

□ 원 저 □

## 백서 천식에서 면역 증강성 CpG 올리고 뉴클레오티드 투여의 효과<sup>†</sup>

고려대학교 의과대학 내과학교실

이신형, 김제형, 정혜철, 김경규, 정기환, 김병규, 이승현,  
박상면, 신 철, 조재연, 심재정, 인광호, 유세화, 강경호

= Abstract =

### Effects of Immunostimulatory CpG-Oligodeoxynucleotides on Bronchial Asthma in Rat

Sin Hyung Lee M.D., Je Hyeong Kim, M.D., Hye cheol Jeong, M.D.,  
Kyung Kyu Kim, M.D., Ki Hwan Jung, M.D., Byung Gyu Kim, M.D.,  
Seung Heon Lee, M.D., Sang Myun Park, M.D., Cheol Sin, M.D., Jae Youn Cho, M.D.,  
Jae Jeong Shim, M.D., Kwang Ho In, M.D., Se Hwa Yoo, M.D., Kyung Ho Kang, M.D.

*Department of Internal Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background and Object :** Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides (ISS CpG-ODN) up-regulate the T<sub>H1</sub>-type immune response and down-regulate the T<sub>H2</sub>-type response. This study was performed to investigate the immune response changes resulting from ISS CpG-ODN on bronchial hyperresponsiveness, eosinophilic inflammation and mucus hypersecretion in rat asthma.

**Materials and Methods :** 10 normal controls(NC) and 26 asthmatic rats, which were generated by ovalbumin (OVA) sensitization and challenge, were studied. The asthmatic rats were randomized into 11 asthma controls (AC) and 15 in the asthma-CpG treatment group(CpG). The CpG group was administered ISS CpG-ODN intramuscularly and the AC group was administered a placebo(0.9% NaCl) on day 15 and 20. After CpG-ODN or placebo administration, we measured the IFN- $\gamma$ (T<sub>H1</sub>-type cytokine) and IL-4(T<sub>H2</sub>-type cytokine) lev-

<sup>†</sup>본 연구는 고려대학교 의과학 연구원의 연구비에 의하여 연구되었음.

Address for correspondence :

Kyung Ho Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, Korea University Guro Hospital

80, Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul, 152-703, Korea

Phone : 02-818-6638 Fax : 02-865-9670 E-mail : kkhchest@kumc.or.kr

els in the bronchoalveolar lavage fluid(BALF), the specific airway resistance(sRaw), eosinophilic fraction in BALF, eosinophilic infiltration, goblet cell dysplasia and MUC5AC gene expression in the lung tissue.

**Results :** In the BALF of the CpG group, the IFN- $\gamma$  concentration was significantly high and the IL-4 concentration was significantly low when compared with the AC group. Both the sRaw and eosinophilic fraction, and infiltration into the BALF and lung tissue significantly lower in the CpG group when compared with the AC group. However, little difference in goblet cell dysplasia and MUC5AC gene expression was observed between the CpG group and the AC group.

**Conclusion :** ISS CpG-ODN decreases bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation in the rat asthma model through the up-regulation of the T<sub>H1</sub>-type immune response with the down-regulation of the T<sub>H2</sub>-type response. However, the effect of these immune response changes on mucus hypersecretion was is not remarkable in this study. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 12-28)

**Key words :** Bronchial asthma, Immunostimulatory DNA sequences, Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides.

## I. 서 론

기관지 천식은 다양한 유발 인자에 대해서 기관지 과민 반응과 기도의 염증 반응 및 가역적인 기도의 폐쇄를 증상으로 하며, 그 유병률은 4% 내지 5% 정도이고, 대부분 젊은 연령에서 이환되어 평생동안 지속된다.

알레르기성 기관지 천식과 관련된 염증 및 면역 반응은 기도 내 호산구(eosinophils)<sup>1,2</sup>와 T<sub>H2</sub> 형 임파구(lymphocytes)의 침윤 및 T<sub>H2</sub> 형 사이토카인(cytokines)의 발현을<sup>3,4</sup> 특징으로 하며, T<sub>H2</sub> 형 면역 반응을 억제할 경우 알레르기성 반응이 감소되고, 천식의 기본적인 병리 현상인 기도 내 염증 반응도 호전된다고 보고된 바 있다. 따라서 최근 T<sub>H2</sub> 형의 면역 반응을 억제시키고, T<sub>H1</sub> 형 반응을 증강시킬 수 있는 방법을 이용한 천식의 새로운 치료법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이러한 연구 성과들 중 가장 괄목할 만한 것이, 세균의 면역 증강성 유전자 서열(immunostimulatory DNA sequences, ISS)을 이용한 DNA-based immunization, 즉 DNA 백신이다.

DNA 백신이란 알레르겐 또는 병원성 바이러스,

종양 등에 대해서 세포성 및 체액성 면역 반응을 유발하는 세균의 DNA 서열로, DNA 이외에 지방질과 같은 운반체(vehicle)가 전혀 포함되지 않은 순수 DNA(naked DNA)를 말한다<sup>5</sup>. 이 들 DNA 서열의 면역 자극 효과의 대부분은, 메틸화 되지 않은 사이토신(cytocine)과 구아닌(guanine)이 포함된 핵산 서열(unmethylated CpG dinucleotide sequences), 즉 CpG motifs로부터 기인하는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>.

면역 증강성 CpG-올리고 뉴클레오티드(Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides, ISS CpG-ODN)는 CpG-motifs를 포함하는 합성 올리고 뉴클레오티드로, ISS CpG-ODN을 동물 천식 모델에 투여할 경우, T<sub>H1</sub> 형의 면역 반응은 항진되어 Inteferone- $\gamma$ (INF- $\gamma$ ) 등의 사이토카인은 증가하고, T<sub>H2</sub> 형 반응은 억제되어 Interleukin-4(IL-4)와 IL-5 등의 사이토카인은 감소하여, 결과적으로 천식의 특징적인 기도 과민성이나 호산구성 염증과 같은 조직학적 소견이 호전되는 것으로 이해되고 있다<sup>7-10</sup>. 그러나 최근의 연구에 의하면 INF- $\gamma$  녹아웃 생쥐(INF- $\gamma$  knock out mice)에서도 CpG-ODN 투여 후 기관지 천식의 호전이 관찰되어, CpG-ODN의 기관지 천식에 대한 억제 효과는 T<sub>H1</sub>과 T<sub>H2</sub> 형 면역 반응의 조절

이외에도, 다른 기전이 작용하는 것으로 추정되고 있다<sup>11</sup>.

점액 과다 분비(mucus hypersecretion)는 천식 발작 시 나타나는 주요한 병태 생리 현상으로<sup>12,13</sup>, 최근의 연구들에 의하면, T<sub>H2</sub> 형 사이토카인인 IL-4가 증가할 경우 인간의 기관지 및 폐조직에서 점액의 과다 분비를 결정하는 MUC5AC 유전자의 발현이 증가하는 것으로 보고된 바 있어<sup>14,15</sup>, 기관지 천식 모델에서 ISS CpG-ODN으로 인한 면역 반응의 변화, 즉 T<sub>H2</sub> 형 사이토카인인 IL-4의 감소가 점액의 과다 분비를 억제하여, 천식의 임상 증상 호전에 영향이 있을 것이라는 추정이 가능하다.

이에 본 연구는 백서 천식 모델에서, 다음과 같은 사항들을 고찰함으로써, ISS CpG-ODN이 기관지 천식에 미치는 효과를 연구하고자 하였다.

첫째, 이미 형성된 백서 천식 모델에서, ISS CpG-ODN 투여 전후의 항원 유발(antigen challenge)에 따른 특이 기도 저항(specific airway resistance, sRaw)을 측정하여 그 변화를 비교함으로써, CpG-ODN이 기관지 천식의 가장 중요한 병인인 기도의 과민성에 미치는 영향을 고찰하고자 하였다.

둘째, CpG-ODN을 투여한 백서의 폐에 대해서 기관지 폐포 세척술(bronchoalveolar lavage, BAL)을 시행하여, 폐포 세척액에서 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> helper T 임파구의 T<sub>H1</sub> 형 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 와 T<sub>H2</sub> 형인 IL-4의 농도를 측정하고, CpG-ODN을 투여하지 않은 천식 백서에서의 농도와 비교함으로써, 기관지 천식의 면역 기전에 대한 영향을 알아보하고자 하였다.

셋째, 기관지 폐포 세척액(BAL fluid) 내의 호산구의 분획(differential count)과 함께 폐조직, 특히 기관지 주위의 호산구 침윤(infiltration)의 정도에 대해 병리조직학적 조건을 관찰함으로써, 면역 반응의 변화가 기관지 천식의 주요한 병리 현상인 호산구성 기관지 염증에 미치는 영향을 고찰하고자 하였다.

