아 혈청을 포함하는 RPMI-TPS-1배지에 들어가도록 조정하였다.

여기에 ³H-thymidine으로 표지된 질트리코모나스를 대식세포 대 질트리코모나스의 비율이 10 : 1이 되도록 1 × 10⁴ 개를 100 μ l의 RPMI-TPS-1 배지에 포함시켜 넣었다. 각 실험군에 대해 3 well씩 시행하였다. 37°C, CC₂ 항온함습기에서 18 시간 배양한 후 plate를 400 G에서 10 분간 원심분리한 후 100 μ l의 상청액을 2 ml의 scintillation cocktail(Scinti-A XF, PACKARD, Downers Grove, IL)이 든 vial에 옮겨 방사능을 liquid scintillation counter(PACKARD)로 측정하였다. 자연방출(spontaneous release)은 microwell plate well에 0.1 ml의 표지된 원충만을 넣고 반응시켰고, 최대 방출(maximum release)은 표지된 원충에 0.1% sodium dodecyl sulfate를 넣은 후 방사능을 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{cpm of experimental release} - \text{cpm of spontaneous release}}{\text{cpm of maximum release} - \text{cpm of spontaneous release}} \times 100$$

7. Nitrite 생산량 측정

대식세포의 세포독성과 nitrite 생산이 비례하는지 알아보고자 nitrite 양을 standard Griess reaction(Hageman and Seed, 1980; Lepoivre *et al.*, 1989; Vincendeau and Daulouede, 1991)의 방법에 의해 측정하였다. 각 실험군의 well에서 33.3 μ l씩의 상청액을 3 well에서 모아 100 μ l를 수거하여 시험관에 넣었다. Griess reagent는 1N HCl에 녹인 1.5% sulfanilamide(Sigma)와 중류수에 녹인 0.15% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride(Sigma)를 동량 섞어 준비하였다. 수거한 시료 100 μ l가 들어있는 시험관에 Griess reagent 600 μ l를 넣어 30분간 암실에서 반응시킨 후 ELISA plate로 옮겨 ELISA 광량계(Titertek, North Ryde, NSW)를 사용하여 파장 540 nm에서 흡수광량을 측정하였다. 표준곡선을 그리기 위해 시험관에 sodium nitrite를 20, 30, 40, 50, 75, 100 및 150 μ M이 되도록 넣은 후 흡수광량을 측정하였다.

실 험 성 적

1. 재조합 림포카인 농도에 따른 대식세포의 세포독성

대식세포를 rGM-CSF 3, 30, 100 및 300 U/ml로 환

성화시켰을 때 세포독성은 24.4, 30.8, 25.4 및 23.2%로 농도에 따른 차이는 관찰할 수 없었으나 대조군에 비해 낮은 값을 보였다(Table 1, Fig. 1). rIL-2로 대식세포를 활성화시켰을 때 40 U/ml에서 48.5%로 대조군보다 높은 값을 보였고 200 U/ml의 농도에서는 6.3%로 낮은 세포독성을 보였다(Table 1, Fig. 2). rIFN- γ 의 경우 100 U/ml에서 세포독성은 44.5%로 대조군보다 높은 세포독성을 나타냈고 25 U/ml에서 17.1%, 1,000 U/ml에서 23.9%로 낮은 값을 나타냈다(Table 1, Fig. 3). rIL-4는 대식세포와 반응시켰을 때 2 U/ml에서는 세포독성이 38.2%이었고 20 U/ml에서 23.9%로 낮은 값을 보였다(Table 1, Fig. 4).

2. 배합된 재조합 림포카인으로 활성화시킨 대식세포의 세포독성

재조합 림포카인의 배합에 따른 세포독성을 알아보기로 대식세포와 질트리코모나스의 비율을 10:1에서 20:1로 대식세포 비율을 증가시켰을 때 대조군을 비롯한 실험군의 세포독성이 전반적으로 증가되었다. rGM-CSF의 단독처리에서 52.4%이었던 세포독성이 rIFN- γ 및 rIL-2를 첨가해서 대식세포를 반응시켰을 때 각각 63.0% 및 86.3%로 rIFN- γ 를 넣을 때 보다 rIL-2를 넣었을 때 세포독성이 더 증가되었으며, rIL-4

Table 1. Cytotoxicity of macrophages activated by various concentration of recombinant lymphokine against *T. vaginalis*

