

# 생쥐 천식모델에서 생후 조기 알레르겐/내독소 노출이 성숙 후 알레르기 기도염증에 미치는 영향

경희대학교 의과대학 소아과학교실

나 영 호 · 최 선 희

= Abstract =

## The effects of early allergen/endotoxin exposure on subsequent allergic airway inflammation to allergen in mouse model of asthma

Yeong-Ho Rha, M.D., Sun-Hee Choi, M.D.

Department of Pediatrics, School of Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

**Purpose:** Recently many studies show early exposure during childhood growth to endotoxin (lipopolysaccharides, LPS) and/or early exposure to allergens exhibit important role in development of allergy including bronchial asthma. The aim of this study was to evaluate the role of endotoxin and allergen exposure in early life via the airways in the pathogenesis of allergic airways inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR) in mouse model of asthma.

**Methods:** Less than one week-old Balb/c mice was used. Groups of mice were received either a single intranasal instillation of sterile physiologic saline, 1% ovalbumin (OVA), LPS or 1.0 µg LPS in 1% OVA. On 35th day, these animals were sensitized with 1% OVA for 10 consecutive days via the airways. Animals were challenged with ovalbumin for 3 days on 55th days, and airway inflammation, hyperresponsiveness, and cytokine expression were assessed. Measurements of airway function were obtained in unrestrained animals, using whole-body plethysmography. Airway responsiveness was expressed in terms of % enhanced pause (Penh) increase from baseline to aerosolized methacholine. Lung eosinophilia, serum OVA-IgE and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid cytokine levels were also assessed. ANOVA was used to determine the levels of difference between all groups. Comparisons for all pairs were performed by Tukey-Kramer honest significant difference test; *P* values for significance were set to 0.05.

**Results:** Sensitized and challenged mice with OVA showed significant airway eosinophilia and heightened responsiveness to methacholine. Early life exposure of OVA and/or LPS via the airway prevented both development of AHR as well as bronchoalveolar lavage fluid eosinophilia. Exposure with OVA or LPS also resulted in suppression of interleukin (IL)-4, 5 production in BAL fluid and OVA specific IgE in blood.

**Conclusion:** These results indicate that antigen and/or LPS exposure in the early life results in inhibition of allergic responses to OVA in this mouse model of asthma. Our data show that early life exposure with OVA and/or LPS may have a protective role in the development of allergic airway inflammation and development of allergen-induced airway responses in mouse model of asthma. (Korean J Pediatr 2010;53:481-487)

**Key Words:** Asthma model, Mouse, Endotoxin, Ovalbumin

## 서 론

지난 30여 년간에 걸친 알레르기 질환의 유병율의 증가는 한편으로는 소아가 생후 초기에 노출되는 미생물적 부하(microbial burden)의 변화와 관련하여 알레르기 질환 유병율의 증가를 제시한 '위생가설'(hygiene hypothesis)에 근거하여 설명될 수 있다<sup>1)</sup>. 천식은 소아에서 가장 흔한 만성 질환이며 이와 동반되는 상당한 병상태(morbidity)를 나타낸다. 흔한 대기 알레르겐에 의한 기도의 알레르기 감작은 천식과 알레르기비염의 발생과 관련되며 많은 것은 전 인구의 30%가 이들 질환에 이환된다<sup>2)</sup>. 실제로 시골의 농

Received : 5 January 2010, Revised : 2 February 2010

Accepted : 25 March 2010

Corresponding Author: Yeong-Ho Rha, M.D.

Department of Pediatrics, Kyunghee University Hospital, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul, 131-702 Korea

Tel: +82.2-958-8306, Fax: +82.2-958-8304

E-mail: yhrha@khu.ac.kr

This study was supported by Sam-A Academic Award (2006) of Korean Pediatrics Society.

촌 환경에서 성장한 소아는 천식과 아토피질환의 발생으로부터 어느 정도 방어되며 이러한 방어현상은 그 기전이 생후 초기에 알레르겐과 Lipopolysaccharide (LPS)와 같은 내독소(endotoxin)를 포함하는 면역 자극에 노출된 결과일 가능성이 여러 연구결과에서 제시되었다<sup>3-9</sup>.