넷째, 기관지 주위의 배상 세포 이형성(goblet cell dysplasia)과 폐조직에서 MUC5AC 유전자의 발현 정도를 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcrip-

tion-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용하여 준정량적 방법(semi-quantitative method)으로 비교하여, CpG-ODN으로 인한 면역 반응의 변화가 천식 발작 시 호흡 곤란의 정도에 중요한 영향을 미치는 점액 과다 분비에 대한 영향을 알아보하고자 하였다.

결론적으로 위의 네 가지 실험 결과를 종합하여, 이미 밝혀진 CpG-ODN의 면역학적 효과가 천식에서 발생하는 호흡 생리적, 병리적 현상에 미치는 영향을 관찰하고, 그 효과들의 상호 관련성과 인과 관계를 해석함으로써 기관지 천식의 예방 및 치료에 ISS CpG-ODN의 임상적 유용성에 대하여 고찰하고자 본 연구를 시행하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 백서 천식 모델의 형성

7주 내지 8주 령(齡)<sup>16</sup>의 수컷 백서(Sprague-Dawley rat)를 50마리를 대상으로, 연구 제1일과 7일에 항원 ovalbumin(OVA) 1mg과 면역 보강제로 수산화 알루미늄{aluminium hydroxide, Al(OH)<sub>3</sub>} 200mg을 피하 주사하여 감작(sensitization)시키고, 제14일에 1% weight/volume의 OVA 용액을 5분간 연무기(nebulizer)로 흡입시켜 기관지 천식을 유발하였다. 이 때 유발 전후의 특이 기도 저항을 측정하여, 유발 전보다 sRaw가 150% 이상 증가된 경우를 천식 모델이 형성된 것으로 판정하였고<sup>17,18</sup>(Fig. 1), 결과적으로 50마리 중 26마리에서 천식 모델이 형성되었다.

sRaw의 측정은 백서를 마취나 기관지 삽관을 시키지 않은 상태에서, 머리 부분과 몸통 부분으로 나뉘어진 두 방(chamber)으로 구성된 실험 동물용 체적 기록 상자(animal plethysmography box)<sup>19</sup>인 Pulmodyn<sup>®</sup>(Hugo Sachs Elektronik, Germany)에서 두부와 체부의 기류 곡선을 측정하여, 흡기 말에서의 위상차( $\theta$ )를 이용한 Pennock 법<sup>20</sup>으로 측정하였

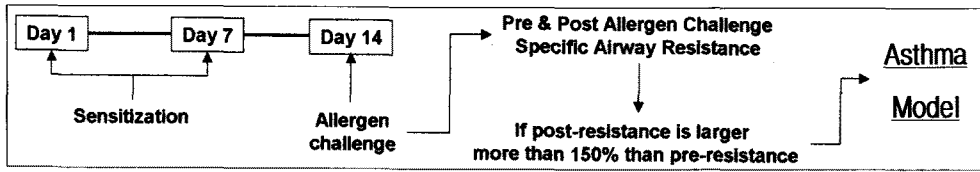
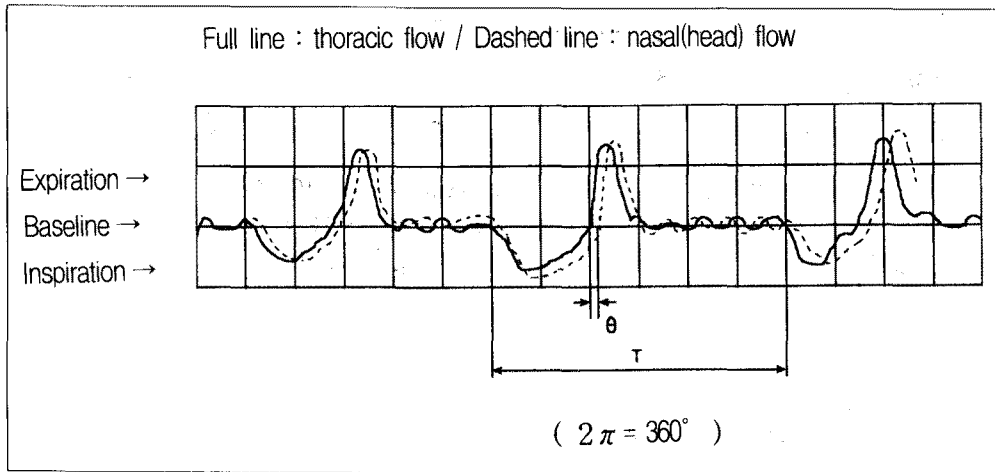


Fig. 1. Formation of asthma model.



$$\tan \theta = \Omega \times R \times C$$

$\theta$  : phase displacement

$\Omega$  :  $2\pi \times$  respiration rate,

$R \times C$  : time constant of respiratory system

$C$  : thoracic gas volume(V)/(Patm-47mmHg)

Specific airway resistance (sRaw),

$$R \times V = (\text{Patm} - 47\text{mmHg}) \times 13.6 \times \tan \theta / 2\pi f$$

$R$  : airway resistance

$\text{Patm}$  : pressure of atmosphere

$f$  : respiratory rate

Fig. 2. Pennock method for measuring specific airway resistance(sRaw).

다(Fig. 2).

## 2. 실험 대상군의 설정

실험군은 천식 모델을 형성하지 않은 정상 대조군 10마리, ovalbumin 감작과 유발로 기관지 천식 모델로 확인된 26마리의 백서를, 천식 대조군(asthma control group) 11마리 및 천식-CpG 치료군(asthma-CpG treatment group) 15마리를 대상으로 세군으

로 나누어 연구하였다(Fig. 3).

정상 대조군은 실험 시작 전 기저 기도 저항(basal sRaw)을 측정한 후, 실험 제15일과 제20일에 placebo(생리 식염수) 1ml를 근육 주사하고 제16일과 제21일에 생리 식염수를 5분간 연무하여 노출시킨 후, 제21일에 sRaw를 측정하였다.

천식 대조군은 실험 제15일과 제20일에 placebo(생리 식염수) 1ml를 근육 주사하고, 제16일과 제21일에 1% weight/volume의 OVA 용액을 5분간

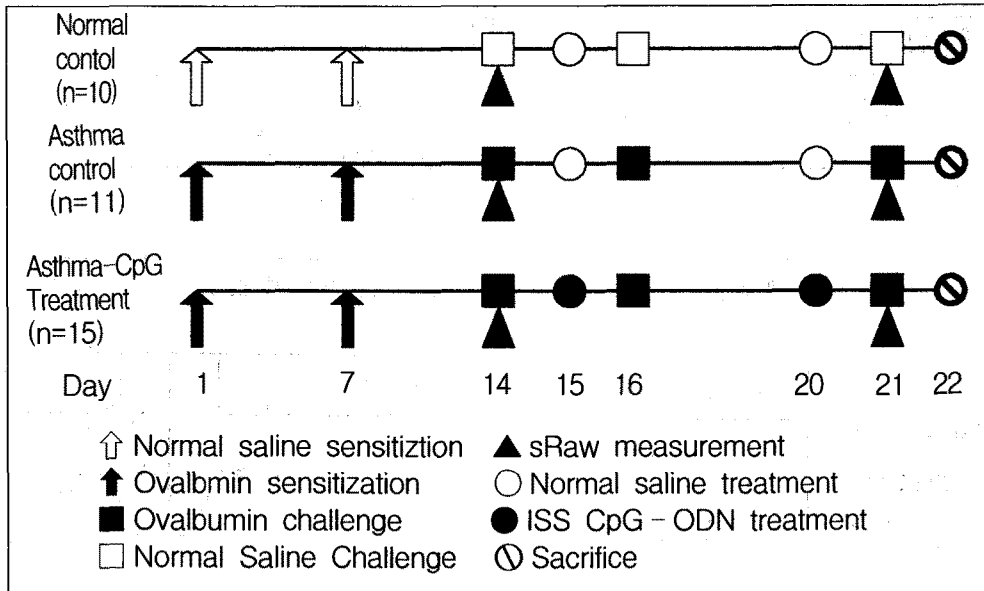


Fig. 3. Overall schedule of formation of asthma model and placebo or CpG-ODN administration. sRaw : specific airway resistance  
ISS CpG ODN : immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides.

연무하여 노출시킨 후, 제21일 노출 시 sRaw를 측정하였다.

천식-CpG 치료군은 실험 제15일과 제20일에 CpG-ODN 300  $\mu$ g<sup>21</sup>을 근육 주사하고, 제16일과 제21일에 1% weight/volume의 OVA 용액을 5분간 연무하여 노출시킨 후, 제21일 노출시 sRaw를 측정하였다.

세 군 모두 실험 제22일에 희생(sacrifice)시킨 후, 기관지 폐포 세척술을 시행하고 병리 조직학적 연구 및 분자생물학적 연구를 위해 폐조직을 처리하였다.

