

## Expression on *Echinostoma hortense* Infection Manifestation on the Cytokine of the Splenocytes of BALB/c and C3H/HeN Mice

Yong-Suk Ryang<sup>†</sup>, Yoon-Kyung Cho, Jee-Aee IM, Kyu-Je Lee<sup>1</sup>, Insik Kim<sup>2</sup> and Ho-Joong Sung

Department of Biomedical Laboratory Science and Institute of Health Science, College of Health Science, Yonsei University, Kangwon-Do 220-710, <sup>1</sup>Department of Parasitology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Kangwon-Do 220-701, Korea, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory Science, School of Medicine, Eulji University, DaeJeon, Korea 301-714

This experiment was performed to examine the *in vitro* and *in vivo* affects of the two different haplotype strains of mice, BALB/c and C3H/HeN infected with *Echinostoma hortense*, and the manifestation of the profiles of cytokine in the splenocytes. In the *in vitro* experiment, the two mice's splenocytes were divided and stimulated with antigen of crude extracts and the antigen of excretory and secretory products of an adult worm and the manifestation of cytokine mRNA was verified with RT-PCR. As a result, the two different strains of mice both strongly manifested the Th2 cytokine rather than the Th1 cytokine and in the case of the Th2 cytokine, the BALB/c mice manifested more strongly than the C3H/HeN mice. In the experiment using the ELISA method, the protein cytokine manifestation had the same result as the mRNA experiment. In the *in vivo* experiment, the mice was infected via oral route with the metacercaria of the *Echinostoma hortense* and the manifestation of cytokine was verified by RT-PCR and ELISA and the results were the same as the *in vitro* experiment. Therefore, in the two strains of BALB/c and C3H/HeN, the C3H/HeN showed a higher susceptibility to the *Echinostoma hortense*.

**Key Words:** *Echinostoma hortense*, Mice spleen cell, Cytokine, RT-PCR

### 서 론

Cytokine의 면역반응은 숙주가 유도하는 양상에 따라 T helper 1 (Th1) 형과 T helper 2 (Th2) 형으로 나눌 수 있다. Th1 형은 proinflammatory cytokine으로서 IL-12, IL-2, Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), tumor necrosis factor-beta (TNF- $\beta$ ) 등을 들 수 있으며 (Schmitt et al., 1994; Wong et al., 2001), 이들은 지연성 과민반응 (delayed hypersensitivity)과 세포독성 T세포 (cytotoxic T cell) 반응 그리고 대식세포의 활성화 등과 같은 세포매개성면역 (cell-mediated immunity; CMI)에 관여한다. Th2 형은 일반적으로 호산구와 같은 과립구 등을 활성화하여 IgE 항체 생산을 촉진하는 즉시형과민성반응 (immediate-type hypersensitivity)을

유발하며, 여기에는 IL-4, IL-5 및 IL-13 등이 관여된다고 보고되고 있다 (Blanchard et al., 1996; George-Pinchuk et al., 1996; Ishihara et al., 1999).

Th2 세포가 분비하는 cytokine IL-4는 CD4 T<sup>+</sup> 세포와 활성화된 비만세포에 의해 만들어지는 약 20 kDa의 단백질로서 B 세포 성장인자이다. 그리고 B 세포 면역글로부린 class switch에 관여하는 분화인자로 작용하며 IgE의 Fc에 대한 수용체 발현을 유도한다 (Abbas et al., 1991; Joseph et al., 1991). 또한 세포매개성면역의 가장 중요한 작용으로서, CD4+ T 세포, 비만세포, 대식세포 및 Th2 세포의 활성화 인자로 작용하며, IgE를 합성하여 항체반응을 시작하고 조절하는 역할을 담당한다. Tepper et al., (1990)은 IL-4 농도와 IgE 항체 반응과는 비례한다고 보고하였고, Rihet et al., (1991)은 IL-4 유전자가 부족한 쥐는 IgE 항체반응을 하지 못한다고 보고하였다. IL-5는 활성화된 CD4+ T 림프구와 비만세포에서 합성되며, 호산구의 증식과 분화를 유도하고 성숙 호산구를 활성화시킨다. 그리고 IL-2 및 IL-4와 함께 B 림프구 증식과 분화에 관련하며, T 림프구의 활성화 호산구성 질환에서 특히 주요하게 관여한다고 알려져 있다 (Yamaguchi et al., 1988; Leckie et al., 2000; Ishihara et al., 2001; Togawa et al., 2001;

\*논문 접수: 2004년 8월 21일  
수정재접수: 2004년 9월 8일

<sup>†</sup>Corresponding author: Yong-Suk Ryang, Department of Biomedical Laboratory Science and Institute of Health Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju-city, Kangwon-do, Korea 220-710  
Tel: 033-760-2422, Fax: 033-763-5224  
e-mail: ryang@eco.yonsei.ac.kr

Tsuda et al., 2001).

기생충 감염 및 알레르기성 질환 환자에서 호산구의 역할이 연구 보고되고 있으며, 조직 내에서 호산구의 침윤 현상 또한 보고되고 있다 (Moqbel and Pritchard, 1990; Gounni et al., 1994; Stern et al., 1992; Lukacs et al., 1994; Dombrowicz et al., 2001).

기생충 감염 시에 T 세포에서 분비하는 cytokine 반응에 대한 연구 보고는 다음과 같다. 즉, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* 그리고 *Toxoplasma gondii*와 같은 세포 내 기생충은 대부분 Th1 형의 발현이 우세하게 나타내며 (Skeiky et al., 1995; Camargo et al., 1997; Dragana et al., 2001; Macrovinich et al., 2001), 유통류와 같은 세포 외 기생충은 Th2 형의 발현이 우세하게 반응한다고 보고 하였다 (Finkelman et al., 2000, Jankovic et al., 2000; Dragana et al., 2001). Inbred 마우스 숙주를 이용한 연구 결과에 의하면, 위장관기생충 (gastro intestinal nematodes)에 감염된 마우스에서는 대부분 Th2 형의 cytokine이 생성되었고 (Golehill et al., 1997), 호산구와 비만 세포의 증가와 IgE의 상승을 보고하였다 (Wakelin, 1997; Garside et al., 2000). Cytokine 작용은 기생충의 종류와 숙주의 유전학적인 배경에 따라서 다른 양상을 보이게 된다 (Behnke and Wakelin, 1977; Deelder et al., 1978; Chai, 1979; Storey et al., 1985; Kroeze and Tanner, 1987; Else and Wakelin, 1988; Wakelin et al., 1993; Nawa et al., 1994), 기생충 감염에 대한 면역학적 반응 역시 마우스의 품종에 따라 다르게 나타난다 (Ishih and Nishimura, 1997). 즉, 특정항원에 대한 면역반응이 잘 유도되는 숙주의 개체 (high responder)와 면역반응이 잘 유도되지 않는 개체 (low responder)의 주된 원인이, 면역반응 유전자의 차이에서 비롯된다고 보고하고 있다 (Geoffery et al., 1990). 이를테면, 17번 염색체에 위치하는 마우스의 histocompatibility-2 (H-2)는 세포독성 T 세포와 helper T 세포의 작용을 매개한다고 보고하면서 (Louis et al., 2001), 그러나 같은 haplotype을 가진 마우스일지라도 품종이 달라지면 다른 면역 특성을 나타낸다고 보고하였다.

본 연구에서는 호르텐스극구흡충이 숙주 비장세포에서 나타나는 면역기전의 특성을 알아보기 위하여, T helper cell (Th1 및 Th2)의 cytokine 분비 및 활성 여부와 mRNA 및 단백질 발현 여부를 비교 연구 하였다. 이에 대한 실험은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험으로 하였으며, 또한 실험동물을 품종에 따라서 나타나는 특성의 차이를 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 호르텐스극구흡충 피낭유충 분리와 감염

섬진강 상류지역에서 포획한 미꾸리 (*Misgurnus anguillicaudatus*)에 감염된 호르텐스극구흡충 피낭유충 30개를

BALB/c와 C3H/HeN 마우스에게 경구 감염시켰다. 감염 4주일 후 마우스를 희생시키고 장관에 기생한 호르텐스극구흡충 성충을 분리하여 실험에 사용하였다.