Macrophages treated with	Cytotoxicity	
	Mean \pm S.D (%)	NO ₂ ⁻ (μ M/10 ⁵ cells/18hr)
Medium	40.9 \pm 2.03	10.8
1/10 crude lymphokine	75.1 \pm 4.1	15.7
1/100 crude lymphokine	37.6 \pm 4.65	5.0
GM-CSF 3U	24.4 \pm 0.81	3.8
30U	30.8 \pm 2.99	11
100U	25.4 \pm 0.64	12
300U	23.2 \pm 4.59	15
IL-2 10U	40.7 \pm 1.27	30.5
40U	48.5 \pm 3.48	24.3
80U	38.2 \pm 1.81	1.1
200U	6.3 \pm 0.42	—
IFN- γ 25U	17.1 \pm 3.68	13.7
50U	36.8 \pm 4.74	22.6
100U	44.5 \pm 3.32	33.4
1,000U	23.9 \pm 1.77	25.6
IL-4 2U	38.2 \pm 4.63	25.8
20U	23.9 \pm 1.63	4.2
100U	27.3 \pm 2.47	7.5

* The ratio of effector cells to target cells was 10 : 1.

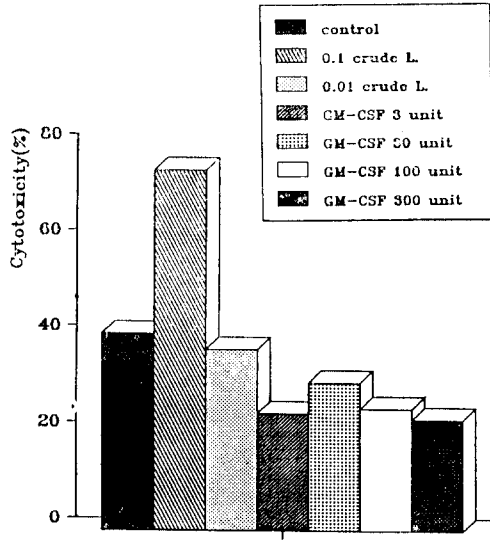


Fig. 1. Cytotoxicity of macrophages activated by rGM-CSF against *T. vaginalis*.

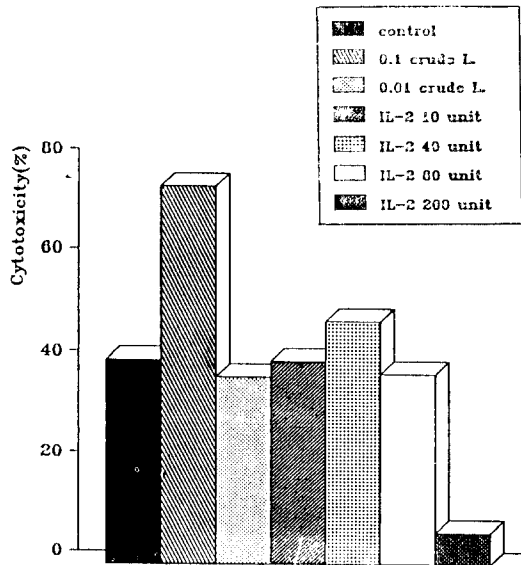


Fig. 2. Cytotoxicity of macrophages activated by rIL-2 against *T. vaginalis*.

(30 U/ml)를 첨가했을 때에는 22.9%로 낮았다(Table 2).

rIL-2 단독의 세포독성은 81.0%로 대조군보다 약간 높았으나 rIL-4 및 rIFN- γ 를 첨가했을 때 각각 38.4% 및 34.7%로 감소되었다. rIL-4 단독의 세포독성은 20.9%로 매우 낮았고, rGM-CSF, rIL-2 및 rIFN- γ 에 rIL-4를 첨가시켰을 때에는 각각의 단독적인 세포독성 52.4%, 81.0%, 88.8%에 비해 22.9%, 38.4%, 14.5%로 세포독성이 많이 감소되었다.

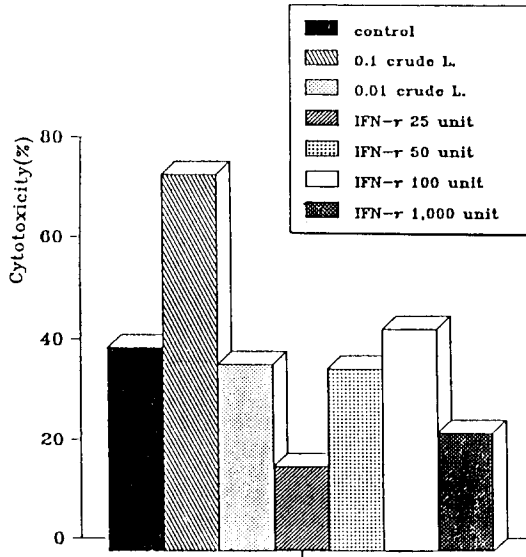


Fig. 3. Cytotoxicity of macrophages activated by rIFN- γ against *T. vaginalis*.

