

기도 염증이 유발된 생쥐에서 CpG Oligodeoxynucleotides가 미치는 효과

동국대학교 의과대학 소아과학교실

황혜원 · 김수진 · 김원덕 · 조성민 · 이동석 · 최성민

Effect of CpG Oligodeoxynucleotides on Airways of Mice with Established Airways Inflammation

Hei-Won Hwang, M.D., Su-Jin Kim, M.D., Won-Duk Kim, M.D.
Sung-Min Cho, M.D., Dong-Suk Lee, M.D. and Sung-Min Choi, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Dongguk University, Kyungju, Korea

Purpose : Airways eosinophilia and increased IgE, characteristic features of asthma, result from a predominant Th2 response. In this study, we investigated the effect of CpG oligodeoxynucleotides (ODNs) on the inhibition of airways eosinophilia in mice with established airway inflammation. We also investigated the immunological mechanisms involved.

Methods : Groups of BALB/c mice were sensitized intradermally with ovalbumin(OVA). At week 10, airway inflammation was induced by intranasal challenge of the mice with OVA. At week 14, the mice were challenged intranasally again with OVA in the presence and without the presence of CpG ODNs. Mice with saline administration served as negative controls. Bronchoalveolar lavage fluids(BALF) were obtained and eosinophils were counted. Th1 and Th2 cytokines in the spleen cell cultures were measured by ELISA. Serum OVA-specific IgE and IgG2a antibodies were also measured by ELISA.

Results : BALF eosinophils were significantly inhibited in the CpG ODNs-treated mice($P<0.01$). IgE and IgG2a levels increased significantly in both CpG ODNs-treated and untreated groups as compared to the negative control group; there was, however, no significant difference between the two groups four days after intranasal administration of CpG ODNs. Cytokine analysis revealed decreased production of IL-4, IL-5, and IL-13 and increased production of IL-12 in the CpG ODNs-treated group as compared to the untreated group. Interestingly, IFN- γ levels were not upregulated in the CpG ODNs-treated group.

Conclusion : CpG ODNs vaccination is a potentially useful approach for reversing airways eosinophilia in mice with established airways inflammation. (*J Korean Pediatr Soc* 2002;45:875-883)

Key Words : CpG oligodeoxynucleotides, Eosinophils, Th1 and Th2 cytokines

서 론

* 본 연구는 동국대학교 논문게재연구비 지원으로 이루어졌음.
접수 : 2002년 1월 21일, 승인 : 2002년 5월 8일
책임저자 : 최성민, 동국의대 경주병원 소아과
Tel : 054)770-8251 Fax : 054)741-2093
E-mail : csm21@dongguk.ac.kr

기관지 천식은 기도 염증과 기관지 과민 반응 및 가역적인 기관지 수축을 특징으로 하는 질환으로 기침, 천명, 호흡곤란 등의 임상 증상이 있으며, 소아기의 가

장 큰 만성질환 중 하나로 입원과 학교 결석의 주요 원인이다^{1,2)}. 병리학적으로는 기도 염증 조건이 특징이며 기도 점막의 부종, 상피 세포의 탈락, 점액의 과분비 및 호산구를 비롯한 염증 세포의 침윤을 보인다³⁾. 호산구증은 천식 환아를 비롯하여 알레르기 비염, 호산구성 폐렴, 호산구성 장염 등에서 볼 수 있고, 호산구는 기도평활근의 수축, 기도 과민성 반응 그리고 다른 염증 세포의 침윤을 유발한다⁴⁾. 이러한 현상은 천식 환자에서 두드러지게 나타나므로 호산구의 이동과 활성화는 천식 연구의 주요 대상이 되어 왔다⁵⁾. 따라서 호산구의 조직 이동을 차단하는 것은 알레르기 질환을 해결하는데 과제이다. CpG oligodeoxynucleotides(ODNs)은 박테리아의 DNA 염기서열 20개로 구성되어있으며^{6,7)}, 이 짧은 DNA 염기서열을 고등동물의 면역 체계가 이물질로 인식하여 면역 반응을 유발하게 되는 것이다^{8,9)}. CpG ODNs은 이미 동물 모델에서 Th1 사이토카인인 interferon(INF)- γ 와 interleukin(IL)-12 유도과 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13을 하강 조절하여 기도내의 호산구증 및 전신적 IgE 생성을 억제하며, 메타콜린 흡입에 의한 기관지 과민성을 방지하여 알레르기 반응을 억제시킬 수 있음이 증명되었다^{6,10)}.

저자들은 ovalbumin(OVA)에 의해 인위적으로 유발된 기도 염증이 있는 생쥐의 기도에서 박테리아 DNA 혹은 합성 CpG ODNs의 투여가 기도의 호산구증에 미치는 영향과 그 외 면역학적 기전에 대하여 연구하고자 한다.

대상 및 방법

1. 실험 재료

생후 8-10주된 암컷 BALB/c 생쥐 12마리(각 군당 4마리)를 실험 동물로 사용하였다. 모든 동물들은 동일한 방에서 균등한 상태를 유지하며 키웠다.