### 2. 마우스 비장세포 분리 및 배양

대한실험동물센터에서 공급받은 6주령 된 BALB/c와 C3H/HeN 암컷 마우스에서 비장세포를 적출하여 Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM; Gibco BRL, Hercules, CA, U. S. A.) 성장 배지에서 5 ml 주사기 (Dongshin Medi-tech, Seoul, Korea)로 perfusion을 실시하였다. 비장세포를 분리한 후 적혈구 lysis 용액 (Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.)을 사용하여 적혈구를 제거하였고, 1,200 rpm, 5분 동안 원심분리를 실시하였다. 원심분리된 비장세포는 chamber를 이용하여 세포 수를 측정하였다. 측정된 세포는 10% Fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Hercules, CA, U. S. A.)이 첨가된 DMEM 배지에 분주하고, 24시간 동안 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> 항온항습기 (NAPCO 6001, Winchester, VA, U. S. A.)에서 배양하였다.

### 3. 호르텐스극구흡충 총체 조항원 및 분비배설항원 제조

총체의 조항원의 제조는 호르텐스극구흡충 성충을 0.01 M phosphate buffered saline (PBS; Gibco BRL, Hercules, CA, U. S. A., pH 7.2)에서 3회 이상 수세한 후 조직 마쇄기로 총체를 마쇄한 뒤, ultrasonicator 100 watt에서 30초간 처리하고, 냉각시키는 과정을 5회 반복하여 균질화시켰다. 균질화 된 검체를 4°C에서 하루 동안 방치한 후 15,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 얻었으며 이를 정량하여 조항원으로 사용하였다. 조항원의 단백질 정량은 Lowry 방법 (Lowry et al., 1951)에 따라 측정하였다. 분비배설항원의 제조는 실험동물에서 얻어진 총체를 100 ml의 0.01 M sodium phosphate buffer에 넣고 37°C 항온항습기 (JEIO TECH, Seoul, Korea)에서 12시간 배설시켰다. 이 분비배설액을 4°C, 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4)에서 24시간 동안 투석한 뒤, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다.

### 4. 조항원 및 분비배설항원에 대한 세포독성 확인

Trypan blue exclusion법을 통해 확인된 생존 세포를 96 well microplate에  $5 \times 10^6$  cells/ $\mu$ l 씩 분주하였다. 조항원과 분비배설항원의 농도를 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.7 mg/ml, 1 mg/ml이 되게 DMEM 성장 배지로 희석한 뒤 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> 항온항습기에서 24시간 동안 배양하였다. 다음으로 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide]용액 (1 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.) 50  $\mu$ l를 각 well에 첨가하여 4시간 동안 항온항습기에 다시 배양한 후, 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리한 뒤 PBS

로 세척하여 DMSO (Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.)를 150 µl 씩 분주하였다. 그리고 540 nm에서 ELISA Reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, U. S. A.)로 흡광도를 측정하였으며, 각각 3번의 실험을 통한 값의 평균을 구해 이를 실험값으로 하였다. 세포독성능의 환산은 대조군의 흡광도에 대한 조항 원과 분비배설항원을 농도별로 처리한 흡광도를 % survival 로 하였다.

### 5. Total RNA 분리

조항원과 분비배설항원으로 자극한 숙주의 비장세포와 경구 감염시킨 숙주의 비장세포를 RNA 분리용액 (Intron, Seoul, Korea) 1 ml에 처리한 뒤 chloroform : isoamylalcohol (Sigma, St. Louis, MO, U. S. A., 24:1) 200 µl에 혼합하고 4°C에서 13,000 rpm 15분 동안 원심분리한 후 상층액 400 µl을 취하였다. 상층액과 isopropanol (Merck, Damstadt, Germany) 400 µl를 혼합한 후 다시 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리를 하여 상층액을 제거하였다. 그리고 멸균한 0.01% DEPC (Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.) D.D.W.로 희석된 70% alcohol 400 µl를 넣은 뒤 13,000 rpm 5분 동안 원심분리를 실시하여 상층액을 완전히 제거하였다. 분리된 total RNA는 20 µl의 멸균된 0.01% DEPC D.D.W.로 용해시킨 뒤 -70°C에서 보관하였다.

분리된 total RNA의 확인은 TBE buffer (Tris-borate / EDTA electrophoresis buffer, pH 8.0)를 사용하였으며, RNA sample 10 µl와 6 X loading buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, U. S. A.) 4 µl를 혼합하여 100 V, 1시간 동안 전기영동을 실시하였으며 1% agarose gel (Intron, Seoul, Korea)을 사용하였다. 전기영동 gel은 자외선 광원 (Vilert-Lourmat, Mame La Valle, France) 위에 두고 Polaroid film이 들어 있는 Photo-Documentation Camera (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U. S. A.) 254 nm에서 촬영하였다.

### 6. RT-PCR을 이용한 cytokine mRNA 발현

cDNA의 합성은 AccuPower RT-PreMix (Bioneer, Seoul, Korea)을 사용하였고, 57°C에서 10분, 42°C에서 60분, 94°C에서 5분 간 실시하여 합성하였다. PCR 반응은 합성된 cDNA와 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP (Intron, Seoul, Korea)를 4 µl 넣어서 사용하였다. 그리고 10 X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, Intron, Seoul, Korea) 5 µl, 25 mM MgCl (Intron, Seoul, Korea) 5 µl, primer set 20 pmole/µl (Table 1)를 각각 5 µl 씩 첨가하였으며, Taq polymerase 0.025 U (Intron, Seoul, Korea)를 첨가하였다. 또한 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 50 µl가 되도록 하여 Thermal cycler (MJ Reaserch, South San Francisco, CA, U. S. A.)에서 증폭하였다. PCR 생성물의 확인은 1.5% agarose gel을 이

**Table 1.** DNA sequence of the primers used in the PCR and size of the amplified products

Target mRNA	Primer sequence (5' → 3')	Length (bp)
β-actin	AGGCTGTGCTGTCCCTGTATCC	395
	ACCCAAGAAGGAAGGCTGGAAA	
IFN-γ1	TGGATATCTGGAGGAAGTGG	310
	CGACTCCTTTTCCGCTTCCT	
IL-122	CACTCACATCTGCTGCTC	240
	GGCAGCCACTGAGTCT	
IL-43	TCTCTAGATCATGGGCATTTTGAAGGAGGT C	306
	TGCATGATGCTCTTTAGGCTTTGG	
IL-5	ATGATCGTGCCCTCTGTGCTGGAGC	243
	CTGTTTTCTGGAGTAACTGGG G	

1: Dijkema et al., (1986); 2: Catherine et al., (1998); 3: Wang et al., (1998)

용하였고, 100 V로 전기영동하여 cytokine의 발현을 확인하였으며, 전기영동이 끝난 gel은 자외선 광원 (Vilert-Lourmat, Mame La Valle, France), Photo-Documentation Camera (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U. S. A.), 254 nm에서 촬영하였다.

### 7. ELISA를 이용한 cytokine 발현

96 well polystyrene microplate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 sandwich 방법과 indirect 방법으로 각각 항원과 sample을 PBS에 희석하여 4°C에서 24시간 반응시킨 다음 coating하는 과정을 거쳤으며, horseradish peroxidase-rabbit anti-goat IgG (Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.)와 ortho-phenylenediamine (OPD, Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.) 기질액을 사용하였다. 그리고 ELISA 광량계 (Molecular Device, Sunnyvale, CA, U. S. A.), 파장 490, 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cytokine 대조 well의 경우 각각의 cytokine (R&D system, Minneapolis, MN, U. S. A.)을 1 ng/100 µl에서 18.75 pg/100 µl로 단계별 희석하여 측정하였다.

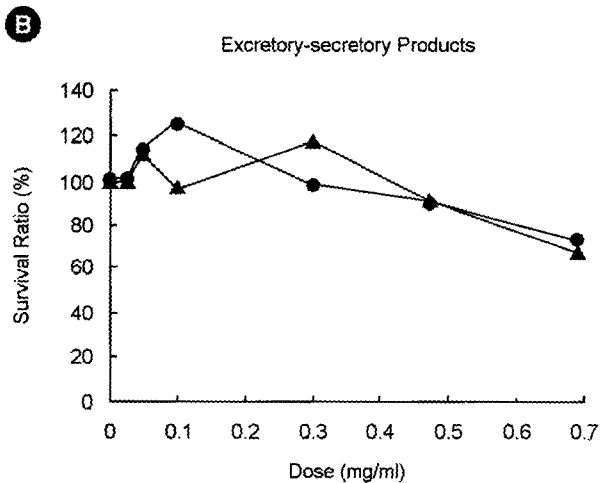
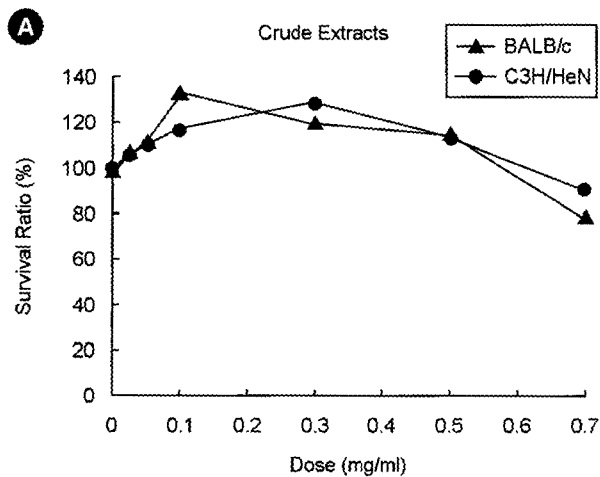
### 8. 통계적 분석

실험결과와 통계적 분석은 분산분석 (repeated measure ANOVA)을 이용하여 처리하였다.