### 3. CpG-ODN의 합성 및 투여

CpG-ODN은 2개의 CpG-motifs를 포함하는 20개의 염기 서열(TCCATGACGTTCTCTGACGTT)<sup>9</sup>로 Bionner사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였고, 투여 할 CpG-ODN의 용량은 300  $\mu$ g<sup>21</sup>으로 phosphate-buffered saline(PBS)에 섞어서 백서의 둔근(臀筋, gluteus muscle)에 근육 주사하였다.

### 4. 기관지 및 폐의 적출 및 처리

실험 제22일 마지막 항원 노출 24시간 후, pentobarbital sodium 60mg/kg를 복강 내 주사하여 마취시킨 후, 흉곽을 절개하고 기관지와 폐 전체를 적출하였다. 적출 후 즉시 우상엽은 RT-PCR을 위해 액체 질소로 냉동 처리, -70℃ 냉장고에 보관하였다. 우중엽 및 우하엽은 폐조직 내 호산구의 침윤과 배상세포 이형성의 정도를 관찰하기 위하여 10% 포르말린 용액으로 고정하였다. 좌폐에서는 기관지 폐포 세척액 내의 사이토카인(IFN- $\gamma$ , IL-4)의 농도와 호산구의 분획을 측정하기 위하여 기관지 폐포 세척술을 시행하였다.

### 5. 기관지 폐포 세척술

우상엽을 절제한 후, 플라스틱 튜브를 기관지를 통해 좌측 주기관지(left main bronchus)에 삽입하고, 3-0 봉합사로 주기관지를 묶은 후, PBS를 4ml, 3ml,

2ml 세 번 주입하여, 매번 주입할 때마다 플라스틱 튜브를 통하여 흘러나오는(natural drainage) 세척액을 시험관에 받았다.

#### 6. 기관지 폐포 세척액 내의 IFN- $\gamma$ 와 IL-4 농도의 측정

첫 1ml의 기관지 폐포 세척액(BAL fluid)을 1.5ml Eppendorf 튜브에 받은 후, 4°C에서 150G로 10분간 원심 분리한 후, 상층액을 취하여 -70°C에 냉동 보관하였다. IFN- $\gamma$ 와 IL-4 등의 사이토카인의 측정은 냉동 보관한 폐포 세척액을 녹인 후 Solid phase sandwich Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) 방법으로 측정하였다. ELISA는 백서의 IFN- $\gamma$ 와 IL-4 kit(Cytoscreen Immunoassay kit Rat INF- $\gamma$  and IL-4, BioSource International, Inc., USA)를 사용하고, 그 흡광도를 ELS 800 ELISA READER(Biotec, USA)로 측정하여 농도를 결정하였다.

#### 7. 기관지 폐포 세척액 내의 호산구 분획의 측정

첫 1ml를 제외한 나머지 세척액을 모은 후, 잘 섞고 그 중 200  $\mu$ l 를 취하여, cytopsin 기계를 이용하여 실온에서 8분간 원심 분리하여 처리한 후, Wright-Giemsa stain<sup>16</sup>으로 염색한 후 총 200개의 세포 중 호산구의 분획을 계산하였다.

#### 8. 폐조직 내의 호산구 침윤 및 배상 세포 이형성의 관찰

절제 후 고정된 우중엽 및 하엽을 파라핀(paraffin) 블록에 포매한 후, 4 $\mu$ m의 두께로 잘라 호산구 침윤의 정도를 관찰하기 위하여 Hematoxlin and Eosin(H/E) 염색을 시행하고, 배상 세포의 이형성을 관찰하기 위하여 Periodic Acid Schiff(PAS)<sup>22</sup> 염색을 시행하였다. 호산구 침윤의 정도와 배상세포 이형성의 정도는 각각 5개의 고배율 시야( $\times 400$ )에서 관찰된 세

포의 수로 표시하여 비교하였다.

#### 9. MUC5AC 유전자 발현에 대한 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)

-70°C로 동결된 우상엽으로부터 TRIZOL REAGENT<sup>®</sup>(Life Technologies, Inc. USA)을 이용하여 mRNA를 추출하였다. 추출된 mRNA의 농도를 흡광계로 측정하여 모든 검체에 대하여 동량인 2  $\mu$ g의 RNA로 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(Boehringer Mannheim, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 시발체(primer) 5'-GCC CTC CGG ACA GAA GCA GCC TTC-3'와 5'-GGC CAG TGC GGC ACT TGC ACC AAC-3'을 사용하여 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다. PCR은 GeneAmp PCR System 9600<sup>®</sup>(Perkin Elmer Cetus, USA)으로, 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 변성반응은 94°C에서 20초, 결합반응은 61.5°C에서 30초, 연장반응은 72°C에서 30초씩 반복적으로 32회전을 시행한 후 72°C에서 7분 반응시키고 4°C에서 보관하였다. House keeping 유전자는 백서의 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다. 중합효소 연쇄 반응 생성물은 전기영동 시켜 Ethidium bromide 염색 후 폴라로이드 필름으로 촬영하여 컴퓨터 프로그램 Scion Image(Scion Corporation, USA)를 사용하여 상대적 밀도 분석을 통해 각 실험군에서 MUC5AC 유전자의 발현 정도를 준정량적 방법으로 측정하였다.

#### 10. 통계분석

각 군간의 비교는 Mann-Whitney U 검정과 Kruskal Wallis 검정을 사용하여 분석하였다. CpG-ODN 투여군에서 투여 전과 후의 차이에 대한 비교는 Wilcoxon의 순위합 검정을 이용하였고, 시간별로 측정된 각 군의 기도저항은 반복 측정 분산 분석법을 사용하여 분석하였다. 모든 계산은 SPSS for Win-

dows Release 9.0.0 (SPSS Inc. USA)을 사용하고, p값이 0.05 이하인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

### III. 결 과

#### 1. 특이 기도 저항(Specific airway resistance, sRaw)의 변화

Placebo(생리 식염수) 혹은 CpG-ODN 처치 전, ovalbumin(천식 대조군과 천식-CpG 치료군) 혹은 생리 식염수(정상 대조군)를 연무하여 노출시킨 후 측정된 특이 기도 저항은, 노출 후 4분부터 10분까지 세 군간에 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$  by Kruskal-Wallis test). 즉 정상 대조군과 천식 대조군 및 천식-CpG 치료군 사이에는 노출 후 2분에서 10분까지 기도 저항에 있어서 유의한 차이를 보였으나( $p < 0.05$ ), 천식 대조군과 천식-CpG 치료군 사이에는 노출 전후에 유의한 차이는 관찰되지 않았다( $p > 0.05$ )(Fig. 4).

Placebo(생리식염수) 혹은 CpG-ODN 처치 후 측정된 기도 저항은, 항원 노출 후 2분에서 10분까지 세 군에서 유의한 차이를 보였으며( $p < 0.05$  by Kruskal-Wallis test), 천식 대조군과 천식-CpG 치료군 및 정상 대조군 사이에는 노출 후 2분에서 10분까지 기도 저항에 있어서 유의한 차이를 보였으나( $p < 0.05$ ), 정상 대조군과 천식-CpG 치료군 사이에는 노출 후에 유의한 차이는 관찰되지 않아( $p > 0.05$ ), CpG-ODN 치료 후 천식-CpG 치료군의 기도 저항이 통계적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 4).

#### 2. 기관지 폐포 세척액 내의 IFN- $\gamma$ 와 IL-4의 농도

기관지 폐포 세척액에서 측정된  $T_{H1}$  형 사이토카인인 INF- $\gamma$ 의 농도는 천식 대조군과 천식-CpG 치료군에서 각각  $3.9 \pm 1.3$  pg/ml,  $24.1 \pm 10.4$  pg/ml로 측정되어, 천식-CpG 치료군에서 천식 대조군에 비하여 유의하게 높았으며( $p = 0.005$ ),  $T_{H2}$  형 사이토카인인

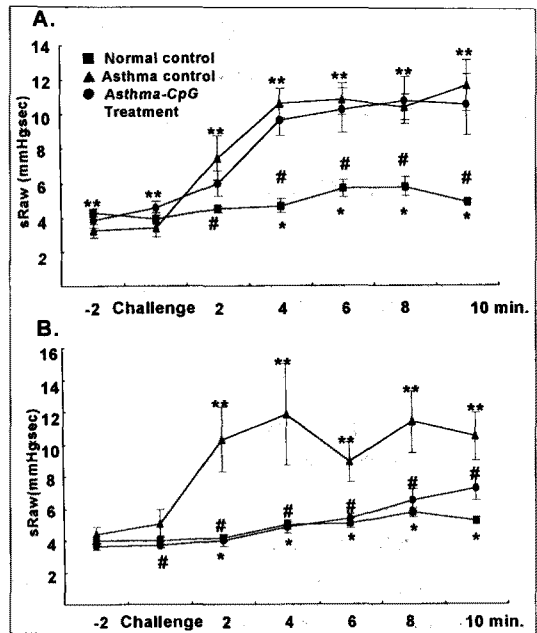


Fig. 4. Specific airway resistance(sRaw) before (A) and after(B) placebo(saline) and ISS CpG-ODN treatment.

