

Original Article / 원저

## 수질(水蛭)이 THP-1세포의 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

김현지 · 김경준

가천대학교 한의과대학 안이비인후피부과 교실

### Effects of *Whitmania pigra* on the expressions of cytokine genes in human THP-1 cells

*Hyun-Ji Kim · Gyung-Jun Kim*

Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology,  
College of Oriental Medicine, Gachon University

#### Abstract

**Objective** : This study was performed to evaluate the effect of immune reaction inductive substances such as PMA, LPS, DPE, DNCB and WP, the *whitman pigra* extracting substance at simultaneously on the translocation of NF- $\kappa$ B towards to the nucleus and the mRNA expression patterns of various cytokine genes in THP-1 cells, monocytes of human.

**Methods** : To analyze the cytokine genes expressions, the RT-PCR method was used, and measuring TNF- $\alpha$  that had been secreted during cell culture by the ELISA method. The morphological changes were observed during THP-1 cell by a scanning electron microscope and the quantitative distribution of NF- $\kappa$ B in the cell that was analyzed through immunocytochemistry and a confocal microscopy.

**Results** : WP showed different influences onto the mRNA expression patterns of cytokine genes with PMA, LPS, DPE and DNCB according to the types of immune inductive substances in the THP-1 cells. Upon treating PMA and DPE on the THP-1 cells at the same time or either additionally treating WP thereon, the movement of NF- $\kappa$ B increase towards the nucleus from cell cytoplasm was able to be observed. The expressions of IL-1 $\alpha$  and IFN- $\gamma$  induced by PMA and PMA+DNCB were suppressed by WP while the expression of TGF- $\beta$  was promoted.

© 2013 the Society of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Regarding the secretion pattern of TNF- $\alpha$  according to the treatment of PMA, its secretion amount was incredibly increased by concurrent treatment of WP, however, in case of co-treatment of WP with PMA and DNCB, it was found that the secretion amount of TNF- $\alpha$  decreased.

**Conclusions** : In this study, the WP extracting substance was confirmed that it had an influence on expression patterns of cytokine genes according to the actions of a variety kinds of immune reaction inductive substances treated on the THP-1 cells. Especially, WP co-treatment with PMA and DNCB was suppressed the expression of inflammatory cytokines, such as IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ .

**Key words** : cytokines; *Whitmania pigra*; immune responses; THP-1, TNF- $\alpha$

## 1. 서 론

대식세포는 혈액 단핵구에서 유래한 조직-기반 포식세포로, 병원체 침입의 1차적 방어역할을 하는 세포로서 선천면역을 담당하고 적응면역반응에서도 중요한 역할을 하는데 내독소, 미생물산물, CD4 ligand, interferon (IFN)- $\gamma$  등에 의해 활성화 되어 미생물을 포식하여 제거하고, 다양한 사이토카인을 분비하여 광범위한 면역반응에 관여하며, 포식한 항원을 도움 T-세포(helper T-cell)에 제시하여 최적화된 면역반응을 유도한다<sup>2)</sup>.

활성화된 대식세포에는 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, chemokines, IFN- $\gamma$  등을 분비하는데 이는 초기 면역반응에서 중요한 역할을 한다. 그러나 이러한 사이토카인들이 대식세포에서 비정상적으로 과도하게 분비되는 경우에는 알레르기 또는 만성 염증과 같이 오히려 숙주의 손상을 초래할 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>2-6)</sup>. 그 대표적인 예로 아토피 피부염을 들 수 있는데, 아토피 피부염의 병인론은 아직 확실히 밝혀져 있지는 않지만 면역학적 이상과 관련된 질환으로 생각되고 있으며<sup>7-9)</sup> 특히 T-림프구에서 Th2 사이토카인의 증가<sup>10-13)</sup>와 Th1 사이토카인 감소<sup>14-16)</sup>로 인한 사이토카인 불균형이 가장

기본적인 이상소견으로 본다. Th1, Th2의 분화는 수 T-세포에서 시작되며, 이러한 Th1 또는 Th2로의 분화·활성화 과정에 바로 대식세포에서 분비되는 사이토카인이 중요한 작용을 하고 있다<sup>2)</sup>.

사이토카인은 세포표면에 있는 수용체에 대해 높은 친화력을 가지고 있으며, 적은 양으로도 강력한 생물학적 작용을 나타낸다. 수용체와 결합하면 세포 내의 특정 유전자의 mRNA와 단백질의 변화를 일으켜서 세포의 활동에 영향을 미치며, 특정 사이토카인의 효과는 사이토카인의 농도, 표적세포의 종류, 억제 또는 길항 효과를 갖는 다른 사이토카인들과의 상호작용에 의해 특이적으로 결정된다. 각각의 사이토카인은 단독으로보다는 다른 사이토카인들과 일종의 network를 형성하여 여러 가지 복잡하고 복합적인 조절기능을 수행하며 일부의 사이토카인은 단독으로보다는 서로 중복된 기능을 가지고 있고, 상호간의 분비를 유도하고, 길항 및 억제 작용을 하기도 하며 대부분의 사이토카인은 주로 T-세포 또는 B-세포에 작용하여 효율적인 면역반응을 유도하게 된다<sup>17,18)</sup>.

수질(*Whitmania pigra* WHITMAN, WP)은 거머리과(Hirudinidae)에 속한 거머리(水蛭)의 건조체로, 여름과 가을에 잡아 끓는 물에 燙死시킨 다음 晒乾 또는 저온에서 건조한 것이다<sup>19)</sup>. 수질은 『신농본초경』에서 처음으로 인용되었고 그 귀경은 肝經이며 氣味는 性平, 有小毒하며 辛鹹苦味이며 破血, 逐瘀, 通經의 작용을 한다<sup>19)</sup>. 수질에 관한 국내 연구로는 蚯蚓, 水蛭, 鱗鱉 및 蜈蚣이 혈전증에 미치는 영향<sup>20)</sup>, 熊膽 및 水蛭이 어혈병태모형에 미치는 영향<sup>21)</sup>,

교신저자 : 김경준, 인천광역시 남동구 구월동 1200-1번지  
가천대학교 부속 김한방병원 안이비인후피부과  
(Tel : 032-468-0330, E-mail : kkjo215@hanmail.net)  
• 접수 2013/1/18 • 수정 2013/2/7 • 채택 2013/2/14

水疾, 虵蟲, 斑猫가 임신에 미치는 영향<sup>22)</sup> 등 어혈에 관계된 연구보고가 있고 그 외 소아에서의 수지재접합술 후 의료용 거머리를 이용한 것<sup>23)</sup>에 대한 임상보고 및 한국산 거머리로부터 항혈전 단백질의 검색과 분리·정제<sup>24)</sup>한 실험보고가 있으나 이 역시 수질의 혈전용해 작용에 관한 연구이다. 국외의 경우는 대부분 심혈관계 질환 및 만성 폐색성 폐질환등의 호흡기 질환 및 천식의 임상연구 등에 관한 보고가 주류를 이룬다고 보고되어 있다<sup>25)</sup>. 그러나, 수질의 혈전치료에 관한 연구보고 외에도 항염 효과에 관한 연구 보고도 있는데 Chopin 등에 의해 수질추출물(WP)에서 분리한 tessulin이라는 물질이 항염 효과가 있는 것<sup>26)</sup>으로 보고된 바가 있으며, 최근에는 국내에서도 수질추출물이 흰쥐를 이용한 동물모델과 인간의 비만세포주인 HMC-1에서 알러지 염증 반응을 억제하는 것으로 보고<sup>25)</sup>된 연구결과가 있다. 이처럼 수질에 관해서는 최근 연구에서 알려진 바와 같이 수질의 약리 작용은 단순히 타박의 치료나 혈전용해 작용이 아닌 면역계통에 유의성 있는 작용을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 또한, 어혈의 개념 관하여 신<sup>27)</sup>은 미세순환장애, 혈액성분이상, 조직변성, 면역이상 등의 병리와 연관성이 깊다고 하였고, 전 등<sup>28)</sup>은 어혈이란 단순히 打撲으로만 발생되는 물질적 측면의 死血이라기 보다는 영양물질, 氣, 血, 津液 등의 순환부전을 포괄한 개념임을 고금의 문헌적 근거를 고찰하여 밝혔듯이 필자 역시 수질 등 어혈치료 약재를 단순히 타박이나 혈전 치료 작용으로 인식하는 것 외에 아토피 피부염 등의 면역 불균형에서 기인한 질환의 치료에도 활용이 가능할 것으로 여겼고 그리하여 이번 실험에서 동물성 어혈치료약제인 수질(WP)을 선정하여 사이토카인의 유전자 발현에 유의성 있는 작용을 하는지 확인해보고자 하였다.