## 결 과

### 1. 호르텐스극구흡충 조항원 및 분비배설항원에 대한 세포독성

호르텐스극구흡충의 조항원 및 분비배설항원이 각 마우스 비장세포에 미치는 독성에 대해 알아보기 위해 MTT법으로 조사한 결과는 다음과 같다. 조항원의 경우 BALB/c 마우스는 0.5 mg/ml, C3H/HeN 마우스는 0.3 mg/ml까지 세포독성이

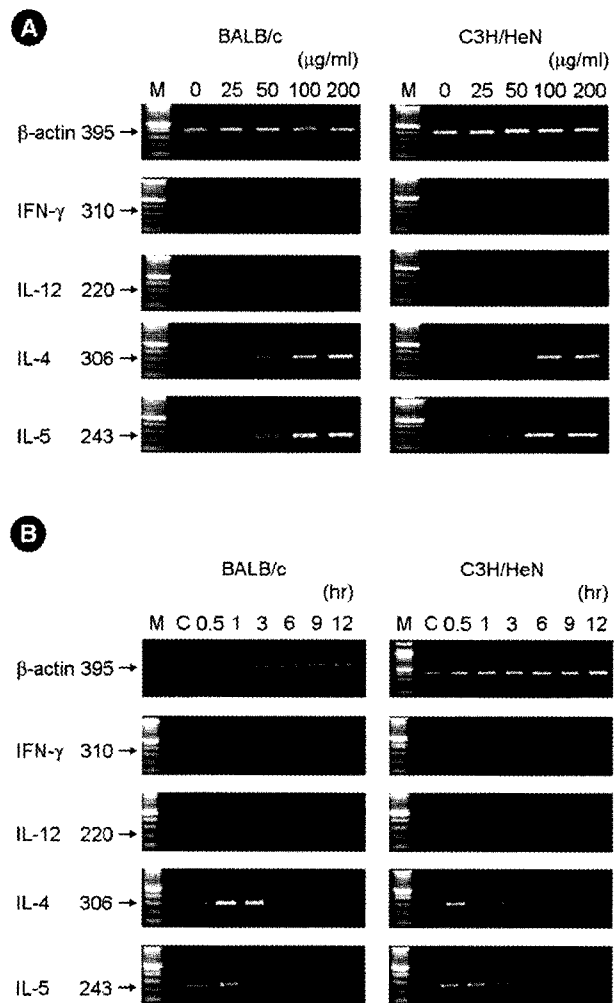


**Fig. 1.** Cytotoxicity of *E. hortense* crude extracts (A) and excretory-secretory products (B) to BALB/c and C3H/HeN mouse splenocytes.

관찰되지 않았다 (Fig. 1A). 분비배설항원의 경우에는 BALB/c 마우스는 0.3 mg/ml, C3H/HeN 마우스는 0.1 mg/ml까지 세포 독성이 관찰되지 않았다 (Fig. 1B).

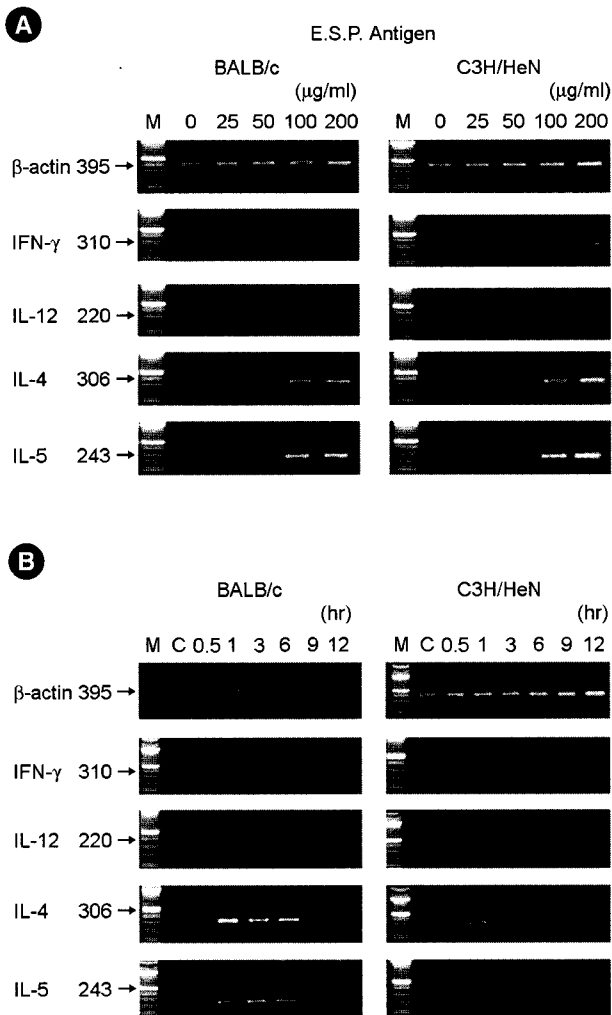
## 2. RT-PCR을 이용한 호르텐스극구흡충 조항원 자극에 의한 cytokine mRNA 발현

10% FBS를 첨가한 DMEM 성장 배지로 24시간 배양한 BALB/c와 C3H/HeN 마우스 비장세포 ( $1 \times 10^6$  cells/wells)에 조항원을 각각 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 250  $\mu$ g/ml, 500  $\mu$ g/ml 농도별로 자극하고, 1시간 후 total RNA 분리하여 RT-PCR을 실시한 결과는 다음과 같다. IFN- $\gamma$ 와 IL-12 cytokine은 BALB/c, C3H/HeN 마우스 모두 100  $\mu$ g/ml에서 발현되기 시작하였으며, IL-4와 IL-5는 두 품종 마우스 모두 50  $\mu$ g/ml에서 발현되기 시작하였다 (Fig. 2A). 시간별 (30분, 1, 3, 6, 9,



**Fig. 2.** Profiles of Th1 and Th2 cytokine mRNA expression in BALB/c and C3H/HeN splenocytes after *in vitro* stimulation of various amounts (A) and time (B) of *E. hortense* crude extracts.

