



항 바이러스제의 면역변조 효과

Immunomodulatory Effects of Antiviral Agents

저자 (Authors)	정우식, 박종욱, 한인숙, 백원기, 서성일, 서민호, 곽춘식, 최병길 Woo-Shik Chung, Jong-Wook Park, In-Sook Han, Won-Ki Baek, Seong-Il Suh, Min-Ho Suh, Chun-Sik Kwak, Byung-Kil Choe
출처 (Source)	The Journal of the Korean Society for Microbiology 31(4) , 1996.8, 387-398 (12 pages)
발행처 (Publisher)	대한미생물학회 The Korean Society For Microbiology
URL	http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01486202
APA Style	정우식, 박종욱, 한인숙, 백원기, 서성일, 서민호, 곽춘식, 최병길 (1996). 항 바이러스제의 면역변조 효과. <i>The Journal of the Korean Society for Microbiology</i> , 31(4), 387-398.
이용정보 (Accessed)	계명대학교 114.71.5.213 2016/01/11 15:15 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

항 바이러스제의 면역변조 효과

계명대학교 의과대학 면역학교실¹, 미생물학교실², 생화학교실³,
및 의과학연구소⁴

정우식^{1,4} · 박종욱^{1,4} · 한인숙^{1,4} · 백원기^{2,4} · 서성일^{2,4}
서민호^{2,4} · 곽춘식^{3,4} · 최병길^{1,4}

=Abstract=

Immunomodulatory Effects of Antiviral Agents

Woo-Shik Chung^{1,4}, Jong-Wook Park^{1,4}, In-Sook Han^{1,4}, Won-Ki Baek^{2,4}, Seong-II Suh^{2,4},
Min-Ho Suh^{2,4}, Chun-Sik Kwak^{3,4} and Byung-Kil Choe^{1,4}

*Departments of Immunology¹, Microbiology²,
Biochemistry³ and Institute for Medical Science⁴, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

In order to investigate the immunomodulatory effects of antivirals, we have studied the effects of ribavirin (RV), acyclovir (ACV), and isopurinosine (IP) on the immune responses of ICR mouse and on the proliferation and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). Humoral and cell-mediated immune responses were investigated using ICR mice either immunized with sheep red blood cells (SRBC) or sensitized with dinitrofluorobenzene (DNFB). RV suppressed anti-SRBC antibody response, delayed-type hypersensitivity to SRBC as well as contact hypersensitivity to DNFB, whereas ACV and IP did not exhibit any immunomodulatory effects. T cell response was evaluated by the phytohemagglutinin (PHA)-stimulated PBMC proliferation assay. In this assay system, RV and ACV exhibited proliferation inhibition effects in a dose-dependent fashion. However, IP did not show any effect at low-dose ranges or exhibited marginal stimulatory effect at high-dose ranges of IP treatment. Immunomodulatory effects of these antiviral drugs were further investigated using the cytokine gene expression as the indicators. IP and ACV did not show any modulator effects on the expression of interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, tumor necrosis factor, migration inhibitory factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) genes of PBMC which have been cultured in the presence or absence of PHA and phorbol myristate acetate (PMA). However, RV suppressed significantly the gene expression of IL-2, IL-3 and GM-CSF in the mitogen-stimulated PBMC. In conclusion, the observed suppressive effects of RV on immune responses in vivo, seem to be due to suppression of IL-2, IL-3 and GM-CSF gene expression and proliferation of PBMC, and IP and ACV seem to have unremarkable modulatory effects on immune system.

Key Words: Antivirals, Immune response, Cytokine.

*주소: 정우식, 대구광역시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 미생물학교실

서 론

미생물이 체내에 들어오면 이것은 이물질로 인식되어 체내에서 각종 면역반응이 일어나 궁극적으로 미생물을 제거하게 된다. 미생물의 표면항원에 대한 항체는 미생물을 직접 응집시키거나 미생물의 이동 또는 숙주세포와의 결합을 차단하며, opsonization 작용에 의해 탐식을 도와 주거나 보체계를 활성화시켜 미생물을 용해시킨다. 각종 미생물의 독성산물도 중화항체에 의해 중화된다. 협조 T 세포는 interleukin-2를 비롯한 각종 사이토카인을 분비하여 체액성 및 세포성 면역반응을 증폭시키고, 사이토카인에 영향을 받은 세포독성 T 세포는 직접세포독성을 나타내며, 탐식세포는 미생물의 탐식과 nitric oxide와 같은 각종 항미생물작용을 갖는 물질을 만드는 등 다양한 면역반응이 미생물의 침입에 대응하게 된다^{4,14)}. 그러나 미생물의 병원성이 강하거나 항원성이 미약한 경우 또는 면역계의 기능이 저하되어 있는 경우에는 감염질환이 쉽게 발생하게 되며, 감염병의 치료 또는 예방을 위해 항균제의 사용이 불가피하다. 각종 항균제의 미생물에 대한 항균력은 이미 제품개발과정에서 규명되었으며, 매년 각 항균제에 대한 내성균의 출현 빈도를 조사하는 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나 항균제는 항미생물 작용 외에 면역세포의 기능에도 영향을 줄 수가 있다. 특히 항바이러스 제제는 숙주세포 내에 기생하고 있는 바이러스에 작용해야 하므로 선택독성이 적어 여러가지 문제점을 야기할 수 있다^{5,12,15)}. 항바이러스 제제가 면역기능에 미치는 영향들을 연구한 보고들을 보면 다수 항바이러스제제가 면역기능 변조와 관련이 있는 것을 알 수 있다. Ribavirin은 IgM 및 IgG plaque forming cell 반응을 억제시키며¹⁹⁾ mitogen에 의해 유도되는 말초혈액단핵구 증식성을 억제시키며¹⁸⁾, acyclovir는 면역억제 강도는 약하나 약간 체액성 면역반응을 억제시키는 것으로 보고되고 있으며¹³⁾, immunovir라 불리는 isoprinosine는 phytohemagglutinin (PHA)에 의한 lymphoproliferative response를 증가시켜 오히려 면역기능을 증가시키는 약제로 보고되어 있다^{9,20)}. 이러한 항바이러스제의 면역반응 변조능을 조사하는 일은 약제의 항균력 연구와 더불어 중요한 일이라 생각된다. 좋은 항균력을 가진 약

제가 개발되었을때 이것이 면역계의 기능에 영향이 없거나 또는 면역기능을 증가시킬 수 있는가가 검증되어야 하며, 이미 개발된 약제들도 이런 점들을 재검증하여 약제선별을 위한 자료를 제공하여야 한다. 이러한 자료들은 특히 암이나 만성질환에 의해 면역기능이 저하된 환자 또는 면역억제요법을 받는 사람 및 면역기능을 변화시키는 바이러스성 감염질환자 등의 치료에 유용할것으로 사료된다⁹⁾.