알레르기의 발생에는 알레르겐 접촉에 의한 제2형 조력 T 세포(Th2-type T cells)의 활성화가 필수적으로 관여를 하지만 반면에 알레르기가 없는 비알레르기(nonallergic) 개체에서는 알레르겐에 대한 반응으로 제1형 조력 T 세포(Th1-type T cells) 반응이나 조절 T 세포(regulatory T cell-Treg) 형 면역반응이 나타난다.<sup>10-13</sup> 이처럼 알레르기 개체는 비록 유전적으로 Th2 반응 형태를 따르는 감수성이 있으나<sup>14-16</sup>, 역학적 연구 결과들은 Th2 반응 형태가 환경적 영향에 의해서 Th1 반응 혹은 조절 T 세포 반응 방향으로 그 흐름이 재설정될 수 있다는 근거들을 제시하였다<sup>9, 15-18</sup>. 1989년에 Strachan<sup>19</sup>에 의해서 처음으로 제시된 '위생가설'은 세균에 의한 기도의 조기 자극이 결과적으로 되먹이기 억제반응(feedback inhibition)의 형태를 통해서 주로 Th1 림프구 반응을 자극하여 기도에서 Th2의 표현 경향을 감소시킨다는 이론을 내세웠다. 이는 세균에 의하여 기도가 적절하게 자극되지 않으면 Th2 림프구의 경로를 통해서 기도감작(airway sensitization)이 증가하는 결과가 초래된다는 이론이다<sup>20</sup>. 한편 최근의 많은 연구결과들은 기도의 비알레르기성 반응이 Th1 및 Th2 림프구 반응 모두를 능동적으로 억제하는 조절 T 세포의 활성화로 특징지을 수 있다는 근거를 제시하였다<sup>11-13, 21, 22</sup>. 따라서 천식을 포함한 알레르기 질환은 생후 초기에 항원자극을 통한 기도 점막 면역계의 능동적 불응화의 실패한 결과라고 추측할 수 있다. 만약에 생후 초기의 조력 T 림프구 반응이 적절하게 유도되지 않으면 이어서 나타나는 무해한 대기항원과 점막의 접촉은 알레르기 감작(allergen sensitization)으로 귀결되는 것이다. 출생 전 면역계는 Th2 세포를 활성화하는 경향이 있으나<sup>4, 23</sup> 출생 이후 항원과의 접촉에 의하여 유도되는 면역반응의 성숙은 자극에 따라서 좌우되어 여러 다른 경로를 취할 수 있다<sup>9, 18, 24</sup>. 실제로 여러 역학적 연구결과들은 출생 전 및 신생아기 면역계가 이들 환경 자극들 의하여 영향 받을 수 있으며 신생아기의 항원에의 노출이 기관-특이 면역관용(organ-specific tolerance)으로 귀착될 수도 있다는 것을 시사하였다<sup>6, 9, 16, 17</sup>.

이상의 여러 연구 결과를 종합해보면 천식을 포함한 알레르기 질환의 발병에 소아의 성장시기에 알레르겐이나 내독소(LPS) 등과 같은 물질에의 노출이 중요한 역할을 할 가능성이 매우 높다고 할 수 있겠다. 따라서 출생 초기에 기도 점막을 통한 알레르겐과 내독소의 노출이 성장한 후에 알레르기 기도질환의 발생에 어떠한 효과를 나타내는지와 그 기전을 규명하는 것은 특히 알레르기 질환이 발병하는 시기인 소아기에서 천식의 발병기전과 알레르기 질환의 예방지침의 수립에 매우 중요한 기초 자료가 될 수 있다. 따라서 본 연구자들은 천식 생쥐모형에서 생후 초기의 알레르겐/내독소 노출이 알레르겐 감작에 의하여 발생된 기도염증과

기도과반응성(airway hyperresponsiveness, AHR)과 관련되는 성숙 후 알레르겐 면역반응에 미치는 효과를 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 동물

실험동물은 태어난 지 3일 이내의 암컷 BALB/c 신생 생쥐를 사용하였다. 동물사육 조건은 온도와 습도가 일정하게 유지되는 specific pathogen free (SPF)의 무균 동물 사육실에서 명암교대는 하루 12 시간씩의 일광 조건으로 사육하였다.

#### 1) 실험군의 분류

실험동물은 다음과 같이 4군으로 분류하였으며 알레르겐/내독소(LPS)를 이용한 노출(exposure)은 생후 3일째부터 매일 5  $\mu$ L를 5일간 연속해서 각 비공을 통하여 비강 내 점적하였다.

I군은 saline을 투여받은 군, II군은 1% 난알부민(ovalbumin) (grade V; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA)을 투여받은 군, III군은 1.0  $\mu$ g LPS (Escherichia coli serotype O111:B4; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA)를 투여 받은 군, IV군은 1% 난알부민(ovalbumin)에 용해된 1.0  $\mu$ g LPS를 투여 받은 군으로 하였다.

#### 2) 항원감작(Allergen sensitization) 및 기도유발(Airway allergen challenge)

4군의 실험 동물은 연구 시작 제 35일부터 10일간 매일 20분 동안 AeroSonic ultrasonic nebulizer (DeVilbiss Health Care, Somerset, PA USA)를 이용하여 5% ovalbumin in PBS를 분무하여 기도를 통하여 감작시켰다. 최종 기도 감작 10일 후인 제 55일부터 3일간 매일 20분 동안 네뮬라이저를 이용하여 1% ovalbumin in PBS를 분무하여 기도 항원유발(airway allergen challenge)을 시행하였다. 최종 기도유발 48시간 후 체적검사(plethysmography)를 이용하여 비특이적 기관지과반응성 검사(methcholine challenge test)를 시행하였으며 기관지과반응성 검사 후 실험동물을 희생시켜서 검체를 취하였다.