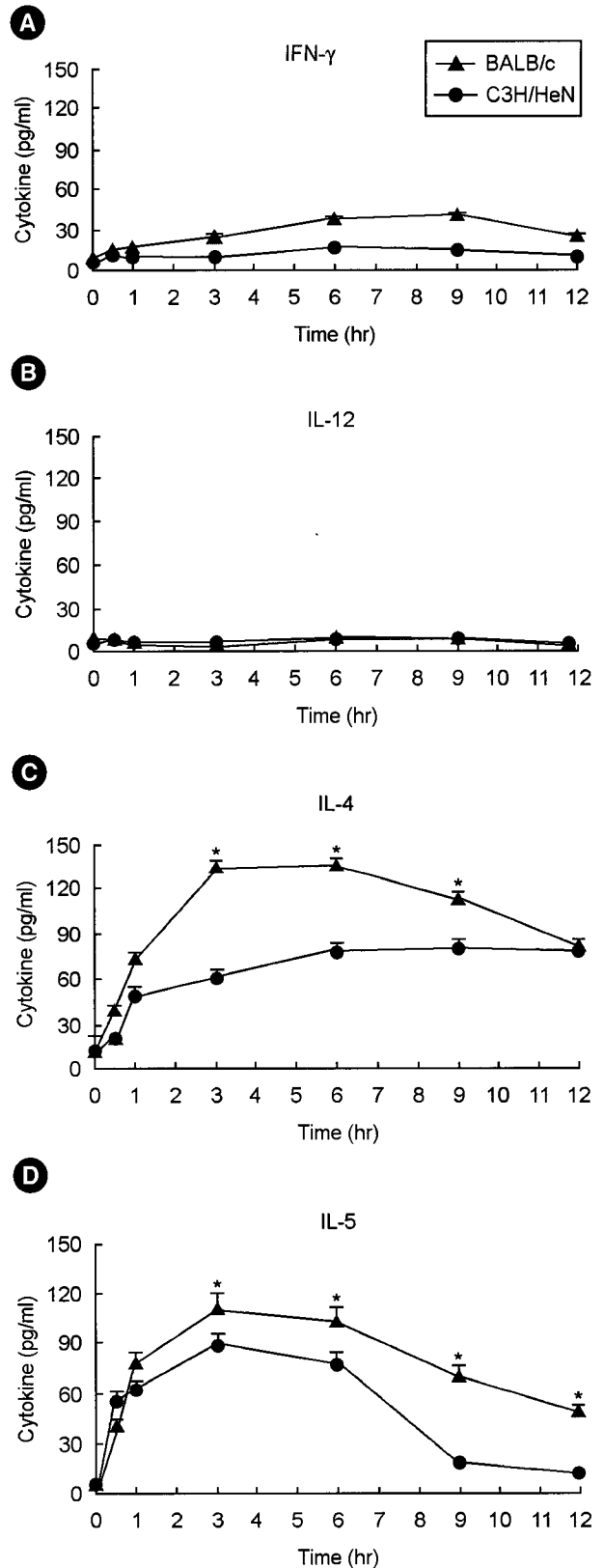
12시간)로 각 cytokine의 mRNA 발현 정도를 관찰해본 결과, BALB/c 마우스의 경우 IFN- $\gamma$ 는 30분부터 12시간까지, IL-12는 30분부터 3시간까지 약하게 발현되다가 감소되었으나, IL-4는 30분부터 6시간까지, IL-5는 30분부터 12시간까지 발현되었으며, 이것은 IFN- $\gamma$ 나 IL-12보다 현저하게 강하게 발현되는 성적이었다. C3H/HeN 마우스의 경우 IFN- $\gamma$ 는 1시간부터 6시간까지 발현되었으나 약한 반응을 보였고, IL-12는 거의 발현되지 않았으며, IL-4와 IL-5는 모두 30분에 발현되기 시작하여 6시간, 9시간까지 발현되어 강하게 발현되었다. 그리고 마우스 품종별로 발현 정도를 비교해 본 결과, IFN- $\gamma$ 와 IL-12는 별 차이가 없었으나 IL-4와 IL-5 경우에 BALB/c 마우스에서 보다 C3H/HeN 마우스에서 더 강하게 발현되었다 (Fig. 2B).



**Fig. 3.** Profiles of Th1 and Th2 cytokine mRNA expression in BALB/c and C3H/HeN splenocytes after *in vitro* stimulation of various amounts (A) and time (B) of *E. hortense* excretory-secretory products.

### 3. RT-PCR을 이용한 호르텐스극구흡충 분비배설항원 자극에 의한 cytokine mRNA 발현

10% FBS를 첨가한 DMEM 성장 배지로 24시간 배양한 BALB/c와 C3H/HeN 마우스 비장세포 ( $1 \times 10^6$  cells/wells)에 분비배설항원을 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml의 농도별로 각각 자극하고 RT-PCR을 실시한 결과는 다음과 같다. 즉, IFN- $\gamma$ , IL-12의 경우 BALB/c, C3H/HeN 마우스 모두 100 µg/ml에서 발현되기 시작하였으며, IL-4와 IL-5는 모두 50 µg/ml에서 발현되기 시작하였다 (Fig. 3A). 시간별로 (30분, 1, 3, 6, 9, 12시간) 각 cytokine의 mRNA 발현 정도를 관찰해본 결과, BALB/c 마우스에서는 IFN- $\gamma$ 는 30분부터 6시간까지 발현되었으나 약한 반응을 보였고, IL-12는 발현되지 않았으며, IL-4는 30분부터 9시간까지 그리고 IL-5



**Fig. 4.** Profiles of IFN- $\gamma$  (A), IL-12 (B), IL-4 (C) and IL-5 (D) release in the supernatants of BALB/c and C3H/HeN splenocytes *in vitro* stimulation of *E. hortense* crude extracts (100 µg/ml).

는 30분부터 12시간까지 발현되었다. C3H/HeN 마우스의 경우에도 IFN- $\gamma$ 는 30분부터 6시간까지 발현되었으나 약한 반응이었고, IL-12는 거의 발현되지 않았으며, IL-4와 IL-5는 모두 30분에 발현되기 시작하여 9시간과 6시간까지 각각 발현되었다. 마우스 품종 별로 mRNA cytokine 발현 정도를 비교해 본 결과 조항원의 결과와 같은 성적을 보였다 (Fig. 3B).

4. 호르텐스극구흡충 조항원 자극에서 ELISA를 이용한 cytokine 발현

Cytokine 발현의 차이를 품종별로 확인한 결과는 다음과 같다. 즉, IFN- $\gamma$ 의 경우 BALB/c 마우스는 9시간에 42 pg/ml, C3H/HeN 마우스는 6시간에 17 pg/ml로 가장 높은 발현이 관찰되었으며 품종 별 차이는 없었다 ( $P>0.05$  & Fig. 4A). IL-12에서도 마우스 품종 별 차이가 없었고 ( $P>0.05$ ), 발현 농도가 매우 낮았다 (Fig. 4B). IL-4의 경우에는 BALB/c 마우스의 경우 30분부터 생산되기 시작하여 6시간에 136 pg/ml, C3H/HeN 마우스의 경우 9시간에 81 pg/ml로 가장 높은 발현이 관찰되었으며, 두 품종 별에서 유의한 차이를 확인할 수 있었다 ( $P<0.01$  & Fig. 4C). IL-5의 경우에서도 BALB/c 마우스는 3시간에 111 pg/ml로, C3H/HeN 마우스의 3시간에 88 pg/ml로 높은 발현농도를 보였으며, 성적은 IL-4에서보다 낮았으나 품종 별로 유의한 차이가 관찰되었다 ( $P<0.05$  & Fig. 4D).

5. 호르텐스극구흡충 분비배설항원 자극시 ELISA를 이용한 cytokine 발현

IFN- $\gamma$ 와 IL-12의 경우 낮은 농도로 발현되었고, 품종 별로는 유의한 차이가 없었다 ( $P>0.05$  & Fig. 5A, B). IL-4의 경우 BALB/c 마우스에서는 자극 30분부터 생산되기 시작하여 3시간에 126 pg/ml로 발현되었고, C3H/HeN 마우스는 3시간에 69 pg/ml로 가장 높은 발현이 관찰되어 BALB/c 마우스에서 보다 높은 농도로 발현되어 두 품종 별에서 유의한 차이를 확인할 수 있었는데 ( $P<0.01$ ), 특히 6시간에서의 발현 차이가 가장 높았다 ( $P<0.01$  & Fig. 5C). IL-5의 경우 BALB/c 마우스는 1시간에서 120 pg/ml, C3H/HeN 마우스는 3시간에서 72 pg/ml로 가장 높은 발현농도를 보였으며 ( $P<0.01$ ), IL-4에서와 같이 BALB/c 마우스에서 보다 C3H/HeN 마우스가 더 높은 농도로 발현되어 두 품종 별에서 유의한 차이를 확인할 수 있었다 ( $P<0.05$  & Fig. 5D). 두 마우스 모두 조항원 자극 시에 나타난 결과와 같은 성적으로 보여, Th2 cytokine인 IL-4와 IL-5 cytokine의 발현이 더 높게 나타남을 관찰하였다.