In A. \* $p < 0.05$  by Kruskal-Wallis test  
# $p < 0.05$  Normal control vs. Asthma control and Asthma-CpG treatment  
\*\* $p > 0.05$  Asthma control vs. Asthma-CpG treatment  
In B. \* $p < 0.05$  by Kruskal-Wallis test  
\*\* $p < 0.05$  Asthma control vs. Normal control and Asthma-CpG treatment  
# $p > 0.05$  Normal control vs. Asthma-CpG treatment.

IL-4의 농도는 천식 대조군과 천식-CpG 치료군에서 각각  $5.3 \pm 0.7$  pg/ml,  $2.7 \pm 0.6$  pg/ml, 천식-CpG 치료군에서 천식 대조군에 비하여 유의하게 낮았다( $p = 0.006$ )(Fig. 5).

#### 3. 기관지 폐포 세척액 및 폐조직에서의 호산구성 염종의 정도

기관지 폐포 세척액에서의 호산구의 분획은, 정상 대조군, 천식 대조군 및 천식-CpG 치료군에서 총 200

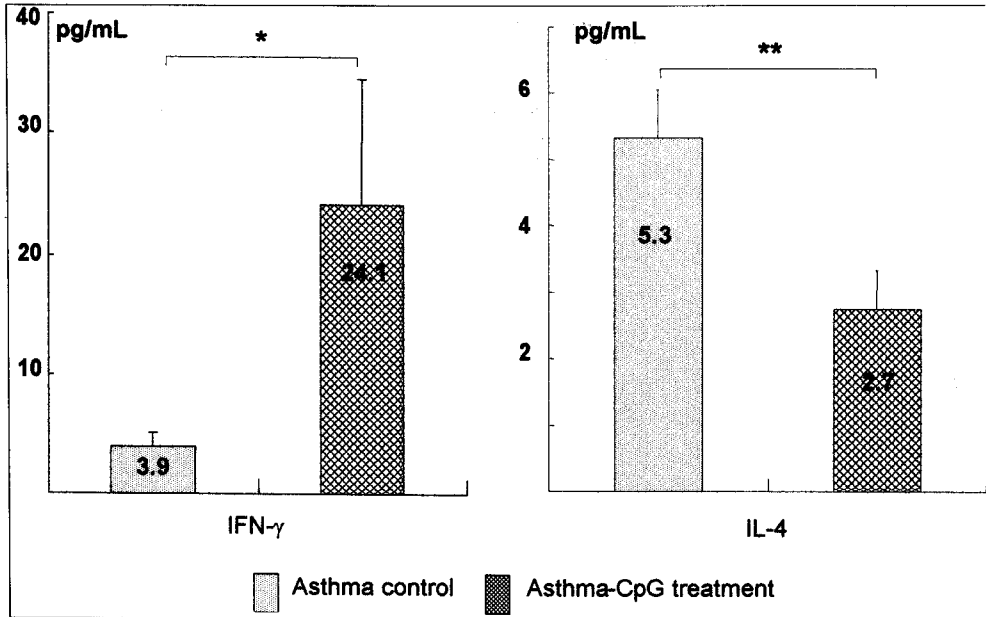


Fig. 5. Concentration of IFN- $\gamma$  and IL-4 in BAL fluid in asthma control and asthma-CpG treatment group.  
\* $p=0.005$ , \*\* $p=0.006$

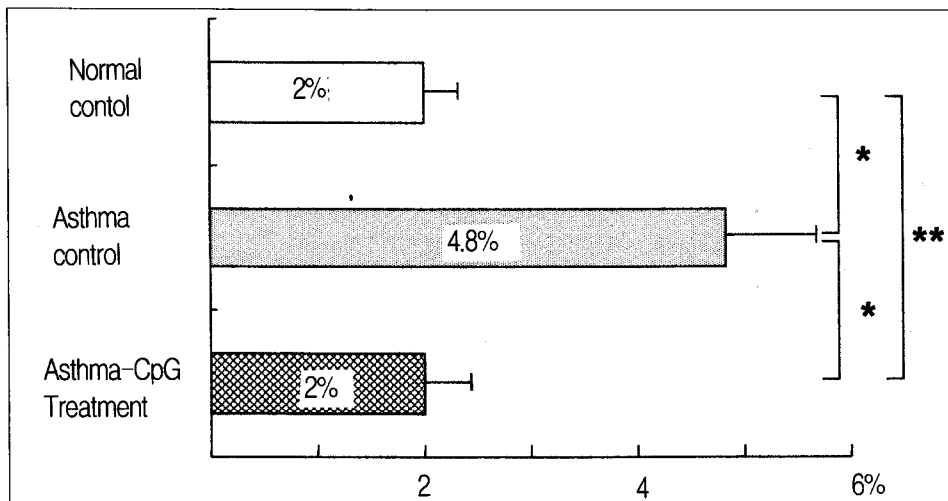


Fig. 6. Differential count of eosinophil in BAL fluid.( % in 200 cells)  
\* $p<0.05$ , \*\* $p=0.57$

개의 세포 중 각각  $2.0 \pm 0.3\%$ ,  $4.8 \pm 0.9\%$ ,  $2.0 \pm 0.4\%$ 로 천식 대조군에서 다른 두군에 비하여 유의하게 높았으나( $p<0.05$ ), 정상 대조군과 천식-CpG 치료

군간에 유의한 차이는 없었다( $p=0.57$ )(Fig. 6). 폐조직, 특히 기관지 주위의 호산구 침윤의 정도는, 5개의 고배율( $\times 400$ ) 시야에서, 정상 대조군, 천식



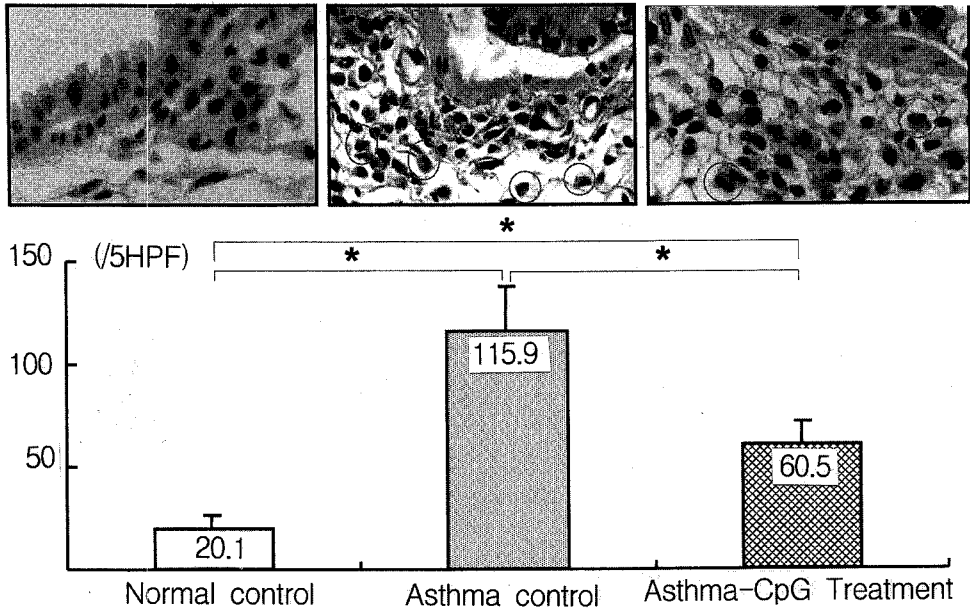


Fig. 7. Eosinophilic infiltration in lung tissue.(number of eosinophil in 5 HPF,  $\times 400$ )  
\* $p < 0.05$