2. CpG ODNs

Oligos 회사(Wilsonville, OR)에서 만들어진 2개의 CpG motifs를 포함한 20개의 염기서열(TCCATG-ACGTTTCCTGACGTT)로 구성된 immunostimulatory unmethylated CpG ODNs을 사용하였다.

3. 감작 및 알레르기 항원 유발

BALB/c 생쥐에 매주 2회씩 면역보강제가 없는 OVA 10 μ g을 피하 주사하여 감작시켰고 음성 대조군은 생리식염수(0.9% NaCl)로 감작하였다. 감작 후 10주째에 생쥐를 이소프루란 마취상자 속에 15-30초간 넣어 의식을 소실시킨 뒤, 하루에 한번씩 연속 2일 동안 50 μ g OVA를 생쥐의 비강내로 점적 흡입 주입하여 기도 염증을 유도하였고, 음성 대조군은 생리식염수만 비강내로 투여하였다. 비강내로 투여 4주 뒤인 14주째 다시 생쥐의 비강내에 OVA+CpG ODNs과 OVA를 각각 점적 흡입 주입하였고, 다음날 두 군 모두 OVA만 비강내로 투여하였다. 동시에 음성 대조군은 생리식염수만 2일간 비강내로 투여하였다(Fig. 1).

4. 기관지폐포 세척액의 처리와 염색

마지막 기도 염증 유발 4일째 말초혈액 채취 후 곧바로 기관을 절개하여 기관 상단부를 통해 polyethylene 도관을 삽입하여 고정시키고, 4°C의 멸균된 생리식염수 2.4 mL(0.8 mL씩 3회)로 기관지폐포 세척술을 시행하였다. 회수된 기관지폐포 세척액은 양을 기록하고, 즉시 광학 현미경하에 혈구계(neubauer chamber)를 사용하여 총 세포수를 계산하였다. 기관지폐포 세척액을 4°C, 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 버린 후, 표본 튜브 내에 남아있는 세포수가 mL당 약 100,000개가 되도록 식염수로 희

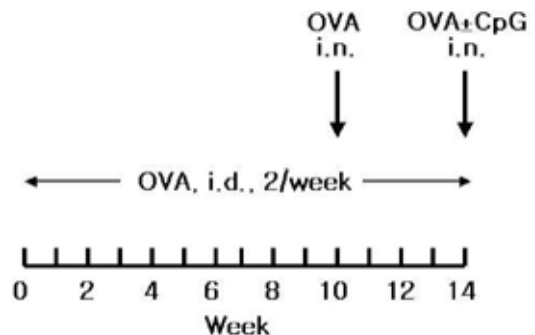


Fig. 1. Immunization protocol. Mice were sensitized intradermally(i.d.) with 10 μ g of ovalbumin(OVA) without adjuvant twice weekly for 14 weeks. At weeks 10, all mice received intranasal(i.n.) administration of 50 μ g of OVA to induce airway inflammation. After a 4-weeks rest, at weeks 14, mice were challenged i.n. again with OVA in the presence or absence of CpG Oligodeoxynucleotides (ODNs).

석하여 각 spin에 150 μ L씩 넣어 cytospin(Shandon, Pittsburg, PA)으로 표본도말 하였다. 도말 표본은 호산구를 염색하기 위해 peroxidase substrate DAB 용액에 10분 동안 처치한 후 Hema 3 solution II에 1 초 동안 3-5번 반복해서 담구어 잔여 세포를 염색하여 광학현미경 400배율하에서 500개 세포의 백분율을 계산함으로써 얻어졌다. 모든 도말 표본은 2회 측정 후 통계 처리를 위해 평균치를 이용하였다.

5. 혈청 항원 특이적 IgE, IgG2a

감작 후 4, 8, 12, 14주(기관을 절개하기 직전)에 생쥐의 꼬리에서 각각 채혈하여 24시간 동안 4°C에서 냉장 보관한 후, 상층액인 혈청만 4°C, 2,000 rpm으로 약 10분간 원심 분리하여 혈청 0.4-0.5 mL를 얻어 냉동 보관(-20°C 이하)하여 IgE, IgG2a 측정에 이용하였다. OVA 특이적 IgE는 역형 anti-IgE capture ELISA 방법에 의해 측정하였다. 즉 monoclonal rat anti-IgE(PharMingen, San Diego, CA)가 피막된 ELISA plate(Nunc-Immuno Plate MaxiSorp™, Denmark)에 시험혈청(1:50), 표준혈청(1:50), PBS를 각각의 well에 100 μ L를 넣고 4°C에서 24시간 반응시킨 후, biotinylated OVA 100 μ L를 첨가하여, 상온에서 1.5시간 반응 후 streptavidin-alkaline phosphatase conjugate(1:1,000)(PharMingen) 100 μ L를 첨가한 후 상온에서 1.5시간 동안 방치하였다. OVA 특이적 IgG2a는 antigen-capture ELISA 방법을 사용하여 측정하였다. 즉 OVA 2 μ L/mL 피막된 ELISA plate에 시험혈청(1:200), 표준혈청(1:200), PBS를 각각의 well에 100 μ L를 넣고 4°C에서 24시간 반응시킨 후, alkaline phosphatase-conjugated monoclonal rat anti-IgG2a(1:10,000)(PharMingen) 100 μ L를 첨가한 후 상온에서 1.5시간 방치하였다. IgE, IgG2a 모두 substrate(p-nitrophenylphosphate, 1 mg/mL in diethanolamine buffer, PH 9.8)로 발색 반응을 하였고, 표준 혈청은 OVA로 염증이 유발된 생쥐에서 얻었으며 각 시험 혈청은 microplate reader(Molecular Devices, CA, USA)로 흡광도 405 nm(OD405)에서 PBS 대조군 값을 감한 후 측정하여 표준 혈청치를 이용해서 정상화하였다. 모든 시험 측정은 ELISA에서 두 개의 well에 중복 측정하였으며 통계처리를 위해 평균치를 산출하였다.

