

마우스 만성천식모델에서 경구면역관용 유도에 의한 알레르기 염증의 예방효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

김진숙, 이정미, 김승준, 이숙영, 권순석, 김영균, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학

The Preventive Effect of Allergic Inflammation by Induction of Oral Tolerance in a Mouse Model of Chronic Asthma

Jin sook Kim, Jung Mi Lee, Seung Joon Kim, M.D., Sook Young Lee, M.D., Soon Seog Kwon, M.D.,
Young Kyoan Kim, M.D., Kwan Hyoung Kim, M.D., Hwa Sik Moon, M.D., Jeong Sup Song, M.D., Sung Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Induction of oral tolerance (OT) has been known to prevent allergic inflammation in acute asthma model within 4 weeks. However it is remained whether induction of OT may effectively prevent allergic inflammation in chronic asthma model over 4 weeks. We observed the effect of induction of OT on allergic inflammation and airway remodeling in chronic asthma model up to 8 weeks.

Methods : 5-week-old female BALB/c mice divided into 4 groups-control group, asthma group, low dose OT group, and high dose OT group. To induce oral tolerance mice were fed ovalbumin (OVA) before sensitization with OVA and aluminum hydroxide-1 mg for 6 consecutive days in the low dose OT group and 25 mg once in the high dose OT group. Mice in the asthma group were fed phosphate buffered saline instead of OVA. After sensitization followed by repeated challenge with aerosolized 1% OVA during 6 weeks, enhanced pause (Penh), inflammatory cells, IL-13, and IFN- γ levels in bronchoalveolar lavage (BAL) fluids as well as OVA-specific IgE, IgG1, and IgG2a levels in serum were measured. In addition the degree of goblet cell hyperplasia and peribronchial fibrosis were observed from lung tissues by PAS and Masson's trichrome stain.

Results : Both OT groups showed a significant decrease in Penh, inflammatory cells, IL-13, and IFN- γ levels in BAL fluids as well as OVA-specific IgE, IgG1, and IgG2a levels in serum compared with the asthma group ($P<0.05$). In addition, the degree of goblet cell hyperplasia and peribronchial fibrosis were significantly attenuated in both OT groups compared with the asthma group ($P<0.01$).

Conclusion : These results suggest that induction of OT may effectively prevent allergic inflammation as well as airway remodeling even in chronic asthma model up to 8 weeks. (*Tuberc Respir Dis* 2004; 57:425-433)

Key words : Allergic asthma, Oral tolerance, Ovalbumin, Airway remodeling.

서 론

기관지천식은 임상적으로 가역적인 기도폐쇄와 기도민반응을 특징으로 하고, 병리학적으로는 만성기도염증반응 및 기도재형성의 소견을 보이는 만성기도질환이다. 기도염증반응은 Th2 면역 반응에 의해 호산구, 비만세포, 림프구의 침윤이 관찰되며, 기도재형성 즉 상피세포의 탈락, 술잔세포 증가, 기저막하부의

섬유화, 혈관 신생, 평활근의 비후 등의 소견을 볼 수 있다^{1,2}.

경구면역관용(oral tolerance)은 소화기를 통하여 노출된 항원에 대하여 전신적인 면역학적 무반응이 유도되는 현상을 말하는데, 지금까지는 주로 자가면역성 뇌염, 당뇨병, 포도막염이나 콜라겐 유도 관절염 등과 같은 Th1 매개 자가면역 질환 모델에서 연구되어 왔으며, 원인 단백을 고용량으로 일회 경구를 통해 전처치 함으로써 이들 질환의 발생이 억제됨이 증명된바 있다³⁻⁵. 반면 Th2 매개 알레르기 질환을 대상으로 한 경구면역관용 유도에 관한 연구는 최근에 들어서야 시작되었으며 이 경우에는 고용량을 한번 투여하는 경우 뿐만 아니라 저용량의 반복 투여에 의한 면역관용 유도에 관심이 모아지고 있다^{6,7}. 이러한 형태의 면역관용 유도는 흡입항원에 감작된 알레르기 질환

Address for correspondence : **Sung Hak Park, M.D.**
Department of Internal Medicine, Kangnam St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-Dong, Seocho-Gu, Seoul, 137-040, Korea
Phone : 02-590-1563 Fax : 02-596-2158
E-mail : cmcpsh@catholic.ac.kr
Received : Sep. 10. 2004.
Accepted : Sep. 23. 2004.

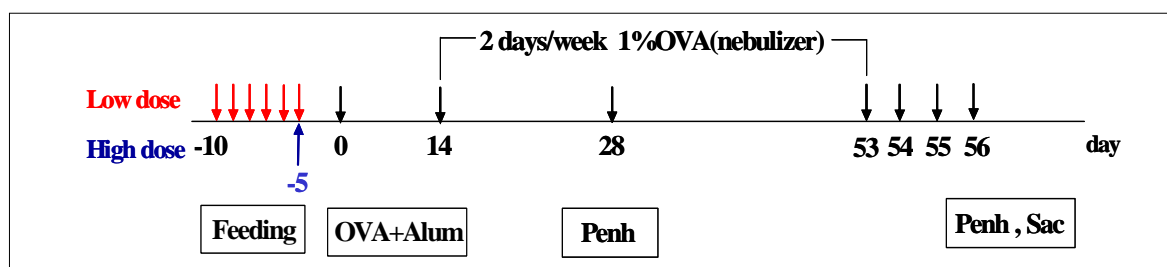


Figure 1. Experimental protocol.