이 연구에서는 항바이러스제가 면역계에 미치는 영향에 대한 자료를 제공하고자 상용되는 약제 또는 일부 면역변조능이 보고된 항바이러스제를 대상으로 이들의 생체내 면역변조능을 조사하였으며, 각 항바이러스제가 사이토카인 유전자발현에 미치는 영향을 조사하여²⁰⁾ 바이러스제에 의한 면역반응 변조기전을 분석하였다.

재료 및 방법

실험동물 사육 및 항바이러스제 투여

생후 8-10 주된 수컷 ICR마우스를 사용하였다. 마우스는 polycarbonate cage에 10 마리씩 넣어 수돗물과 동물사료 (삼양유지사료주식회사)를 공급하고 가능한한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서 사용하였다. 항바이러스제는 ribavirin (RV), acyclovir (ACV), isoprinosine (IP)를 멸균 증류수에 적정농도로 녹인 뒤 소분하여 -70℃ 냉동고에 보관하면서 필요시 마다 1개씩 취하여 사용하였다. 마우스를 10마리씩 실험군 및 대조군으로 나누고, 실험군에 RV는 10 mg/kg를 1일 2회, IP는 50 mg/kg를 1일 2회, ACV는 10 mg/kg를 1일 2회 경구투여 하였으며, 대조군은 동일 용량의 생리식염수를 같은 방법으로 투여하였다.

항 원

체액성면역반응 및 지연성과민반응을 평가하기 위한 항원으로 면양적혈구 (Sheep Red Blood Cell, SRBC)를 사용하였다. SRBC는 칠곡가축위생시험소에서 사육하고 있는 면양의 경정맥으로부터 채혈한 후 동량의 Alsever용액 (pH 6.1)을 가하여 4-6℃에 보관하면서 채혈후 4주 이내에 사용하였다. 접촉성과민반응을 측정하기 위한 항원으로 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)를 사용하였다. DNFB는 acetone-olive oil solution에 0.5% 및 0.2% 농도로 용해시켜 감작 및 야기조치에 사

용하였다.

Anti-SRBC 항체가 측정

항바이러스제들을 상기한 방법으로 면역 7일 전부터 채혈 직전까지 투여하였다. SRBC를 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 원심세척한 후 PBS에 2×10^7 cell/ml 농도로 부유시켜 세포 부유액을 만든 뒤 마우스 복강에 0.5 ml씩 주사하여 면역조치하였다. 면역조치 후 7일째 안와후 정맥에서 파스트르피펫을 이용하여 채혈하고 혈청을 분리하였으며, 혈청내 anti-SRBC antibody titer는 direct hemagglutination법으로 측정하였다. 혈청을 56℃ 수조에 30 분간 방치하여 비동화시킨 후 96 well microplate에 첫열에 50μl씩 분주하고 PBS를 전 well에 50μl씩 분주한 후 hand diluter로 혈청을 2 배 배수희석하였다. 혈청이 희석된 plate 전 well에 0.5% SRBC 용액을 50μl씩 분주하여 실온에 3 시간 방치하여 응집을 관찰하였으며, 응집을 나타낸 최고 혈청희석배수의 역수를 구한 뒤 log₂를 취하여 항체가로 나타내었다²⁾.

접촉성과민반응 측정

항바이러스제를 감작조치 7일 전부터 야기조치 2일 후까지 상기한 용량대로 투여하면서 접촉성과민반응 변화를 측정하였다. 접촉성과민반응을 유도하기 위하여 acetone-olive유에 용해된 0.5% DNFB용액을 25μl씩 마우스 복부피부에 2일 연속 도말하여 감작조치시키고, 감작후 4일째 0.2% DNFB용액을 마우스 좌측귀 양면에 각각 10μl씩 도말하여 접촉성과민반응을 야기시켰다. Micrometer (Mitumoto Co)를 사용하여 DNFB 야기조치 직전 (T₀), 24 시간 후 (T₂₄) 및 48 시간 후 (T₄₈) 귀종창 두께를 측정하였으며 귀종창 증감 정도를 다음의 공식으로 평가하였다³⁾.

$$\% \text{ Increase} = \frac{T_{24} \text{ or } T_{48} - T_0}{T_0} \times 100$$

지연성과민반응 측정

항바이러스제를 SRBC로 면역하기 7일전부터 야기조치 2일후까지 상기한 용량대로 투여하면서 지연성과민반응 변화를 측정하였다. 지연성과민반응을 유도하기 위하여 0.2% SRBC부유액을 0.5 ml씩 마우스 복강에 주사하여 면역조치하

였으며, 면역후 4일째 20% SRBC부유액 0.3ml를 마우스의 족척피하에 주사하였다. 족척종창은 micrometer를 사용하여 야기조치 직전 (T₀) 및 48 시간 후 (T₄₈)에 측정하였으며, 종창의 증감은 다음의 공식으로 평가하였다.

$$\% \text{ Increase} = \frac{T_{48} - T_0}{T_0} \times 100$$

말초혈액단핵구 증식능 검사

헤파린을 처리한 인간의 말초혈액에 동량의 Hank's balanced salt solution (HBSS)을 넣어 희석한 뒤 FicolI/Hypaque (F/H) solution 위에 부드럽게 중층시키고 2400 rpm (900g)에서 20분간 원심분리하였다. F/H층과 HBSS층 사이에 있는 단핵구 세포층을 수거하여 HBSS에 재부유시킨후 3 회 원심세척하고 최종 세포 pellet을 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640배지 (RPMI-10)에 2×10^6 cell/ml 농도로 부유시켰으며 mitogen으로서 PHA를 10μg/ml 농도로 첨가하여 세포부유액을 준비하였다. RV, IP 및 ACV가 말초혈액 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96 well culture plate의 전 well에 RPMI-10을 100μl씩 분주하고, 첫열에 RV, ACV 및 IP를 각각 100μl씩 넣은뒤 micropipette으로 2 배 배수희석하였다. 희석된 항바이러스제에 상기한 방법으로 준비된 단핵구 부유액을 100μl씩 가하여 잘 혼합한 뒤 36℃, 5% CO₂ 배양기에 넣어 60 시간 배양하였다. 그리고는 ³H-thymidine incorporation 검사를 하였다. 즉 ³H-thymidine을 각 well에 0.5 Ci씩 첨가하여 12-18 시간 더 배양하였다. 배양 종료후 cell harvester (Dynatech Co)로 cell을 glass filter paper에 수거한 뒤 1l toluene에 2, 5-dimethyl oxazole 4g, 1,4-bis[5-phenyl-2-oxazolyl] benzene, 2, 2'-p- phenylene-bis[5-phenyloxazole] 0.1g이 들어 있는 cocktail solution에 넣어 β-counter (Packard Co, TRI-CARB 4530)로 cpm을 측정하였다.