본 실험은 인간의 단핵세포의 세포주인 THP-1에 THP-1의 세포분화유도인자인 Phorbol-myristate-acetate (PMA)를 처리하면서 면역반응 유발물질로 알려져 있는 lipopolysaccharide (LPS), 먼지진드기

추출물 *Dermatophagoides pteronyssus crude extract* (DPE), 화학물질인 dinitrochlorobenzene (DNCB)에 따라 유발되는 사이토카인 mRNA 발현 양상을 각각 확인하고 동시에 수질추출물(WP)을 추가 처리하여 면역반응 신호 전달 체계 중에 하나인 NF- $\kappa$ B 전사조절인자의 세포내 이동과 각각의 사이토카인 유전자 발현 양상 및 염증 반응의 매우 중요한 조절인자로 알려져 있는 TNF- $\alpha$  분비량을 측정하고 이를 비교·분석하여 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 세포주와 세포 배양

실험에 사용한 인간 단핵구 세포주인 THP-1은 한국세포주연구재단(KCLB, Korea)에서 구입하였으며, RPMI 1640에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin과 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다. 배양액은 2일 마다 교환해 주었으며, 계대배양은 배양 중인 세포들이 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 각 세포주의 기본 배지로 수세한 후 새로운 플라스크에 분주하였다. 계대배양 과정에서는 10% FBS 조건을 유지하였다. THP-1을 대식세포로 분화시키기 위하여 Phorbol-myristate-acetate (PMA; Sigma, USA)를 사용하였다.

#### 2) 면역반응 유발물질 및 수질추출물 준비

면역반응 유발물질로 알려져 있는 LPS는 Sigma (St Louis, USA)에서, 먼지진드기 추출물 DPE는 Cosmo Bio (Japan)에서, 화학물질인 DNCB는 Fisher Scientific (USA)에서 구입하였다. 건조 수질은 (주)음니허브로부터 구입하여 막자사발로 제분하고 1 g을 칭량한 후 수질에 포함된 수용성 단백질의 효과를 확인하기 위해 10 ml의 증류수에 용해한 뒤

단백질의 구조적인 안정성이 유지되도록 실온에서 2 시간 동안 진탕하고 4000 RPM에 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 된 시약의 상층을 취하여 0.22  $\mu$  m filter로 여과멸균 후 Bradford 방법으로 단백질 농도를 측정하였다. 각각의 면역반응 유발물질들이 처리된 세포들에서 total RNA는 Trizol reagent (Invitrogen, Germany)를 사용하여 분리하였으며, 사이토카인 유전자들의 발현 양상을 확인하기 위한 RT-PCR primers는 Table 1에 나타난 염기서열로 합성하였으며, AccuPower RT-PCR PreMix는 Bioneer (Korea) 제품을 사용하였다. 면역반응 유발 물질 처리 후 PMA에 의해 분화된 THP-1 세포에서 분비된 TNF- $\alpha$ 의 양을 측정하기 위한 ELISA kit은 Koma Biotech (Korea) 제품을 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 세포 증식 영향 평가

면역반응 유발물질들이 세포 증식에 미치는 영향을 평가하기 위해 배양된 THP-1 세포를 96-well plate에 일정량( $1 \times 10^4/ml$ ) 접종한 후에 면역반응 유발물질을 각각 LPS (0, 0.1, 1, 10  $\mu g/ml$ ), DPE (0, 1, 10, 50  $\mu g/ml$ ), DNCB (0, 1, 5, 20  $\mu g/ml$ ), 수질추출액(0, 0.1, 1, 10  $\mu g/ml$ ) 등의 농도로 처리하였다. 처리 농도는 기존의 연구 결과들을 참고하여 고, 중저 농도의 3단계로 처리하였다<sup>30,31</sup>. 각각의 물질을 48시간 동안 처리한 후 증식된 세포의 수를 비교하여 세포 증식에 미치는 영향을 확인하였다.

### 2) 면역반응 유발물질의 처리

배양된 세포를 4-well plate에 각각의 세포주를 일정량( $5 \times 10^4/ml$ ) 접종한 후에 면역반응 유발물질들을 각각 1  $\mu g/ml$ 의 LPS, 10  $\mu g/ml$ 의 DPE, 5  $\mu g/ml$ 의 DNCB, 1  $\mu g/ml$ 의 WP 농도로 처리하였다. 처리 농도는 기존의 연구 결과들과 세포 증식 영향 평가 결과를 참고하였다<sup>30,31</sup>. 각각의 면역반응 유발물질들이

처리된 세포들에서 분비된 TNF- $\alpha$ 의 단백질량을 측정하기 위해 면역반응 유발물질을 처리한 후 0, 12, 24, 48 시간에 배양 중인 배지를 수확하였으며, 각각의 처리 시간에 lysis buffer와 분리 시약을 이용하여 total RNA를 추출하였다.

### 3) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

각각의 시료에서 추출된 total RNA의 양은 spectrophotometer로 정량하였으며, 그 상태는 2% agarose gel 전기영동 후 18s와 28s rRNA band를 전기영동을 통해 관찰하였다. 추출한 total RNA 300 ng을 reverse transcription mixture (5 $\times$  PrimeScript™ Buffer, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I, 50  $\mu$ M Oligo dT Primer, 100 uM Random 6 mers, RNase Free dH2O)에 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 RNA에 대한 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA 1  $\mu$ l과 각각의 유전자에 대한 primers (Table 1)를 PreMix PCR tube에 넣고 초기 denaturation (94 $^{\circ}$ C에서 5분) 후에, 증폭을 위해 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55~59 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분의 주기를 각각의 유전자의 특성에 따라 30~38 주기 시행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel 상에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후 UV light 하에서 densitometer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 relative intensity를 측정하였다. 비교정량적인 분석을 위하여 GAPDH를 internal control로 사용하였으며, GAPDH PCR 산물 intensity에 대한 각각의 유전자들의 PCR 산물 intensity의 비율로 양적인 비교를 실시하였다.