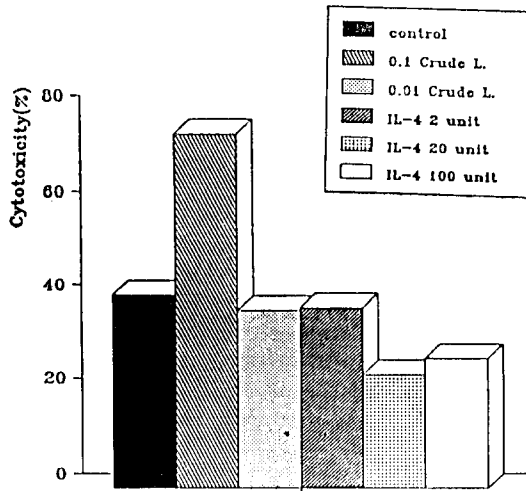


Fig. 4. Cytotoxicity of macrophages activated by rIL-4 against *T. vaginalis*.

rIFN- γ 로 대식세포를 활성화시키면 88.8%로 대조군 보다 높은 세포독성을 보였으며, rIL-2 및 rIFN- γ 각각의 림포카인을 단독으로 첨가하였을 때에는 대조군보다 높은 세포독성을 보이나 두개의 림포카인을 배합하였을 때 34.7%로 세포독성이 감소하였다(Table 2).

3. rIL-2와 rIFN- γ 의 혼합에 따른 세포독성

rIL-2 및 rIFN- γ 각각의 세포독성은 56.3%, 48.5%로 대조군과 비슷하였으나 이 두 림포카인을 혼합하였을 경우 18시간 후에 28.0%의 낮은 세포독성을 보였다. 여기에 rGM-CSF를 첨가하였을 때 42.1%로 세포

Table 2. Cytotoxicity of recombinant lymphokine-activated macrophages against *T. vaginalis*

Macrophages treated with	Cytotoxicity	
	Mean \pm S.D.(%)	
Medium	75.8 \pm 1.48	
1/10 Crude lymphokine	90.1 \pm 2.33	
GM-CSF	52.4 \pm 1.27	
GM-CSF+IL-2	86.3 \pm 1.68	
GM-CSF+IL-4	22.9 \pm 1.2	
GM-CSF+IFN- γ	63.0 \pm 0.92	
IL-2	81.0 \pm 5.57	
IL-2+IL-4	38.4 \pm 2.52	
IL-2+IFN- γ	34.7 \pm 0.42	
IL-4	20.9 \pm 2.55	
IL-4+IFN- γ	14.5 \pm 2.5	
IFN- γ	88.8 \pm 4.3	

* The ratio of effector cells to target cells was 20:1.

* The concentrations of GM-CSF, IL-2, IL-4 and IFN- γ were 100 U/ml, 40 U/ml, 30 U/ml and 50 U/ml, respectively.

Table 3. Cytotoxicity of macrophages activated by combined recombinant lymphokine against *T. vaginalis*

Macrophages treated with	Cytotoxicity(%) (Mean \pm S.D.)		NO ₂ ⁻ (μ M/10 ⁵ cells/18hr)
	6hr	18hr	
Medium	9.2 \pm 1.9	51.4 \pm 3.15	12.5
IL-2+IFN- γ	3.9 \pm 0.5	28.0 \pm 1.93	25.8
IL-2+IFN- γ +GM-CSF	11.9 \pm 4.3	42.1 \pm 1.55	15.8
IL-2+IFN- γ +IL-4	4.3 \pm 0.4	27.3 \pm 3.36	9.1
IL-2+IFN- γ +IL-4+GM-CSF	9.0 \pm 2.3	36.8 \pm 1.78	2.5
IL-2	15.6 \pm 1.2	56.3 \pm 1.47	13.8
IFN	19.4 \pm 0.5	48.5 \pm 2.76	24.3

* The ratio of effector cells to target cells was 10:1.