역전사 종합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

Interleukin 2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-6, tumor necrosis factor (TNF) α, migration inhibitory factor (MIF),granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)의 cDNA 염기서열을 유전정보 은행에서 찾아 open reading frame (orf)을 읽고

Table 1. Primer sequences used in amplification of cytokine messenger by RT-PCR

Cytokine	Type	Sequence	cDNA size(bps)
IL-2	S*	5'-ACATGTACAGGATGCAACTCCTGTCT-3'	464
	AS*	5'-TCAAGTCAGTGTGAGATGATGCT-3'	
IL-3	S	5'-TCATGAGCCGCTGCCCGTCCTGCTC-3'	459
	AS	5'-CTAAAAGATCGCGAGGCTCAAAGT-3'	
IL-4	S	5'-CCATGGGTCTCACCTCCCAACTG-3'	462
	AS	5'-TCAGCTCGAACACTTTGAATATTTCTC-3'	
IL-6	S	5'-TCATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCC-3'	639
	AS	5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAG-3'	
TNF	S	5'-TCATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG-3'	703
	AS	5'-TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGA-3'	
MIF	S	5'-CTCCTGGTCCCTTCTGCCATCATG-3'	360
	AS	5'-CGTGGGTCCCTGCGGCTCTTAGG-3'	
GM-CSF	S	5'-ACATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTC-3'	435
	AS	5'-TCACTCCTGGACTGGCTCCAGCAGTC-3'	

*S and AS mean sense primer and antisense primer, respectively.

orf의 처음 부위와 끝 부위를 sense 및 antisense primer로 설계하였다. 실험에 사용된 cytokine primer의 종류와 각 primer의 염기서열 및 예상되는 cDNA 크기를 표 1에 정리하였다.

RPMI 10 배지에 각종 항바이러스제와 PHA (1µg/ml) 및 phorbol myristate acetate (PMA) (1ng/ml) 을 넣은 말초혈액단핵구 부유액 또는 항바이러스 제제만 넣은 말초혈액단핵구 부유액을 4.5% CO₂ incubator에 넣어 48 시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리법으로 수거하여 tris buffered saline으로 2차 원심 세척한 후 세포 pellet에 RNAzolB (Cinna Biotech Co) 1ml와 chloroform 100µl를 넣어 15 초간 진탕혼합하였다. 상기한 혼합물을 얼음에 15 분간 둔 후 12,000 rpm으로 15 분간 원심분리하였으며 폐놀 및 단백질을 제거하고 분리된 상층을 조심스럽게 수거하였다. 분리한 상층을 새 시험관에 옮긴 후 동량의 ice-cold isopropanol을 넣어 -70℃에 일주야 둔 후 12,000 rpm으로 15 분간 원심하여 RNA pellet을 만들고 이것을 75% ethanol로 1회 세척한후 SpeedVac (Savant Co)으로 말렸다. RNA pellet에 nuclease가 없는 증류수를 넣어 녹인 후 UV spectrophotometer로 순도 및 농도를 측정하고 RT-PCR에 이용하였다. RT-PCR은 Perkin Elmer사의 RNA PCR kit (N808-0017)를 이용하였다. 증합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 용 tube에 25 mM MgCl₂을 4µl, 10× PCR buffer를

2µl, 10mM dNTPs를 각 2µl, 20 U/µl RNase inhibitor를 1µl, 50 U/µl의 역전사효소 (reverse transcriptase, RT)를 1µl, 15µM oligo dT primer를 1µl 첨가하여 혼합하고 여기에 80℃에서 10 분간 변성시킨 총 RNA 2µg을 혼합하고 증류수로 최종 용량을 20µl로 맞추어 RT-mixture를 제작하였다. RT-mixture를 실온에 10분간 둔 후 PCR machine (Perkin Elmer Cetus 480)에 넣어 42℃에서 60 분, 99℃에서 5 분, -4℃에서 5 분간 반응시켜 역전사효소반응을 완료하였다. RT-mixture가 들어있는 시험관에 25mM MgCl₂를 4µl, 10× PCR buffer를 8µl, 증류수를 65.5µl, AmpliTaq DNA polymerase (5 U/µl)를 0.5µl, sense 및 antisense primer (15µM)를 각각 1µl를 첨가하여 혼합하여 PCR mixture를 제작한 후 상기한 PCR machine에 넣어 증합효소연쇄반응을 실시하였다. PCR의 조건은 95℃에서 3 분간 1 회 반응시켜 DNA를 변성시킨 뒤, 95℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 40 초 - 1 분 30 초를 1 cycle로 하여 총 23-30회 반응시켜 각 사이토카인의 cDNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72℃에서 7 분간 DNA 합성을 연장시킨 후 전기영동을 실시하였다. PCR조건 중 72℃, extension time은 생성될 사이토카인 cDNA 크기마다 다소 변화시켜 실험하였고, RT-PCR의 일관성을 평가하기 위한 internal standard로서 β-actin유전자 증폭을 같이 실시하였으며, 최종 RT-PCR산물을 1-1.5% agarosegel 상에서 전

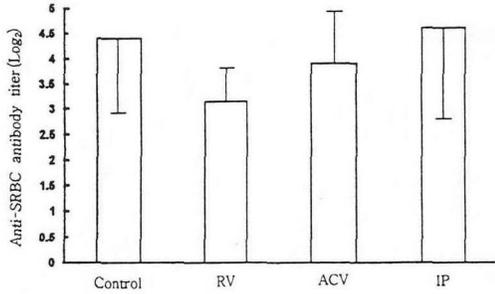


Fig. 1. Effect of antivirals on anti-SRBC antibody response in ICR mouse. All groups of mice, except control, were treated with RV(10mg/kg), or IP(50mg/kg), or ACV(10mg/kg) twice a day from 5 days before immunization to 6 days after immunization. All groups of mice were immunized i.p. with 0.5ml of SRBC suspension(2×10^7 cell/ml) and bled at 7 days after immunization. Anti-SRBC antibody titers of each sera were measured by direct hemagglutination method. The vertical bars are expressed as mean of antibody titer \pm SD with 10 mice in each group.