### 4) 효소결합 면역흡착분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)

각각의 시료에서 배양액으로 분비된 TNF- $\alpha$ 를 효소결합 면역흡착분석법(ELISA)으로 측정하기 위해 실험 과정에서 배양액을 수확하여 측정 전까지 -70 $^{\circ}$ C

에서 보관하였다. 일차적으로 TNF- $\alpha$ 에 대한 mouse monoclonal antibody가 도포되어 있는 96-well plate에 시료를 처리하기 전에 비특이적인 반응을 억제하기 위해 0.05% Tween-20이 포함된 PBS를 사용하여 2번 수세하였다. 제조사의 사용방법에 따라 negative control과 positive control 그리고 시료를 96-well plate에 1 시간 동안 처리하였으며, 발색 반응 결과를 Genios ELISA reader (Tecan, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 시료의 TNF- $\alpha$  농도는 흡광도에 대한 표준농도곡선을 이용하여 계산하였다.

5) 주사전자현미경 관찰

(Scanning electron microscopy)

배양된 시료를 채취하여 2.5% glutaraldehyde용액

(0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 4℃)에서 2시간 동안 전 고정 한 후, 완충용액(0.1M phosphate buffer)으로 10분씩 3회 세척하고, 1% Osmium tetroxide (0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 4℃)로 1시간 동안 후 고정 하였다. 동일 완충액(0.1M phosphate buffer)으로 0분씩 3회 세척한 후, 50%-70%-90%-95% 에탄올로 각각 10분씩 처리하고, 100% 에탄올로 10분씩 3회 처리하였다. 탈수 처리가 끝난 시료는 isoamyl acetate로 치환 후 액체이산화탄소에 의한 임계점 건조(HCP-2, Hitachi, Japan)과정으로 건조시킨 후 aluminum stub에 고정 하여, 이온코팅기(E-1030, Hitachi, Japan)를 이용하여 약 5~10nm 두께로 Pt-Pd ion particle 코팅 처리 후, 전계방사형 주사전자현미경(S-4700, Hitachi, Japan)을 이용하여 가속전압 10kV상에서 관찰하였다.

Table 1. Primers of RT-PCR for Various Cytokines

Name of genes		Primer sequences (5'---3')	Product size (bp)
IL-1 $\alpha$	F	CTCACGGCTGCTGCATTACA	236
	R	GTGCCGTGAGTTCCAGAA	
IL-8	F	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	292
	R	TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCTC	
IL-10	F	ATCAAGGCGCATGTGAATC	598
	R	GTTGGCTCCCAAAGAACAT	
IFN- $\gamma$	F	AACTGTCGCCAGCAGCTAAA	560
	R	GAAGCACCAGGCATGAAATC	
TGF- $\beta$	F	GCGGCAGCTGTACATTGACT	239
	R	CCACGTAGTACACGATGGGC	
TNF- $\alpha$	F	TGGGATTCAGGAATGTGTGG	363
	R	TACCCCGTCTCCCAAATAA	
LT- $\alpha$	F	GGTCGTACCACCTCTCCTT	279
	R	TAGTCCCCTCCCTGCCTCTA	
MCP-1	F	AATGCCCCAGTCACCTGCTGTAT	427
	R	GCAATTTCCCAAGTCTCTGTATC	
$\beta$ 2-MG	F	TGAATTCACCCCATGAAA	137
	R	CAAATGCGGCATCTTCAAAC	
GAPDH	F	ACTGCCAACGTGTCAGTGGT	320
	R	TGGTCCAGGGTCTTACTCC	

IL: interleukin, IFN: interferon, TGF: transforming growth factor, TNF: tumor necrosis factor, LT: lymphotoxin, MCP: monocyte chemoattractant protein, MG: microglobulin, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

6) 면역형광 세포화학염색법

(Immunofluorescent cytochemistry)

각각의 시료에서 세포질 내에서 활성화된 NFκB의 핵 내부로의 이동(translocation) 여부를 알아보기 위해 mouse monoclonal NFκB p65(F-6) antibody (Santacruz,sc-8008)를 1차 항체로 사용하고, 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Rhodamine-conjugate antibody (Invitrogen, USA)를 사용하여 공초점 현미경(Zeiss, Germany)을 통하여 관찰하였다. 핵은 DAPI로 염색하여 관찰하였다. 관찰된 형광이미지를 세포질과 핵질로 구분하여 NFκB의 intensity ratio를 Zeiss image analyzing program (Germany)으로 정량화하여 비교하였다.

III. 결 과

1. THP-1에서 면역반응 유발물질이 세포 증식에 미치는 영향

인간 단핵구 세포주인 THP-1에 LPS를 0.1 μg/ml 처리하였을 때, 대조군에 비해 77.1%의 세포 증식이 관찰되었으며, 1 μg/ml 처리 시 64.5%, 10 μg/ml 처리 시 45.1%의 세포 증식이 각각 관찰되었다. DPE를 1, 10, 50 μg/ml의 농도로 처리하였을 때는 각각 86.4%, 76.0%, 52.0%의 세포 증식이 관찰되었으며, DNCB를 1, 5, 20 μg/ml의 농도로 처리하였을 때는 각각 92.7%, 78.1%, 61.0%의 세포 증식이 관찰되었다. 수질추출물인 WP를 0.1, 1, 10 μg/ml의 농도로 처리한 결과 각각 77.8%, 72.2%, 63.9%의 세포 증식률을 나타내었다. 이상의 면역반응 유발물질들이 세포증식에 미치는 영향 분석을 통해 향후 실험에서는 65~78% 정도의 세포 증식률을 나타내는 농도인 1 μg/ml의 LPS, 10 μg/ml의 DPE, 5 μg/ml의 DNCB, 1 μg/ml의 WP를 사용하였다.

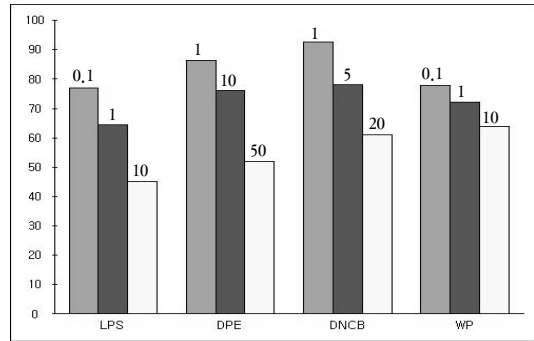


Fig. 1. The effect that material which induce immune response influence at the cell proliferation in THP-1.

2. THP-1에서 면역반응 유발물질에 의한 NFκB 전사조절인자의 세포내 이동에 미치는 영향

인간 단핵구 세포주인 THP-1에서 다양한 사이토카인의 유전자 발현을 조절하는 전사조절인자인 NFκB의 세포질에서 핵으로의 이동을 면역형광 세포조직화학적 염색방법(immunofluorescent cytochemistry)으로 관찰하였다(Fig. 2). 이러한 NFκB의 이동 양상을 정량화하여 분석하였을 때, 시간이 지남에 따라 핵으로 이동된 NFκB의 양이 증가됨을 알 수 있었다. 특히, PMA와 DPE를 동시에 처리하거나 여기에 WP를 추가적으로 처리하였을 때 NFκB의 이동이 현저하게 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

3. THP-1에서 면역반응 유발물질에 의한 사이토카인 유전자의 발현에 미치는 영향

인간 단핵구 세포주인 THP-1에서는 IL-8, IL-10, IFN-γ, LT-α, TGF-β, TNF-α, MCP-1등의 발현이 관찰되었으며, THP-1에 10 μg/ml의 PMA를 처리하여 대식세포로의 분화를 유도하였을 때, IL-1α의 발현이 유발되었으며, IL-10, IFN-γ, LT-α, TGF-β, TNF-α, MCP-1와 IL-8 등의 발현이 다소 증가되었다. PMA 처리 후 24 시간까지 대부분의 유전자 발현이 유사하거나 증가하였으나, 48 시간에서는