6. OVA에 의해 생성된 사이토카인 분석

생쥐의 기관지폐포 세척술을 시행한 직후 비장으로 부터 비장 세포 현탁액¹¹⁾을 만들어 세포수가 2×10^7 cells/mL 되도록 24 well plate에 10% FCS-RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 또한 OVA는 well당 600 μ g/mL 되도록 첨가하여 배양하였다. Con A 및 순수 배양액을 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다. 세포는 5% CO₂, 37°C 조건 하에 배양하여 2일, 3일, 4일째 배양부유층을 수확하였으며, 사이토카인 분석을 할 때까지 -70°C 저장하였다. IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IFN- γ 의 농도는 sandwich ELISA법¹²⁾으로 측정하였다. 96 well plates에 정제된 monoclonal rat antimouse IL-4, IL-5, IL-12, IL-13과 IFN- γ (1 μ g/mL)로 피막한 뒤, 시험 배양부유액 혹은 recombinant standard(IL-4, 1-1,000 pg/mL; IL-5, 2.5-2,500 pg/mL; IL-12, 4-4,000 pg/mL; IL-13, 2.5-2,500 pg/mL; IFN- γ , 1-1,000 pg/mL)에 4°C, 24시간, biotinylated monoclonal rat anti-mouse IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IFN- γ 에 4°C, 24시간 유지한 후 streptavidin alkaline phosphatase(1:1,000)으로 마지막 처리한 다음에 substrate로 발색반응을 유도해 OD를 측정하였다. 사이토카인 측정시 민감도는 IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IFN- γ 각각 4, 10, 8, 10, 16 pg/mL였다.

7. 통계처리

IgE, IgG2a와 사이토카인 농도 수치는 평균값±표준편차로 나타내었다. 각 군들간의 통계학적인 유의성은 Student's t-test로 검정하였다. 유의 수준은 P값 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. 염증이 유발된 기도에 CpG ODNs 투여로 인한 기관지폐포 세척액의 호산구 백분율의 변화

기관지폐포 세척액내의 세포분획의 비교에서 호산구 백분율은 OVA 감작 후 CpG ODNs을 투여한 군이 7.6[5.8-9.4]%, CpG ODNs을 투여하지 않은 군이 42.0[38.2-44.6]%로 기관지 염증이 있는 생쥐에게 CpG ODNs을 비강내 투여한 군은 투여하지 않은 군에 비해 기도 염증 세포내의 호산구증을 현저히 억제

시켰다($P<0.01$). 생리식염수만 투여한 음성 대조군은 1.0[0.4-1.8]%로 OVA에 감작된 두 군 모두에 비해 호산구 백분율이 낮아 매우 유의한 차이를 보였다($P<0.01$)(Fig. 2, 3).

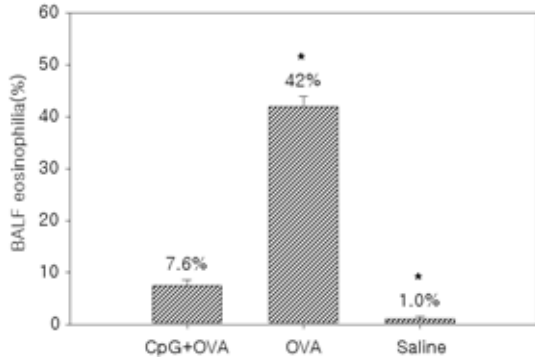


Fig. 2. Inhibition of airway eosinophilia in mice with established airway inflammation. Two days after the last challenge, the mice were sacrificed, bronchoalveolar lavage fluids(BALF) were obtained and BALF eosinophils were stained and counted. Each bar was expressed as mean(\pm SEM) of four mice per group. CpG+OVA: CpG ODNs treated mice after OVA immunization, OVA: CpG ODNs untreated mice after OVA immunization, Saline: negative control group. * $P<0.01$ compared with CpG ODNs treated group.