6. 호르텐스극구흡충 피낭유충 감염시 RT-PCR을 이용한 cytokine mRNA 발현 확인

1주일부터 8주일까지 매주일 마다 마우스를 희생시키고,

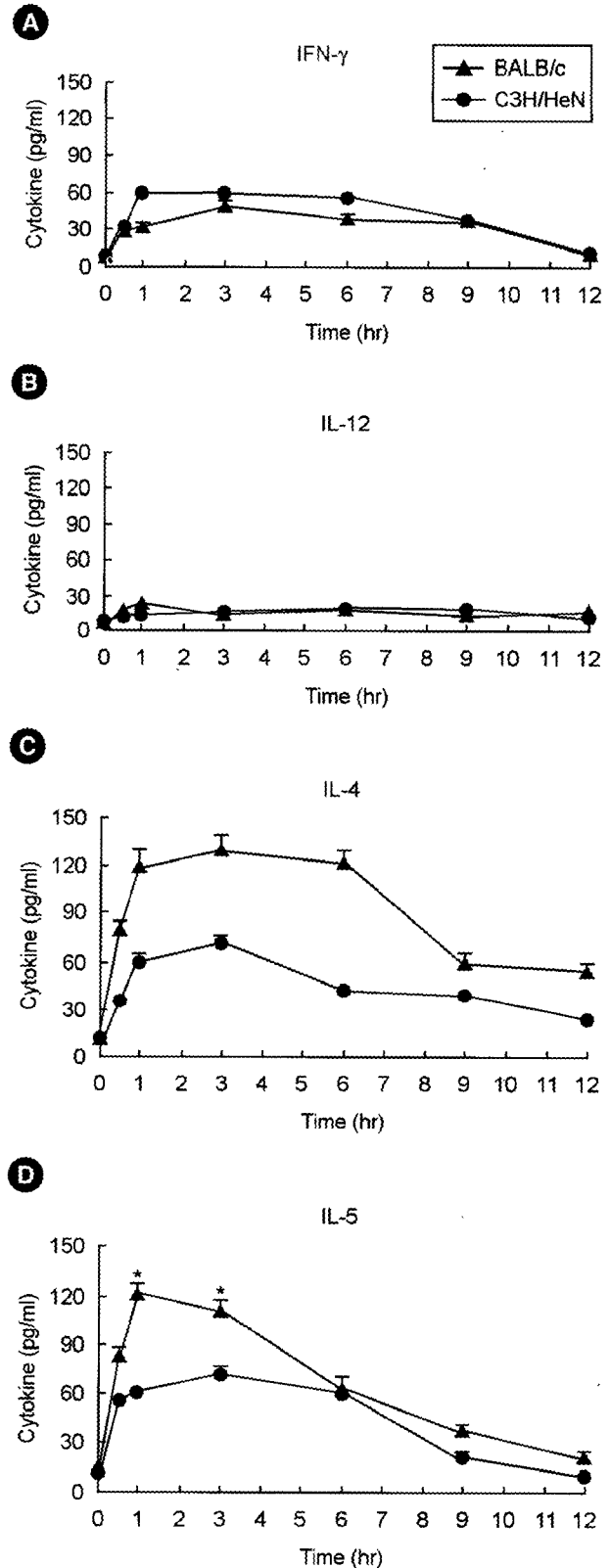
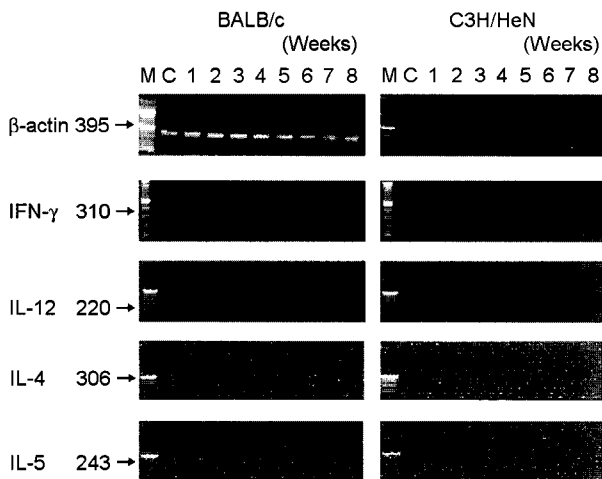


Fig. 5. Profiles of IFN- $\gamma$  (A), IL-12 (B), IL-4 (C) and IL-5 (D) release in the supernatants of BALB/c and C3H/HeN splenocytes *in vitro* stimulation of *E. hortense* excretory-secretory products (100  $\mu$ g/ml).

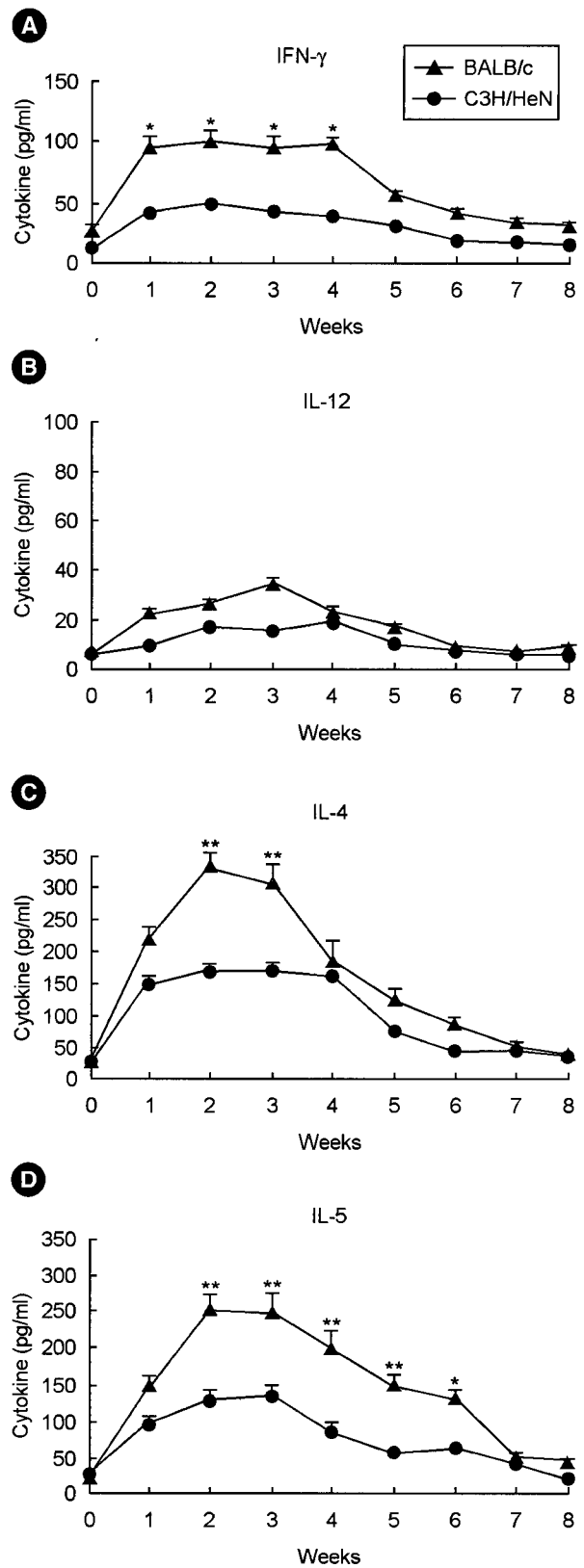


**Fig. 6.** Profiles of mRNA expression in obtained from *E. hortense* infected BALB/c and C3H/HeN mouse.

비장세포를 분리하여 RT-PCR법으로 cytokine mRNA 발현 양상을 관찰한 결과 (Fig. 6), IFN- $\gamma$ 의 경우 BALB/c 마우스는 1주일부터 8주일까지, C3H/HeN 마우스는 1주일부터 6주일까지 발현되었으나, 두 마우스 모두 발현 정도가 낮았고 품종별로 차이를 보이지 않았다. IL-12 역시 두 마우스 모두 1주일부터 4주일까지 발현되다 감소하였고, 반응강도는 IFN- $\gamma$ 보다 미약하게 관찰되었다. IL-4와 IL-5의 경우 BALB/c, C3H/HeN 마우스 모두 1주일에서 4주일까지 발현되었으며, 특히 2~3주일에 강한 발현이 관찰되었고, C3H/HeN 마우스에서 보다 BALB/c 마우스에서 발현이 더 강하게 관찰되었다. mRNA cytokine의 발현 양상은 두 마우스 모두 Th1 형인 IFN- $\gamma$ 와 IL-12보다 Th2 형인 IL-4, IL-5의 발현이 더 뚜렷하게 발현하는 것을 관찰할 수 있었고, 이 결과는 조항원과 분비배설항원으로 자극한 후 발현된 결과와 같은 양상을 보임을 알 수 있었다.

#### 7. 호르텐스극구흡충 피낭유충 감염시 ELISA를 이용한 cytokine 발현

1주일부터 8주일까지 매주 마우스의 안와정맥에서 혈액을 채취하여 ELISA법으로 cytokine 발현 차이를 비교하였다. 즉, IFN- $\gamma$ 의 경우 BALB/c 마우스는 1주일부터 증가하기 시작하여 4주일까지 비슷한 농도 (95~100 pg/ml)를 유지하다가 5주일부터 감소하기 시작하였고, C3H/HeN 마우스는 2주일 (48 pg/ml)까지 증가하다가 점차 감소하였으며, 이 결과는 BALB/c 마우스에서 보다 낮은 농도를 나타내는 것으로 품종 별에서 유의한 차이가 관찰되었다 ( $P < 0.05$  & Fig. 7A). IL-12의 경우는 발현농도가 매우 낮았고, 두 마우스 품종 별에서 차이가 없었다 ( $P > 0.05$  & Fig. 7B). IL-4의 경우 BALB/c 마우스는 1주일부터 증가하기 시작하여 2주일째에 가장 높



**Fig. 7.** Profiles of IFN- $\gamma$  (A), IL-12 (B), IL-4 (C) and IL-5 (D) release in the serum of BALB/c and C3H/HeN mouse experimentally infected with *E. hortense* metacercaria.