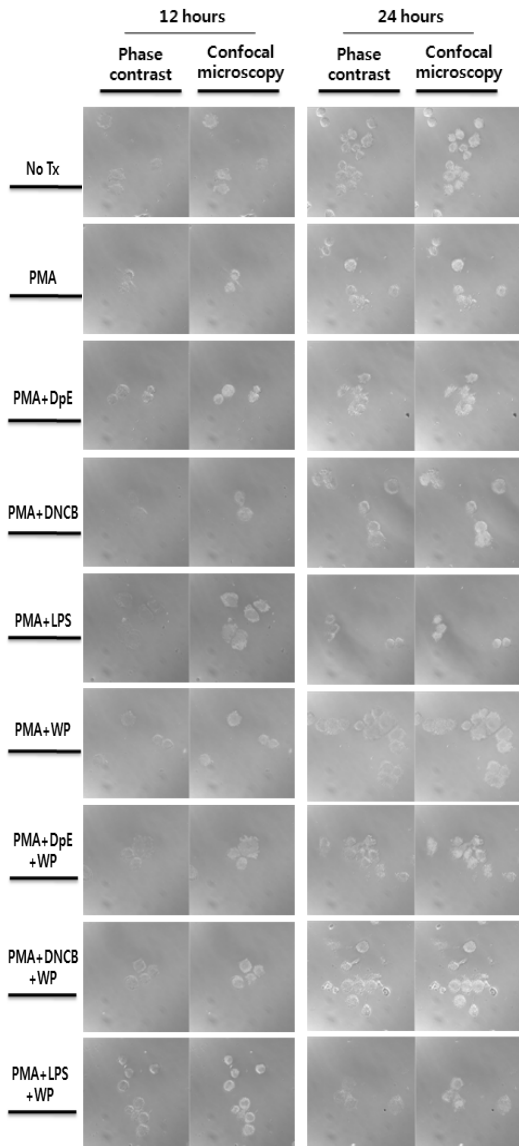


Fig. 2. Subcellular localization of  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (red color) and nucleus (blue color) by immunofluorescent cytochemistry and confocal microscopy in THP-1 cells after treatments of immune modulating substances, PMA, LPS, DPE, DNCB and WP. Abbreviation : Phorbol-myristate-acetate (PMA), lipopolysaccharide (LPS), Dermatophagoides pteronyssus crude extract (DPE), dinitrochlorobenzene (DNCB), Whitman Extract (WP)

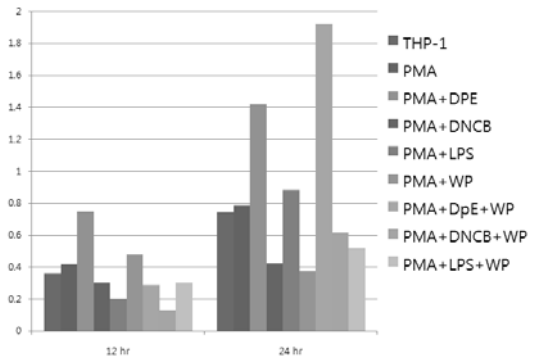


Fig. 3. Translocation of  $\text{NF}\kappa\text{B}$  into nucleus by quantitative analysis for the intensity with immunofluorescent cytochemistry and confocal microscopy in THP-1 cells after treatments of immune modulating substances, PMA, LPS, DPE, DNCB and WP. Abbreviation same as Fig. 2.

$\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-8}$ ,  $\text{TGF-}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{MCP-1}$  등의 유전자 발현이 감소되었다(Fig. 4). 인간 단핵구 세포주인 THP-1에 PMA와 박테리아 항원인 LPS를 동시에 처리한 경우에는 PMA 단독 처리 시에 비해  $\text{IL-1}\alpha$ 의 발현이 다소 감소되었으며,  $\text{IL-8}$ 과  $\text{TGF-}\beta$ 의 발현은 증가되는 양상을 나타내었다. PMA와 WP(수질추출물)을 동시에 처리한 경우에는  $\text{IFN-}\gamma$ 의 발현이 감소되었으며,  $\text{TGF-}\beta$ 의 발현은 다소 증가되었다(Fig. 4). THP-1 세포주를 대식세포로 분화시키는 과정에서 다양한 면역반응 유발물질과 수질추출물을 동시에 처리한 경우에 나타나는 사이토카인 유전자들의 변화 양상을 Fig. 4에 나타내었다. DPE와 WP를 동시에 처리한 경우에는 DPE만을 처리한 경우에 비해  $\text{IL-1}\alpha$ 와  $\text{LT-}\alpha$ 의 발현이 다소 증가되었다. DNCB에 WP 처리 시에는  $\text{IFN-}\gamma$ 와  $\text{LT-}\alpha$ 의 발현이 다소 감소되었으며,  $\text{TGF-}\beta$ 의 발현이 증가되는 양상을 나타내었다. LPS와 WP를 동시에 처리한 경우에는  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TGF-}\beta$ ,  $\text{MCP-1}$  등의 발현이 다소 감소되는 양상이 관찰되었다.

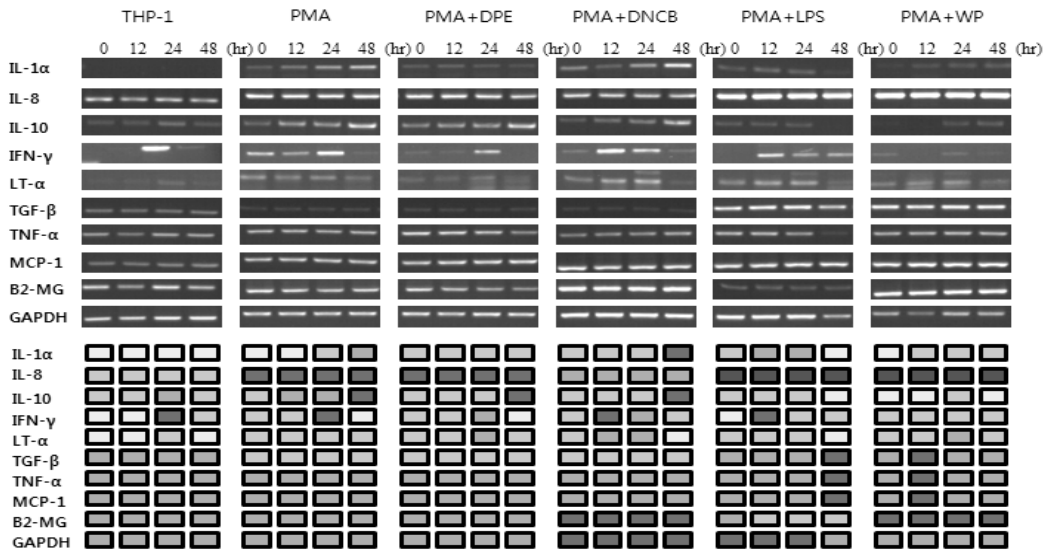


Fig. 4. Effects of immune modulating substances, PMA, LPS DPE, DNCB and WP on the mRNA expression of various cytokines in THP-1 cells. Schematic presentation of relative expression pattern as color intensity of tiles. Abbreviation same as Table 1 and Fig. 2.