독성이 약간 증가되었다. rIL-4의 첨가는 rIL-2 및 rIFN- γ 혼합에 의한 세포독성에 영향을 미치지 않았고 여기에 다시 rGM-CSF를 첨가하면 세포독성이 다시 약간 증가 되었다. 즉 rGM-CSF는 rIL-2 및 rIFN- γ 의 혼합에 의한 세포독성을 증가시켰다(Table 3).

rIL-2 및 rIFN- γ 의 혼합에 의한 대식세포의 활성화는 세포독성이 낮았으나 반응 18시간 후 도립현미경 관찰에서 보면 원충의 수가 세포독성이 높은 다른 실험군에 비해 감소되어 있었으며 실제로 원충의 수가 감소되어 있는지 알아보기로 세포독성 반응이 끝난 후 대조군, 표지된 질트리코나스만 넣은 군, rIFN- γ 로 환

Table 4. Effect of lymphokine activated macrophages on the proliferation of *T. vaginalis*

Macrophages	No. of <i>T. vaginalis</i>
control M	3.2×10^4
rIFN- γ M	3.3×10^4
rIFN- γ +rIL-2 M	2.1×10^4

* Lymphokine activated macrophages were cocultured with *T. vaginalis* for 18 hours. *T. vaginalis* from each wells were transferred into TPS-1 medium and incubated for 48 hours.

성화시킨군, rIL-2와 rIFN- γ 를 혼합하여 활성화시킨군 등 4군의 각 well에 들어있는 질트리코모나스를 TPS-1 배양 배지에 넣고 2일간 배양한 후 그 수를 측정하였을 때 rIL-2와 rIFN- γ 로 혼합하여 활성화시킨군은 대조군(3.2×10^4), rIFN- γ 으로 활성화시킨 군(3.3×10^4)에 비해 감소된 수(2.1×10^4)를 관찰할 수 있었다(Table 4).

4. 조제 림포카인의 세포독성

조제 림포카인 원액 및 1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000 희석액을 첨가하여 세포독성을 측정하였더니 원액에서는 13.7%로 낮은 세포독성을 보인 반면 1/10희석액에서는 75.1%로 세포독성이 크게 증가하나 1/100, 1/1,000 및 1/10,000 희석액에서는 각각 37.6%, 32.7% 및 33.4%로 대조군(40.9%)보다 약간 낮은 값을 보였다. 조제 림포카인의 어떠한 성분이 세포독성을 나타내는지 알아보기 위하여 rIL-2 및 rIFN- γ 에 대한 단세포균 항체를 1/100로 희석한 조제 림포카인과 25°C 환온항습기에서 3시간 반응시킨 후 대식세포의 세포독성은 anti-IL-2를 첨가한 경우 12.6%의 낮은 세포독성을 나타낸 반면 anti-IFN- γ 를 첨가했을 때에는 32.4%로 조

Table 5. Effect of various concentration of crude lymphokine and anti-lymphokine antibody on the cytotoxicity of macrophages against *T. vaginalis*

Macrophages treated with	Cytotoxicity(%)	
	Mean \pm S.D.	NO ₂ ⁻ (μ M/10 ⁶ cells/18hr)
Medium	40.9 \pm 2.03	10.8
Crude lymphokine(CL)	13.7 \pm 3.75	0.87
1/10 CL	75.1 \pm 4.1	15.7
1/100 CL	37.6 \pm 4.65	5.0
1/1,000 CL	32.7 \pm 2.33	8.3
1/100 CL	33.4 \pm 3.46	14.5
1/100CL+anti-IFN- γ	32.4 \pm 2.71	31.5
1/100CL+anti-IL-2	12.6 \pm 1.90	20.1

* The ratio of effector cells to target cells was 10 : 1.

제 림포카인의 37.6%에 비해 약간 감소되었다(Table 5).

5. Nitrite 생산량

대조군 및 여러 재조합 림포카인으로 반응시킨 대식세포 모두에서 NO₂⁻ 양을 측정하였다. rIFN- γ 및 rIL-4 각각으로 활성화시킨 대식세포에서는 세포독성능과 nitrite 생산량이 비례하였고 rIFN- γ 100 U/ml에서 44.5%의 세포독성을 보였을 때 nitrite는 33.4 μ M을 보였고, rIL-4 2 U/ml에서 세포독성이 38.2%였을 때 nitrite는 25.8 μ M이었다. rGM-CSF의 경우 림포카인의 양이 증가될수록 nitrite 양도 증가되었으나 세포독성과 비례되지 않았고 rIL-2에서는 rIL-2양(10, 40, 80, 200 U/ml)을 증가시키에 따라 30.5, 24.3, 1.1 μ M로 감소되었고 세포독성과 비례되지 않았다(Table 1).

rIL-2 및 rIFN- γ 를 혼합하여 대식세포를 자극시킬 때 세포독성은 각각의 림포카인을 단독으로 처리했을 때 보다 낮았으나 nitrite 생산량은 rIL-2 및 rIFN- γ 에서 각각이 13.8 μ M 및 24.3 μ M인데 비해 두 림포카인을 혼합했을 때 25.8 μ M로 증가되었다(Table 5). 그러나 질트리코모나스의 증식은 억제되었다(Table 4).