### 2. Methacholine에 의한 기관지 과반응성의 측정

최종 기도유발 48시간 후에 마취나 기관 삽관없이 의식이 있는 상태에서 single one-chamber animal plethysmograph (Buxco Electronics, Sharon, CT USA)를 이용하여 다음과 같은 과정으로 비특이적 기관지 과반응성을 측정하였다. 생쥐를 체용적 변동기록기의 측정박스에 넣은 후 5분 정도 호흡을 안정시켰다. 호흡이 안정되면 생리식염수를 AeroSonic ultrasonic nebulizer를 이용하여 2분간 흡입시킨 후 Penh (enhanced pause)를 측정하여 기저치로 이용하였다. 비특이적 기관지 과반응성의 유발은, 메타콜린(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA)을 0.9% 생리 식염수로 용해하여 5 단계의 농도(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL)로

제조하였다. 네뷸라이저를 이용하여 각 농도마다 체적 검사 박스에 2분간 분무하여 기도 유발(airway challenge)을 시행하였다. 메타콜린 분무가 끝난 후 기관지 수축으로 발생된 폐기능의 변화를 Penh로 측정하였다. Penh치는 3분간 30초 간격으로 평균화된 측정치를 컴퓨터에 저장하며 실험군과 대조군 간의 메타콜린의 각 농도에 따른 차이를 비교하였다. Enhanced pause는 한 주기의 호흡을 최대호기유량(Peak Expiratory Flow, PEF)/최대흡기유량(Peak Inspiratory Flow, PIF)의 비와 전반기 호기량(Former expiratory volume)에 비례하는 무차원의 수로 표시되며, 기도저항과 상관 관계가 양호한 것으로 알려져 있다. Penh치는 기저치에서의 증가를 %로 표시하였다.

### 3. 폐포기관지세척(Bronchoalveolar Lavage, BAL)

실험동물은 기관지과반응성 검사가 끝난 후 마취하고 개흉하였다. 개흉 후 18개지 주사바늘을 기관에 삽입하고 좌측 주 기관지에 고정하였다. 1 mL의 HBSS를 주입하고 곧 바로 흡인하여 BAL 액을 취하였다. 얻어진 기관지 폐포 세척액은 4°C 300 g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 -20°C에 보관하였다. 원심분리된 세포침전물은 HBSS로 2회 세척 후 hemocytometer (Coulter Counter; Coulter, Hialeah, FL USA)로 총세포수를 측정하고, 100 μL는 cytocentrifuge를 이용하여 세포분획을 위한 슬라이드를 제작하였다. cytopsin slide는 Diff-quick (Dade Behring Inc, Deerfield, IL, USA)으로 염색을 하여 400배 시야에서 망검법으로 최소한 300개의 세포를 세어 대식세포, 림프구, 호중구, 호산구를 감별 계산하였다.

### 4. BAL 액내 Cytokine 측정

BAL액 내의 IL-4, IL-5, IFN-γ 농도를 ELISA kit (BD PharMingen; San Diego, CA, USA)를 이용하여 프로토콜에 따라서 측정하였다. 실험은 3회 반복하여 평균 측정치를 구하였다.

### 5. 혈청 면역글로불린 측정

혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 혈중 OVA 특이 면역글로불린 E (OVA specific IgE) 농도를 ELISA 방법(optEIA IgE Kit; Pharmingen, San Diego, CA, USA)을 이용하여 측정하였다.

### 6. 통계분석

실험은 각 군 당 4마리씩으로, 2번 반복하였으며 실험결과는 평균±표준오차(SEM)로 표기하였다. 통계적 유의성은 SPSS 통계프로그램을 사용하였고 각 군의 측정치 비교는 Mann Whitney test와 analyses of variance (ANOVA)를 이용하였다. P값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 생후 초기 OVA, LPS 노출 후 메타콜린에 의한 기도과반응성의 변화

최종 기도유발 48시간 이후에 알레르기 기도염증에 의한 기도 반응성의 변화를 알아보기 위하여 one-chamber animal plethysmography를 이용하여 비특이적 기관지 과민성을 측정하였다. 생후 초기에 OVA, LPS, OVA/LPS를 비강내 투여하여 노출된 II, III, IV 군은 saline에 노출된 I군에 비해서 OVA에 의한 기도감작과 유발 후에 기도과민성의 발생이 통계학적으로 유의하게 억제되었다( $P < 0.05$ , Fig. 1).