은 농도 (330 pg/ml)로 증가하다가 4주일 이후 급격하게 감소하였다. 그리고 C3H/HeN 마우스는 1주일부터 증가하여 4주일까지 일정한 농도 (171~175 pg/ml)를 유지하다가 이후 감소되었는데, 이 cytokine의 발현 결과는 마우스 품종 별에서 가장 유의한 차이가 관찰되었다 ( $P < 0.01$  & Fig. 7C). IL-5의 경우에서도 BALB/c 마우스는 1주일부터 증가하기 시작해서 2주일 (247 pg/ml)까지 발현농도가 증가하다가 3주일 이후 감소하기 시작하였고, C3H/HeN 마우스는 3주일까지 증가하다가 (132 pg/ml) 4주일 이후 감소하여 품종 별에서 유의한 차이가 관찰되었다 ( $P < 0.05$  & Fig. 7D). 이상의 결과는 조항원과 분비배설항원으로 자극한 후 생산된 cytokine의 결과와 일치하였고, RT-PCR법으로 확인한 cytokine mRNA 발현과도 일치하였다.

## 고 찰

본 연구에서 호르텐스극구흡충을 BALB/c와 C3H/HeN 마우스에 실험적으로 감염시킨 후 T helper cell (Th1 및 Th2) cytokine의 분비 및 활성 양상을 조사해 보았다. Cytokine 발현 양상을 RT-PCR법 및 ELISA법을 관찰한 결과 두 품종의 마우스 모두에서 Th1 cytokine보다 Th2 cytokine에서 우세하게 나타났다. 이와 관련된 다른 연구 보고에 의하면, 기생충 종류에 따라서 차이를 보이고 있다. 즉, 숙주에 감염된 후 발현되는 cytokine 반응은 세포 내에 기생하는 기생충 (intracellular parasites)과 세포 외에 기생하는 기생충 (extracellular parasites)의 면역반응이 다르게 반응하는 것으로 보고되고 있다 (Dragana et al., 2001). 세포 내에 기생하는 기생충으로 인한 감염 때에는 주로 Th1 형의 cytokine이 우세하게 발현하였고 (Skeiky et al., 1995; Camargo et al., 1997; Dragana et al., 2001; Marovich et al., 2001), 세포 외에 기생하는 기생충 감염 때에는 주로 Th2 형의 cytokine이 우세하게 발현한다고 보고하였다 (Finkelman et al., 2000; Jankovic et al., 2000; Dragana et al., 2001). 세포 내 기생 기생충인 *Leishmania major*의 경우 감염 숙주에 의한 cytokine 발현을 관찰한 결과 Th1 cytokine (IL-12, IFN- $\gamma$ )이 우세하게 나타났다고 보고하였다 (Reiner, 1982; Scott et al., 1988; Lakashmi et al., 1996; Soares et al., 1997). 또한 Jian et al., (1996)에 의하면 *Leishmania* spp.에 감염된 CB6 F1 마우스에게 IL-12를 투여한 결과 총체 수도 감소하였고 lesion의 크기도 줄어들었음을 보고하면서, Th1 cytokine이 치료에 결정적인 역할을 한다고 보고하였다. 반면, 세포 외 기생 기생충에 관한 연구에서 Catherin et al., (1998)에 의하면 *Schistosoma mansoni*를 흰쥐에게 감염시킨 결과 예방면역 (protective immunity)에서는 IFN- $\gamma$ 나 활성화된 대식세포 등이 영향을 미치며, 호산구나 IgE 등은 관련이 적었으며, 반면 이차면역 (repeated immunity)에서는 IL-4와 IL-5

발현이 증가하였다고 보고하였으며, 특히 IL-2가 IL-5 발현에 중요하게 영향을 미친다고 하였다. 그리고 *Trichuris muris* 감염의 경우 초기단계에서는 Th1 보다 Th2가 더 밀접한 관련이 있다고 하였다 (Sher, 1988; Caulada et al., 1991; Pearce and Sher, 1991; Yamashita and Boros, 1992). 이와 같은 연구보고와 비교해 볼 때 호르텐스극구흡충은 세포 외 기생충에서 나타나는 cytokine 면역반응과 유사한 결과를 보이고 있다. 즉 호르텐스극구흡충은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 BALB/c와 C3H/HeN 마우스 모두 Th2 cytokine 발현이 Th1 cytokine에서 보다 강하게 나타났으며, 특히 Th2 cytokine IL-4와 IL-5에서 더욱 강하게 나타나 *Schistosoma mansoni*, *Trichuris muris* 등과 같은 양상을 보이고 있다. Cytokine의 면역반응은 림프구의 기능에서 기생충 반응과 관련하여 매우 중요한 역할을 하는데, IgE 생산과 호산구 활성화를 유도하고, IgE를 생산하는데 관여하며 이것은 주로 Th2 cytokine인 IL-4와 IL-5라고 보고되고 있다 (Finkelman and Urban, 1992; Coffman et al., 1989).

본 연구의 경우 cytokine mRNA와 cytokine 단백질 발현에 있어서 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$  및 IL-12는 거의 발현되지 않았으며, Th2 cytokine인 IL-4와 IL-5이 뚜렷하게 발현한 결과는 이상의 사실에 부합된다고 하겠다. 또한 Th2 cytokine이 강하게 발현되는 사실을 다르게 설명하면, Th1 cytokine의 발현이 억제된 결과로도 설명된다 (Pearce and Reiner, 1995). 호르텐스극구흡충의 숙주 감염에 따른 다양성을 알아보기 위해 총체의 조항원과 분비배설항원을 제조하여 두 품종 마우스 비장세포에 자극시킨 후 cytokine 발현 여부를 알아본 결과, 마우스 모두에서 항원의 종류에 상관없이 비슷한 결과를 보였다. 즉, RT-PCR이나 ELISA법 모두 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 나 IL-12 발현은 거의 관찰되지 않았으나, Th2 cytokine인 IL-4와 IL-5의 발현은 현저하게 우세한 발현 결과를 보였다. 그리고 Th2 cytokine 발현에서 항원의 자극별로 차이를 보였는데, PCR법에서 조항원 자극 시 IL-4는 C3H/HeN 마우스의 경우 30분부터 6시간까지, IL-5는 30분부터 9시간까지 그리고 BALB/c 마우스의 경우 12시간까지 발현됨을 확인할 수 있었다. 분비배설항원 자극 시는 C3H/HeN 마우스의 경우 IL-4는 30분에서 9시간까지, IL-5는 30분에서 6시간까지 발현되었고, BALB/c 마우스의 경우 모두 12시간까지 발현되었다. 즉, 호르텐스극구흡충은 항원종류에 따라 발현 시간에 차이를 보였고, 마우스 품종간에도 차이가 있음을 확인할 수 있었다. ELISA법으로 확인한 결과도 조항원 자극 시 IL-4는 BALB/c 마우스에서 6시간 후 136 pg/ml, C3H/HeN 마우스에서 9시간 후 81 pg/ml로 가장 높은 농도로 발현되었고, 분비배설항원 자극 시 IL-4는 BALB/c 마우스에서 3시간 후 126 pg/ml, C3H/HeN 마우스에서 69 pg/ml, IL-5는 BALB/c 마우스에서 1시간 후 120 pg/ml, C3H/HeN 마우스



스에서 3시간 후 72 pg/ml로 최고치를 보여 항원의 종류에 따라 발현농도와 발현시간 그리고 마우스 품종 간 차이가 있음을 알 수 있었다. 즉, cytokine의 발현은 IL-4와 IL-5 모두 분비배설항원보다 조항원으로 자극했을 경우 발현농도가 더 높게 관찰되었다.