Female BALB/c mice were fed with 1 mg of OVA for 6 consecutive days in low dose group or 25 mg of OVA once in high dose group or phosphate buffered saline in OVA(asthma) group. Five days later the animals were sensitized with 100 μ g of OVA and 500 μ g of Aluminum hydroxide two times on day 0 and day 14. After sensitization the animals were challenged by nebulization of aerosolized 1% OVA twice a week during the next 5 weeks and then for 3 consecutive days before Penh measurement in the last week. OVA: ovalbumin, Alum: Aluminum hydroxide, Penh: enhanced pause, Sac: sacrificed.

환환자에서 보편적으로 시행되고 있는 항원 특이 면역요법과 유사한 경우에 해당하는 것으로서 많은 관심이 가는 부분이다.

기관지천식에서 경구면역관용 유도에 대한 현재까지의 연구들은 대부분 4주 이내의 급성 기관지천식 모델을 대상으로 하여 경구면역관용의 예방효과를 관찰하였으며, 그 결과 또한 비교적 긍정적으로 평가되고 있으나 그 효과가 장기간 지속될 수 있는지에 대해서는 불확실하다. 또한 경구면역관용 유도가 기관지천식의 비가역적인 요소에 중요한 역할을 차지하고 있는 기도재형성에 미치는 영향 및 그와 관련되는 기전에 대한 연구는 없는 실정이다. 이에 대한 연구를 위해서는 우선 최소 6주 이상 지속되는 사람과 유사한 만성기관지 천식 모델의 확립이 필수적이다.

본 연구에서는 BALB/c 마우스를 이용하여 사람과 유사하게 기도재형성을 일으키는 만성기관지천식 모델을 만들어, 경구면역관용이 급성 염증 및 기도과민 반응뿐만 아니라 만성 염증에도 억제 효과가 있는지, 또는 경구면역관용이 만성에서 보이는 기도재형성을 억제하는지 알아보고, 이러한 효과가 저용량, 고용량에 따라 차이가 있는 지, 저용량과 고용량의 기전에 차이가 있는 지 알아보고자 하였다.

방 법

1. 실험동물

5주된 암컷 BALB/c 마우스(Samtako bio, Korea)

를 사용하였다. 실험동물은 천식유발을 하지 않은 음성대조군, Ovalbumin(OVA)으로 감작시킨 후 천식유발을 시킨 양성대조군(천식군), 저용량 경구면역관용군, 고용량 경구면역관용군으로 나누었으며 각 군당 12마리의 마우스를 사용하였다.

2. 경구면역관용 유도^{6,7}

저용량 경구면역관용군은 1mg의 OVA(grade V; sigma, St. Louis, MO)을 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 경구삽관용 튜브를 이용하여 6일동안 매일 먹이고, 고용량 경구면역관용군은 25mg의 OVA를 1회 먹였다. 천식군은 항원대신 동량의 PBS를 경구 투여하였다. 5일 후에 OVA 100 μ g과 aluminum hydroxide (Aldrich, Milwaukee, WI) 500 μ g을 섞어 2주 간격으로 2회 복강 내 투여하여 감작한 후 6주동안 1% OVA를 30분간 네블라이저(macjinmedical, Korea)로 흡입시키는데 5주는 주 2회, 마지막 주에는 3일 동안 연속으로 흡입시켜 기관지천식을 유발하였다(그림 1).

3. 기도과민성의 측정

각 군별로 감작시키고 흡입유발 후 급성천식모델인 4주 때와 도살직전 만성천식모델인 8주 때 마지막 네블라이저 흡입 24시간 후 기도저항 측정기(Allmedicus, An Yang, Korea)를 이용해 기도과민성을 측정하였다. 기도과민성은 0, 12.5, 25, 50, 100 mg/ml의 메

타콜린(sigma)을 각 농도별로 3ml씩 Ultra-Neb 초음파 연무기(3650p, DeVilbiss, Pennsylvania, PA)를 이용하여 에어로졸로 3분간 흡입 후 3분 동안의 enhanced pause(Penh) 값을 구하여 측정하였다. 이때 Penh은 기도저항을 나타내는 지표로서 구하는 공식은 다음과 같다.

$$\text{Penh} = (\text{Te}/\text{RT}-1) \times \text{PEF}/\text{PIF}$$

Te : expiratory time (sec),

흡기 끝에서 다음 흡기까지

RT : relaxation time (sec),

호기동안 호기량이 일회호흡량의 30%가 남을 때까지 걸리는 시간

PEF : peak expiratory flow rate (mL/s)

PIF : peak inspiratory flow rate (mL/s)

4. 기관지폐포세척

각 군별로 기도과민성측정 후 바로 케타민과 자일라진을 섞어 복강내로 주사하여 마취시키고 개흉하였다. 좌측 주기관지는 실로 묶고 22게이지 주사바늘을 기관에 삽입하고 우측 폐에서 기관지폐포세척을 시행하였는데 1회에 0.4 ml의 PBS를 3회 주입하여 수거하였으며, 수거율은 90%이상이었다. 수거된 기관지폐포세척액을 4℃, 2000rpm에서 7분간 원심분리하고, 상층액은 -70℃에 보관하였다. 세포침전물은 혈구계 선반을 이용하여 총세포수를 세고, 1×10^6 개/ml가 되도록 만든 후 50μl를 따서 700 rpm에서 5분간 원심분리(Cytospin 3, Shandon, Runcorn, UK)하여 슬라이드를 만들었다. Diff-Quik(국제시약, Japan)으로 염색하고 400배 시야에서 500개의 세포를 세어 세포백분율을 계산하였다.