### 2. 생후 초기 OVA, LPS 노출 후에 의한 기도 호산구 염증의 변화

기도과반응성 검사 후 알레르기 기도염증의 특징적인 변화인 기도내 호산구 침윤을 알아보기 위하여 BAL 액을 취하여 세포원심하여 슬라이드를 제작하였으며 염색을 하여 대식세포, 림프구, 호중구, 호산구를 감별 계산하였다. 생후초기에 saline을 투여하고 OVA에 의한 기도감작과 유발을 시킨 I 군은 BAL 액내 호산구 수가 증가되어 OVA에 의한 기도염증을 나타냈다. 생후초기에 OVA, LPS, OVA/LPS를 비강내 투여하여 노출된 II, III, IV 군은 I군에 비해서 BAL액내 호산구 수가 현저하게 감소하여 기도염증의 발생이 억제된 것을 관찰할 수 있었으며 그 차이는 통계학적으로

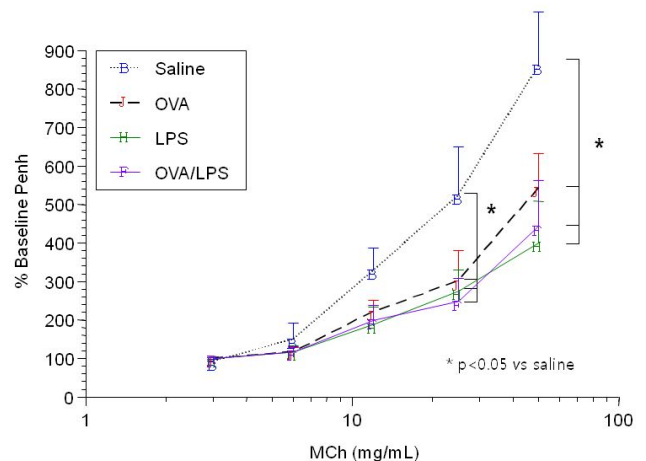


Fig. 1. Exposure to allergen and/or LPS in early life prevents the development of Airway hyperresponsiveness. Groups of mice were exposed to OVA and/or LPS then sensitized, challenged with OVA as described in Methods. Airway reactivity to increasing concentrations of MCh was measured 48 hr after the last challenge in unrestrained, conscious mice and Penh values were determined. Means±SEM of Penh values from 2 independent experiments are expressed as the percentage of baseline Penh values observed after PBS exposure (n=8 in each group). \*Significant difference ( $P < 0.05$ ) between saline exposed group and OVA and/or LPS groups. Abbreviations : OVA, ovalbumin; LPS, lipopolysaccharides; Penh, enhanced pause; Mch, methacholine.

로 유의하였다( $P<0.05$ ). 다른 세포는 연구군 사이에서 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

### 3. 생후 초기 OVA, LPS 노출에 의한 기관지 폐포 세척액내 사이토카인의 변화

알레르기 염증 사이토카인의 변화를 알아보기 위하여 BAL 액 내의 IL-4, IL-5, IFN-g의 농도를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 생후초기에 OVA, LPS, OVA/LPS를 비강내 투여하여 노출된 II, III, IV 군은 I군에 비해서 BAL액내 IL-4, 5 농도가 유의

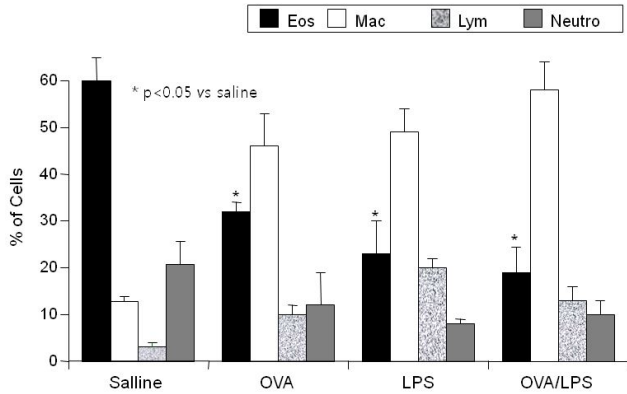


Fig. 2. Exposure to allergen and/or LPS in early life prevents eosinophil airway infiltration. To determine the effects of exposure to allergen and/or LPS in early life on inflammation following allergic sensitization and challenge, the cellular content of BAL fluid was assessed. Mice were investigated 48 hr after last aerosol exposure as described in Methods. The number of each cell type is expressed. Data represents the mean±SEM (n=8) of the number of the different cell types from two independent experiments. \*Significant difference ( $P<0.05$ ) between saline exposed group and OVA and/or LPS groups. Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; OVA, ovalbumin; LPS, lipopolysaccharides; Eos, eosinophils; Macro, macrophages; Lym, lymphocytes; Neutro, neutrophils.