2. 감작 및 알레르기 항원 유발에 따른 OVA 특이적 혈청 IgE, IgG2a의 변화

OVA 특이적 혈청 IgE, IgG2a 수치는 CpG ODNs을 투여한 군과 투여하지 않은 군 모두에서 음성 대조군에 비해 매우 증가하였으며, 감작의 횟수가 많아지면서 OVA 특이적 혈청 IgE, IgG2a 수치는 더욱 더 증가하였다. 10주째에 비강내로 OVA항원 유발 투여 2주 후 측정된 OVA 특이적 혈청 IgE, IgG2a 수치는 OVA 항원 유발 2주 전에 측정된 수치에 비해 양군에서 매우 유의하게 증가되었다($P<0.05$). CpG ODNs을 투여 후 3일째에 측정된 OVA 특이적 혈청 IgE, IgG2a치는 투여 전에 측정된 수치와 비교하여 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, OVA 특이적 혈청 IgE치는 CpG ODNs을 투여한 군이 투여하지 않은 군에 비해 다소 증가하는 변화를 보였으며, OVA 특이적 혈청 IgG2a치는 CpG ODNs을 투여한 군이 투여하지 않은 군에 비해 약간 감소하는 변화를 보였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다(Fig. 4).

3. CpG ODNs 투여에 대한 항원유도 사이토카인들의 반응

배양된 비장 세포의 사이토카인 생산은 배양 4일째

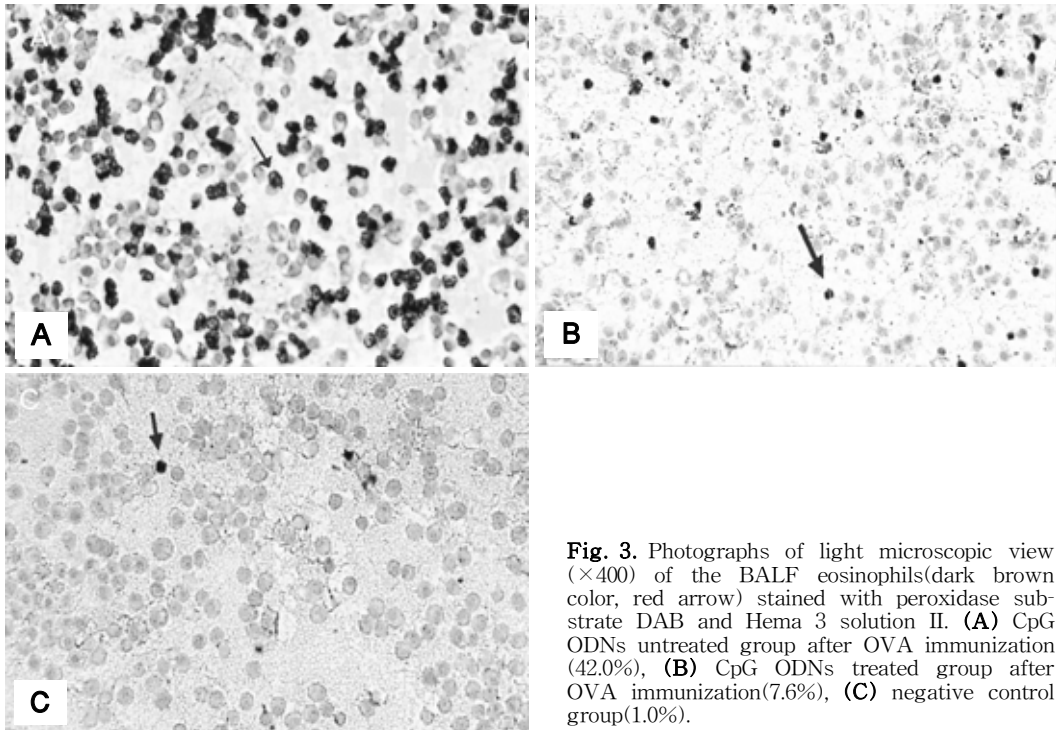


Fig. 3. Photographs of light microscopic view ($\times 400$) of the BALF eosinophils(dark brown color, red arrow) stained with peroxidase substrate DAB and Hema 3 solution II. (A) CpG ODNs untreated group after OVA immunization (42.0%), (B) CpG ODNs treated group after OVA immunization(7.6%), (C) negative control group(1.0%).

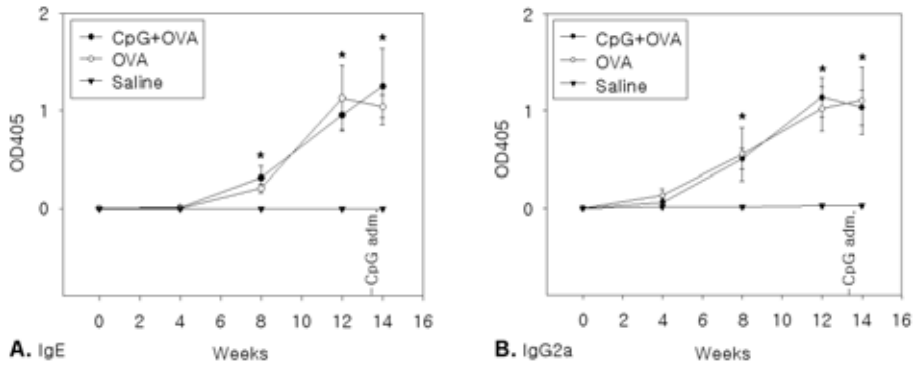


Fig. 4. The effect of CpG ODNs vaccination on established IgE responses. Serum OVA-specific IgE(A) and IgG2a(B) levels during the sensitization and challenge increased significantly in both CpG ODNs treated and untreated groups as compared the negative control groups ($P < 0.01$) at 8 weeks, 12 weeks and 14 weeks. At 4 days after intranasal administration of CpG ODNs, IgE and IgG2a levels were no difference between the CpG ODNs treated groups and untreated groups.