5. 기관지폐포세척액의 상층액에서 시토카인 측정

기관지폐포세척액의 상층액에서 Th2 시토카인인 IL-13과 Th1 시토카인인 IFN-γ을 각각에 대한 ELISA kit (R&D system, MN, U.S.A)를 이용하여 측정하였다. 이 검사의 감수성은 각각 4, 2 pg/ml이었다.

6. 혈청 OVA 특이 IgE, IgG1, IgG2a의 측정⁸

각 군에서 채취한 혈청으로 OVA 특이 IgE (BD biosciences, San Diego, CA), IgG1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), IgG2a (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 항체반응정도를 ELISA방법을 이용하여 측정하였다.

먼저 OVA의 농도를 100 μg/ml로 희석하여 96-well plate에 각 well 당 100 μl씩 분주하였으며 이에 결합하는 각각의 특이 항체를 측정하고, 이때 표준 시료의 농도를 100 arbitrary unit(A.U.)로 가정하고 단계별로 희석하여 표준농도곡선을 얻은 다음 상대적인 단위(A.U.)를 구하였다.

7. 폐조직

기관지폐포세척을 시행하지 않은 좌측 폐를 떼어내어 4% paraformaldehyde에 고정시킨 후 조직절편을 만들었다. 기관지 상피세포에서 술잔세포는 periodic acid-Schiff (PAS) 염색으로 확인하였으며, 그 정도는 전체 기관지상피세포 중에서 PAS에 염색되는 세포의 비율에 따라서 5단계로 점수를 부여하여 측정하였다. 즉 PAS 양성 세포가 하나도 없는 경우는 0점, 25% 미만인 경우는 1점, 25-50% 미만인 경우는 2점, 50-75% 미만인 경우는 3점, 75-100% 미만인 경우 또는 점액에 의해 기관지가 막힌 경우는 4점으로 하였다⁹.

기관지하부의 섬유화 정도는 Masson's trichrome 염색으로 측정하였으며 기저막하부에 섬유화로 염색되는 부위의 면적을 측정하였다¹⁰.

모든 기관지는 기저막둘레의 길이를 기준으로 크기가 유사하고 비교적 원형모양을 띄는 3개를 정해 평균값을 계산하였으며 모든 측정은 computerized image analyzer 프로그램(BX50, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다.

8. 통계처리

모든 측정값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 각

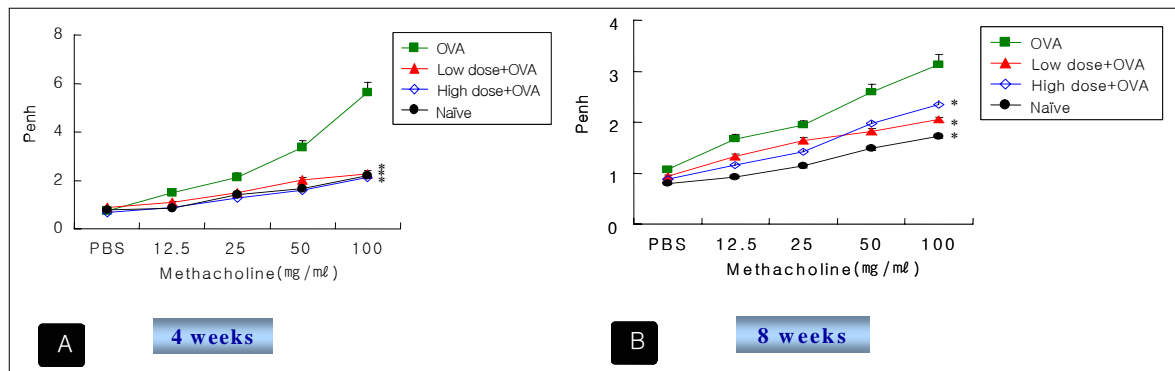


Figure 2. The preventive effect by induction of oral tolerance on AHR to methacholine in each group. AHR was measured at 4 weeks (A) and 8 weeks (B) after sensitization. AHR was calculated in Penh. * : $P < 0.01$ vs OVA group, AHR: airway hyperresponsiveness.