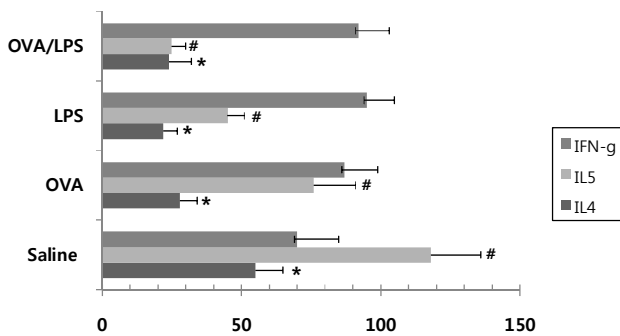


Fig. 3. Effect of exposure to allergen and/or LPS in early life on cytokine production in BAL fluid in sensitized and challenged mice. BAL fluid IL-4, IL-5, IFN-g levels were determined in allergen and/or LPS exposed mice and in sensitized and challenged mice by ELISA as described in Methods (n=8). Results of each group are expressed as mean±SEM (pg/mL) from two independent experiments. \*Significant differences ( $P<0.05$ ) of IL-4 between between saline exposed group and OVA and/or LPS groups. #Significant differences ( $P<0.05$ ) of IL-5 between saline exposed group and OVA and/or LPS groups.

하게 감소하였다( $P<0.05$ ). INF-g 농도는 I군에서 다른 군에 비해서 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3).

### 4. 생후 초기 OVA, LPS 노출에 의한 기관지 혈청 OVA 특이 IgE의 변화

알레르기 면역글로불린의 변화를 알아보기 위하여 혈액 내의 OVA 특이 IgE의 농도를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 생후초기에 OVA, LPS, OVA/LPS를 비강내 투여하여 노출된 II, III, IV 군은 saline에 노출된 I군에 비해서 혈청 내 OVA 특이 IgE 농도가 유의하게 감소하였다( $P<0.05$ , Fig. 4).

## 고 찰

본 연구자들은 신생 생쥐에서 항원(OVA)과 LPS에 의한 점막 자극이 뒤 이은 성숙 생쥐의 알레르기 유발에 따른 기도과반응성의 발생과 면역반응에서의 효과를 알아보려고 본 연구를 시행하였다. 본 연구결과 비점막에 대한 OVA, LPS, OVA/LPS 노출로 성숙 생쥐에서 생후초기 saline에 노출된 군에 비해서 알레르기 감작 및 유발 후 기도과반응성 발생이 유의하게 억제되었다. 또한 폐내 알레르기염증을 반영하는 BAL 액내 IL-4, IL-5가 감소되었고 혈청 IgE 농도 또한 유의하게 낮았다. 이러한 결과는 생후초기에 알레르기나 LPS에 대한 노출이 알레르기 기도질환의 발생에 중요 역할을 한다는 근거를 제공한다고 할 수 있다.

생후초기에 알레르기성 기도는 원래는 무해한 항원에 대한 부적절한 면역 반응으로부터 발생한다<sup>7)</sup>. 본 연구는 천식, 알레르기 비염과 같은 알레르기 기도질환이 생후초기에 기도점막 면역계의 항원자극을 통한 자발적인 활성화적인 면역관용에 실패로 초래된 것이라는 가설에 근거하였다<sup>25, 26)</sup>. 이러한 가설에 근거한다면 만약

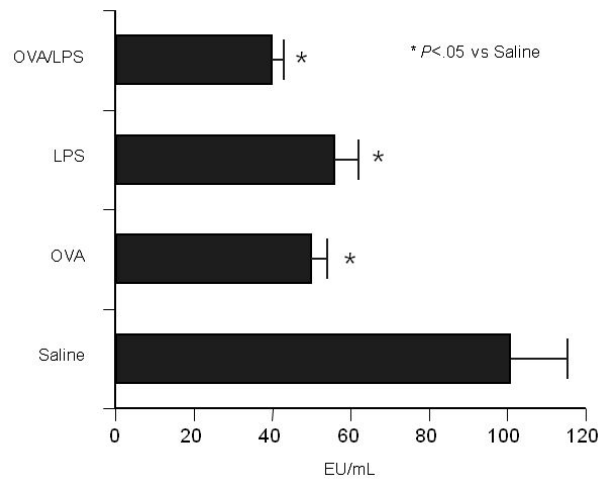


Fig. 4. Effect of exposure to allergen and/or LPS in early life on serum OVA-IgE. Serum levels of OVA-specific IgE was measured 2 days after the last airway challenge by ELISA. The results for each group are mean±SEM (n=8). \*Significant differences ( $P<0.05$ ) between saline exposed group and OVA and/or LPS groups.