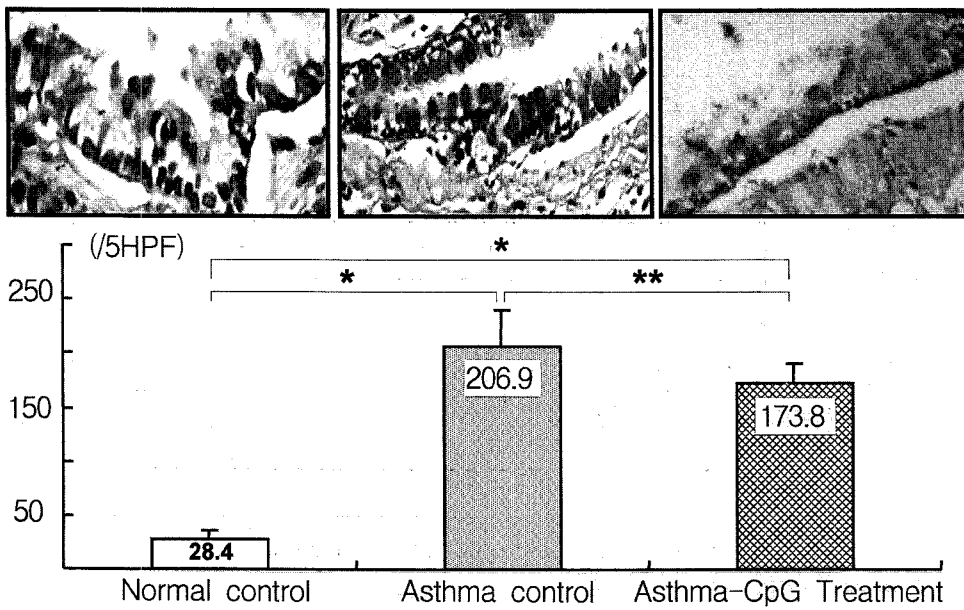


Fig. 8. Goblet cell dysplasia in lung tissue (number in 5 HPF,  $\times 400$ )  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.508$

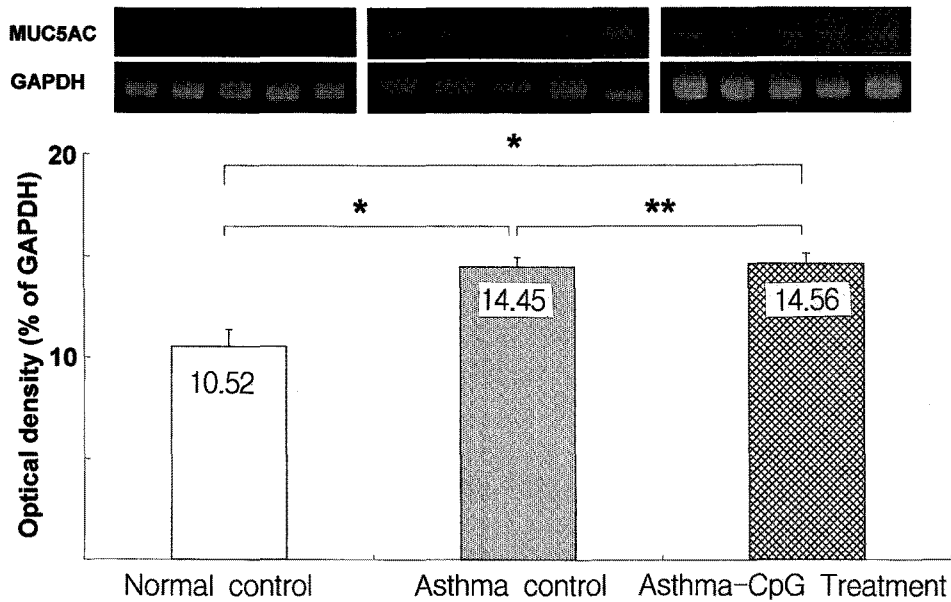


Fig. 9. Expression of MUC5AC gene in lung tissue(optical density, % of GAPDH)  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p = 0.61$

대조군 및 천식-CpG 치료군에서 각각  $20.1 \pm 5.98$  개,  $116.0 \pm 21.6$  개,  $60.5 \pm 11.6$  개로, 천식 대조군에서 다른 두군에 비하여 유의하게 높았으며 ( $p < 0.05$ ), 정상 대조군과 천식-CpG 치료군간의 비교에 있어서는 천식-CpG 치료군에서 정상 대조군에 비하여 유의하게 높아 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7), CpG-ODN 치료 후 호산구성 염증의 정도가 유의하게 감소함을 관찰하였다.

#### 4. 배상 세포의 이형성 및 MUC5AC 유전자의 발현 정도

PAS 염색 하에서 관찰한 기관지 주변의 배상 세포의 이형성 세포수는, 정상 대조군, 천식 대조군, 천식-CpG 치료군에서 5 고배율 시야 당 각각  $28.4 \pm 7.43$  개,  $207 \pm 32.7$  개,  $173 \pm 17.2$  개로, 정상 대조군에 비하여 천식 대조군 및 천식-CpG 치료군에서 이형성의 정도가 유의하게 높았고 ( $p < 0.05$ ), 천식 대조군과 천식-CpG 치료군간의 비교에서는 천식-CpG 치료군에서 낮은 경향을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ( $p = 0.508$ ) (Fig. 8).

컴퓨터 프로그램 Scion Image (Scion Corporation, USA)를 사용하여, House keeping 유전자인 GAPDH와의 상대적 광학 밀도(optical density) 분석을 통해 측정된 MUC5AC 유전자의 발현 정도는 정상 대조군, 천식 대조군, 천식-CpG 치료군에서 각각  $10.52 \pm 0.84\%$ ,  $14.45 \pm 0.45\%$ ,  $14.56 \pm 0.53\%$ 로, 정상 대조군에 비하여 천식 대조군 및 천식-CpG 치료군에서 발현 정도가 유의하게 높았으나 ( $p < 0.05$ ), 천식 대조군과 천식-CpG 치료군간에는 유의한 차이가 없어 ( $p = 0.61$ ) (Fig. 9), CpG-ODN의 치료가 점액 과다분비의 지표인 배상 세포의 이형성 및 MUC5AC gene의 발현에는 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

#### IV. 고 안

기관지 천식의 병인에 관한 최근의 연구 결과들<sup>1,2</sup>에 의하면, 천식은 활성화된 T 임파구로부터 분비된 여러 가지 사이토카인 및 염증 매개 물질들로 인하여 기관지 점막 내에 호산구가 침윤되고 활성화되는, 특이

한 유형의 세포 매개성 면역 반응임을 시사하고 있다. 이들 사이토카인들은 에어로알레르겐(aeroallergens)과 같은 다양한 점막의 항원에 대하여, T 임파구의  $T_{H2}$  형 면역 반응으로 인하여 분비되며 이와 같이 항진된  $T_{H2}$  형 반응을 억제하는 것이 향후 천식의 치료에 있어서 중요한 변화를 가져올 수 있을 것으로 판단되고 있다<sup>23</sup>. 이 같이 증가된  $T_{H2}$  형의 면역 반응을 억제하고, 또한  $T_{H1}$  형의 반응을 항진시키기 위한 방법으로, 최근 가장 활발하게 연구되고 있는 것이, 면역 증강성 유전자 서열을 이용한 DNA-based immunization, 즉 DNA 백신이다.

면역 증강성 유전자 서열은 Tokunaga 등<sup>24</sup>이 *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)으로부터 추출하여 정제한 유전자(DNA)가 NK 세포(Natural killer cell, NK cell)를 활성화시키고, Interferons (IFNs)  $\alpha/\beta/\gamma$ 의 합성을 촉진시켜, 선천적인 항암효과를 유발시키는 것을 보고함으로써 알려지게 되었다. 그 후 세 가지 BCG 단백질의 여러 가지의 코딩(coding) 영역에 상응하는 다양한 합성 45-mer 올리고뉴클레오티드들이 합성되었다<sup>25</sup>. IFNs의 분비를 유발하고, NK 세포의 활성을 증가시키는 이와 같은 ODNs는 CpG dinucleotides를 포함하는 회귀성 헥사머(palindromic hexamer, e.g., 5'-GACGTC-3', 5'-AGCGCT-3' and 5'-AACGTT-3'), 즉 CpG motifs를 포함한다<sup>26</sup>.