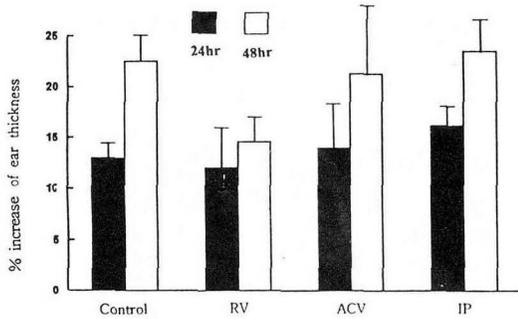


Fig. 2. Effect of antivirals on contact hypersensitivity to DNFB in ICR mouse. All groups of mice, except control, was treated with RV(10mg/kg), or IP(50mg/kg), or ACV(10mg/kg) twice a day from 5 days before sensitization to just before challenge with DNFB. All groups of mice were sensitized with 20 μ l of 0.5% DNFB solution by painting on abdomen and were challenged with 10 μ l of 0.2% DNFB by painting on each sides of right ear. Ear thickness was measured just before(T0) and 48hr after(T48) challenge. The percent increase of ear swelling was calculated using following formula; % increase = (T48-T0)/T0 \times 100. Each column and bar represent the mean of % increase and SD from 10 mice, respectively.

기영동하여 결과를 관찰하였다¹⁾.

cDNA의 진공전달 및 autoradiography

증폭된 사이토카인의 양을 정량하기 위하여 상기한 RT-PCR 실험의 PCR mixture를 만들때

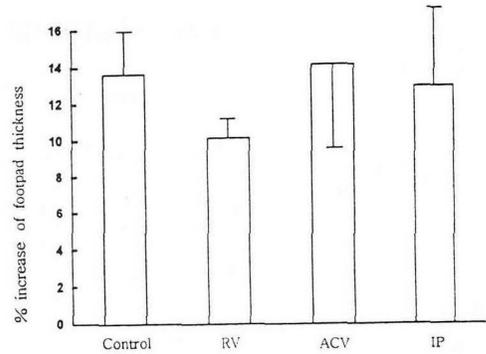


Fig. 3. Effect of antivirals on delayed-type hypersensitivity to SRBC in ICR mouse. Each group of mice, except control, was treated with RV(10mg/kg), or IP(50mg/kg), or ACV(10mg/kg) twice a day from 5 days before immunization to just before challenge with SRBC. All groups of mice were immunized i.p. with 0.5ml of SRBC suspension(2×10^7 cell/ml) and were challenged s.c. with 0.03ml of 20% SRBC suspension on the footpad at 4 days after immunization. Footpad thickness was measured just before(T0) and 48hr after(T48) challenge. The percent increase of footpad swelling was calculated using following formula; % increase = (T48-T0) / T0 \times 100. Each column and bar represent the mean of % increase and SD from 10 mice, respectively.

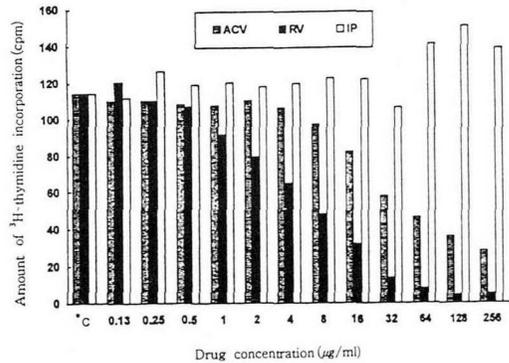


Fig. 4. Effect of antivirals on the DNA synthesis of peripheral blood mononuclear cells stimulated with PHA(10 μ g/ml). PHA-stimulated cells, except control, were treated with RV, ACV or IP and were cultured for 72hrs.

³²P-dATP를 1 μ l 첨가하여 cDNA를 증폭하였고, RT-PCR산물을 전기영동한 후gel을 vacuum blotter에 장착하고 90 분간 진공을 걸어 agarosegel 상의 DNA band를 nylon 막에 전달시켰으며, nylon 막을 건조시킨 후 X-ray cassette에 장착하여 autoradiography를 실시하였으며 x-ray film에 나타난 각 band의 density를 densitometer로 측정하였다. Autoradiography에 나타난 각 사이트

카인의 density를 sample의 internal standard인 β -actin의 density로 나누어 relative intensity (RI)를 구하였으며, 약물처리군과 대조군간의 RI를 비교하였다.

결 과

Anti-SRBC antibody response

RV, ACV 및 IP가 생체내에서 SRBC에 대한 체액성면역반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각종 약제를 SRBC로 면역시키기 1 주 전부터 채

혈 직전까지 ICR mouse 실험군에 투여한 후 SRBC에 대한 항체생산반응을 direct hemagglutination 법으로 측정하고 그 결과를 대조군과 비교하였다 (그림 1). 항바이러스제 중 RV가 대조군에 비해 가장 현저하게 항체생산반응을 억제시켰다. ACV와 IP는 각각 대조군에 비해 항체생산반응을 다소 억제 및 증가시켰으나 대조군과 큰 차이는 없었다.