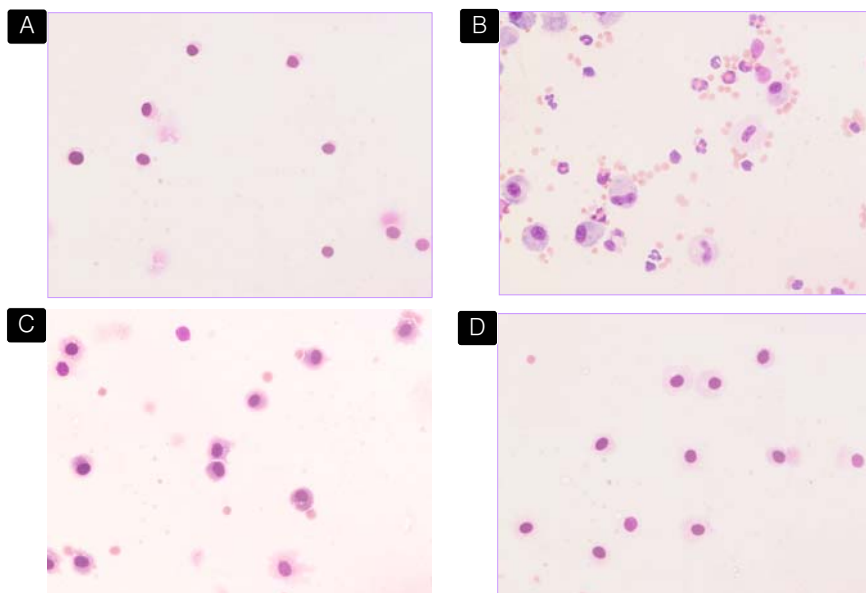


Figure 3. Representative photomicrographs of Diff-Quik stain of broncho-alveolar lavage cells in each group of mouse model ($\times 400$) : (A) Naive group, (B) OVA(asthma) group, (C) Low dose group, (D) High dose group. Compared with OVA group, oral tolerance groups showed a significant decrease in inflammatory cells including eosinophils, lymphocytes and neutrophils.

군간의 통계적 검정은 Windows용 SPSS 통계 프로그램(version 10.0)을 이용하여 independent sample T-test로 검정하였고 P 값이 0.05이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 보았다.

결 과

1. 기도과민성

OVA로 감작 후 4주째와 8주째에 측정한 Penh 값은

메타콜린 농도에 상관없이 두 경구면역관용군에서 천식 군보다 유의하게 감소되었으며($P < 0.01$), 이러한 차이는 4주째가 8주째에 비해, 저농도의 메타콜린보다는 고농도의 메타콜린을 흡입시켰을 때 더욱 뚜렷한 차이를 보여주었다(그림 2A, 2B). 두 경구면역관용군간의 차이는 보이지 않았으며, 음성대조군과도 차이가 없었다.

2. 기관지폐포세척액 세포수

기관지폐포세척액내 염증세포를 현미경으로 관찰

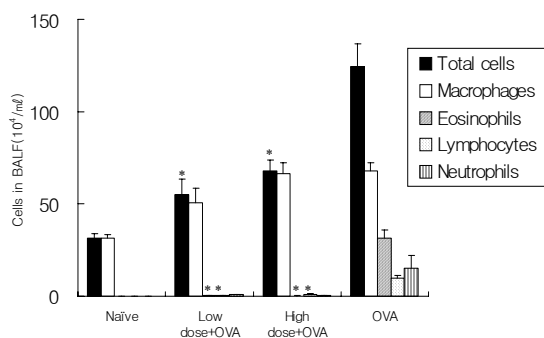


Figure 4. Inflammatory cell counts in bronchoalveolar lavage fluids(BALF) at 8weeks after systemic immunization. Compared with OVA group, oral tolerance groups showed a significant decrease in inflammatory cells including total cells, eosinophils and lymphocytes. *: $P<0.01$ vs OVA group.

해 보았을 때 천식군에서 염증세포가 많이 관찰되는 것에 비해 두 경구면역관용군에서는 현저하게 감소하는 것을 볼 수 있었다(그림 3). 기관지폐포세척액내 세포수($\times 10^4/\text{ml}$)는 총세포수의 경우 천식군(124.5 ± 12.24)에 비해 저용량 경구면역관용군과 고용량 경구면역관용군(각각 61.90 ± 6.10 , 67.91 ± 6.00)이 유의하게 감소되었다($P<0.01$). 특히 알레르기 염증세포인 호산구수도 천식군 (31.65 ± 4.31)에 비해 저용량 경구면역관용군과 고용량 경구면역관용군(각각 0.28 ± 0.18 , 0.16 ± 0.13)이 유의하게 감소되었다($P<0.01$). 림프구수도 천식군(9.83 ± 1.28)에 비해 저용량 경구면역관용군과 고용량 경구면역관용군(각각 0.32 ± 0.11 , 0.98 ± 0.33)이 유의하게 낮았다($P<0.01$). 호중구수는 저용량 경구면역관용군(0.77 ± 0.37)에서는 천식군 (15.01 ± 6.92)

과 통계적인 차이는 보이지 않았으나 현저하게 감소하는 경향을 보였으며 고용량 경구면역관용군(0.43 ± 0.13)은 천식군에 비해 유의하게 감소되었다($P<0.05$, 그림 4).

3. 기관지폐포세척액내에서 IL-13과 IFN- γ 측정

기관지폐포세척액내의 IL-13 농도(pg/ml)는 천식군(8.8 ± 1.0)에 비해 저용량 경구면역관용군, 고용량 경구면역관용군(2.13 ± 0.34 , 1.86 ± 0.44)이 유의하게 감소하였다($P<0.01$, 그림 5A). IFN- γ 농도(pg/ml)도 천식군(5.78 ± 0.36)에 비해 저용량 경구면역관용군, 고용량 경구면역관용군(4.09 ± 0.1 , 4.17 ± 0.08)이 유의하게 감소하였다($P<0.01$, 그림 5B).

4. 혈청 OVA 특이 IgE, IgG1, IgG2a

혈청 OVA 특이 IgE는 천식군(46.01 ± 16.87 A.U.)에 비해 저용량 경구면역관용군(4.7 ± 2.03 A.U.), 고용량 경구면역관용군 (6.43 ± 2.87 A.U.)이 유의하게 낮았다($P<0.05$, 그림 6). 혈청 OVA 특이 IgG1은 천식군(16.23 ± 5.43 A.U.)에 비해 고용량 경구면역관용군(4.45 ± 0.4 A.U.)은 유의하게 낮았으나($P<0.05$) 저용량 경구면역관용군(6.28 ± 1.22 A.U.)은 통계적으로 유의하진 않지만 현저히 감소되는 경향을 보였다. 저용량 경구면역관용군과 고용량 경구면역관용군 간에는 차이가 없었다(그림 7A).