수확한 배양부유액에서 가장 활발하였다. IL-4 농도는 기관지 염증이 있는 생쥐에게 CpG ODNs을 비강내 투여한 군 11.6 ± 3.7 pg/mL로 투여하지 않은 군 75.5 ± 36.3 pg/mL에 비해 의미있게 낮았으며 ($P < 0.01$), 두 군 모두에서 생리식염수만 투여한 음성 대조군 2.1 ± 1.7 pg/mL보다 IL-4 농도가 높았다 ($P < 0.01$). IL-5 농도는 기관지 염증이 있는 생쥐에게 CpG ODNs을 비강내 투여한 군 138.7 ± 34.2 pg/mL로 투여하지 않은 군 396.0 ± 163.6 pg/mL에 비해 의미 있게 낮았으며 ($P < 0.05$), 두 군 모두에서 생리식염수만 투여한 음성 대조군 19.0 ± 7.5 pg/mL보다 IL-5 농도가 높았다 ($P < 0.01$). IL-13 농도는 기관지 염증이 있는 생쥐에게 CpG ODNs을 비강내 투여한 군 421.5 ± 399.6 pg/mL로 투여하지 않은 군 933.0 ± 582.4 pg/mL에 비해 낮았으나 통계적으로 유의하지는 않았으며, 두 군 모두에서 생리식염수만 투여한 음성 대조군 14.5 ± 16.7 pg/mL보다 IL-13 농도가 높았다 ($P < 0.01$). IL-12 농도는 기관지 염증이 있는 생쥐에게 CpG ODNs을 비강내 투여한 군 211.1 ± 110.1 pg/mL로 투여하지 않은 군 96.0 ± 27.7 pg/mL에 비해 높았으나 통계적으로 유의하지는 않았으며 ($P = 0.08$), 두 군 모두에서 생리식염수만 투여한 음성 대조군 47.8 ± 20.5 pg/mL보다 IL-12 농도가 높았다 ($P < 0.05$). INF- γ 농도는 기관지 염증이 있는 생쥐에게 CpG ODNs을 비강내 투여한 군 75.5 ± 44.1 pg/mL로 투여하지 않은 군은 175.0 ± 121.3 pg/mL, 생리식염수만 투여한 음성 대조군 164.7 ± 146.0 pg/mL로

세 군간에 의미 있는 차이는 없었다 ($P > 0.1$) (Fig. 5).

고 찰

DNA 백신은 1990년 plasmid DNA를 동물에 직접 주입했을 때 단백질이 만들어진다는 보고에 이어 이렇게 생성된 소량의 단백질이 항원으로 작용해 면역 반응이 유도된다는 결과가 발표되면서 DNA 백신에 대한 연구가 시작되었고^{13, 14}, 약독화 생백신과 같이 항원이 세포 내에서 발현되는 특징을 가지고 있지만, 병원체 전체를 이용하는 것이 아닌 방어 면역을 유발하는데 중요한 부분만을 포함하고 있기 때문에 감염에 대한 위험성이 없다¹⁵. 특히 CpG ODNs을 이용한 면역 치료의 장점은 DNA만으로 면역 치료를 했을 때보다 더욱 높은 면역 반응을 유발하는 것인데, 단백질 백신의 높은 체액성 면역 반응과 DNA의 장점인 Th1 면역 반응을 동시에 유도할 수 있어 여러 질병의 치료에 이용되고 있다^{7, 16-18}.

1937년 Freund 등¹⁹에 의해 처음으로 결핵균 추출물 전체를 파라핀 기름과 섞은 complete Freund's adjuvant(CFA)로 사용하였고, Tokunaga 등²⁰은 결핵균에서 정제된 DNA가 비강 세포에서 인터페론 분비를 유도한다는 사실을 밝혔다. 결핵균 DNA는 면역 반응을 조절하는 여러 개의 DNA 염기서열로 되어 있고 또한 여러 실험에서 단핵구에서 주로 INF- α , β ^{20, 21}, IL-6⁸, IL-12²⁰와 natural killer(NK) 세포에서 INF- γ ²¹ 분비를 유도하는 것을 알았다.