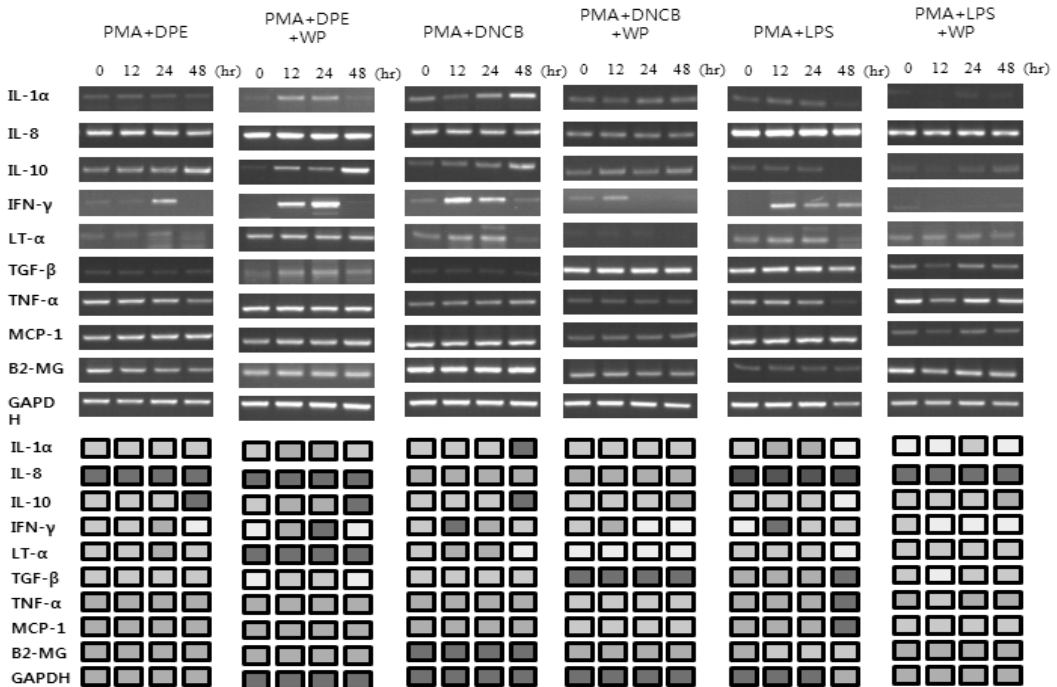


Fig. 5. Effects of immune modulating substances (PMA, DPE, DNCB and LPS) with WP on the mRNA expression patterns of various cytokines in PMA treated THP-1 cells. Schematic presentation of relative expression pattern as color intensity of tiles. Abbreviation same as Table 1 and Fig. 2.



#### 4. THP-1에서 면역반응 유발물질에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비에 미치는 영향

인간 단핵구 세포주인 THP-1에 10 ng/ml의 PMA를 처리하여 대식세포로의 분화를 유도하였을 때, TNF- $\alpha$ 의 분비량은 시간 의존적으로 증가됨을 관찰할 수 있었다. 먼지진드기 추출물(DPE)과 PMA와 동시에 처리한 경우에는 PMA에 의해 유발되는 TNF- $\alpha$ 의 분비가 현저하게 감소되었으나, 화학물질인 DNCB는 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 증가시켰다. WP(수질추출물)을 동시에 처리한 경우에도 시간 의존적으로 TNF- $\alpha$ 의 분비가 증가되는 양상을 나타내었다. DNCB와 WP를 동시에 처리한 경우에는 DNCB에 의해 유발된 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 다소 감소되었으나, LPS와 WP를 동시에 처리한 경우에는 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 증가되었다(Table 2).

Table 2. Secretion of TNF- $\alpha$  by Treatments of Immune Modulating Substances, PMA, LPS, DPE, DNCB and WP in THP-1 Cells

TNF- $\alpha$ (pg/ml)	6hr	12hr	24hr	48hr
No treatment	34.6	41.5	27.3	27.1
PMA	227.2	288.1	680.8	737.7
PMA+DPE	90.3	176.5	151.5	68.6
PMA+DNCB	330.5	326.5	1647.1	1478.1
PMA+LPS	273.0	990.9	435.3	669.8
PMA+WP	345.4	592.9	1039.4	1316.3
PMA+DPE+WP	248.8	194.7	139.3	69.1
PMA+DNCB+WP	321.4	579.7	717.2	799.0
PMA+LPS+WP	491.8	1411.6	1929.4	1819.5

Abbreviation same as Table 1 and Fig. 1.

#### 5. THP-1에서 면역반응 유발물질에 의한 형태학적인 변화에 미치는 영향

인간 단핵구 세포주인 THP-1에 10 ng/ml의 PMA를 처리하여 대식세포로의 분화를 유도하였을 때, 전

형적인 구형의 단핵구 세포들이 시간 경과에 따라 집합되고 세포돌기를 갖는 대식세포로의 변화가 관찰되었으며, 박테리아 항원인 LPS를 동시에 처리한 경우에는 48시간에 세포돌기를 갖는 대식세포로의 변화 빈도가 높게 나타났다. 처리한 면역반응 유발물질들에 따라 그 형태적인 변화들이 다양하게 관찰되었다(Fig. 6).

광학현미경으로 관찰된 형태학적 변화는 주사전자현미경(SEM)을 이용한 미세구조 관찰에서도 일치함을 확인하였다(Fig. 7).

### IV. 고찰

아토피 피부염의 원인과 발병기전은 아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않으며, 이 질환의 진단에 필요한 특정한 방법이나 검사법이 없기 때문에 대부분의 경우 소양증, 특징적인 피부염의 모양 및 부위와 천식, 알레르기성 비염, 그리고 아토피 피부염의 개인 및 가족력 등의 3가지를 주 진단기준으로 하여 진단이 시행되고 있다<sup>31)</sup>. 아토피 피부염의 병인론 역시 아직 확실하게 밝혀 있지 않지만 면역학적 이상이 관여하는 유전적인 질환으로 보고되고 있으며<sup>7-9)</sup> 면역학적으로 아토피 피부염은 T-림프구에서 Th2 사이토카인의 증가와 Th1 사이토카인 감소로 인한 사이토카인 불균형을 가장 기본적인 이상소견으로 본다. 이러한 면역학적인 불균형은 초기 대식세포가 분비하는 사이토카인과 깊은 관련이 있다. Th1 또는 Th2 세포의 활성화와 균형은 대식세포에서 분비되는 사이토카인들과 밀접한 관련이 있기 때문에 이번 실험에서는 인간의 단핵구 세포주인 THP-1을 다양한 면역유발물질 및 수질추출물(WP)치리에 의한 사이토카인 발현양상에 관한 실험연구 대상으로 설정하게 되었다.