DNFB에 대한 접촉성과민반응

항바이러스제가 생체내에서 DNFB에 대한 접

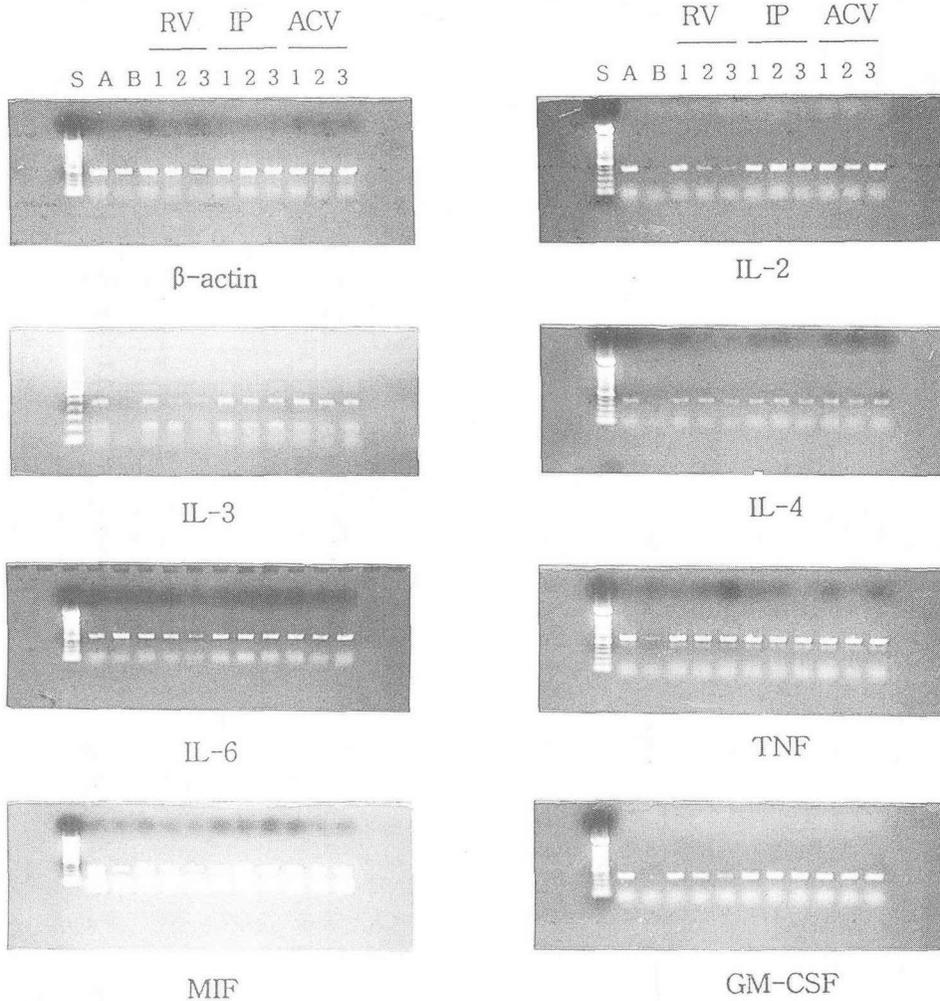


Fig. 5. Effect of antivirals on cytokine gene expression of PHA-stimulated human peripheral blood mononuclear cell. PHA-stimulated cells, except control(lane B), were treated with RV, ACV or IP and were cultured for 48hrs. Total RNA of cells were isolated and the message of each cytokine was amplified from total RNA(1 μ g) of each sample by RT-PCR. Lane S, size marker; lane A and lane B are control. Drug concentrations of lane 1, 2 and 3 are 4, 16 and 64 μ g/ml, respectively.

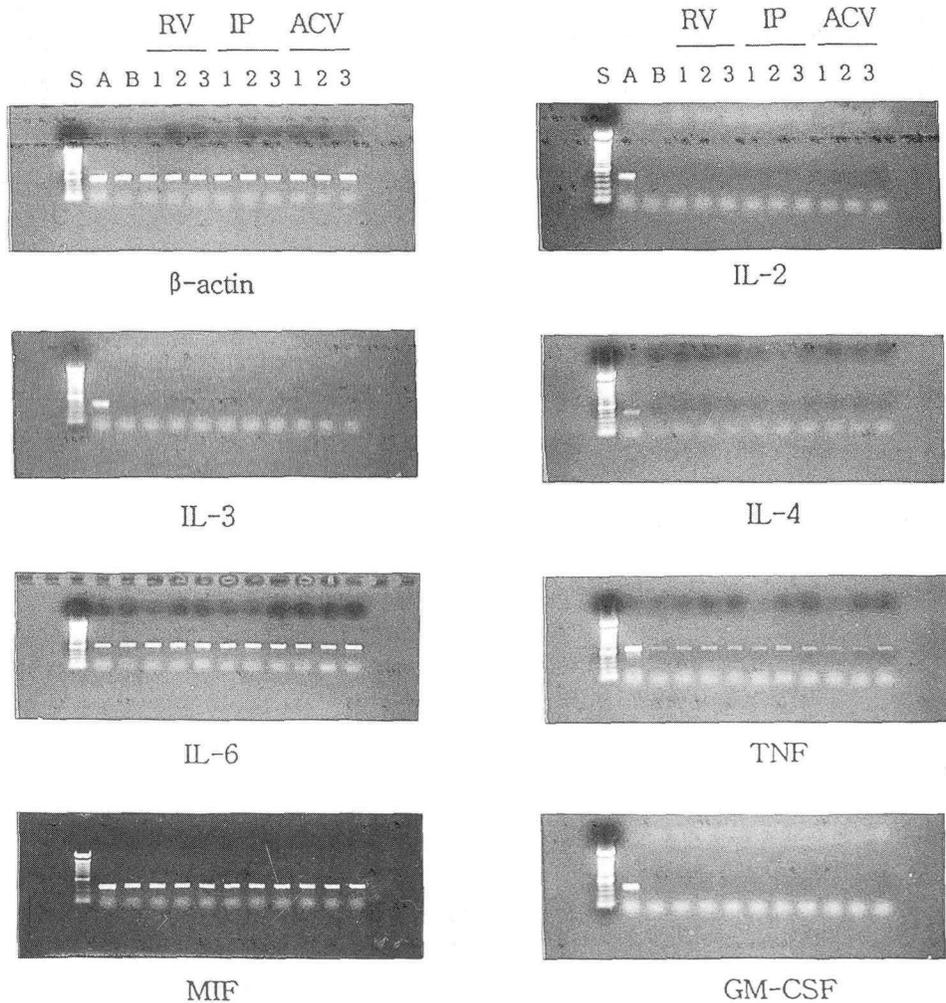


Fig. 6. Effect of antivirals on cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cell. Cells which were not stimulated with PHA except lane A, were treated with RV, ACV or IP and were cultured for 48hrs. Total RNA of cells were isolated and the message of each cytokine was amplified from total RNA(1µg) of each sample by RT-PCR. Lane S, size marker; lane A and lane B are control. Drug concentrations of lane 1, 2 and 3 are 4, 16 and 64µg/ml, respectively.

축성 과민반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각종 약제를 DNFB로 감작하기 1주전부터 야기조치 직전까지 mouse 실험군에 투여한 후 DNFB에 대한 접촉성과민반응을 이 종창 증가 정도로 측정하고 그 결과를 대조군과 비교하였다 (그림 2). 야기조치 24 시간 후에 측정된 결과는 모든 실험군과 대조군 간에 큰 차이가 없었다. 야기조치 후 48 시간때 측정된 결과에서는 항바이러스제 중 RV가 대조군에 비해 가장 현저한 억제반응을 보였으며, ACV는 대조군에 비해

접촉성과민반응을 다소 억제하였으며, IP는 다소 증가시켰으나 큰 차이는 없었다.

SRBC에 대한 지연성과민반응

면양적혈구에 대한 지연성과민반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 면양적혈구로 면역하기 7 일 전부터 야기조치 2 일 후까지 각 항균제를 처치하고 족척종창을 측정하여 종창의 변화를 비교하였다. 야기조치 후 48 시간때 측정된 결과 항바이러스제 중 RV가 대조군에 비해 가장 현저