조제림포카인의 경우 75.1%의 높은 세포독성을 보였던 1/10 희석액에서 nitrite양은 15.7 μ M였고 세포독성이 33.4%였던 1/10,000 희석액에서 14.5 μ M로 세포독성과 nitrite 생산량과의 상관성을 관찰할 수 없었다(Table 5).

고 찰

림포카인에 의해 활성화된 대식세포는 여러 종류의 기생충을 죽이거나 증식을 억제한다고 알려져 있다(Bout *et al.*, 1981; Oliver *et al.*, 1989; Hughes *et al.*, 1987; 柳 등, 1990). 대식세포를 활성화시키는데 있어서 여러종류의 림포카인중 IFN- γ 는 가장 필수적이라고 알려져 있는데(Roitt *et al.*, 1989), Belosevic *et al.* (1988)은 *Leishmania tropica major* 감염에 있어서 IFN- γ 단독으로는 기생충을 억제시키는데 별 효과가 없고 GM-CSF, IL-2, IL-4등과 각각 혼합시켰을 때 대식세포를 활성화시켜 감염을 억제시키거나 감염된 *Leishmania tropica major*를 사멸시킨다고 하였다. Golden and Tarleton(1991)은 *Trypanosoma cruzi*의 감염에서 고단위(1000U)의 IFN- γ 단독으로도 감염을 감소시키나 복합 림포카인(cytokine-rich supernatant)에 IFN- γ 를 첨가하면 그 작용이 증강된다고 하였다. 또한 Belosevic *et al.*, (1990)은 T 림프구에서 분비되는 IL-2도 IFN- γ 와 함께 대식세포가 *Leishmania tropica major*를 죽이는데 조인자(cofactor)로 작용하는데 IL-2 단독보다는 IFN- γ 를 가할때 감염에 대한 저항이 증가된다고 하며, IFN- γ 로 대식세포를 반응시키던 IL-2에 대한 결합을 증가시킨다고 하였다. 한편 Wahl *et al.* (1988)은 세포의 기생충인 *Giardia lamblia*를 사

별시키는데 IFN- γ , IL-2 없이는 일어나지 않는다고 하였다.

이 실험에서도 rIL-2 40 U/ml와 rIFN- γ 100 U/ml는 단독으로 대식세포를 활성화시켰을 때 대조세포보다 약간 높은 세포독성을 나타냈으며 대식세포 대 질트리로코모나스의 비율을 20:1로 한 경우에서도 rIL-2, rIFN- γ 단독 처리군과 rIL-2 및 rGM-CSF 혼합처리군에서 대조보다 높은 독성을 보였다. 그런데 rIL-2와 rIFN- γ 를 혼합시켜 대식세포를 활성화시켰을 때에는 낮은 세포독성을 보였으나 도립현미경으로 관찰하였을 때 대조군보다 낮은 세포독성인데도 원충 수가 대조군이나 다른 실험군에 비해 매우 감소되어 있었으며, 이 원충을 TPS-1 배지에 넣고 48 시간 후에 관찰하였더니 대조군에 비해 원충 수가 적음을 알 수 있어 세포 독성은 낮으나 증식을 억제함을 알 수 있었다.

rIL-2 및 rIFN- γ 를 혼합한 군에서 원충의 수가 적은 것은 질트리로코모나스가 증식되기 전인 반응초기에 활성화된 대식세포가 원충에 세포독성을 나타낸다고 생각되어 반응 6 시간 후 세포독성을 관찰하였던 바, 18 시간과 비슷하게 이 군에서 세포독성이 낮아 rIL-2 및 rIFN- γ 로 활성화된 대식세포는 반응초기에 원충을 탐식하거나 또는 어떤 mediator를 생산하여 반응초기에 증식을 억제하는 것으로 생각되며 이에 대해서는 앞으로의 연구에서 밝혀야 할 것이다.