수질에 관한 연구로는 활혈화어 작용이 적용되는 혈전증이나 항염효과<sup>26)</sup> 및 알러지반응에 관한 연구보

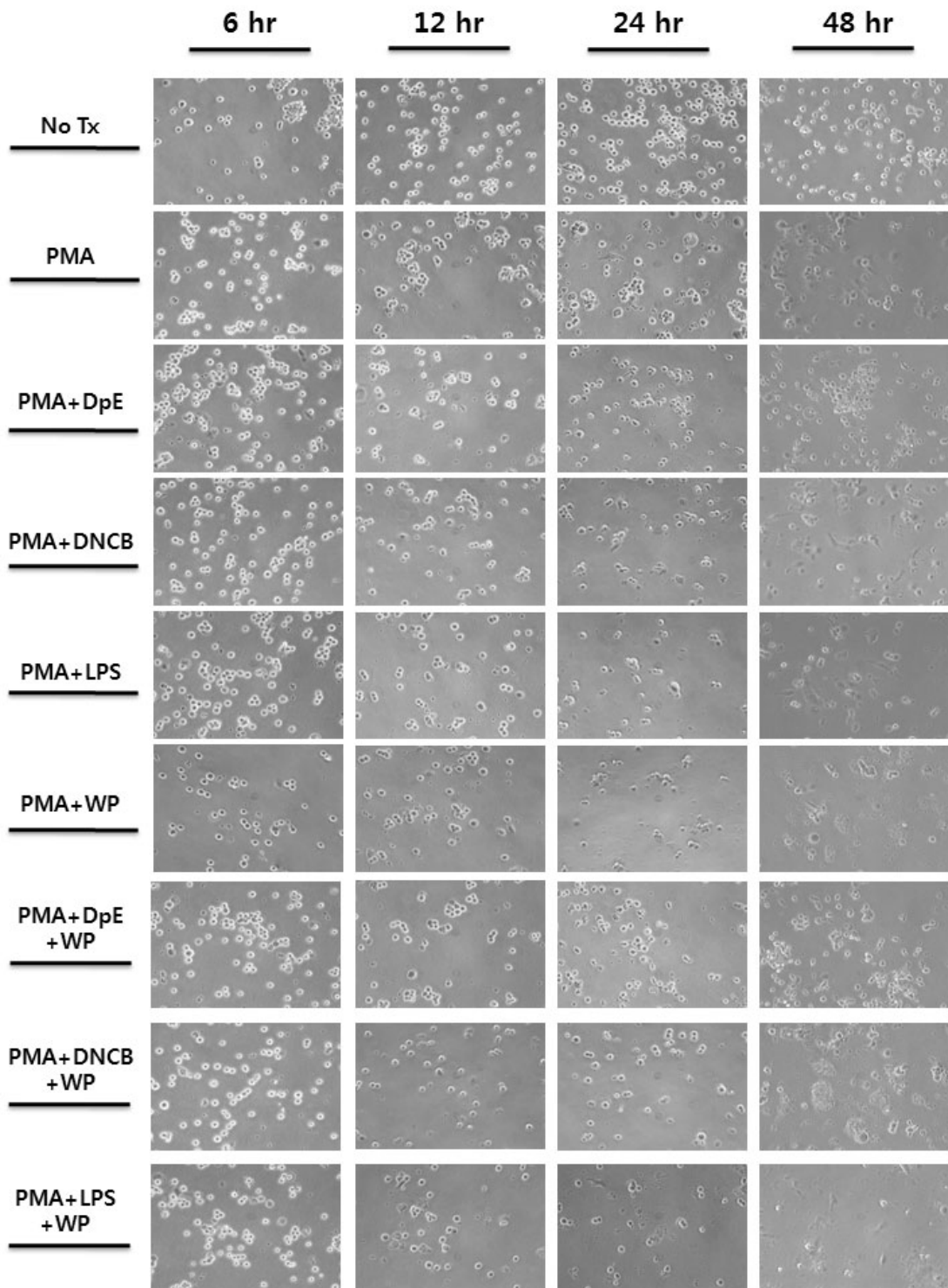


Fig. 6. Morphological changes of THP-1 cells by treatments of immune modulating substances, PMA, LPS, DPE, DNCB and WP with phasecontrast microscope (Mag.×200). Abbreviation same as Fig. 2.

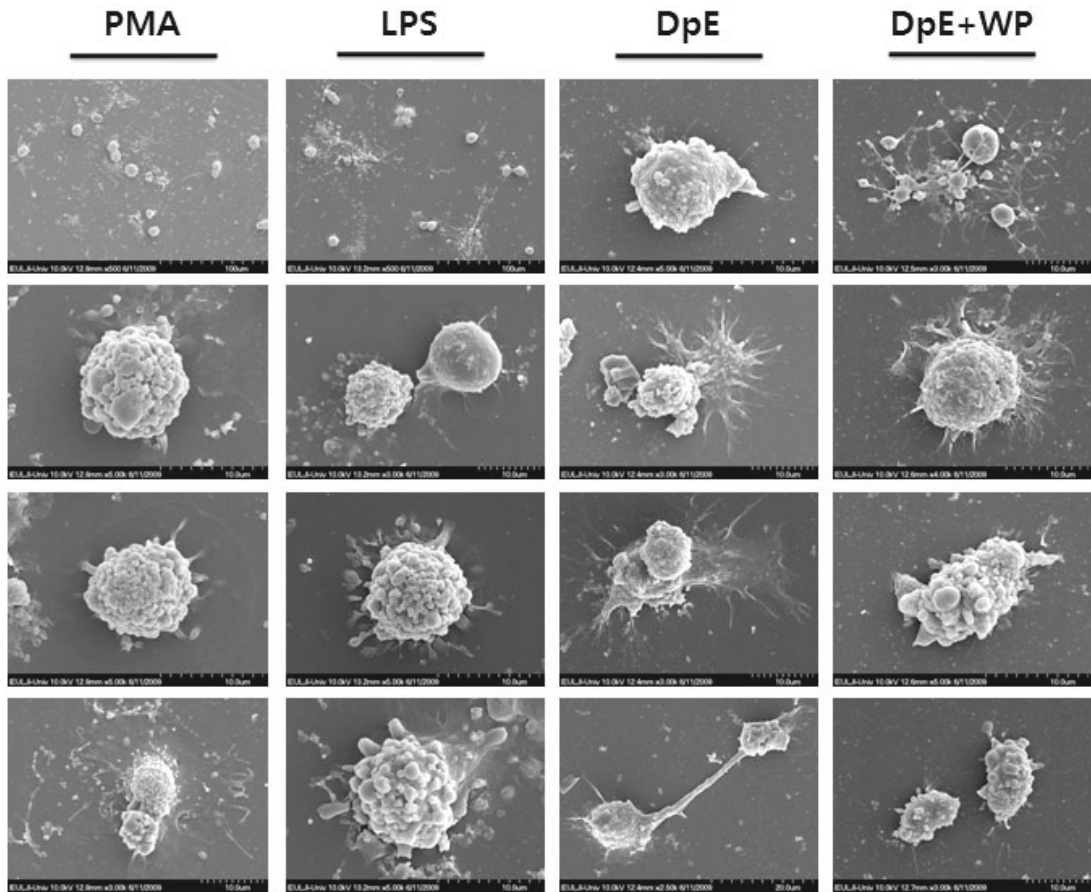


Fig. 7. Ultrastructural changes of THP-1 cells by treatments of immune modulating substances, PMA, LPS, DPE, DNCB and WP. Abbreviation same as Fig. 2.

고<sup>25)</sup>도 있으나 대식세포의 사이토카인 발현에 미치는 영향에 관한 연구는 부족하였기에 이번 실험에서는 인간의 단핵구 세포주인 THP-1에 수질추출물을 처리하여 사이토카인 유전자 발현에 미치는 작용을 실험을 통하여 살펴보고자 하였다.