혈청 OVA 특이 IgG2a는 천식군 (9.9 ± 1.46 A.U.)에

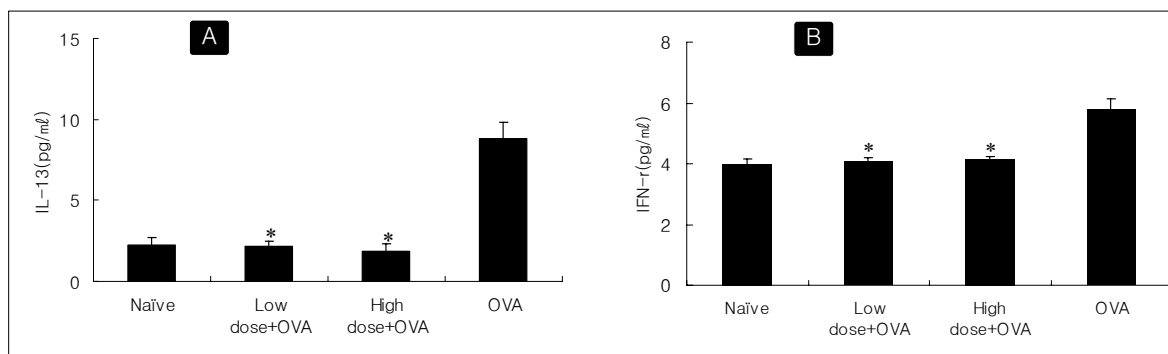


Figure 5. Cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid at 8 weeks after induction of oral tolerance. IL-13 (A) and IFN- γ (B) production in mouse bronchoalveolar lavage fluids. Compared with OVA group, oral tolerance groups showed a significant decrease in BAL fluid IL-13 and IFN- γ . *: $P<0.01$ vs OVA group

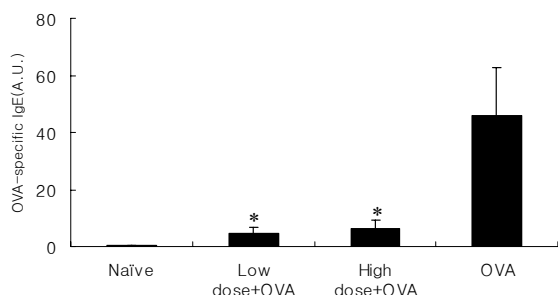


Figure 6. Suppression of OVA-specific IgE levels in serum after the induction of oral tolerance. Compared with OVA group, oral tolerance groups showed a significant decrease in serum OVA-specific IgE levels. * : $P<0.01$ vs OVA group

비해 저용량 경구면역관용군(4.16 ± 0.81 A.U.), 고용량 경구면역관용군 (0.61 ± 0.16 A.U.)이 모두 유의하게 낮았다($P<0.01$, 그림 7B).

5. 기관지상피세포에서 술잔세포의 과다형성정도

음성대조군에서는 술잔세포가 관찰되지 않았으며, PAS 염색에서의 술잔세포 과다형성 점수는 천식군에 비해 저용량 및 고용량 경구면역관용군에서 유의하게 낮았다(3.63 ± 0.14 , 0.45 ± 0.12 , 1.00 ± 0.19 , $P<0.01$, 그림 8A, 8B).

6. 폐조직에서 기저막하부의 섬유화 정도

기저막하부의 섬유화 면적(μm^2)은 음성대조군($9,686 \pm$

460), 저용량 경구면역관용군($17,470 \pm 1,796$), 고용량 경구면역관용군($16,476 \pm 1,325$), 천식군($39,046 \pm 3,534$)으로 천식군에 비해 모든 경구면역관용군에서 섬유화가 억제되는 것을 관찰할 수 있었다($P<0.01$, 그림 9A, 9B).

고 찰

알레르기성 기관지천식은 반복적으로 알레르겐에 노출되어 나타나는 만성질환의 형태로서 궁극적으로 기도에 만성적인 염증상태가 지속되어 구조적인 이상을 초래하여 기도재형성이 발생된다. 기도재형성은 기도과민반응을 악화시키고 비가역적인 기도폐쇄를 일으키기 때문에 임상적으로 문제가 된다^{11,12}. 알레르기 기관지천식의 진행 및 악화를 방지하기 위해서는 항원회피가 필수적이나, 항원회피가 불가능한 경우에는 면역요법이 중요한 비중을 차지한다.