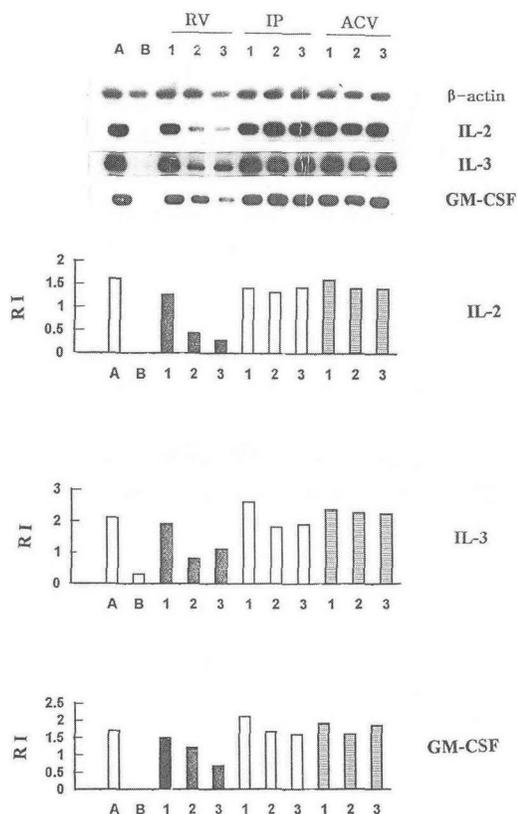


Fig. 7. Suppressive effect of RV on IL-2, IL-3 and GM-CSF gene expression. PHA-stimulated cells, except control(lane B), were treated with RV (■), IP(□) or ACV(▨), respectively. Results of autoradiography of amplified gene was translated into relative intensity(RI) by following formula; RI = intensity of each cytokine cDNA band/ intensity of each β -actin cDNA band. Lane A and lane B are control. Drug concentrations of lane 1, 2 and 3 are 4, 16 and 64 μ g/ml, respectively.

한 억제반응을 보였으며, ACV 및 IP는 대조군에 비해 다소 높거나 낮게 나타났다(그림 3).

말초혈액 단핵구 증식능

RV, ACV 및 IP가 PHA로 자극한 말초혈액단핵구의 증식능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 항바이러스제제를 0.125 μ g/ml농도에서 256 μ g/ml 농도까지 세포배양액에 첨가하여 배양시키고 증식 정도를 3 H-thymidine incorporation assay법으로 측정하여 대조군과 비교하였다(그림 4). RV는 약 농도가 증가함에 따라 현저히 세포증식을 억제하였으며 ACV도 다소 약하나 비슷한 양

상을 나타내었다. 그러나 IP는 저농도에서는 대조군과 비슷하였으나 고농도에서는 (64-128 μ g/ml) 대조군에 비해 세포증식을 많이 증가시키는 것으로 나타났다.

이상의 생체내 면역반응을 조사한 결과로 볼 때 RV는 체액성면역반응 및 세포성면역반응을 모두 억제시키는 작용을 가지고 있음을 알 수 있으며, ACV와 IP는 사용한 약 용량에서는 생체내 면역반응을 변화시키지 않는 것으로 나타났으며 세포증식반응은 IP 및 ACV가 억제작용을, IP가 고농도에서 다소 증가작용을 보이는 것으로 요약할 수 있다.

RT-PCR

생체내 면역반응검사에서 나타난 RV의 면역반응 억제능과 ACV 및 IP의 면역변조능을 보다 상세히 해석하기 위하여 각 항바이러스제를 처리한 배양세포로부터 RNA를 추출하여 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, TNF, MIF, GM-CSF의 cDNA를 RT-PCR법으로 증폭시켜 대조군과 비교해 보았다. 먼저 PHA 및 PMA로 자극한 말초혈액단핵구를 사용한 결과 대상 사이토카인이 양적인 차이는 있으나 모두 잘 발현되었다. 항균제를 처리한 group중 RV를 처리한 곳에서 IL-2의 억제가 매우 심하게 일어났으며, IP 및 ACV는 대조군과 큰 차이가 없었다(그림 5). PHA와 PMA로 자극치 않은 말초혈액단핵구에서는 IL-2, IL-3, IL-4 및 GM-CSF가 발현되지 않았으며 나머지 cytokine들도 자극군에 비해 발현량이 저하되었으며, 발현된 IL-6 와 TNF 및 MIF의 량은 RV 및 나머지 항바이러스제에 의해 증가되거나 감소되는 경우는 없었다(그림 6). PHA 및 PMA로 자극한 말초혈액단핵구에 대한 RV의 사이토카인 발현 억제능을 알아보기 위하여 증폭된 DNA band를 nylon막에 옮기고 autoradiography를 실시하여 relative intensity를 구해 본 결과 그림 7에서처럼 IL-2의 발현억제가 가장 뚜렷하였으며, IL-3 및 GM-CSF의 발현도 상당히 억제되고 있음을 알 수 있었다.

고 찰

바이러스 감염증 치료를 위해서는 체내에서 바이러스 항원에 대한 항체나 특이 T 세포와 같은 면역반응이 유도되어야 하며, 또한 적절한

항바이러스요법이 필요하다. 그러나 항바이러스제는 선택독성이 부족하여 여러가지 부작용이 있으며 특히 면역계에 영향을 미칠수 있으므로 약제선택과 사용 등에 세심한 주의가 필요하다⁹⁾. 항바이러스제 중 RV는 synthetic nucleotide analogue로서 세포내로 들어가서 viral mRNA에 incorporation되며 결과적으로 virus의 단백질합성을 저해하는 약제로서 influenza virus, respiratory syncytial virus 및 measles과 arenavirus등에 효과가 있는 약제이다²⁷⁾. RV는 면역기능 억제작용이 있는 약제로서 이 실험에서 마우스의 SRBC에 대한 체액성 면역반응과 PHA에 의한 세포증식반응을 현저히 저하시켰으며 이 결과는 RV가 IgG 및 IgM plaque forming cell 반응 및 PBMC의 mitogen responsiveness 등을 억제한다는 보고^{18, 19, 21)}와 일치한다. 그리고 DNFB에 의한 접촉성과민반응과 SRBC에 대한 지연성과민반응을 저하시킴으로써 RV가 T 세포가 분비하는 사이토카인에 의해 증폭되는 세포성면역반응까지 억제하고 있음을 새로이 알 수 있다.

본 실험에서 RV는 면역반응의 증폭에 중요한 역할을 하는 IL-2^{6, 11, 23, 26)}의 발현을 매우 억제시켰다. 이러한 RV의 IL-2 산생 억제는 상기한 바와 같이 직접적인 T 세포 활성화 억제에 이어서 T 세포에서 유래하는 각 사이토카인 감소에 따른 B 세포의 항체생산능 및 세포성면역반응 작동세포의 기능의 연차적인 저하를 초래케 한다고 생각되며 이러한 기전에 의하여 이 실험에서 각종 생체내 면역반응이 RV 처치군에서 현저히 억제되었다고 사료된다. RV는 시험관내에서 mitogen으로 자극받은 세포의 증식을 억제하였으며, 사이토카인 유전자 발현 실험에서도 IL-2 이외에 IL-3와 GM-CSF의 발현을 억제시켰다. Powers 등²¹⁾은 임파구가 다른 세포에 비해 RV의 직접세포독성에 더욱 많은 영향을 받으며, 그 원인은 다른 세포에 비해 임파구는 purine 신합성 경로에 의한 GMP합성능이 적어 RV가 inosine monophosphate dehydrogenase를 억제할 때 GMP의 결핍이 심하게 생기기 때문이라 추정하였다. 이 실험에서 나타난 RV에 의한 세포증식능의 감소의 원인과 RV처리군에서 총 RNA 량의 감소는 RV의 상기한 직접세포독성에 기인한 것으로 생각된다. 또 RV는 상기한 임파구에 대한 직접독성 외에도 IL-3 및 GM-CSF와 같은 중요 분화 및 증식인자의 유전자 발현을 선택적으로 저해하