기생충의 조항원 및 다른 자극원에 대한 IL-4와 IL-5 mRNA의 변화에 관한 다른 연구 보고를 인용하면 다음과 같다. Cetre et al., (1999)에 의하면 *Schistosoma mansoni*의 조항원으로 마우스를 자극하였을 때 cytokine 발현 시간에서 현저한 차이를 나타냈다고 보고하였으며, Sturm et al., (1995)에 의하면 alveolar echinococcosis 환자의 말초혈액 내 단핵구를 *Echinococcus multilocularis* 조항원으로 자극한 결과 IL-4 cytokine은 24시간 이상 cytokine의 발현이 지속되었으나, IL-5의 경우에는 발현되지 않았다고 보고하였다. 본 저자의 연구에서도 차이가 나는 결과를 보였다. 즉, RT-PCR이나 ELISA법에서 모두 Th1 cytokine인 IFN- $\gamma$ 나 IL-12 발현은 거의 관찰되지 않았으나, Th2 cytokine인 IL-4와 IL-5 발현은 현저하게 발현되는 결과를 보였다. 그러나 Th2 cytokine 발현의 경우 항원물질에 따라서 차이를 보였다. PCR법에서 조항원으로 자극하였을 때, C3H/HeN와 BALB/c 마우스 모두에서 시간적 차이를 보였고 품종 간에서도 차이를 보였다. 그리고 ELISA법으로 확인한 결과에서도 자극 시간에 따라서 그리고 품종 간에서도 비슷한 양상으로 차이를 보였다. 이상의 결과를 종합해 보면 cytokine의 발현은 IL-4와 IL-5 모두 분비배설항원 보다 조항원으로 자극했을 때 발현농도가 더 높게 관찰되었다. 특히, 호르텐스극구흡충의 조항원과 충체가 배출하는 분비배설항원을 비교하였을 때, 숙주의 비장세포를 분비배설항원으로 자극할 때보다 조항원으로 자극하였을 경우, Th2 cytokine인 IL-4와 IL-5의 발현이 더 높게 발현되었다. 이와 같이 기생충 항원의 자극에 따른 cytokine의 발현 양상은 숙주 및 감염상태 기생충의 종류에 따라 각각 다른 양상을 보이고 있으며 배양된 세포의 차이나 자극원의 차이에 의해서도 다양성을 나타내고 있다.

또한 두 품종 마우스에 대한 cytokine의 발현 양상 역시 다르게 나타났다. 즉, PCR법에 의한 발현을 관찰한 결과 BALB/c 마우스에서 IL-4와 IL-5 모두 감염 1~4주 사이에 강한 발현을 보였으며, ELISA법에서도 C3H/HeN 마우스보다 BALB/c 마우스에서 더 높은 농도 (IL-4, IL-5)로 발현되었다 ( $P<0.01$ ). 이에 대한 다른 연구자들의 보고를 보면, Yoshimura et al., (1980, 1988)은 *Angiostrongylus costaricensis*가 감염된 BALB/c 마우스와 C57BL/6 마우스에서 Th1은 감염 후반기에 증가하였고, Th2는 감염 초기에 증가하였으나 후반기에는 감소하였다고 보고하였다. Sugaya et al., (1997)은 *Angiostrongylus cantonensis*가 감염된 BALB/c와 C57BL/6 마우스를 비교한 결과 BALB/c 마우스는 Th1 형 면역반응과

더 연관이 있었다고 보고하였다. Bindseil과 Christensen (1984)에 의하면 *Echinostoma revolutum*를 마우스에게 감염시키고 연구한 결과, 감염 기생충이 숙주를 자극하여 장관 점막에서 일어나는 면역학적인 병변은 흥선 의존성이 아니라 몇 가지의 다른 복합적인 요인에 의해서 발생한다고 보고하였다. 그리고 이 원인은 충체가 분비하거나 배설하는 독성물질 등에 의한 손상으로 발생한다고 추정하였다. 또한 Thronyke와 Whitfield (1987)에 의하면 장관 내 혈관 활성물질 (intestinal vasoactive polypeptide-like material)도 숙주 점막 병변에 직접 또는 간접적 원인이 될 수 있을 것으로 추측하였다.

또한 Lee et al., (2004) 마우스 품종에 따른 면역반응의 차이를 관찰하기 위하여 haplotype이 다른 (H-2d인 BALB/c 마우스와 H-2k 형인 C3H/HeN 마우스) 두 품종에게 호르텐스극구흡충을 감염시켜 비교한 결과 차이가 있음을 관찰하여 보고하였다. 즉, 호르텐스극구흡충 피낭유충을 두 품종 마우스에게 감염시키고 주일별로 충체 회수율을 확인해 본 결과, C3H/HeN 마우스의 경우는 감염 1주일에 65.7%, 2주일에 53.5%로 높은 감염율을 보인 반면, BALB/c 마우스의 경우 감염 1주일에 23.2%, 2주일에 12.8%의 낮은 감염율을 보였다. 그리고 BALB/c 마우스는 감염기간이 더 짧았으며, 2~3주일이면 모두 배출 (expulsion) 되었다고 보고하였다 ( $P<0.01$ ).

본 연구는 호르텐스극구흡충의 조항원과 분비배설항원을 배양된 두 품종의 마우스 비장세포에 실험적으로 반응시킨 다음 면역반응을 유도하고, 또한 피낭유충을 직접 경구 감염 시켜서 면역반응을 유도한 다음 Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12) cytokine과 Th2 (IL-4, IL-5) cytokine의 발현 양상을 RT-PCR과 ELISA 방법을 통해 측정하여, cytokine 반응으로 유도되는 항체가의 변화를 관찰 분석하였다. 그 결과, 호르텐스극구흡충은 *in vitro* 자극 실험이나 *in vivo* 감염실험에 의한 cytokine 발현은 모두 Th2 형에서 현저하게 발현됨을 알 수 있었다. 또한 같은 마우스 품종은 haplotype의 차이에 따라 감수성이 달랐으며 충체 회수율에서도 차이를 보였으며, 이 감수성의 차이는 마우스에서 생산되는 cytokine의 종류 및 발현 정도에 따라서 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 요약하면, 인체기생 장흡충류인 호르텐스극구흡충의 경우 충체 및 충체가 분비 배설하는 항원이 장관 점막의 면역세포와 cytokine과 같은 면역 활성물질 등이 복합적으로 반응하여, 숙주의 병인에서 주요한 요인으로 작용한다고 분석되었다. 그리고 마우스 품종의 특성에 대하여 요약하면 C3H/HeN 마우스는 호르텐스극구흡충에 대한 감수성이 높은 품종이고, BALB/c 마우스는 호르텐스극구흡충에 대한 저항성이 높은 품종으로 분석되었다.

---

#### 감사의 말

본 연구는 2001년도 연세대학교 학술연구비 지원 (511

Y0001)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 1st ed. 1991. pp. 50. WB Saunders Company. Philadelphia. USA.
- Behnke JM, Wakelin D. *Nematospiroides dubius*: stimulation of acquired immunity in inbred strains of mice. J Helminthol. 1977. 51: 167.
- Bindseil E, Christensen NO. Thymus-independent crypt hyperplasia and villous atrophy in the small intestine of mice infected with the trematode *Echinostoma revolutum*. Parasitology. 1984. 88: 431.
- Blanchard DA, Auffredou M, Therese T, Vazquez A. Modulation of the p27 kip 1 cyclin-dependent kinase inhibitor expression during IL-4-mediated human B cell activation. Biol Cell. 1996. 88: 81.
- Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Azzinelli RT. Glycosyl phosphatidyl inositol-anchored mucin-like initiate the synthesis of proinflammatory cytokine by macrophages. J Immunol. 1997. 158: 5890.
- Catherine C, Cecile C, Christine P, Claude G, Ande C, Monique C and Jamal K. *In vivo* expression of cytokine mRNA in rats infected with *Schistosoma mansoni*. Parasitol Immunol. 1998. 20: 135.
- Caulada Z, Al-Zamel F, Sher A and James S. Comparison of Th1 and Th2 associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice irradiated *Schistosoma mansoni* cercaria. J Immunol. 1991. 146: 1655.
- Cetre C, Pierrot C, Cocude C, Jamal K. Profiles of Th1 and Th2 cytokine after primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semi-permissive rat host. Infect Immunol. 1999. 50: 2713.
- Chai JY. Study on *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) in Korea V. Intestinal pathology in experimentally infected in albino rats. Seoul J Med. 1979. 20: 104.
- Chai JY, Shin EH, Han ET, Guk SM, Choi MH, Lee SH. Genetic difference in susceptibility and fatality of three strains of mice experimentally infected with *Neodiplostomum seoulense*. J Parasitol. 2003. 86: 1140-1144.
- Coffman RL, Seymour BWP, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to IL-5 inhibits Helminth induced eosinophilia in mice. Science. 1989. 245: 308.
- Deelder AM, Class FHJ, De Vries RRP. Influence of the mouse H-2 gene complex on experimental infections with *Schistosoma mansoni*. Trans R Soc Trop Med Hye. 1978. 72: 321.
- Dombrowicz D, Capron M. Eosinophils, allergy and parasites. Cur Immunol. 2001. 13(6): 716.
- Dragana J, Alan S, George Y. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. Infec Immun. 2001. 13: 403.
- Else KJ, Hultner L, Grecnis RK. Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris* II. Differential induction of the Th cell subsets in resistant versus susceptible mice. Immunology. 1992. 75: 232.
- Else KJ, Wakelin D. The effect of H-2 and non H-2 genes on the expulsion of the nematode *Trichuris muris* from inbred and congenic mice. Parasitology. 1988. 96: 543.
- Finkelman FD, Morris SC, Orekhova T, Mori M, Donaldson D, Reiner SL, Reilly NL, Schopf L, Urban JF. Stat6 regulation of *in vivo* IL-4 responses. J Immunol. 2000. 164: 2303.
- Finkelman FD, Urban JF. Cytokine: Marking the right choice. Parasitol Today. 2000. 8: 311.
- Garside P, Kennedy MW, Wakelin D, Lawrence CE. Immunopathology of intestinal helminth infection. Parasitol Immunol. 2000. 22(12): 605.
- Geoffrey LA, Francesco D, Yvonne G, Khai S, Marck Z. Major histocompatibility complex regulation of the class of the immune response: the H-2d haplotype determines poor interferon- $\gamma$  response to several antigens. Eur J Immunol. 1990. 20: 1305.
- George-Pinchuk VM, Catherine A, Annuska MG, Armitage RJ, Milner Eric CB. VH repertoire in human B lymphocytes stimulated by CD40 ligand and IL-4: Evidence for positive and negative selection mechanisms coupled to CD40 activation. J Immunol. 1996. 33(17): 369.
- Gounni AS, Lamkhioued B, Delaporte E, Dubost A, Kinet J, Capron A, Capron M. The high-affinity IgE receptor IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy? J Clin Immunol. 1994. 94(6): 1214.
- Golehill J, Finkelman FD, Shea-Donohue Y. Cytokine regulation of host defence against parasitic gastrointestinal nematodes; lessons from rodent model. Ann Rev Immunol. 1997. 15: 505.
- Ishihara K, Satoh I, Mue S, Ohuchi K. Possible participation of a JAK2 signaling pathway in recombinant rat interleukin-5-induced prolongation of rat eosinophil survival. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - M Bas Dis. 2001. 1536(1): 73.
- Ishih A, Nishimura M. Differential responses of SM/J and A/J