먼저 WP(수질추출물)의 사이토카인 유전자 발현에 관한 작용을 확인을 위하여 면역형광 세포조직화학적 염색방법(immunofluorescent cytochemistry)을 사용하여 NFκB의 세포질에서 핵으로의 이동결과를 살펴보고 그 결과를 확인하였다. NFκB는 inhibitor인 inhibitory kappa Ba (Ik-Ba) protein과 결합하여 비활성인 상태로 세포질에 존재하다가 다양한 요인

에 의해 활성화 되면 NFκB와 결합해 있던 Ik-Ba가 분해되면서 NFκB가 세포 원형질에서 핵으로 들어가게 되며 이후 TNF-α, IL-6, IL-12같은 사이토카인 발현의 전사인자로 작용을 하게 된다<sup>33,34)</sup>. 따라서 인간 단핵구 세포주인 THP-1에서 NFκB의 이동양상을 정량화하여 분석하면 면역유발물질 PMA, LPS, DPE, DNCB 및 WP(수질추출물)에 의한 사이토카인유전자 발현에 관한 작용을 확인할 수 있다. 실험 결과, 시간이 지남에 따라 핵으로 이동된 NFκB의 양이 증가됨을 알 수 있었고, 특히 PMA+DNCB나 PMA+LPS에 비해 PMA+DPE의 경우가 현저히 전이가 활성화 되었음을 확인할 수 있었

다. 또한 PMA+DPE+WP의 경우는 NF $\kappa$ B의 전이가 더욱 현저히 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 즉, 면역유발물질로 대표적으로 알려진 LPS, DPE, DNCB 중에서 DPE만이 NF $\kappa$ B 경로를 주로 활성화 하였으므로 각각의 유발물질에 따라 주된 반응을 하는 신호전달 경로가 다르다는 것을 추론해 볼 수 있었다. 또한 이를 정량화 하였을 때 다른 유발물질에 비해 DPE인 경우, WP(수질추출물)는 오히려 이 경로를 더욱 활성화하므로 면역유발물질에 따라 WP(수질추출물)의 효과도 달라짐을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 참고로 일반적으로 사용되는 LPS에 비해 본 연구에서 사용한 먼지 진드기 기원의 DPE는 아토피 피부염과 천식을 유발하는 보다 강력한 항원으로 알려져 있으며, 이를 이용한 다양한 연구들이 진행되어져 왔다<sup>35)</sup>.

서로 다른 면역반응 유발물질과 각각에 WP(수질추출물)를 첨가한 THP-1에서 사이토카인 유전자의 발현 양상을 살펴보니 모두 반응이 나타났다. THP-1에서는 IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1등의 발현이 관찰되었으며, THP-1에 10 ng/ml의 PMA를 처리하여 대식세포로의 분화를 유도하였을 때, IL-1 $\alpha$ 의 발현이 유발되었고, IL-10, IFN- $\gamma$ , LT- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1와 IL-8, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 등의 발현이 다소 증가되었다(Fig. 4).

PMA와 WP를 동시에 처리한 경우에는 IFN- $\gamma$ 의 발현이 감소되었으며, TGF- $\beta$ 의 발현은 다소 증가되었다. 그 외 THP-1에 PMA 단독 처리 시에 비해 PMA와 박테리아 항원인 LPS를 동시에 처리한 경우에는 IL-1 $\alpha$ 의 발현이 다소 감소되었으며, IL-8과 TGF- $\beta$ 의 발현은 증가되는 양상을 나타내었다(Fig. 4). THP-1에 면역유발물질인 DPE, DNCB, LPS와 WP를 동시에 처리한 경우 사이토카인의 변화 양상을 분석하면 DPE와 WP를 동시에 처리한 경우에는 DPE만을 처리한 경우에 비해 IL-1 $\alpha$ 와 LT- $\alpha$ 의 발현이 다소 증가되었다. DNCB에 WP를 처리한 경우

에는 DNCB만을 처리한 경우에 비해 IFN- $\gamma$ 와 LT- $\alpha$ 의 발현이 다소 감소되었으며, TGF- $\beta$ 의 발현이 증가되는 양상을 나타내었다. LPS와 WP를 동시에 처리한 경우에는 LPS만을 처리한 경우에 비해 IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , MCP-1 등의 발현이 다소 감소되는 양상이 관찰되었다(Fig. 5). 즉, 면역유발물질에 따라 유발되는 사이토카인 발현 양상에 차이가 있었으며 동일한 WP를 추가 처리하였다 하더라도 면역유발물질에 따라 사이토카인 발현 결과에 차이가 나타남을 확인할 수 있었다.

TNF- $\alpha$ 는 활성화된 단핵포식세포가 주로 생산하는 사이토카인으로 특히 감염초기 호중구와 단핵구가 감염부위로 동원하도록 자극하고 이들을 활성화시켜 미생물을 퇴치하도록 하는 염증반응조절에 관여하는 중요한 인자이자 피부의 염증반응에도 매우 중요한 조절 인자로 알려져 있어서 이번 실험에서 THP-1에 대한 면역반응 유발물질처리에 의한 TNF- $\alpha$  발현 양상 및 WP처리에 의한 TNF- $\alpha$  분비 양상을 분석, 비교해보았다. THP-1에 10 ng/ml의 PMA를 처리하여 대식세포로의 분화를 유도하였을 때, TNF- $\alpha$ 의 분비양은 시간 의존적으로 증가됨을 관찰할 수 있었다. THP-1에 10 ng/ml의 PMA를 처리하여 대식세포로의 분화를 유도하였을 때, TNF- $\alpha$ 의 분비양은 시간 의존적으로 증가됨을 관찰할 수 있었다. DPE와 PMA를 동시에 처리한 경우에는 PMA에 의해 유발되는 TNF- $\alpha$ 의 분비가 현저하게 감소되었으나, 화학물질인 DNCB는 TNF- $\alpha$ 의 분비양을 증가시켰다. PMA에 WP를 동시에 처리한 경우에도 시간 의존적으로 TNF- $\alpha$ 의 분비가 증가되는 양상을 나타내었다. DNCB와 WP를 동시에 처리한 경우에는 DNCB에 의해 유발된 TNF- $\alpha$ 의 분비양이 다소 감소되었으나, LPS와 WP를 동시에 처리한 경우에는 TNF- $\alpha$ 의 분비양이 증가되었다(Table 2). 단, DPE과 PMA와 동시에 처리한 경우에는 PMA에 의해 유발되는 TNF- $\alpha$ 의 분비가 현저하게 감소되었고, DPE와 PMA에 WP를 동시 처리한 경우도 이와 유

사한 결과가 나타났다. 이는 TNF- $\alpha$  분비양상으로 보아, 각각의 면역반응물질에 따라 유발되는 TNF- $\alpha$ 의 분비양상이 다르며, 같은 WP를 처리하였다 하더라도 면역유발물질에 따라 TNF- $\alpha$  분비양상에 상이한 결과를 나타냄을 확인하였다.

단, Fig. 1, 2에서 확인되어지는 바와 같이 PMA와 DPE를 동시에 처리한 경우에는 사이토카인 발현의 전사인자인 NF $\kappa$ B가 현저히 전이가 활성화 되고 PMA와 DPE에 WP를 동시 처리한 경우 그 전이가 더욱 현저히 증가함에도 불구하고 여기서 TNF- $\alpha$ 의 분비는 오히려 감소(Table 2)되었는데 이는 어떤 다른 경로에서 TNF- $\alpha$ 의 분비가 차단되었을 가능성도 있으므로 차후 이 분야에서는 좀 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

다양한 면역반응 유발물질들을 처리하는 과정에서 THP-1의 형태적인 변화를 확인할 수 있었는데, 이를 보다 자세하게 관찰하기 위해 주사전자현미경을 사용하였으며 그 결과 구형의 THP-1 세포들이 다양한 형태의 대식세포 또는 수지상세포의 형태로 분화됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 6, 7). 이러한 결과는 본 연구에서 사용한 THP-1 세포의 대식세포로의 분화능력을 확인하여 주었으며, 향후 투과전자현미경을 이용한 미세구조적인 변화에 대한 추가적인 연구가 필요함을 시사하고 있다.