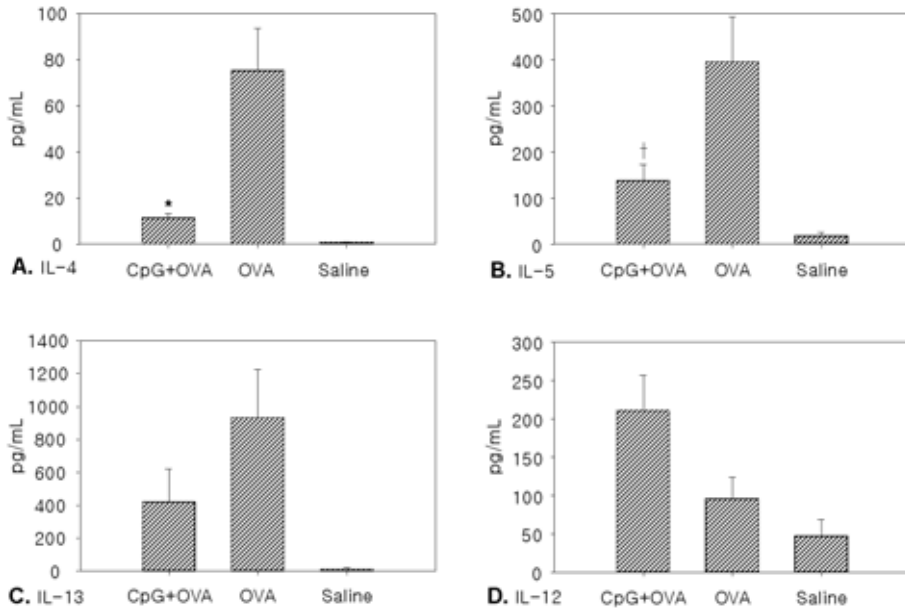


Fig. 5. The effect of CpG ODNs treatment on allergen-induced Th1 and Th2 cytokine induction. The level of IL-4(A), IL-5(B), IL-13(C), IL-12(D) were analyzed by ELISA. The results revealed decreased production of IL-4, IL-5, IL-13 and increased production of IL-12 in the CpG ODNs treated group as compared to the untreated groups (* $P < 0.01$, † $P < 0.05$); each bar indicates the mean(\pm standard error of mean) value for four mice.

CpG ODNs은 20개의 염기서열을 포함한 2개의 CpG motifs로 구성되며²²⁾, 작용은 투여 30분 내에 사이토카인 mRNA를 유도하고⁸⁾, 투여 4시간 내에 IL-6, IL-12 등을 분비한다²³⁾. 특히 Th2 사이토카인에 의한 염증 반응을 억제하고, Th1 사이토카인 반응을 유도하여 광범위하게 염증 반응과 면역 반응 조절에 영향을 준다. 본 연구에서도 CpG ODNs을 투여한 군에서 투여하지 않은 군에 비해 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13의 생성은 감소하였고, Th1 사이토카인인 IL-12 생성은 증가하였다. 최근 생쥐 천식 모델에서도 CpG ODNs 투여시 호산구성 염증 반응 예방에 효과적인 Th1 사이토카인 반응을 유도하는 것이 확인되었다²⁴⁾. 또한 Kline 등²⁴⁾에 의하면 CpG ODNs은 직접적으로 Th2 반응을 억제함으로써 IL-12와 IFN- γ 가 없어도, 주혈흡충란으로 감작시킬 경우 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5의 억제를 발견할 수 있었다. 그러므로 CpG ODNs은 IL-12와 IFN- γ 가 각각 혹은 동시에 없을 시에도 호산구성 기도 염증 반응과 기관지 과민성의 진행을 효과적으로 방지하는 것을 알 수 있었으나, IL-12와 IFN- γ 가 존재하는 것과 비교하여 CpG ODNs의 농도가 더욱 많이 필요

한 것을 알 수 있었다.

CpG ODNs에 의한 전처치는 항원 특이적 IgE의 생성을 억제하고, 항원 특이적 IgG2a를 유도하며 IgE의 생성 억제는 IFN- γ 와 IL-12의 생산에 의하며 IL-4, IL-5의 하강 조절과 연관된다²⁵⁾. 그러나 저자들의 결과에서는 이와 달리 OVA 특이적 혈청 IgE는 CpG ODNs을 투여한 군이 투여하지 않은 군에 비해 다소 증가하는 변화를 보였으며, OVA 특이적 혈청 IgG2a치는 CpG ODNs을 투여한 군이 투여하지 않은 군에 비해 약간 감소하는 변화를 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. Broide 등²⁶⁾에 의하면 항원 노출 6일 전에 단독으로 CpG ODNs을 투여하였을 때 가장 효과적으로 기도 염증을 억제한다고 하였다. 그러나 저자들은 CpG ODNs을 전처치 한 것이 아니라 기관지 염증을 유발한 생쥐의 기도에 CpG ODNs을 투여 후 검사하였기 때문에 이전의 연구 결과와 달리 IgE 감소와 IgG2a 증가를 유도하지 못했을 것으로 생각된다.