병원균에 대한 선천적인 면역 반응은 다당류, 렉틴(lectins), 지질, 리포다당류(lipopolysaccharides, LPS) 및 double-stranded(ds) RNA 등과 같은, 높게 보존되고 반복되는 이물질질을 효율적이고 신속하게 인지하는 것을 기본으로 한다. 이 과정에서 미생물 게놈(microbial genomes) 내에 존재하는 면역 증강성 유전자 서열(ISS)이 바로 면역 체계가 인지하는 표시자가 되며, 더 나아가 이 서열은 병원균의 세포내 침입을 나타내는 표지로 지각된다<sup>25</sup>. 이와 같은 기능을 갖는, 미생물의 면역 증강성 유전자 서열의 합성물인, 면역 증강성 CpG 올리고 뉴클레오티드로 인한 면역 반응은 면역 계통을 효과적으로 자극함으로써 항체의 형성과 MHC class I-restricted  $CD8^+$  cytotoxic

T 임파구 및 MHC class II-restricted  $CD4^+$  helper T 임파구 등을 포함하는 전반적인 면역반응을 유발하는 것으로 보고되고 있다<sup>27,28</sup>. CpG-ODN의 투여는 주로 피내 혹은 근육내 주사로 이루어지며, 이 두 가지 방법 모두 동등하게, 높고 강력한 면역 반응을 유발한다<sup>28</sup>. CpG-ODN을 피내 혹은 근육내로 주사하게 되면, 각질 세포(keratinocytes), 섬유아 세포(fibroblasts) 혹은 근육 세포로부터 복제된(transfected) 항원이 MHC class I molecules에 제시됨으로써  $CD8^+$  cytotoxic T 임파구에 의해서 인식된다. 또한 MHC class II-restricted  $CD4^+$  helper T 임파구를 자극하여, 항원 특이적인  $T_{H1}$  형 면역 반응을 유발하여 단핵구로부터 Interferon- $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-12 및 IL-18 등의 분비를 증가시키고, NK 세포로부터 INF- $\gamma$ 를 비롯한 몇몇 사이토카인의 분비를 촉진시키며<sup>29,30</sup>, 이미 형성된  $T_{H2}$  형의 반응 및 IL-4, IL-5 등의 분비를 억제한다. 또한, NK 세포로부터 분비된 INF- $\gamma$ 는 B 임파구의 IL-6의 분비를 증가시켜, 면역 단백질의 합성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다<sup>31,32</sup>.

알레르기성 질환, 특히 기관지 천식에서 ISS CpG-ODN의 효과에 관한 그 간의 연구들을 살펴보면, Chu 등<sup>7</sup>은  $T_{H2}$ -biased BALB/c와  $T_{H1}$ -biased B10.D2 생쥐 모델에서 hen egg lysozyme(HEL)과 CpG-ODN을 동시에 투여한 결과 HEL 특이 IFN- $\gamma$ 는 증가하고 HEL 특이 IL-5는 감소하여, 결과적으로  $T_{H1}$ 과 관련된 anti-HEL IgG<sub>2a</sub>의 생성이 촉진됨을 보고하였고, Kline 등<sup>8</sup>은 역시 생쥐 천식 모델에서 항원과 CpG-ODN을 동시에 투여 시, 기도 내 호산구의 침윤,  $T_{H2}$  형 사이토카인, IgE의 생성 및 기도의 과민성이 감소하여, CpG-ODN이 항원으로 유발된 기도의 염증을 예방하는 것으로 보고하였다. Broide 등<sup>9</sup>은 CpG-ODN을 전신적으로 혹은 점막으로 투여하면, 기도, 폐실질과 혈액에서 호산구 증가가 억제되고, 간접적으로 단핵구, 대식세포 및 NK 세포를 자극하여 IL-12와 IFNs를 증가시키며, T 임파구에서 유래되는 호산구 활성화 사이토카인인 IL-5, GM-CSF 및 IL-3의 생성을 억제하는 것으로 보고하였다. 더 나아가 Sur 등<sup>10</sup>은 ragweed allergen BALB/c

생쥐에서 이 같은 효과들이 폐조직에서 기억 세포의 생성과 전신적인 저장소(systemic reservoir)로부터  $T_{H1}$  세포들의 보충으로 인하여, CpG-ODN 투여 후 최소 6주까지 지속되는 것을 관찰하였다. 결론적으로 동물 천식 모델에서 ISS CpG-ODN은 우선 단핵구와 NK 세포 등의 면역 체계를 활성화시킴으로써, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ 와 IL-12의 분비를 촉진시켜 호산구의 침윤과 활성을 억제하며, 이때 분비가 증가된 IFNs와 IL-12는  $T_{H2}$  세포로부터의 IL-3, 4, 5 및 골수에서 호산구의 증식을 촉진시키는 GM-CSF의 분비를 억제한다. 이와 같은 일련의 반응들은 CpG-ODN 투여 후 수시간 내에 일어나며, 선천적인 면역 체계에 의하여 매개되고, 일시적인 항호산구성(anti-eosinophilic) 기능을 나타낸다. 또 다른 한편으로, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ 와 IL-12는 naïve  $T_H$  세포를 항원 특이적인  $T_{H1}$ -type으로 분화케 함으로써, 항원의 자극에 대하여 IFN- $\gamma$ 의 분비를 촉진시켜,  $T_{H2}$ -type 반응의 활성화와 분화 및 호산구의 활성을 감소시키며, 이 같은 반응은 획득성 면역의 결과로, 기억세포를 생성시켜 지속적인 면역 효과를 나타낸다<sup>9,33</sup>.

본 연구에서도, ISS CpG-ODN을 이미 형성된 백서 천식 모델에서 둔근(臀筋, gluteus muscle)에 근육 주사한 후, 기관지 폐포 세척액에서 측정된  $T_{H1}$  형 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 의 농도가 CpG-ODN 치료군에서 천식 대조군에 비하여 유의하게 높았으며,  $T_{H2}$  형 사이토카인인 IL-4는 CpG-ODN 치료군에서 천식 대조군에 비하여 유의하게 낮아, ISS CpG-ODN의 투여 후,  $T_{H2}$  형 면역 반응은 감소되고,  $T_{H1}$  형 반응은 항진됨을 관찰하였다. 또한 CpG-ODN 치료 전 차이를 보이지 않던 천식 대조군과 천식-CpG 치료군의 특이 기도 저항이, CpG-ODN 혹은 placebo(생리 식염수) 치료 후, 천식-CpG 치료군에서 천식 대조군에 비하여 유의하게 감소하여, 정상 대조군의 백서와 차이가 없어, CpG-ODN으로 인한 면역 반응이 기관지 천식의 기도 과민성을 감소시킴을 알 수 있었다. 또한 기관지 폐포 세척액 내의 호산구의 분획 및 폐조직에서의 호산구의 침윤 정도 역시 CpG-ODN 치료군에서 천식 대조군에 비하여 유의하게 감소하여,

CpG-ODN이 호산구성 기도 염증을 억제하는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과들은 그 간 동물 천식 모델에서 행해진 ISS CpG-ODN의 효과에 대한 연구 결과들<sup>7-10</sup>과 부합하는 것으로, CpG-ODN이 기관지 천식의 기도 과민성 및 호산구성 염증의 치료에 있어서 잠재적인 효과가 있을 것을 시사하는 결과라고 할 수 있겠다.

기도의 점액 과다 분비는 기관지 천식의 주요한 병태 생리 중의 하나로, 이로 인한 점액 플러그(mucus plug)의 형성은 심한 급성 천식 발작으로 사망한 환자에서 흔하게 관찰되는 소견이다<sup>12,13</sup>. 점액은 수분과 단백질, 당단백, 지질 및 염(鹽, salts)의 복합체로, 주성분인 점액소(粘液素, mucin)는 점액성의 당단백으로, 점액의 점성 및 탄성을 결정하는 요소이다<sup>34</sup>. 호흡기 점액의 기능은 일차적으로 기관지 상피 세포의 섬모 운동을 원활하게 함으로써, 기도내의 이물질의 배출을 용이하게 하고, 점액에 포함된 면역 단백질, 락토페린(lactoferrin) 및 리소자임(lysozyme) 등의 항균 물질들을 통하여 세균의 감염을 예방하며, 흡입된 공기를 가습시킴과 동시에 기도 표면의 수분의 손실을 차단하는 역할을 한다<sup>35</sup>. 기도 점액의 분비는 점액성 과립(mucous granules)들을 포함하는 표면 상피의 배상 세포와 점막하 분비샘의 점액 세포에서 분비된다<sup>36</sup>. 점액의 분비를 결정하는 점액소 유전자(mucin gene)는 현재까지, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 그리고 MUC7 등의 8가지 종류가 밝혀졌으며<sup>37</sup>, 이 중 MUC1, MUC2, MUC4, MUC5가 폐에서 발현되고, 그 가운데에서 MUC2와 MUC5의 mRNA가 기도에 존재하는 것이 증명되어, 이 두 유전자가 기도의 점액 분비를 결정하는 것으로 판단되고 있다<sup>36</sup>.