기생충 감염에서 IL-4에 의해 활성화된 대식세포의 역할에 대해서는 많은 보고가 있다. *Leishmania* 감염에 있어 Scott *et al.* (1989)은 생체내와 시험관내에서 IL-4가 감염을 억제시키는데 중요하다고 하며, Lehn *et al.* (1989)은 인체 대식세포를 IL-4 및 IFN- γ 로 혼합 처리하면 IFN- γ 단독의 항 *Leishmania* 작용을 감소시키는데 대식세포에 IL-4를 먼저 넣고 IFN- γ 를 나중에 처리하면 항 *Leishmania* 작용을 감소시키지 못한다고 하였다. *T. cruzi* 감염에 있어서는 대식세포를 amastigote로 감염시키기 24시간 전에 IL-4로 활성화시켰을 때 원충 수를 감소시켰으나 trypomastigote를 감염시키면 감염이 억제되지 않는다고 하였는데 (Wirth *et al.*, 1988), Golden and Tarleton (1991)도 *T. cruzi* trypomastigote에 대해 같은 결과를 보고하였다. 이 실험에서는 rIL-4가 단독으로도 비교적 낮은 세포독성을 보이며 다른 제조항 림포카인(rGM-CSF, rIL-2 및 rIFN- γ)과 혼합시켰을 때 세포독성을 감소시켰는데 앞으로의 실험에서는 rIL-4에 대한 항체를 반응시켜 세포독성에 어떤 영향을 미치는지 추시되어야 할 것이다.

조제 림포카인은 적당히 희석되었을 때 높은 세포독성을 보였는데 조제 림포카인의 어떤 성분이 세포독성에 중요한지 알아보고자 rIL-2와 rIFN- γ 에 대한 단세포군 항체를 조제 림포카인에 넣었다. 이 실험에서 rIL-2에 대한 단세포군 항체는 세포독성을 1/3 정도로 감소시켰으며 rIL-2는 대식세포가 질트리로코모나스에 대하여 세포독성을 나타내는데 있어 중요한 림포카인

이라고 생각되었다. rIFN- γ 가 대식세포를 활성화시키는데 있어서 여러 종류의 림포카인 중 필수적이라고 알려진 것 (Roitt *et al.*, 1989)과 상반되게 이 실험에서는 anti-IFN- γ 로 rIFN- γ 를 감소시켰을 때에도 세포독성에 별 영향이 없어 앞으로의 실험에서는 rIFN- γ 에 대한 또 다른 항체를 구입하여 반응시키거나 anti-IFN- γ 를 넣은 후 생기는 항원항체 복합체 (IFN- γ + anti-IFN- γ complex)를 제거하는 방법등을 써서 rIFN- γ 의 역할을 추시하여야 할 것이다.

활성화된 대식세포는 여러 효소나 TNF(tumor necrosis factor), 산소 또는 질소 중간산물(oxygen or nitrogen intermediate)을 분비하여 세포내 또는 세포밖 표적에 해를 끼친다는 것이 알려져 있다 (James, 1991). rIFN- γ 에 의해 활성화된 대식세포에서 분비되는 nitric oxide는 L-arginine의 말단 부위의 구아니딘 질소원자(terminal guanido nitrogen atom)의 산화에 의해 citrulline과 함께 합성되는데 (James and Hibbs, 1990) NO는 NC_2^- 나 NO_3^- 로 분해되므로 이러한 중간산물의 측정으로 NC의 양을 알아낼 수 있다. NO의 작용(metabolic effect)은 종양 세포에서 많이 연구되었는데 세포내 철(intracellular iron)과 결합하여 철 의존성 효소경로(iron-dependent enzyme pathway)를 방해하며 (James and Hibbs, 1990; Liew and Cox, 1991) 전자 전달체(electron transport chain)의 복합체 I (complex I)과 복합체 II (complex II)를 불활성화시켜 mitochondrial respiration을 억제시킨다고 하며, 또한 NO는 DNA 합성에 관여하는 ribonucleotide reductase를 억제시키는데, 이처럼 활성화된 대식세포는 세포증식저지(cytostatic)와 세포독성을 나타낸다고 한다 (James, 1991). 세포 내에 기생하는 원충인 *Toxoplasma gondii* (Adams *et al.*, 1990) 및 *L. tropica major* (Green *et al.*, 1989; Liew *et al.*, 1990)와 세포밖에 기생하는 원충 *Trypanosoma muscliculi* (Vincendeau and Daulouede, 1991)에서 IFN- γ 로 활성화시킨 대식세포가, *S. mansoni* schistosomule에 대해서는 조제 림포카인으로 활성화시킨 대식세포에서 방출한 NO가 원충의 살상 또는 감염억제에 중요한 역할을 한다고 보고되었다.