CpG ODNs이 기도의 호산구증을 억제하는 기전으로 생각되는 것은 첫째로는 골수에서 호산구의 생성과 분비를 억제하며, 둘째로는 호산구 생성에 영향을

주는 IL-3, IL-5, 과립구 대식세포 집락 자극 인자 생성을 억제하고 셋째로는 단핵구, 대식세포, NK 세포에서 IL-12와 IFN- γ 를 생성 유도함으로 인한 간접적인 Th2 사이토카인의 억제이며, 넷째로는 IL-12와 IFN- γ 의 직접적인 생성 자극이다²⁶⁾. 이런 CpG ODNs의 효과는 투여 이후 6주 동안 지속되며, 이 기간 동안 기도 호산구증 감소 및 기관지 염증과 기관지 과민성을 억제하였다²⁷⁾. 본 연구 결과에서도 기도 염증을 유발한 생쥐에 CpG ODNs을 투여한 결과 기도 호산구증이 현저하게 억제되는 것을 보여주었다. CpG ODNs은 기도내로 직접 투여했을 때 투여 용량이 제일 적게 사용되며, 부작용을 감소시키므로 더욱 효과적이다²⁷⁾. 특히 CpG ODNs이 스테로이드에 비해 알레르기 질환에서의 장점은 항원에 노출되었을 때 Th1 반응으로 숙주의 사이토카인을 변화시킨다는 것이며, 또한 감염의 위험 없이 면역 조절을 한다는 것이다²⁶⁾.

Peng 등²⁵⁾의 연구는 2종류의 생쥐 종류인 BALB/c와 C57BL/6를 사용하여 CpG ODNs의 유전자에 대한 평가와 CpG ODNs으로 전처치하지 않은 생쥐에 비해 CpG ODNs으로 전처치 된 생쥐에서 항원 특이적 IgE가 현저히 감소하였고, 항원 특이적 IgG1, IgG2a를 생성하였다. 또한 이 연구에서 CpG ODNs 투여로 인한 지연 피부 반응이 일부에서 관찰되었는데 이것은 감각 전에 전처치로 CpG ODNs을 1회 투여 받은 생쥐에서는 발견되지 않았다. 그러므로 지연 피부 반응은 CpG ODNs의 부작용으로 보여지며, 지연 피부 반응은 CpG ODNs의 투여 횟수와 연관이 있었고, C57BL/6 생쥐에서는 생기지 않았으므로 유전적 배경이 영향을 준다는 것을 알았다.

최근 선진국에서 IgE 관련 질환들이 현저히 증가되고 있는데, 이것의 원인으로 결핵 등의 감염성 질환의 감소가 알레르기 질환의 증상 악화와 유행을 시키는 기저인자로 작용하는 것을 들 수 있다. 그 예로 Munich의 아이들에 비해 Leipzig의 아이들에서 천식과 알레르기 질환이 적게 발생했는데, 즉 Leipzig 아이들에 있어서 영아기에 감염성 질환의 증가가 아토피를 방지하였으며²⁸⁾, Shaheen 등²⁹⁾은 감염과 아토피의 관계에 대한 보고를 하였는데 1979년 Guinea-Bissau에서 홍역이 대대적으로 유행하면서 아토피를 감소시켰으며, Shirakawa 등³⁰⁾은 결핵 검사에 양성으로 나온 경우 천식과 아토피의 발생이 감소되며, 결핵

반응이 Th1 사이토카인을 유도하고, Th2 사이토카인을 억제하는 것을 보고하였다. 앞에서 언급한 것과 같이 CpG ODNs은 결핵균 DNA에서 분리하였으므로 이의 접종은 알레르기 항원에 노출시 면역 반응의 조절을 유도하는 것이다²⁵⁾.

원인 항원을 일정한 간격을 두고 소량씩 증량 시켜 환자에게 주사하여 면역학적 변화를 유도하는 전통적인 면역 요법은 비교적 유효성이 낮고 아나필락시스 등의 심각한 부작용을 일으키며^{31, 32)}, 시간과 경비가 많이 들며, 불편하고 때로는 알레르기 질환이 악화될 수 있기 때문에 알레르기 질환의 치료에 있어 1차적 치료 선택은 아니다. 그러나, CpG ODNs은 전신적 및 기도내 흡입 등의 점막 경로로 환자에게 투여할 수 있는 장점과 또한 부작용 없이 면역 조절을 하는 장점을 가지고 있다. CpG ODNs의 백신접종은 면역 반응을 조절하여 호산구와 IgE 생성을 방지하는 데 효과적이며, 알레르기 질환으로 진행되는 위험을 감소시킨다. 그러므로 CpG ODNs의 백신 접종은 좀더 연구 되어져 인체에 적용해야 할 것이다.

요 약

목적 : 기관지 천식은 Th2 반응 우세로 인한 기도의 호산구증과 IgE 증가를 특징으로 하는 질환이다. 박테리아 DNA 혹은 합성 ODNs인 unmethylated CpG motifs(CpG)은 Th1 사이토카인인 INF- γ 와 IL-12 유도와 Th2 사이토카인을 하강 조절하여 기도내의 호산구증 및 전신적 IgE 생성을 억제하며, 메타콜린 흡입에 의한 기관지 과민성을 방지한다. 저자들은 기도 염증을 유발한 생쥐의 비강내에 합성 CpG ODNs의 점적 투여로 기도의 호산구증과 그 외 면역학적 기전에 대한 영향을 연구하고자 한다.