- mice to experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Int J Parasitol.* 1997. 27(11): 1411.
- Jankovic D, Kullberg MC, Noben-Trauth N, Caspar P, Paul WE, Sher A. Single cell analysis reveals that IL-4 receptor / Stat6 signaling is not required for the *in vivo* or *in vitro* development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol.* 2000. 164: 3047.
- Jian LI, Phillip S, Jay PF. *In vivo* alterations in cytokine production following IL-12 and anti-IL-4 antibody treatment of CB6F1 mice with chronic cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immune* 1996. 64(12): 5248
- Joseph FU Jr, Ildy MK, William EP, Fred DF. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1991. 88: 5513.
- Kroeze WK, Tanner CE. *Echinococcus multilocularis*: susceptibility and responses to infection in inbred mice. *Int J Parasitol.* 1987. 17: 873.
- Leckie MJ, Khan J, O'Connor BJ, Hansel TT, Chung K, Fan DD, Djukanovic PJ, Holgate ST. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* 2000. 356(9248): 2144.
- Lee KJ, Park SK, Im JA, Kim SK, Kim JH, Kim GY, Yang EJ, Ryang YS. Susceptibility of several strains of mice to *Echinostoma hortense* infection. *Korean J. Parasitol.* 2004. 42(2): 51-56.
- Lee SH, Park SK, Seo M, Guk SM, Choi MH, Chai JY. Susceptibility of various species of animals and strains of mice to *Gymnophalloides seoi* infection and the effects of immunosuppression in C3H/HeN mice. *J Parasitol.* 1997. 83(5): 883.
- Louis CG, Eldin AL, Tad S. Role of the bovine immune system and genome in resistance to gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol.* 2001. 98: 51.
- Lowry OH, Rosenbrough N, Lewis-Farr A, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951. 193: 365.
- Lukacs WN, Strieter MR, Chensue WS, Kunkel LS. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994. 10(5): 526.
- Macrovich MA, McDowell MA, Thomas EK, Nutman TB. IL-12p70 production by Leishmania major-harboring human dendritic cells is a CD40 / CD40 ligand-dependent process. *J Immunol.* 2001. 164: 5858.
- Moqbel R, Pritchard ID. Parasites and allergy: evidence for a "cause and effect" relationship. *J Brit Soc Clin Immunol.* 1990. 20(6): 611.
- Nawa Y, Ishikawa N, Tsuchiya K, Horn Y, Abe T, Khan AI, Itoh H, Ade H, Uchiyama H. Selective effector mechanism for the expulsion of intestinal helminths. *Parasitol Immunol.* 1994. 16: 333.
- Pearce EJ, Sher A. Functional taxonomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.* 1991. 73: 110.
- Pearce EJ, Reiner SL. Induction of Th2 responses in infectious diseases. *Curr Opin Immunol.* 1995. 7: 497.
- Reiner NE. Host-parasite relationship in murine leishmaniasis: pathophysiological and immunological changes. *Infect Immun.* 1982. 38: 1223.
- Rihet P, Demeure CE, Bourgeois A, Prata A, Dessein AJ. Evidence for association between human resistance to Schistosomiasis and high anti-larval IgE levels. *Eur J Immunol.* 1991. 21: 2679.
- Schmitt E, Hoehn P, Germann T, Rude E. Differential effects of IL-12 on the development of naive mouse CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1994. 24: 343.
- Scott P, Natovitz RL, Coffman E, Pearce A. Immuno-regulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity of exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1988. 168: 1675.
- Sher A. Vaccination against parasites: special problems imposed by the adaptation of parasitic organisms to the host immune response. 1988. pp. 169. In *The Biology of Parasitism*. P. T. England & A. Sher, eds. Alan R. Liss Inc., New York, USA.
- Sher A, Coffman RL, Hieny S, Cheever AW. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J Immunol.* 1990. 145: 3911.
- Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaro T, Trinchieri G, Reed SG. A recombinant Leishmania antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med.* 1995. 181: 1527.
- Soares MBP, Titus RG. An *in vitro* model for infection with Leishmania major that mimics the immune response in mice. *Infect Immun.* 1997. 65: 2837.
- Stern M, Meagher L, Savill J, Haslett C. Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. *J*

- Immunol. 1992. 148: 3543.
- Storey N, Wakelin D, Behnke JM. The genetic control of host responses to *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) infections in mice. *Parasitol Immunol.* 1985. 7: 349.
- Sturm D, Menzel J, Kern P. Interleukin-5 is the predominant cytokine produced by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis. *Infect Immun.* 1995. 39: 1688.
- Sugaya H, Aoki M, Abe T, Ishida K, Yoshimura K. Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res.* 1997. 83: 10.
- Tepper RI, Levinson DA, Stanger BZ, Campos-Torres J, Abbas A, Leder P. IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cell development in transgenic mice. *Cell.* 1990. 62: 457.
- Thorndyke M, Whitfield PJ. Vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive tegumental cells in the digenean *Echinostoma liei*: possible role in host-parasite interactions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1987. 68: 202.
- Togawa M, Kiniwa M, Nagai H. 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.* 2001. 69(6): 699.
- Tsuda K, Takashi M, Akira T, Yoshiya W, Eriko M, Hideaki E, Naoaki A, Shinji I, Toshiji S, Saburo O. Eosinophil-induced liver injury: an experimental model using IL-5 transgenic mice. *J Hepatol.* 2001. 34(2): 270.
- Urban JF, Madden KB, Svetic A. The importance of Th2 cytokine in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev.* 1992. 127: 205.
- Wakelin D. Parasites and the immune system. *Bioscience.* 1997. 47(1): 32.
- Wakelin D, Rose ME, Hesketh P, Else KJ, Grecnis RK. Immunity to coccidiosis: genetic influences on lymphocyte and cytokine responses to infection with *Eimeria vermiformis* in inbred mice. *Parasitol Immunol.* 1993. 15(1): 11.
- Wong CK, Ho CY, Ko FWS, Chan CHS, Ho ASS, Hui DSC, Lam CWK. 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.* 2001. 125(2): 177.
- Yamaguchi Y, Suda T, Suda J, Eguchi M, Miura Y, Harada N, Tommaga A, Takatsu K. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med.* 1988. 167: 43.
- Yamashita T, Boros DL. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine *Schistosomiasis mansoni*. *J Immunol.* 1992. 149: 3659.
- Yoshimura K, Sugaya H, Kawamura K, Kumagai M. Ultrastructural and morphometric analysis of eosinophils from the cerebrospinal fluid of the mouse and guinea-pig infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Immunol.* 1988. 10: 411.