조기 반응 생후 초기 반응이 적절하게 유도되지 않는다면 이후에 발생하는 무제한 대기환경과의 점막 접촉으로 알레르기 감작이 발생하게 된다. 여러 역학연구에서는 농장이나 전원환경에서 높은 농도의 내독소나 항원 혹은 둘 모두에 지속적으로 노출이 되는 경우에 명확한 기전은 밝혀져 있지 않으나 천식과 알레르겐 감작에 대하여 예방효과 있다는 결과를 보였다<sup>6, 8)</sup>. 본 연구에서는 신생생쥐에게 LPS 혹은 항원 혹은 둘 모두를 이들 환경적인 요인과 자연적인 접촉을 본 따서 생후 초기에 노출시켰다. 그 결과 항원유발 기도과민성 발생과 Th2 반응이 생후초기의 항원 그리고 혹은 LPS의 점막 노출에 의하여 억제되었다. 알레르기 염증 반응의 LPS의 효과에 대한 연구결과는 일정하지 않다. 동물모형에서 단회의 고용량 LPS 노출을 사용한 연구결과는 염증전구 면역반응이 TNF- $\alpha$  생산의 증가로서 낮으며 나타났고<sup>27, 28)</sup> 호중구성 기도 염증반응과 기도과민성이 야기되었다<sup>29, 30)</sup>. 이들 연구결과와는 대조적으로 본 연구결과에서는 LPS에 대한 신생 생쥐의 노출로 기도과민성 발생과 Th2 반응이 억제되었다. 이는 LPS에 대한 반복적인 노출로 면역관용(tolerance)이 생겨서 나타난 것으로 추측될 수 있다. 이러한 설명을 뒷받침하는 연구결과로 농장과 비농장 가구 모두에서 LPS 고농도의 소아에 대한 지속적인 환경적인 노출이 실험실에서 LPS 유도 사이토카인 생산 감소를 초래하였다는 결과가 있다<sup>8)</sup>.

LPS는 항원제시세포(antigen-presenting cells, APCs)에 존재하는 CD14과 TLR4 (Toll-like receptor 4)에 부착함으로써 면역세포들에 작용한다<sup>36)</sup>. 천식의 발생에 있어서 LPS 노출의 효과는 설치류 모델(rodent model)에서 많이 연구되었다<sup>9, 14, 37-39)</sup>. Tulic 등은 쥐모델(rat model)에서 난알부민(ovalbumin)에 의한 복강내 감작 직전 혹은 최장 4일 후에 투여된 LPS가 난알부민특이 IgE(ovalbumin-specific IgE)를 감소시키고 기도유발 후에 나타나는 기도과민성(airways hyperresponsiveness)을 감소시킬 뿐만 아니라 폐호산구증가증(lung eosinophilia)과 염증성 변화를 예방하였다고 하였다<sup>38)</sup>. 이와는 대조적으로 다른 감작 후에 투여된 LPS는 혈관누출을 증가시키고 감염을 증가시키는 결과를 초래하였다는 결과도 보고되었다<sup>39)</sup>. 또한 임신기간 동안의 LPS 노출에 의한 효과에 대한 연구에서 임신 생쥐를 임신전과 임신동안 LPS에 노출시켰을 때 감작과 유발 후의 새끼 생쥐에서의 면역반응은 Th2 사이토카인 표현은 감소하였으나 기도 과민성은 차이가 없었다<sup>37)</sup>. 이러한 연구결과에 근거하여 LPS 노출에 의한 면역조절효능이 제시되었으며 중요하게는 노출의 시기가 뒤이은 면역 반응들의 결과에 영향을 미친다는 사실을 시사하였다<sup>9, 14, 33-39)</sup>. 최근의 연구에서 LPS는 아토피 소아들에서 유래된 로부터의 체외배양 비조직내에서 알레르겐에 의하여 유도된 Th2 사이토카인의 표현을 감소시켰으나 아토피 성인의 경우에는 그렇지 않았다<sup>40)</sup>.

Holt 등은 천식의 발생을 설명할 때 사용할 수 있는 천식의 2 단계 모델(two-phase model of asthma)을 제시하였다<sup>41)</sup>. 이 모델은 영아기와 소아기초기 동안이 대개 알레르겐에 대한 일차

알레르기 감작(1단계)으로부터 성장하면서 반복적인 알레르겐 노출에 따른 만성 기도 염증의 결과인 지속적인 기도질환의 표현(2 단계)으로 진행되는 것을 설명하였다. 이러한 두 단계과정에서 LPS와 같은 미생물학적 자극의 잠재적인 방어 효과는 Th1 기능을 통하여 매개되는 것으로 추측되며 따라서 아토피와 연관된 Th2 면역반응에 대한 되먹이기 억제(feedback inhibition)를 제공하는 것으로 여겨진다.