장의 면역계는 외부 물질에 노출되었을 때 그 물질이 해로운지 아닌지를 구별할 수 있는 능력이 다른 장기에 비하여 탁월한 것으로 알려져 있다^{13,14}. 예를 들어, 병원성 박테리아에 대해서는 면역반응을 일으키는 반면, 식품항원과 정상균무리(normal flora)에 대해서는 면역관용을 일으키게 된다. 이러한 장 점막의 면역계가 면역관용을 계속 유지하는 중요한 기전 중의 하나는 식이 항원에 대한 ‘경구면역관용(oral immune tolerance)’의 획득으로 보고 되어 있다^{3,15}. 실제 임상에서 이러한 경구면역관용의 유도는 투여하기도 쉽고

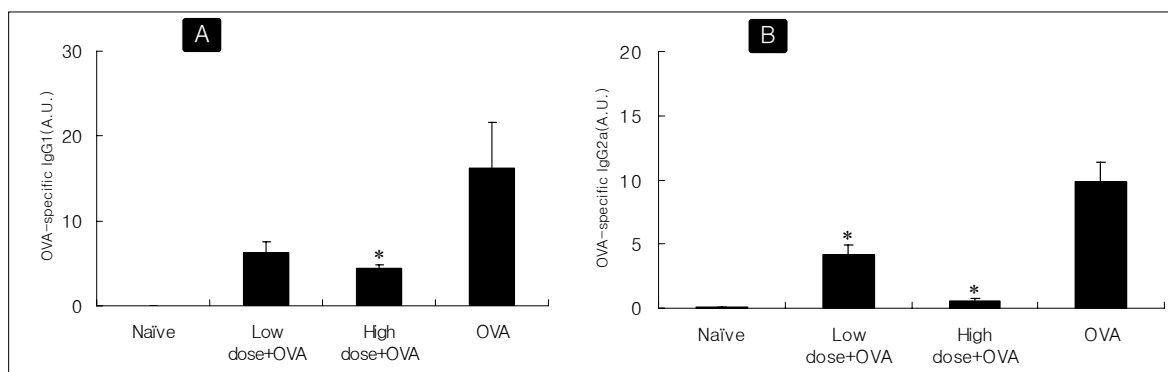


Figure 7. OVA-specific IgG1(A) and IgG2a(B) levels in serum at 8 weeks after systemic immunization. Compared with OVA group, oral tolerance groups showed a significant decrease in serum OVA-specific IgG1 and IgG2a levels. * : $P<0.01$ vs OVA group

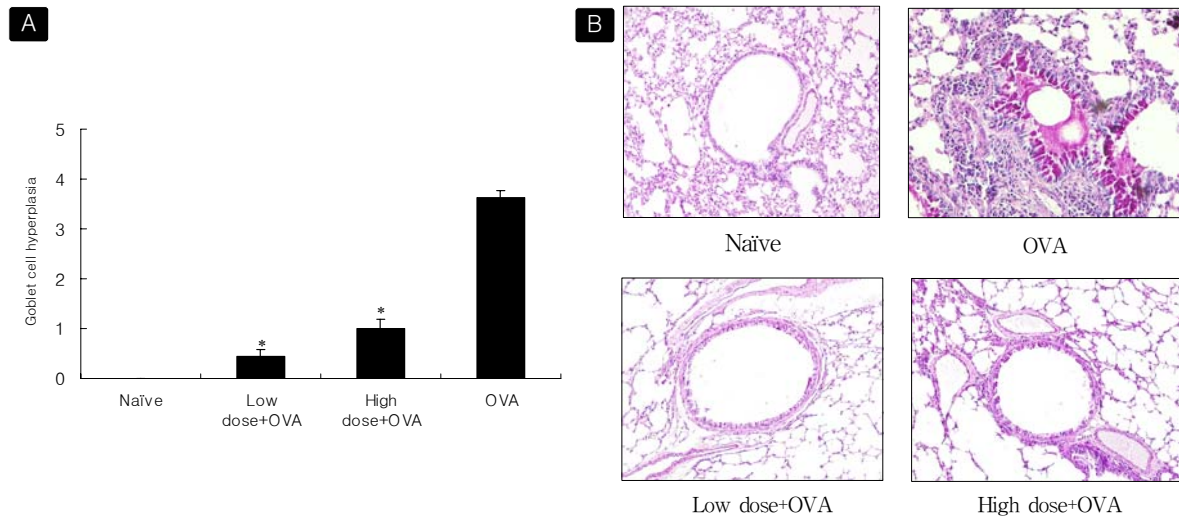


Figure 8. Scoring (A) and representative photomicrograph of PAS stain (X 200) (B) for goblet cell hyperplasia. Goblet cell hyperplasia in the epithelial lining was expressed by a score according to the percentage of the goblet cells with positive in PAS stain in the epithelial cells—grade 0 : no goblet cells, grade 1 : <25%, grade 2 : 25–50%, grade 3 : 50–75%, grade 4 : >75% or total bronchial obstruction due to mucus. Compared with OVA group, oral tolerance groups showed a significant decrease in goblet cell hyperplasia. * : $P < 0.01$ vs OVA group