Ding *et al.* (1988)은 12종류의 cytokine으로 대식세포를 활성화시킨 후 NC_2^- 및 H_2C_2 를 분비하는 능력을 알아보았는데 IFN- γ 만이 NC_2^- 및 H_2C_2 방출에 관여하며 H_2O_2 와 NC_2^- 을 생산하는 경로(pathway)는 서로 독립적이며 IFN- γ 와 TNF- α/β , IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ 와 LPS는 NC_2^- 방출에 있어 상호 협력한다고 하였다.

이번 실험에서는 대조 대식세포 및 여러 제조항 림포카인에 의해 자극된 대식세포가 NC_2^- 를 방출함을 알 수 있었는데 rIFN- γ 와 rIL-4에서는 세포독성과 NC_2^- 생산량이 비례되었고 rGM-CSF 및 rIL-2에서는 세포독성과 NC_2^- 생산과의 상관성은 없었다. rIL-2, rIFN- γ 각각에 의한 NC_2^- 보다 두 림포카인을 혼합

시켰을때 NO₂⁻ 생산량이 증가되었는데 두 림포카인으로 활성화된 군의 질트리코모나스 수가 rIFN-γ 단독 처리군보다 감소되어 있으므로 NO₂⁻ 생산량에 따라 질트리코모나스 증식억제가 비례하는 것으로 생각되나 림포카인과 연계하여 앞으로 연구되어야 할 것으로 생각되며, 이와 더불어 질트리코모나스에 대한 세포독성이 NO에 의존적인지 알아보기 위해서 NO 생산을 억제시키는 inhibitor를 배지에 넣어 세포독성을 알아야 할 것이다.

참 고 문 헌

- Adams, L.B., Hibbs, J.B. Jr, Taintor, R.R. and Krahenbuhl, J.L.(1990) Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immunol.*, **144**(7): 2725-2729.
- Belosevic, M., Davis, C.E., Meltzer, M.S. and Nacy, C.A.(1988) Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-γ for induction of resistance to infection. *J. Immunol.*, **141**(3):890-896.
- Belosevic, M., Finbloom, D.S., Meltzer, M.S. and Nacy, C.A.(1990) IL-2. A cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. *J. Immunol.*, **145**(3):831-839.
- Bout, D.T., Joseph, M., David, J.K. and Capron, A.R.(1981) *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by lymphokine-activated mouse macrophages. *J. Immunol.*, **27**(1):1-5.
- 張相湜, 崔東翺(1976) 대구지역의 질트리코모나스 검출. 경북의대잡지, **17**(1):76-81.
- 주종필, 기노석, 이정훈(1990) 뇨검사에 의한 질트리코모나스 감염을 조사. 전북의대논문집, **14**(1):39-43.
- Ding, A.H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J.(1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **141**(7):2407-2412.
- Diamond, L.S.(1968) Techniques for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoebae. *J. Parasitol.*, **54**:1047-1056.
- Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs, J.B. Jr and Nacy, C.A.(1989) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.*, **144**(1):278-283.
- Golden, J. M. and Tarleton, R.L.(1991) *Trypanosoma cruzi*: Cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp. Parasitol.*, **72**:391-402.
- Hageman, R.H. and Reed, A.J.(1980) Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol.*, **69**: 270.
- Hughes, H.P.A., Speer, C.A., Kyle, J.E. and Dubey, J.P.(1987) Activation of murine macrophages and a bovine monocyte cell line by bovine lymphokines to kill the intracellular pathogens *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, **55**(3): 784-791.
- James, S.L. and Glaven, J.(1989) Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. Immunol.*, **143**(12): 4208-4212.
- James, S.L. and Hibbs, J.B.(1990) The role of nitrogen oxides as effector molecules of parasite killing. *Parasitology Today*, **6**:303-306.
- James, S.L.(1991) The effector function of nitrogen oxides in host defense against parasites. *Exp. Parasitol.*, **73**:223-226.
- Landolfo, S., Mantovani, M.G., Martinetto, P. and Fortri, G.(1980) Natural cell-mediated cytotoxicity against *Trichomonas vaginalis* in the mouse. *J. Immunol.*, **124**(2):508-514.
- Lehn, M., Weiser, W.Y., Engelhorn, S., Gills, S. and Remold, H.G.(1989) IL-4 inhibits H₂O₂ production and anti-*Leishmanial* capacity of human cultured monocytes mediated by IFN-γ. *J. Immunol.*, **143**:3020-3024.
- Lepoivre, M., Boudbid, H. and Petit, J.F.(1989) Antiproliferative activity of γ-interferon combined with lipopolysaccharide on murine adenocarcinoma: Dependence on an L-arginine metabolism with production of nitrite and citrulline. *Cancer Res.*, **49**:1970.
- Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M.J. and Moncada, S.(1990) Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.*, **144** (12):4794-4797.
- Liew, F.Y. and Cox, F.E.G.(1991) Nonspecific defence mechanism: The role of nitric oxide. *Parasitology Today*, **7**:A16-A21.
- Mantovani, A., Polentarutti, N., Peri, G., Martinotti, G. and Landolfo, S.(1981) Cytotoxicity of human peripheral blood monocytes against *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Exp. Immunol.*, **46**:391-396.