는 작용이 있다고 생각된다. RV에 의해 유전자 발현이 억제된 IL-3는 일명 multilineage CSF로 알려져 있는 사이토카인으로서 골수에서 여러 종류의 면역세포의 분화와 증식에 관여하며^{10,25)}, GM-CSF는granulocyte와 macrophage 계열의 세포의 분화와 증식을 초래하는 사이토카인이다^{8, 29)}. 따라서 RV는 IL-2억제에 따른 면역계 활성화 저하는 물론 중요 CSF 유전자 발현저하에 따른 면역세포 분화 및 증식저하까지 초래하고 있으며 이러한 RV의 작용은 생체내에서 나타나는 각종 면역반응의 저하와 밀접한 연관이 있을 것으로 생각된다.

ACV는 전신적 사용을 위해 개발된 최초의 비독성약제로서 체내에 흡수되어 virus specific deoxynucleoside kinase에 의해 인산화되며, 바이러스의 DNA polymerase를 억제하며, 특별히 herpes virus의 DNA 합성효소를 잘 억제하기 때문에 각종 herpes감염병에 쓰이고 있는 약제이다^{17, 24)}. ACV는 면역계에도 비교적 영향이 없는 약제로 알려져 있으며, 일부 보고에서 체액성면역에 다소 억제능이 있는 것으로 보고된 바 있다¹⁹⁾. 이 실험에서도 ACV는 각종 생체내 면역반응에는 별 영향이 없었으며, 면역세포의 사이토카인 유전자발현에도 특별한 영향을 미치지 않았다. 다만 세포증식반응에서 약제의 농도가 증가함에 따라 세포의 증식을 억제하였으며, 이것은 생체내 사용 허용량을 넘어선 농도에서 나타난 현상이므로 큰 의미가 없을 것으로 생각되나, 결국 ACV의 과다사용은 면역세포증식의 저하를 초래할 수 있으므로 장기간 약제사용시 환자의 면역기능상태를 감시할 필요가 있다고 사료된다.

IP는 inosine과 1-dimethyl-2-propanol-p-acetamidobenzoate를 1:3의 비율로 혼합하여 만든 항바이러스제로서 influenza A, herpes simplex, polio 및 adenovirus 등에 효과가 있으며 IP의 항바이러스 기전은 IP가 숙주세포의 ribosome에 변화를 주어 이종의 mRNA의 전사를 억제하는것으로 추정하고 있다⁷⁾. IP는 면역계 기능을 증강시켜 immunovir로 알려진 약제로서 PHA에 의한 임파구증식반응을 증가시키고²⁰⁾ T 세포에 작용하여 IL-2 및 IL-2 수용체를 증가시키며¹⁶⁾, 단구(monocyte)를 활성화시키는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다³⁰⁾. 그러나 IP 단독으로는 세포증식을 야기할수 없기 때문에 이러한 IP의 작용은 IP

가 PHA와 함께 협동적으로 T 세포를 자극하여 IL-2 및 IL-2 수용체를 증가시키는 것으로 해석할 수 있다. 그러나 Pedersen 등²⁰⁾은 IP가 생체외에서 IL-1, IL-2, IL-6 및 TNF의 산생에는 영향이 없으며, Milano 등¹⁶⁾은 IP가 IL-4의 산생은 감소시키는 것으로 보고하고 있어 IP의 면역계에 대한 작용은 아직 분명치가 않다. 이 실험에서는 IP가 생체내 면역반응 중 항체산생반응과 접촉성과민반응을 대조군에 비해 다소 증가시켰으나 큰 차이는 없었으며, 사이토카인 발현에 미치는 영향을 조사한 결과에서도 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, GM-CSF, MIF, TNF 등의 유전자 발현에 별 영향이 없는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 IP가 생체내에서 단독으로는 면역증가 작용을 나타내지 못하던가 또는 그 증강효과가 미약하여 이 실험법에서는 측정하지 못했을 가능성도 있다. PHA 및 PMA로 자극치 않은 cell에서 IP가 IL-2의 발현을 증가시키지 못한 것은 IP자체의 mitogenic effect가 없기 때문으로 생각되며, PHA 및 PMA로 자극한 세포에서는 배지에 첨가한 mitogen에 의해 IP의 작용이 차폐 (masking)되었을 가능성이 있으나 이 성적단으로는 알 수가 없다. 세포 증식반응에서는 고농도에서 IP가 대조군에 비해 세포의 증식을 증가시켜 PHA 등의 mitogenic effect를 IP가 증가시키는 것을 알 수 있다. IP가 최소한 RV와 같은 면역 억제현상을 보인 결과나 연구자들의 보고는 없으므로 면역계 이상을 초래치 않는 약제라고 생각된다.

결 론

Ribavirin (RV), acyclovir (ACV) 및 isoprinosine (IP)이 면역계에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 이들이 마우스 생체내 체액성면역반응 및 세포성 면역반응과 시험관내에서 인간말초혈액단핵구 증식반응 및 사이토카인의 유전자발현에 미치는 영향을 조사하였다.

생체내 면역반응을 평가하기 위하여 면역적혈구에 대한 특이항체 생산반응과 2,4-dinitrofluorobenzene에 대한 접촉성과민반응 및 면역적혈구에 대한 지연성과민반응을 조사한 연구에서 RV (10 mg/kg, 1일 2회)는 대조군에 비해 상기한 생체내 면역반응을 모두 억제하였으며, ACV (10 mg/kg, 1일 2회)와 IP (50 mg/kg, 1일 2회)는 대조군과 비슷하였다.

Phytohemagglutinin으로 자극된 인간 말초혈액 단핵구의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ³H-thymidine incorporation 검사를 실시한 결과 IP는 저농도에서는 대조군과 비슷하게 세포를 증식시켰으나 고농도에서는 세포증식을 증가시켰다. ACV 및 RV는 약용량이 증가함에 따라 세포증식의 억제가 심화되었다.

항균제가 말초혈액 단핵구의 각종 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 연구에서, IP 및 ACV는 interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, tumor necrosis factor, migration inhibitory factor, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)의 유전자발현에 큰 영향을 주지 않았으나, RV는 IL-2, IL-3 및 GM-CSF의 발현을 억제시켰다.