기도의 점액 분비와 점액소 유전자의 발현은, 자극성 가스의 흡입, 염증성 매개 물질, 신경학적 조절 및 물리적 변형 등과 같은 다양한 요인들에 의하여 조절된다<sup>36</sup>. 담배 연기, 이산화 황(sulfur dioxide), 암모니아, 산화 질소(nitric oxide) 등과 같은 자극성 가스는 기도 점액에 용해되어 점액의 산도(pH)를 산성 혹은 알칼리성으로 변화시킴으로써, 원형질막을 손상

시켜 점액소의 분비를 증가시킨다. 또한 아라키돈산 대사물(arachidonic acid metabolites)인 prostaglandin- $F_{2\alpha}$  (PG  $F_{2\alpha}$ ), leukotriene  $D_4$  (LTD $_4$ ), platelet activating factor(PAF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), protease, 활성산소종(reactive oxygen species) 및 nucleotide 등의 염증성 매개 물질들이 점액의 분비를 촉진시킨다<sup>38,39</sup>. 신경학적 조절에 대한 연구로는 기니아피에서 기도의 미주신경을 자극할 경우 배상 세포에서의 점액 분비가 촉진되고, 또한 같은 모델에서 capsaicin이나 substance P로 자극하였을 경우 축삭 반사(axonal reflex)를 통해 배상 세포 과립들의 exocytosis가 발생한다는 보고가 있으며, 배양된 hamster TSE 세포가 저삼투성 상태(hypoosmolar state)에서는 점액소의 분비가 증가되고, 고삼투성 상태(hyperosmolar state)에서는 분비가 감소되며, TSE 세포가 배양되는 겔(gel)을 수축시킬 경우 점액소의 분비가 증가되어, 삼투압 및 겔의 수축으로 유발된 물리적 변형이 점액소의 분비를 조절하는 것으로 추정되고 있다<sup>36</sup>.

인체의 호흡기의 점막으로부터 점액의 분비는, 이와 같은 다양한 원인들로 인하여 점액소 유전자, 특히 MUC2와 MUC5의 발현을 통하여 조절되는 데, MUC2의 경우는 소장, 대장 및 기도에서 발현되지만 호흡기 점막의 주요한 점액소 유전자는 아닌 것으로 판단된다. MUC5의 경우는 MUC5AC 및 MUC5B의 2가지 아형이 존재한다<sup>40</sup>. 이 중 MUC5B는 기도의 주요한 점액소 유전자로, 2가지의 점액소의 분비를 결정하는 데, 그 중 low-charge glycoform이 천식 환자의 기도 점액 플러그에서 더 우세한 것으로 보고되었다<sup>41</sup>. MUC5AC는 정상 호흡기 점액 분비의 주요한 결정 인자 중의 하나로<sup>42</sup>, 인체의 기관지에서 유래되는 MUC5AC로 인한 점액소는 주로 배상 세포로부터 분비되며, 점막하 분비샘에서는 분비되지 않는 것으로 알려져 있다<sup>43</sup>. 최근 Temann 등<sup>14</sup>은 선별적으로 폐에서 IL-4를 과발현하는 유전자 이식 생쥐 모델에서 MUC5AC 유전자의 발현이 증가되는 것을 보고하였고, Dabbagh 등<sup>15</sup>은 in vivo 및 in vitro 모델에서 IL-4가 MUC5AC 유전자의 발현 및 AB/PAS

염색 양성인 배상 세포의 이형성을 증가시키는 것으로 보고하여, IL-4의 분비가 증가하는 경우 MUC5AC 유전자의 발현이 증가하여 점액의 과다 분비가 발생하는 것으로 판단된다.

이에 본 연구에서는 이미 형성된 백서 천식 모델에서, ISS CpG-ODN을 투여할 경우 나타나는 면역학적 반응, 즉 IL-4의 감소로 인하여 MUC5AC 유전자의 발현이 감소하고, 점액소의 분비에 직접적인 영향을 미치는 배상 세포의 이형성이 줄어들어, 점액의 과다 분비가 감소할 것이라고 추정하고, 이를 폐조직에서 배상세포의 이형성에 대한 PAS 염색과 MUC5AC mRNA에 대한 역전사 중합 효소 연쇄 반응을 통하여 증명하고자 하였다. 그러나 실제 연구 결과에서 배상 세포의 이형성은 천식 대조군 및 천식-CpG 치료군에서 정상 대조군에 비하여 유의하게 높게 관찰되고, 천식 대조군과 천식-CpG 치료군의 비교에 있어서는 천식-CpG 치료군에서 낮은 경향을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다( $p=0.508$ ). 또한 MUC5AC mRNA의 발현 정도 역시, 천식 대조군 및 천식-CpG 치료군에서 정상 대조군에 비하여 유의하게 높았으나, 천식 대조군과 천식-CpG 치료군의 비교에 있어서는, 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다( $p=0.61$ ). 이와 같은 결과는 다음과 같은 이유들 때문일 것으로 사료된다. 첫째, 이미 상술한 바와 같이 기도의 점액 분비에는 IL-4를 제외한 여러 가지 다른 염증성 매개 물질들이 관여한다. 실제로 천식 발작 시에, 천식 환자의 기도 표면 점액에서 높은 비율의 호중구가 관찰되는 것으로 보고된 바 있다<sup>44</sup>. 호중구는 여러 가지의 염증성 매개 물질을 분비하는 데, 이 중 호중구 elastase는 기도의 mucociliary clearance를 감소시키고, mRNA의 안정성을 높여 MUC5AC mRNA의 발현을 증가시켜, 점액소의 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다<sup>45</sup>. 결과에서 기술하지는 않았지만, 본 연구에서도 폐조직에서 호중구의 침윤이 관찰되었으며, 이로부터 분비된 호중구 elastase를 비롯한 여러 매개 물질에 의해 점액의 분비가 촉진되었을 것으로 사료된다. 둘째, CpG-ODN은 IL-4를 감소시키는 것 이외에도, IL-

6, IL-12 및 INF- $\gamma$ 의 분비를 촉진시킨다<sup>29,31</sup>. CpG-ODN으로 자극된 NK 세포 및 T 임파구로부터 분비된 INF- $\gamma$ 는 B 임파구의 IL-6의 분비를 촉진시키고, 면역 단백질의 합성을 증가시킨다. Levin 등<sup>46</sup>은 IL-6이 기도 상피 세포에서 MUC2 mRNA의 발현을 증가시키고, 이미 형성된 점액의 exocytosis를 자극하는 것으로 보고한 바 있어, CpG-ODN으로 증가된 IL-6으로 인하여 점액의 과다 분비가 촉진되었을 가능성도 추정할 수 있다. 결국 ISS CpG-ODN으로 분비가 감소된 IL-4의 효과가, 분비가 증가되었을 것으로 추정되는 IL-6 및 호중구성 염증 매개 물질들의 효과에 의해서 상쇄되고, 더 나아가 점액 과다 분비의 지표인 배상 세포의 이형성 및 MUC5AC mRNA의 발현이 증가하였을 것으로 판단된다. 그러나 본 연구에서는, INF- $\gamma$ 와 IL-4의 농도 이외에 호중구성 elastase 등의 염증 매개 물질 및 IL-6 등의 사이토카인의 측정은 시행치 않아, ISS CpG-ODN이 점액 과다 분비에 영향을 미치지 않는 기전에 대해서 정확히 고찰할 수는 없었다. 향후 이러한 효과에 대한 연구를 위해서는 다양한 매개 물질과 사이토카인의 측정을 통한, 병리 기전에 대한 총체적인 접근이 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 면역 증강성 CpG 올리고 뉴클레오티드는 백서 천식 모델에서, T<sub>H1</sub> 형 사이토카인은 증가시키고, T<sub>H2</sub> 형 사이토카인은 감소시킴으로써, 천식의 주요한 병태 생리인 기도의 과민성 및 호산구성 염종의 정도는 유의하게 감소시키나, 점액 과다 분비와 관련된 배상 세포의 이형성 및 MUC5AC gene의 발현 정도에는 유의한 영향은 없는 것으로 관찰되었다.

최근 수십년 간의 급속한 산업화와 아동기 위생 상태의 개선 및 항생제의 광범위한 사용에 따라, 기관지 천식과 알레르기성 질환의 빈도가 급격하게 증가되고 있다. T<sub>H2</sub> 형으로 치우친 신생아의 면역 체계로 인하여, 소아들은 무해한 항원에 대해 알레르기성 반응을 일으키는 빈도가 증가하고 있으며, 다른 한편으로는 소아기에 T<sub>H1</sub> 형과 유사한 감염성 질환에 이환될 경우, 알레르기성 질환의 발생이 예방된다는 가설과 증거들이 제시되고 있다<sup>47</sup>. 동물 기관지 천식 모델에서

이와 같은 효과가 입증된 ISS CpG-ODN를 이용한 DNA 백신은, 현재 CpG-ODN을 래그weed(ragweed) 항원과 결합시킨 형태로 사람에게 대한 임상 실험이 진행되고 있다<sup>48</sup>. 이 같은 DNA 백신은 기존의 단백질 백신에 비하여, 제조하기가 용이하고, 면역체계를 지속적으로 자극하여 장기간의 항원 발현 효과를 가지고 있으며, 단백질 백신과는 질적으로 다른 면역 반응을 유발하고, 단백질 합성이나 정제의 필요성 없이 cDNA 단계에서의 항원력을 조종하는 등의 독특한 이점<sup>28</sup>들 때문에, 향후 천식을 비롯한 알레르기성 질환 뿐 아니라, 감염성 질환 및 종양의 치료에 있어서 임상적으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 요약

### 배 경 :

면역 증강성 CpG 올리고 뉴클레오티드(immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides, ISS CpG-ODN)는 T<sub>H1</sub> 형 면역 반응은 항진시키고, T<sub>H2</sub> 형의 반응은 감소시키는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 백서 천식 모델에서 ISS CpG-ODN으로 인한 면역 반응의 변화가 천식의 주요한 병태 생리 현상인, 기도 과민성, 호산구성 염증 및 점액 과다 분비에 미치는 효과에 대하여 고찰하고자 하였다.