방법 : BALB/c 생쥐에 주당 2번씩 면역보강제 없이 OVA를 10 μ g을 피하 주사하여 감각 시켰다. 10 주째에 50 μ g OVA를 백서의 비강내로 주입하여 기도 염증을 유도한 후, 4주 뒤인 14주째 다시 생쥐의 비강내에 OVA+CpG ODNs과 OVA를 점적 흡입 주입하였다. 마지막 항원 유발(14주) 후 4일째에 기관지 폐포 세척액을 추출하여 세포를 염색한 후 호산구를 측정하였고 동시에 비장 세포를 배양하여 사이토카인 측정을 하였다. 비장 세포에서 OVA에 의해 생성된 사이토카인 즉 Th1(INF- γ , IL-12), Th2(IL-4, IL-

5, IL-13) 사이토카인을 ELISA에 의해 측정하였다. 혈청 항원 특이 IgE, IgG2a 또한 ELISA에 의해 측정하였다.

결 과 :

1) 기관지폐포 세척액의 호중구수: CpG ODNs을 투여한 군이 7.6[5.8-9.4]%, CpG ODNs을 투여하지 않은 군이 42.0[38.2-44.6]%로 기도 염증 세포내의 호산구증을 현저히 억제시켰다($P<0.01$).

2) 혈청 OVA-specific IgE와 IgG2a: CpG ODNs으로 투여한 군과 투여하지 않은 군에서 측정된 혈청 OVA-specific IgE와 IgG2a는 음성 대조군에 비해 현저히 증가하였고, CpG ODNs을 비강내 투여 후 4 일째 측정된 혈청 OVA-specific IgE와 IgG2a 수치는 CpG ODNs 투여군과 비투여군 사이에 유의한 차이가 없었다.

3) 사이토카인 분석: CpG ODNs으로 투여한 군은 투여하지 않은 군에 비해 IL-4, IL-5, IL-13의 생성이 감소하였고 IL-12 생성은 증가하였으나, INF- γ 의 상향조절은 보여주지 못하였다.

결 론 : CpG ODNs의 백신 접종은 면역반응을 조절하여 기도 염증이 형성된 생쥐에서 기도 호산구증을 감소시키는데 매우 효과적이며 천식 치료에 유용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Ellis EF. Asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1983;72:526-39.
- 2) Landau LI. Outpatient evaluation and management of asthma. *Pediatr Clin North Am* 1979;26: 581-601.
- 3) 홍창의. 소아과학. 완전 개정 7판. 서울특별시, 대한교과서 주식회사, 2001:1137-44.
- 4) Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998;338:1592-600.
- 5) Streck ME, Leff AR. Eosinophils in asthma. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers Co, 1997: 339-417.
- 6) 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.
- 7) Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1(Th1) im-

- munity. *J Exp Med* 1997;186:1623-31.
- 8) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546-9.
- 9) Krieg AM. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol* 1995;15:284-92.
- 10) 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;2:540-4.
- 11) Turka LA, Carpenter CB, Yunis EJ, Milford EL. Selective sparing of suppressor cells generated in mixed lymphocyte response by an anti-interleukin-2 receptor antibody. *Transplantation* 1989;47: 182-8.
- 12) Chen YL, Simons FE, Peng Z. A mouse model of mosquito allergy for study of antigen-specific IgE and IgG subclass responses, lymphocyte proliferation, and IL-4 and INF-gamma production. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116:269-77.
- 13) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
- 14) Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-4.
- 15) 송만기, 성영철, 이창우. DNA를 이용한 백신 및 치료. 천식 및 알레르기 2001;2:155-60.
- 16) Oxenius A, Martinic MM, Hengartner H, Klenerman P. CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J Virol* 1999;73:4120-6.
- 17) Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 1997;3:849-54.
- 18) Stacey KJ, Blackwell JM. Immunostimulatory DNA as an adjuvant in vaccination against *Leishmania major*. *Infect Immun* 1999;67:3719-26.
- 19) Freund J, Casals J, Hosmer EP. Sensitization and antibody formation after injection of tubercule bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937;37:509-13.
- 20) 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;79:866-73.
- 21) Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:775-9.
 - 22) Kline JN. Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;247:211-25.
 - 23) Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:2879-83.
 - 24) Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1258-64.
 - 25) Peng Z, Wang H, Mao X, HayGlass KT, Simons FE. CpG oligodeoxynucleotide vaccination suppresses IgE induction but may fail to down-regulate ongoing IgE responses in mice. *Int Immunol* 2001;13:3-11.
 - 26) 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.
 - 27) 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.
 - 28) von Mutius E, Fritsch C, Weiland SK, Roll G, Magnussen H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* 1992;305:1395-9.
 - 29) Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792-6.
 - 30) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-9.
 - 31) Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Is allergen immunotherapy effective in asthma? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:969-74.
 - 32) Creticos PS, Reed CE, Norman PS, Khoury J, Adkinson NF Jr, Buncher CR, et al. Ragweed immunotherapy in adult asthma. *N Engl J Med* 1996;334:501-6.