이상의 결과에서 RV의 생체반응 억제능은 IL-2억제에 의한 T 임파구의 활성화 저하와 이에 따른 항체생산의 저하 그리고 IL-3 및 GM-CSF 발현억제에 의한 각종 면역세포의 분화증식 저하에서 기인하는 것으로 생각되며, ACV 및 immunovir로 알려진 IP는 특별한 생체내 면역반응 변조능과 사이토카인 유도능이 없는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) 박종욱, 한인숙, 서성일, 백원기, 서민호, 배지현, 최병길 : 인삼사포닌이 사이토카인 유전자의 발현에 미치는 영향. *고려인삼학회지* 20: 15-22, 1996.
- 2) 하대유, 박종욱, 박윤규 : 녹농균 Exotoxin A에 의한 면역반응 변화. *대한면역학회지* 11: 45-58, 1989.
- 3) 하대유, 오영미, 박종욱 : Morphine, Meperidine 및 Naloxone이 마우스의 면역반응에 미치는 영향. *대한면역학회지* 14: 107-116, 1992.
- 4) Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS : Immunity to microbes, In Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds.), *Cellular and molecular immunology*. p. 319-338, 1994. Saunders, Philadelphia, U.S.A.
- 5) Clercq E: Antiviral agents and the immune system, in Jeljaszewicz J, Pulverer G (eds.), *Antimicrobial agents and immunity*. p.19 - 68, 1986. Academic Press, San Diego, U.S.A.

- 6) Farrar J J, Benjamin WR, Hilfiker ML, Howard M, Farrar WL and Fuller Farrar J: The biochemistry, biology, and role of interleukin-2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immunol Rev* **63**: 129-166, 1982.
- 7) Gordon P, Ronsen B and Brown ER: Anti-herpes virus action of isoprinosine. *Antimicrob Agents Chemother* **5**: 153-160, 1974.
- 8) Gough NM, Metcalf D, Gough J, Grail D and Dunn AR: Structure and expression of the mRNA for murinegranulocyte macrophage-colony stimulating factor. *EMBO J* **4**: 645-653, 1985.
- 9) Hadden JW, Hadden EM and Coffey RG: Isoprinosine augmentation of phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation. *Infect Immun* **13**: 382-387, 1976.
- 10) Hapel AJ, Lee JC, Farrar WL and Ihle JM: Establishment of continuous cultures of Thy1.2+, Lyt1+, 2-T cells with purified interleukin 3. *Cell* **25**: 179-186, 1981.
- 11) Howard M, Matis L, Malek TR, Shevach R, Kell W, Cohen D, Nakanishi K and Paul WE: Interleukin 2 induces antigen-reactive T cell lines to secrete B cellgrowth factor I. *J Exp Med* **158**: 2024-2039, 1983.
- 12) Jawetz E, Melnick JL and Adelberg EA: Antimicrobial chemotherapy, In Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA (eds.), Review of medical microbiology. p. 130-159, 1992. Appleton & Lange, Los Altos, U.S.A.
- 13) Kankova Vancurova M, Jilek P, Fisterle V and Prochazkova J: Effect of acyclovir on selected immune functions. *Acta Virol* **36**: 284-292, 1992.
- 14) Kuby J: Generation of the humoral immune response, cell-mediated immunity, In Kuby J (ed.), Immunology. p. 323-367, 1994. W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.
- 15) Lambert HP and O'Grady FW: Antiviral agents, In Lambert HP, O'Grady FW (eds.), Antibiotic and chemotherapy. p. 49-71, 1992. Churchill Livingstone, New York, U.S.A.
- 16) Milano SM, Dieli M, Millott S, Miceli MD, Maltese E and Cillari E: Effect of isoprinosine on IL-2, IFN-gamma and IL-4 production in vivo and in vitro. *Int J immunopharmacol* **13**: 1013-1018, 1991.
- 17) Miller WH and Miller RL: Phosphorylation of acyclovir monophosphate by GMP kinase. *J Biol Chem* **225**: 7204-7207, 1980.
- 18) Peavy DL, Koff WC, Human DH and Knight V: Inhibition of lymphocyte proliferative responses by ribavirin. *Infect Immun* **29**: 583-589, 1980.
- 19) Peavy DL, Powers CN and Knight V: Inhibition of murine plaque-forming cell responses in vivo by ribavirin. *J Immunol* **126**: 861-864, 1981.
- 20) Pedersen BK, Tvede N, Diamant M, Gerstoft J, Bagge Hansen M, Haahr PM, Hording M, Kappel Mm Klokke M and Soeberg B: Effects of isoprinosine treatment of HIV-positive patients on blood mononuclear cell subsets, NK- and T-cell function, tumor necrosis factor, and interleukins 1,2 and 6. *Scand J Immunol* **32**: 641-649, 1990.
- 21) Powers CN, Peavy DL and Knight V: Selective inhibition of functional lymphocyte subpopulation by ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* **22**: 108-114, 1982.
- 22) Richner J, Ambinder EP, Hoffmann K, Feuer EJ and Bekesi G: Number of helper T cells and phytohemagglutinin stimulation correlate in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **34**: 138-142, 1991.
- 23) Robb RJ, Greene WC and Rusk CM: Low and high affinity cellular receptors for interleukin-2. implications for the level of tac antigen. *J Exp Med* **160**: 1126-1146, 1984.
- 24) Schaeffer HJ, Beauchamp L and de Miranda P: 9- (2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpesgroup. *Nature (London)* **272**: 583-585, 1978.
- 25) Schrader JW: Interleukin 3, In Thomson A (ed.), The Cytokine hand book. p. 103-118, 1991. Academic Press, San Diego, U.S.A.
- 26) Smith KA: T cellgrowth factor. *Immunol Rev* **51**: 337-357, 1980.
- 27) Smith RA and Kirkpatrick W: Rivabirin: a broad sectrum antiviral agent, In Smith RA, Kirkpatrick W (eds.), p. 32-60, 1980. A-

- ademic Press, New York, U.S.A.
- 28) Vilcek J and Le J: Immunology of cytokines: An introduction, In Thomson A (ed.), The cytokine handbook. P. 1-17, 1991. Academic Press, San Diego, U.S.A.
- 29) Wong GG, Witek JS, Temple PA, Wilkens KM, Leary AC, Luxenberg DP, Jones SS, Brown EL, Kay RM and Orr EC: Humangranulocyte macrophage - colony stimulating factor: molecular cloning of the complementary DNA & purification of the natural and recombinant proteins. *Science* **228**: 810-815, 1985.
- 30) Wybran J, Govaerts A and Appelboom T: Inosiplex, a stimulating agent for normal human T cell and human leukocytes. *J Immunol* **121**: 1184-1187, 1978.
-