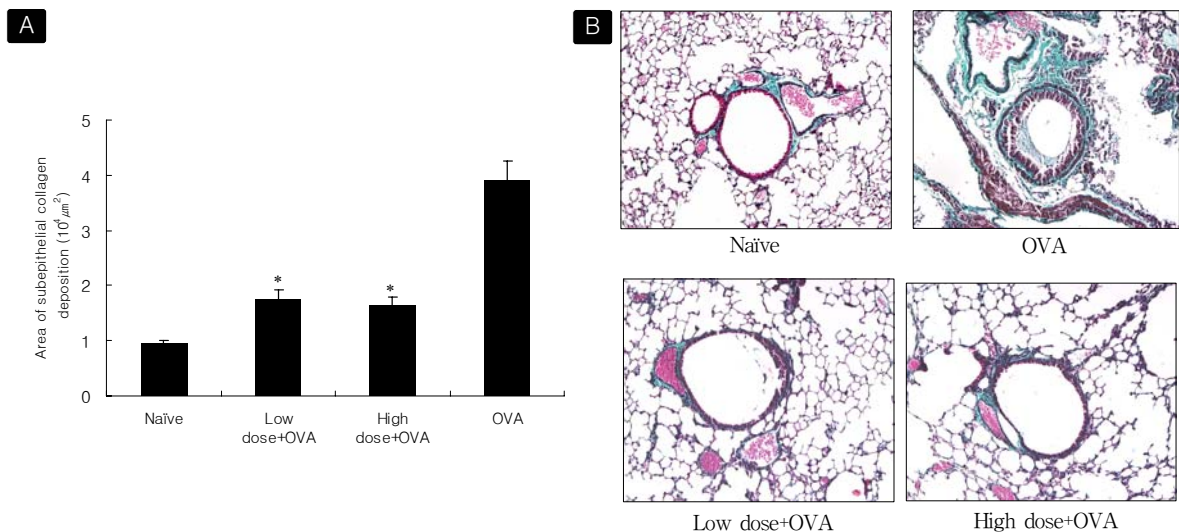


Figure 9. Area (A) and representative photomicrograph of Masson's trichrome stain (X 200) (B) for peribronchial collagen deposition. Compared with OVA group, oral tolerance groups showed a significant decrease in peribronchial fibrosis. * : $P < 0.01$ vs OVA group

비용도 적게 들며, 주사바늘에 대한 거부감도 피할 수 있는 장점이 있다.

최근 이러한 경구면역관용 유도를 알레르기 기관지 천식의 예방 및 치료에 응용하고자 하는 시도가 있어 왔으며, 그 효과 또한 긍정적으로 평가되고 있다. 하지만 현재까지 이에 관한 연구는 대부분 4주 이내의 급성

기관지천식모델에서 효과를 관찰하였으며^{6,16,17}, 그 효과가 4주 이상 장기적으로 지속되는지의 여부에 대해서는 아직 불확실하다.

본 연구 결과 경구면역관용 유도는 4주뿐만 아니라 8주째의 기도과민성도 현저하게 감소시켰으며, 8주째에 나타나는 기도염증반응(기관지폐포세척액내의

염증세포 수)과 기도재형성의 대표적인 지표인 기도상피 술잔세포의 과다형성 및 기저막하부의 섬유화정도도 현저하게 억제시킴을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 알레르기 기관지천식모델에서 알레르기 면역반응을 억제시키기 위한 경구면역관용 유도의 효과가 8주까지 장기적으로 지속될 수 있다는 것을 의미한다.

경구면역관용의 기전은 아직 명확하지 않으나, 항원전달세포(antigen presenting cell, APC)의 해부학적 위치, 표현형, 활성화상태 등에 의해 T 림프구와의 상호작용이 달라짐으로써 면역반응을 일으킬지 면역관용을 일으킬 것인지가 결정된다고 추측되고 있다^{18, 19}. 그리고 항원의 투여량 및 투여 빈도수, 투여시기 등에 의해 T 림프구의 결손(deletion), 무반응(anergy), 활발한 조절(active regulation)등이 일어나고 이로 인해 면역관용이 일어날 수 있다고 알려져 있다¹³. 일반적으로 항원을 저용량으로 반복 투여하면 조절 도움 T 림프구(regulatory Th cell)가 활성화되어 naive T 림프구를 억제함으로써 면역관용이 유도된다고 추측되고 있으며, 항원을 고용량으로 한번만 투여하게 되면 T 림프구의 클론 결손(clonal deletion)과 무반응상태가 일어나서 면역관용을 유도한다고 알려져 있다. 하지만 경구면역관용 유도 방법에 따른 효과의 차이는 아직 불분명하며, 본 연구에서도 저용량 경구면역관용군과 고용량 경구면역관용군간에 알레르기 면역반응 억제효과의 차이는 관찰할 수 없었다.

한편 알레르기 기관지천식의 병태생리에는 Th2세포에서 분비되는 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 등의 시토카인을 포함하여 다양한 면역조절 물질들이 관여하는 것으로 알려져 있는데²⁰, Russo 등¹⁷과 Nakao 등²¹은 경구면역관용 유도 후 Th1 시토카인인 IFN- γ 와 Th2 시토카인인 IL-4, IL-10, IL-13의 농도가 감소하였으며, Fujihashi 등⁷과 Shi 등⁸은 마우스 급성천식모델에서 경구면역관용 유도 후 혈청 내에서 OVA 특이 IgE, Th1 면역반응의 지표인 IgG2a, Th2 면역반응의 지표인 IgG1 농도가 모두 유의하게 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서도 경구면역관용 유도 후 IFN- γ 및 IL-13의 농도가 감소되며, 이러한 시토카인의 영향을 받는 혈청 내 OVA 특이 IgE, IgG1, IgG2a 농도도 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 연구결과들은 경구면역관용 유도가 알레르기 면역반응에서 주가 되는

Th2 면역반응뿐만 아니라 Th1 면역반응까지도 억제됨을 보여 주고 있다. 이는 경구면역관용이 조절 도움 T 림프구의 활성화를 시켜서 면역반응이 억제될 수 있으나 본 연구에서는 조절 도움 T 림프구에서 주로 분비되는 IL-10의 농도가 감소되어 있어 가능성은 희박하다. 다른 기전으로는 경구면역관용이 T 림프구의 클론 결손이나 무반응을 유도하여 항원특이 T 도움세포의 반응이 억제될 수 있으므로 항 후 이에 대한 연구가 필요하겠다.