### 대상 및 방법 :

천식 모델을 형성하지 않은 10마리의 정상 대조군과 ovalbumin(OVA)의 감각 및 유발로 천식 모델이 형성된 26마리의 백서를, 천식 대조군 11마리, 천식-CpG 치료군 15마리로 나누어 실험하였다. 천식-CpG 치료군은 연구 16일과 20일에 ISS CpG-ODN을, 천식 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. CpG-ODN 혹은 생리 식염수 투여 후, 특히 기도 저항, 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 내의 T<sub>H1</sub> 형 사이토카인(cytokine)인 INF- $\gamma$ 와 T<sub>H2</sub> 형 사이토카인인 IL-4의 농도 및 호산구의 분획, 폐조직 내 호산구의 침윤 및 배상 세포의 이형성과 MUC5AC 유전자의 발현을 고찰하였다.

**결 과 :**

ISS CpG-ODN 투여 후 천식 대조군과 비교하여, 천식-CpG 치료군에서 기관지 폐포 세척액 내에서 IFN- $\gamma$ 의 농도는 유의하게 높았고, IL-4의 농도는 유의하게 낮았다. 특히 기도 저항, 기관지 폐포 세척액 내의 호산구의 분획 및 폐조직에서의 호산구의 침윤은 천식-CpG 치료군에서 천식 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 그러나 점액 과다 분비의 지표인 배상 세포의 이형성 및 MUC5AC 유전자의 발현 정도는 천식 대조군과 천식-CpG 치료군간에 유의한 차이가 없었다.

**결 론 :**

백서 천식 모델에서 면역 증강성 CpG 올리고 뉴클레오티드는 T<sub>H1</sub> 형 면역 반응은 항진시키고, T<sub>H2</sub> 형의 반응은 감소시킴으로써, 천식의 주요한 병태 생리 현상인 기도 과민성 및 호산구성 염증을 억제하나, 점액 과다 분비에는 유의한 영향이 없었다.

**참 고 문 헌**

1. Broide DH, Gleich GJ, Cuomo A, Coburn D, Federman E, Schwartz L, et al. Evidence of ongoing mast cell and eosinophil degranulation in symptomatic asthma airway. *J Clin Invest* 1991; 88:637-48.
2. Broide DH, Paine MM, Firestein GS. Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest* 1992;90:1414-24.
3. Drazen JM, Arm JP, Austen KF. Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med* 1996;183(1):1-5.
4. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.
5. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y.

Contribution of CpG motif to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* 1997;158:3635-9.

6. Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: A role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 1998; 161:3042-9.
7. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997;186:1623-31.
8. Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998;160:2555-9.
9. Broide D, Schwarze J, Tighe H, Gifford T, Nguyen MD, Malek S, et al. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 1998;161:7054-62.
10. Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1999; 162:6284-93.
11. Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require T<sub>H1</sub> cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104: 1258-64.
12. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airway of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992;101:916-21.

13. Sheehan JK, Richardson PS, Fung DCK, Howard M, Thornton DJ. Analysis of respiratory mucus glycoproteins in asthma : a detailed study from a patient who died in status asthmaticus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:748-56.
14. Temann UA, Prasad B, Gallup MW, Basbaum C, Ho SB, Flavell RA, et al. A novel role for murine IL-4 in vivo : induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16(4):471-8.
15. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ukei IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999;162:6233-7.
16. Yagi T, Sato A, Hayakawa H, Ide K. Failure of aged rats to accumulate eosinophils in allergic inflammation of the air way. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:38-47.
17. Richards IM, Shields SK, Griffin RL, Dunn CJ. A novel model of antigen-induced lung eosinophilia in brown-norway rats : effect of methylprednisolone. *Eur J Pharmacol* 1990;183:1191-2.
18. 김제형, 심재정, 이승룡, 권영환, 이소라, 이상엽, 등. Ovalbumin으로 감작된 기니픽에서 Allergen 흡입으로 인한 즉시형 기관지 수축반응에 대한 비침습적 측정. 결핵 및 호흡기 질환 1998;45(1):99-106.
19. Agrawal KP. Specific airway conductance in guinea pigs : normal values and histamine induced fall. *Respir Physiol* 1981;43:23-30
20. Pennock BE, Cox CP, Rogers RM, Cain WA, wells JH. A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance. *J Appl Physiol : Respirat Environ Exercise Physiol* 1979;46:399-406.
21. Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Lai YL, Wu HD, Huang SK, et al. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nat Med* 1996;2(5):540-4.
22. Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Bright H, Beesley JE, Sanjar S. Induction, duration, and resolution of airway goblet cell hyperplasia in a murine model of atopic asthma : effect of concurrent infection with respiratory syncytial virus and response to dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:38-54.
23. Corrigan CJ, Kay AB. Chapter 32. T lymphocytes in asthma pathogenesis. In : Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR, Woolcock AJ, editors. *Asthma*. Philadelphia : Lippincott-Raven;1997. p. 433-51.
24. Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, Tokunaga T. In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res* 1988;79:866-873.
25. Uden JV, Raz E. Introduction to immunostimulatory DNA sequences. *Springer Semin Immunopathol* 2000;22:1-9.
26. Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J Immunol* 1992;148:4072-6.
27. Ramsay AJ, Ramshaw IA, Ada GL. DNA immunization. *Immunol Cell Biology* 1997;75:360-3.
28. Tighe H, Corr M, Roman M, Raz E. Gene vaccination : plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today* 1998;19:89-97.
29. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon  $\gamma$ . *Proc Natl*



- Acad Sci USA 1996;93:2879–83.
30. Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996;157:1840–5.
  31. Yi AK, Klinman DM, Martin TL, Matson S, Krieg AM. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. *J Immunol* 1996;157:5394–402.
  32. Yi AK, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM. IFN- $\gamma$  promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1996;156:558–64.
  33. Broide D, Cho JY, Miller M, Nayar J, Stachnick G, Castaneda D, et al. Modulation of asthmatic response by immunostimulatory DNA sequences. *Springer Semin Immunopathol* 2000;22:117–124.
  34. Lopez-Vidriero MT, Reid L. Chemical markers of mucous and serum glycoproteins and their relation to viscosity in mucoid and purulent sputum from various hypersecretory diseases. *Am Rev Respir Dis* 1978;117:465–77.
  35. Kim WD. Lung mucus: a clinician's view. *Eur Respir J* 1997;10:1914–7.
  36. Kim KC, McCracken K, Lee BC, Shin CY, Jo MJ, Lee CJ, et al. Airway goblet cell mucin : its structure and regulation of secretion. *Eur Respir J* 1997;10:2644–9.
  37. Jeffery PK, Li D. Airway mucosa : secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J* 1997;10:1655–62.
  38. Yoon JH, Park IY. Mucin gene expression and mucin secretion in human airway epithelium. *Rhinology* 1998;36:146–52.
  39. Martin LD, Rochelle BM, Krunkosky TM, Adler KB. Airway epithelium as an effector of inflammation : molecular regulation of secondary mediators. *Eur Respir J* 1997;10:2139–46.
  40. Thornton DJ, Howard M, Khn N, Sheehan JK. Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. *J Biol Chem* 1997;272:9561–6.
  41. Sheehan JK, Howard M, Richardson PS, Longwill T, Thornton DJ. Physical characterization of a low-charge glycoform of the MUC5B mucin comprising the gel-phase of an asthmatic respiratory mucous plug. *Biochem J* 1999;338:507–13.
  42. Thornton DJ, Carlstedt I, Howard M, Devine PL, Price MR, Sheehan JK. Respiratory mucin : identification of core proteins and glycoforms. *Biochem J* 1996;316:967–75.
  43. Hovenberg HW, Davies JR, Carlstedt I. Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea : identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells. *Biochem J* 1996;318:319–324.
  44. Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:843–52.
  45. Voynow JA, Young LR, Wang Y, Horger T, Rose MC, Fischer BM. Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol* 1999;276:L835–43.
  46. Levin SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Shelhamer JH. Corticosteroids differentially regulate secretion of IL-6, IL-8, and GM-CSF by a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol* 1993;265:L360–8.
  47. Kline JN. Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;247:211–25.
  48. Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:35–43.