다음에 열거된 여러 임상연구 결과들이 앞서 기술된 생후 초기 미생물학적 노출의 Th1/Th2 면역조절 효과를 증명하였다. 1) 비 아토피 영아에 비해서 아토피 영아의 주택에서 보다 높은 내독소 농도를 보였다<sup>42)</sup>. 2) 소아기 초기의 잦은 바이러스 감염은 생후 7세에서 천식과 기도 과민성의 발생 위험 감소와 관련되었다<sup>43)</sup>. 3) 생후 1세에 가축농장과 농장우유에 노출된 경우 알레르겐 감작, 알레르기 비염과 천식의 빈도가 현저하게 낮았다<sup>1)</sup>. 이러한 연구결과는 알레르겐 감작과 폐의 알레르기 염증이 확립되기 전에 시작되는 경우에는 미생물-유래(microbes-derived) 면역조절 중재(immune modulation intervention)가 가장 효과적이고 가장 안전할 수 있다는 사실을 시사한다고 할 수 있다.

본 연구 결과 신생생쥐 시기의 점막을 통하여 항원, 내독소의 노출이 성숙한 후 항원에 의한 기도염증 및 과민성의 발생을 억제하였으며 향후 작용기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다. 이러한 결과는 궁극적으로 소아에서 영아 초기에 알레르겐이나 내독소에 대한 노출이 알레르기 기도질환의 발생에 중요 역할을 한다는 사실을 증명하여 앞으로 위생개설과 관련된 국내 연구의 기초 자료가 될 수 있으며 또한 임상에 있어서는 이 연구 결과에 따라서 알레르기 질환의 일차치료인 예방에 적절하게 적용될 수 있는 근거 자료를 제공해줄 수 있는 중요한 연구가 될 것이라고 생각한다.

## 요 약

**목적:** 최근 여러 연구결과 천식을 포함한 알레르기질환의 발병에 소아 성장시기에 알레르겐이나 내독소(LPS) 등과 같은 물질에 노출이 중요한 역할을 하는 것으로 제시되었다. 이에 연구자들은 출생 초기에 기도 점막을 통한 알레르겐과 내독소의 노출이 성장한 후에 알레르기 기도염증과 과민성의 발생에 미치는 효과를 생쥐 모델을 통하여 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

**방법:** 실험동물은 무균 상태의 생후 1주이내의 암컷 BALB/c 생쥐를 사용하였다. 실험동물들에게는 각각 신생생쥐시기에 생리식염수, 1% ovalbumin (OVA), 1.0  $\mu$ g LPS, 1.0  $\mu$ g LPS in 1% OVA를 각 비공을 통하여 투여하였다. 실험동물은 연구 시작 35일부터 10일간 5% OVA로 감작시켰으며 최종 기도 감작 10일 후 부터 3일간 1% OVA로 기도 항원유발을 시행하였다. 최종 기도유발 48시간 후 체적검사(plethysmography)를 이용하여 비특이적 기도과민성 검사(Methcholine challenge test)를 시행하였으며 검사 후 실험동물을 희생시켜 검체를 취하여 BAL액내 세

포분획, 사이토카인, 혈청 면역글로불린을 측정하였다.

**결 과:** 1) 메타콜린에 의한 기도과반응성은 생후 초기에 OVA, LPS, OVA/LPS를 투여한 군에서 생리식염수를 투여한 군에 비해 통계적으로 유의하게 억제되었다. 2) OVA, LPS, OVA/LPS를 투여한 군에서 BAL 액내의 호산구수와 IL-4, IL-5가 유의하게 낮았다. 3) 혈청내 OVA 특이 IgE는 OVA, LPS, OVA/LPS 투여군에서 유의하게 감소되었다.

**결 론:** 본 연구 결과 신생생쥐 시기의 접막을 통한 항원, 내독소의 노출이 성숙한 후 항원에 의한 기도염증 및 과반응성의 발생을 억제하였으며 향후 이러한 효과의 작용기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