결론적으로 알레르기 기관지천식모델에서 경구면역관용 유도는 8주까지 장기적으로 기도과민성, 염증반응 및 기도재형성을 억제할 수 있으며, 그 기전에는 항원 특이 면역글로불린과 Th1 및 Th2 시토카인들에 대한 억제작용이 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 이와 같은 연구결과는 향후 실제 임상에서 경구면역관용 유도를 알레르기 기관지천식의 치료에 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

경구면역관용 유도는 4주 이내의 급성천식모델에서 알레르기 염증반응을 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있다. 하지만 경구면역관용 유도가 4주 이상 지속되는 만성천식모델에서도 알레르기 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있는 지에 대해서는 아직 불확실하다. 본 연구에서는 8주 동안 지속되는 만성천식모델을 이용하여 경구면역관용 유도가 알레르기 염증반응 및 기도재형성에 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하였다.

방 법 :

5주된 암컷 BALB/c 마우스에 ovalbumin(OVA)을 복강 내로 투여하여 감작시킨 후, 6주 동안 주 2회 OVA를 반복 흡입시킴으로써 만성천식모델을 만들었다. 경구면역관용은 감작시키기 전에 OVA를 경구 투여함으로써 유도하였으며, 저용량 군(OVA 1 mg/day×6일)과 고용량 군(OVA 25 mg/day×1일)으로 나누었다. 기도과민성은 농도별 메타콜린 흡입에 따른 enhanced pause (penh) 값의 변화로 평가하였으며, 기관지폐포세척액 내의 염증세포수를 측정하고 IL-13, IFN- γ 농도 및 혈청 내 OVA 특이 IgE, IgG1, IgG2a 농도를 ELISA로 측정하였다. 기도재형성 정도

는 폐조직의 PAS 및 Masson's trichrome 염색으로 관찰하였다.

결 과 :

경구면역관용군은 천식군에 비해 penh 값, 기관지폐포세척액 내의 염증세포 수, IL-13 및 IFN- γ 농도, 혈청 내의 OVA 특이 IgE, IgG1 및 IgG2a 농도, 폐조직술잔세포의 과다형성, 기저막하부의 섬유화 정도가 유의하게 감소되었다 ($P<0.05$).

결 론 :

알레르기 기관지천식모델에서 경구면역관용 유도는 8주까지 장기적으로 기도과민성, 염증반응 및 기도재형성을 억제하였으며, 그 기전에는 항원 특이 면역글로불린과 Th1 및 Th2 시토카인들에 대한 억제작용이 중요한 역할을 하는 것으로 추측되었다.

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 지도와 격려를 아끼지 않으신 박성학 지도 교수님과 늘 세심한 배려와 가르침으로 지속적인 관심과 조언을 해주신 김영균 선생님, 권순석 선생님, 따뜻하게 배려해주시고 정신적인 힘이 되어주신 이숙영 선생님, 김승준 선생님께도 감사드리고 언제나 옆에서 힘이 되어준 이정미 연구원에 게도 감사드립니다.

참고문헌

- Kumar RK, Foster PS. Murine model of chronic human asthma. *Immunol Cell Biol* 2001;79:141-4.
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-45.
- Smith KM, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P. Oral tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:S175-8.
- Husby S. Sensitization and tolerance. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001;1:237-41.
- Garside P, Mowat AM, Khoruts A. Oral tolerance in disease. *Gut* 1999;44:137-42.
- Chung Y, Cho J, Chang YS, Cho SH, Kang CY. Preventive and therapeutic effects of oral tolerance in a murine model of asthma. *Immunobiology* 2002;206:408-23.
- Fujihashi K, Dohi T, Kweon MN, McGhee JR, Koga T, Cooper MD, et al. gammadelta T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int Immunol* 1999;11:1907-16.
- Shi HN, Grusby MJ, Nagler-Anderson C. Orally induced peripheral nonresponsiveness is maintained in the absence of functional Th1 or Th2 cells. *J Immunol* 1999;162:5143-8.
- Tanaka H, Masuda T, Tokunaka S, Komai M, Nagao K, Takahashi Y, et al. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res* 2001;50:616-24.
- Ellis R, Leigh R, Southam D, O'Byrne PM, Inman MD. Morphometric analysis of mouse airways after chronic allergen challenge. *Lab Invest* 2003;83:1285-91.
- Leigh R, Ellis R, Wattie J, Southam DS, De Hoogh M, Gauldie J, et al. Dysfunction and remodeling of the mouse airway persist after resolution of acute allergen induced airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:526-35.
- Fahy JV. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:S46-51.
- Garside P, Kennedy MW, Wakelin D, Lawrence CE. Immunopathology of intestinal helminth infection. *Parasite Immunol* 2000;22:605-12.
- Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997;156:145-66.
- Cohn L. Food for thought: can immunological tolerance be induced to treat asthma? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:509-12.
- Russo M, Jancar S, Pereira de Siqueira AL, Mengel J, Gomes E, Ficker SM, et al. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. *Immunol Lett* 1998;61:15-23.
- Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D, et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:518-26.
- Mueller DL, Jenkins MK. Molecular mechanisms underlying functional T-cell unresponsiveness. *Curr Opin Immunol* 1995;7:375-81.
- Healy JI, Goodnow CC. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:645-70.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
- Nakao A, Kasai M, Kumano K, Nakajima H, Kurasawa K, Iwamoto I. High-dose oral tolerance prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *Int Immunol* 1998;10:387-94.