본 실험결과를 통해 인간의 단핵구 세포주인 THP-1에 PMA, DPE, DNCB, LPS의 면역유발물질(항원)과 수질추출물(WP)의 처리 하였을 때 NF $\kappa$ B의 핵으로의 이동, 사이토카인 유전자의 발현양상, TNF- $\alpha$ 의 분비양에 대조적으로 차이를 나타냄을 확인하였다. 그러나 특이적으로 PMA와 DNCB 동시 처리에 의해 유발된 IL-1 $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 발현이 WP에 의해 억제되었으며, TGF- $\beta$ 의 발현은 촉진되었다. 또한, PMA와 DNCB에 동시처리 시 증가한 TNF- $\alpha$ 의 분비양도 WP 동시 처리에 의해 그 분비양이 현저하게 감소됨을 확인하였다.

이와 같은 결과를 통해 면역유발물질에 따라 사이

토카인의 분비양상이 달라지면 같은 치료제를 사용하였다 하더라도 임상적으로는 다른 결과를 나타낼 가능성이 있음을 추론할 수 있고, 수질 추출물 같은 치료약제가 면역유발물질에 따라 사이토카인 발현에 각기 다른 영향을 주면 아토피 병인에 따라 치료제 및 치료효과가 달라질 수 있음을 추론해 볼 수 있다.

상기와 같은 마지막 추론을 뒷받침하기 위해서는, 면역학의 다양성 및 미완성과 복잡한 과정을 고려하여 실험 대상 세포에 따라 좀 더 이론적, 표준적인 실험 방법과 반복적인 데이터 축적을 통한 통계 처리를 통해 임상적 유의성을 확립해야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

인간 단핵구 세포주인 THP-1에 면역유발물질인 PMA, DPE, DNCB, LPS와 수질추출물(WP)을 단독 또는 동시에 처리하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. THP-1에 PMA와 DPE를 동시에 처리하거나 여기에 WP를 추가적으로 처리한 경우에만 NF $\kappa$ B의 이동이 현저하게 증가함을 관찰할 수 있었다.
2. WP는 PMA, LPS, DPE, DNCB로 처리된 THP-1 세포주에서 유발된 사이토카인 유전자의 발현 양상에 면역유발물질의 종류에 따라 상이한 영향을 주는 것으로 확인되었다.
3. PMA와 DNCB 동시 처리에 의해 유발된 IL-1 $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 의 발현이 WP에 의해 억제되었으며, TGF- $\beta$ 의 발현은 촉진되었다. 또한, PMA와 DNCB에 동시처리 시 증가한 TNF- $\alpha$ 의 분비양도 WP 추가 처리에 의해 그 분비양이 현저하게 감소됨을 확인하였다.

이상의 결과를 바탕으로 수질추출물인 WP는 인간의 단핵구 세포주인 THP-1 세포에 처리된 다양한 면역반응 유발물질의 작용에 따른 사이토카인 유전

자들의 발현 양상에 다양한 영향을 미치는 것으로 확인하였다.

### 감사의 글

이 논문은 2013년도 가천대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

### 참 고 문 헌

1. Charles A, Janeway Jr., Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
2. Tlaskalova-Hohogenova H, Tuc L, Lodinova Zadnilova R, et al. Mucosal Immunity: Its role in Defense and Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;128:77-89.
3. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1996;211:24-32.
4. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol*. 1990;144:1425-31.
5. Corbett JA, MacDaniel ML. Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J Exp Med*. 1995;181:559-68.
6. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL. TNF and IFN  $\gamma$  potentiate the deleterious effects of IL-1 $\beta$  on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*. 1994;6:399-406.
7. Peter M, Elias MD. Barrier function and pathogenesis of infection in atopic dermatitis. *The Journal of Skin Research*. 2003;5(1):3-18.
8. Oranje AP, de Waard-van der Spek FB. Atopic dermatitis 2000 to January 2001. *Curr Opin Pediatr*. 2002;14:410-13.
9. Morren MA, Przybilla RG, Bamelis M, Heykants B, Reynaers B, Degreef H. Atopic dermatitis: triggering factors. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31:467-73.
10. Wierenga EA, Snock M, Jansen HM, Bos JD, van Lier RA, Kapsenberg ML. Human atopy-specific types 1 and 2 T helper cell clones. *J Immunol*. 1991;147:2942-9.
11. Parronchi P, Macchia D, Piccini MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, et al. Allergen-bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:4538-43.
12. Van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg JL. High frequency of IL-4 producing CD4<sup>+</sup>allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol*. 1991;97:389-94.
13. Yssel H, Johnson KE, Schneider PV, Widerman J, Terr A, Kastelein R, et al. T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen *Der p I*. *J Immunol*. 1992;148:738-45.
14. Chan SC, Kim JW, Henderson WR, Hanifin JM. Altered prostaglandin E<sub>2</sub> regulation of cytokine production in atopic dermatitis. *J Immunol*. 1993;151:3345-52.

15. Van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff Maggi E, Romangnani S, Westland JK, et al. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of the TH2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90:184-93.
16. Wierenga EA, Snoek M, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg ML. Comparison of diversity and function of house dust mite-specific T lymphocyte clones from atopic and non-atopic donors. *Eur J Immunol*. 1990;20:1519-26.
17. Hsieh MT, Peng Wh, Yeh FT, Tsai HY, Chang YS. Studies on the anticonvulsive, sedative and hypothermic effects of *Periostracom Cicadae* extracts. *J of Ethnopharmacology*. 1991;35(1):83-90.
18. Lyu SY, Park WB. Th1/Th2 Cytokine Modulation in Human PBMC by *Aczanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. *Food Sci Biotechnol*. 2008;17(3):631-6.
19. Heijink IH, Van Oosterhout AF. Targeting T cells for asthma. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5:227-31.
20. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:178-89.
21. Choi IH, Chae BY. A clinical study of patients with atopic dermatitis. *J Korea Orient Soc*. 1991;12:709-19.
22. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. 2000;14(14):1693-711.
23. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*. 1997;18:263-66.
24. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383:787-93.
25. Anjana Rao, Orly Avni. Molecular aspects of T-cell differentiation. *British Medical Bulletin*. 2000;56:969-84.
26. Chopin V, Stefano GB, Salzet M. Amino-acid-sequence determination and biological activity of tessulin, a naturally occurring trypsin-chymotrypsin inhibitor isolated from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Eur J Biochem*. 1998;258(2):662-8.
27. Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS. The paradigm of Th1 and Th2 Cytokines: Its Relavance to Autoimmunity and allergy. *Immunologic Research*. 1999;20:147-61.
28. Pual WE, Seder RA. Lymphocyte reponses and cytokines. *Cell*. 1944;76:241-51.
29. Jun C, Liping J, Xiaomei Z, Xiaofeng Y, Chengyan G, Xiangxin X, et al. Boric acid inhibits LPS-induced TNF- $\alpha$  formation through a thiol-dependent mechanism in THP-1 cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2008;22:189-95.
30. Heijink IH, Van Oosterhout AJ. Targeting T cells for asthma. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5:227-31.
31. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:178-89.
32. Kapsenberg ML, Hilkens CM, Wierenga EA, Kalinski P. The paradigm of type1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:33-6.
33. Athman R, Philpott D. Innate immunity via

- Toll-like receptor and Nod proteins, *Curr Opin Microbiol*, 2004;7:25-32.
34. Beinke S, Ley SC. Function of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004;382,393-409.
35. Arlian LG, Platts-Mills TA. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2001;107:S406-13.