- Oliver, M., Bertrand, S. and Tanner, C.E.(1989) Killing of *Leishmania donovani* by activated liver macrophages from resistant and susceptible strains of mice. *Int. J. Parasit.*, 19(4):377-383.
- Paul, W.E.(1989) *Fundamental Immunology*. 2nd ed. Raven Press Ltd, New York, pp.95-115.
- Roitt, I.M., Brostoff, J. and Male, D.K.(1989) *Immunology*. 2nd ed. Gower Medical Publishing. London, New York, pp.9. 8-9. 10, pp.17. 4-17. 6.
- 柳在淑, 安明姬, 閔得映(1990) 질트리코모나스(*Trichomonas vaginalis*)에 대한 마우스 복강대식세포의 세포독성. *기생충학잡지*, 28(2):85-89.
- Scott, P., Pearce, E., Cheever, A.W., Coffman, R.L. and Sher, A.(1989) Role of cytokines and CD4⁺ T cell subsets in the regulation of parasitic immunity and disease. *Immunological Reviews*, 112:161-182.
- 신수재, 류재숙, 신명현, 안명희, 민득영(1990) 질트리코모나스에 대한 마우스의 세포매개성 면역반응에 관한 연구. *한양의대학술지*, 10(1):237-244.
- Vincendeau, P. and Daulouede, S.(1991) Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves an L-arginine-dependent mechanism. *J. Immunol.*, 146(12):4338-4343.
- Wahl, S.M., McCartney-Francis, N., Hunt, D.A., Smith, P.D., Wahl, L.M. and Katona, I.M.(1988) Monocyte interleukin 2 receptor gene expression and interleukin 2 augmentation of microbicidal activity. *J. Immunol.*, 139(4):1342-1347.
- Wirth, J.J., Kierszenbaum, F. and Zlotnik, A.(1988) Effect of interleukin 4 on macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi*: Comparison with interferon- γ . *FASEB Journal*, 2(4): PA453.

==Abstract==

Cytotoxicity of lymphokine activated peritoneal macrophages against *Trichomonas vaginalis*

Kyong Yoon, Jae-Sook Ryu and Duk-Young Min

Department of Parasitology, College of Medicine

Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Trichomonas vaginalis is a parasitic flagellate in the urogenital tract of human. Innate cytotoxicity of macrophages against *T. vaginalis* has been recognized, but any report on the cytotoxicity of lymphokine-activated macrophages to *T. vaginalis* is not yet available. The present study aimed to elucidate the lymphokine-activated cell mediated cytotoxic effect against *T. vaginalis* by mouse peritoneal macrophages. Cytotoxicity was measured by counting the release of ³H-thymidine from prelabeled protozoa, and tested in U-bottom microtiter plates. Nitrite concentration in culture supernatants was measured by standard Griess reaction.

The results obtained are as follows:

1. The cytotoxicity of macrophages was increased by addition of rIL-2 or rIFN- γ .
2. Cytotoxicity of macrophages was reduced by addition of rIL-4 to rGM-CSF, rIL-2 or rIFN- γ .
3. Crude lymphokine mixed with anti-IL-2 decreased the cytotoxicity of macrophages.
4. In case of macrophages cultured with rIFN- γ or rIL-4, the concentration of nitrite was related with cytotoxicity of macrophages against *T. vaginalis*, but the cytotoxicity of macrophages cultured with rIL-2 and rIFN- γ was decreased in spite of its high production of nitrite.

From the results obtained, it is assumed that rIL-2 and rIFN- γ enhance the cytotoxicity of macrophages while rIL-4 inhibits the cytotoxicity against *T. vaginalis*, and that the production of nitrite does not relate with the cytotoxicity of macrophages, but nitric oxide may play a role as an inhibitory factor on the proliferation of *T. vaginalis*.