## References

- Reidler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001;358:1129-33.
- Levesque B, Rhainds M, Ernst P, Gernier AM, Kosatsky T, Audet N, et al. Asthma and allergic rhinitis in Quebec children. *Can Respir J* 2004;11:343-8.
- Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms With Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 1999;29:28-34.
- Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M. Childhood farm environment and asthma and sensitization in young adulthood. *Allergy* 2002;57:1130-5.
- Ernst P, Cormier Y. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1563-6.
- von Mutius E, Braun-Fahrlander E, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, et al. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1230-4.
- von Mutius E. Influences in allergy: epidemiology and the environment. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:373-9.
- Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Allergy and Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347:869-77.
- Roponen M, Hyvarinen A, Hirvonen MR, Keski-Nisula L, Pekkanen J. Change in IFN-gamma-producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1048-52.
- Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT, Mucosal tolerance and immunity: regulating the development of allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130:108-18.
- Gentile DA, Schreiber R, Howe-Adams J, Trecki J, Patel A, Angelini B, et al. Diminished dendritic cell interleukin 10 production in atopic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;92:538-44.
- Samsom JN, van Berkel LA, van Helvoort JM, Unger WW, Jansen W, Thepen T, et al. Fc gamma RIIB regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells. *J Immunol* 2005;174:5279-87.
- Jaffar Z, Sivakuru T, Roberts K. CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J Immunol* 2004;172:3842-49.
- Amoudruz P, Holmlund U, Malmstrom V, Trollmo C, Bremme K, Scheynius A, et al. Neonatal immune responses to microbial stimuli: is there an influence of maternal allergy? *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1304-10.
- Hoffjan S, Ostrovnaja I, Nicolae D, Newman DL, Nicolae R, Gangnon R, et al. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:511-8.
- Hoffjan S, Nicolae D, Ostrovnaya I, Roberg K, Evans M, Mirel DB, et al. Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the 1st year of life. *Am J Hum Genet* 2005;76:696-704.
- Prescott SL, Taylor A, Roper J, Wahdan A, Noakes P, Thornton C, et al. Maternal reactivity to fetal alloantigens is related to newborn immune responses and subsequent allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2005;35:417-25.
- Celedon JC, Litonjua AA, Ryan L, Platts-Mills T, Weiss ST, Gold DR. Exposure to cat allergen, maternal history of asthma, and wheezing in first 5 years of life. *Lancet* 2002;360:781-82.
- Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
- Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:379-92.
- Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruyff RH, Umetsu DT. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol* 2004;5:1149-56.
- Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 2004;112:352-63.
- Adkins B, Bu Y, Guevara P. Murine neonatal CD4+ lymph node cells are highly deficient in the development of antigen-specific Th1 function in adoptive adult hosts. *J Immunol* 2002;169:4998-5004.
- Douwes J, Le Gros G, Gibson P, Pearce N. Can bacterial endotoxin exposure reverse atopy and atopic disease? *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1051-4.
- Riedl MA, Landaw EM, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Initial high-dose nasal allergen exposure prevents allergic sensitization to a neoantigen. *J Immunol* 2005;174:7440-5.
- Michel O, Duchateau J, Sergysels P. Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J Appl Physiol* 1989;66:1059-64.
- Dankesreiter S, Hoess A, Schneider-Mergener J, Wagner H, Miethke T. Synthetic endotoxin-binding peptides block endotoxin-triggered TNF- $\alpha$  production by macrophages in vitro and in vivo and prevent endotoxin mediated toxic shock. *J Immunol* 2000;164:4804-11.

- 28) Kotanidou A, Xagorari A, Bagli E, Kitsanta P, Fotsis T, Papapetropoulos A, et al. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of proinflammatory molecules in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165: 818-23.
- 29) Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.
- 30) Zeldin DC, Wohlford-Lenane C, Chulada P, Alyce Bradbury J, Scarborough PE, Roggli V, et al. Airway inflammation and responsiveness in prostaglandin H synthase-deficient mice exposed to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:457-65.
- 31) Delayre-Orthez C, Becker J, de Blay F, Frossard N, Pons f. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:298-304.
- 32) Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005;5:271-83.
- 33) Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman CG, et al. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:460-8.
- 34) Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001;2:725-31.
- 35) Matsumoto K, Inoue H, Tsuda M, Honda Y, Kibe A, Machida K, et al. Different roles of interleukin-10 in onset and resolution of asthmatic responses in allergen-challenged mice. *Respirology* 2005;10:18-26.
- 36) Eisenbarth SC, Zhadkevich A, Ranney P, Herrick CA, Bottomly, K. Understanding asthma pathogenesis: linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Pediatr* 2004;16: 659-66.
- 37) Blumer N, Herz U, Wegmann M, Renz H. Prenatal lipopolysaccharide exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:397-402.
- 38) Tulic MK, Wale JL, Holt PG, Sly PD. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22:604-12.
- 39) Tulic MK, Holt PG, Sly PD. Modification of acute and late-phase allergic responses to ovalbumin with lipopolysaccharide. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:119-28.
- 40) Tulic MK, Fiset PO, Manoukian JJ, Frenkiel S, Lavigne F, Eidelman DH, et al. Role of toll-like receptor 4 in protection by bacterial lipopolysaccharide in the nasal mucosa of atopic children but not adults. *Lancet* 2004;363:1689-97.
- 41) Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999;402:B12-7.
- 42) Gereda JE, Leung DYM, Thatayatikom A. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitization in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000;355:1680-3.
- 43) Illi S, von Mutius E, Lau S, et al. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001;322:390-5.