

천식유발 마우스에서의 폐 내 세포조성 변화와 IL-4 및 IL-10의 발현 양상

이수진 · 박세종 · 리천주 · 장양호 · 최농훈*

건국대학교 수의과대학

Received June 3, 2006 / Accepted July 25, 2006

The Change of Cell Distribution in the lung and the Expression Pattern of IL-4 and IL-10 in Asthma Induced Mouse. Soojin Lee, Sejong Park, Tianzhu Li, Yangho Jang and Nonghoon Choe*. *Konkuk University College of Veterinary Medicine, Seoul* – Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways, which characterized by bronchial hyperresponsiveness, reversible airflow limitation and respiratory symptoms. Internationally, the prevalence of asthma has been increased over last 3 decades. Recently, several studies of asthma have been reported with gradually increasing importance. To testify the hypothesis that interleukin (IL)-4 and IL-10 may be an important determinant of the severity of airway inflammation, their expression was studied in mouse model of asthma. BALB/c mouse, IL-4 Knockout (KO) mouse and IL-10 KO mouse were sensitized with intraperitoneal injection of ovalbumin adsorbed to aluminum potassium sulfate, followed by challenges with intranasal ovalbumin on 3 consecutive days. The severity of pulmonary inflammation was assessed by eosinophilia in BAL fluid, number of total BAL cells, histopathological changes in lung tissues, and immunohistochemical staining against IL-4 and IL-10. In BAL fluid, the number of total cells was significantly increased in asthma induced mouse compare to the control. In asthma induced mouse, eosinophil was increased to 56% and neutrophil was 0.2%. In H & E stains, eosinophilic infiltration and epithelium hyperplasia were clearly noticed in asthma induced mouse. In immunohistochemical staining for IL-4 and IL-10, there was no positive reaction in control group. However, very strong reactions were appeared in asthma induced group. In this research, IL-4 and IL-10, which seem to play a central role in allergic asthma, KO mouse was utilized to test the causative relationship between airway inflammation and role of specific cytokine. Asthma induced IL-4 and IL-10 KO mice showed much decreased inflammatory reactions in the number of total BAL cells, in eosinophilic infiltration, and in immunohistochemical stains against diverse inflammatory proteins. These results suggest that IL-4 and IL-10 increase the asthmatic reactions in vivo mice model.

Key words – Asthma mouse model, IL-4 knockout mouse, IL-10 knockout mouse, IL-4, IL-10.

서 론

천식은 기도과민증과 가역적인 호흡기계 반응을 특징으로 하는 만성염증질환으로[31] 지난 30년간 전 세계적으로 증가하는 추세이다[25,33,34]. The Global Initiative for Asthma (GINA) program에 따르면 우리나라의 경우 임상적으로 진단된 천식의 비율이 3.9%에 이르며[19], 천식을 포함한 만성 하부호흡기계 질환으로 사망한 수는 1992년에서 2002년 사이에 인구 10만명당 12.9명에서 22.6명으로 증가하였다[16]. 천식의 원인과 발병 등에 관여하는 병태생리 기전에 관한 연구를 사람을 대상으로 시행하는 데에는 한계가 있으므로 동물 천식모델을 이용한 연구가 필요하다. 다양한 동물로 천식 모델을 만들어 연구에 사용하고 있으나[14,21] 각 동물마다 모델로서의 장단점이 있다[2,4,6,7,28]. 마우스의 경우, 사람과 유사하게 천식 원인물질의 흡입 시 호산구성 기도염증과 기

도과민증이 증가하며[1,37], 다루기가 쉽고, 다양한 단클론항체들이 개발되어 있어 천식의 발생 양상을 연구하는데 다른 동물보다 유리하다.

천식모델을 만들기 위해서는 천식의 발병기전에 대한 이해가 필요하다. 천식은 IgE 관련 type I 과민반응으로 호흡을 통하여 외부로부터 천식의 원인물질인 항원이 폐 내로 들어왔을 때 이에 대한 반응으로 기도의 알레르기성 염증이 발생하게 된다[8,24]. 이때 항원의 제거의 일차적인 역할은 폐포대식세포가 담당하게 되고[9] 활성화된 폐포대식세포는 항체를 생산하도록 B 세포를 자극하여 항원 특이성 IgE를 생산한다. IgE는 비만세포를 활성화시키고 항원과 IgE가 결합하면 비만세포에서 탈과립이 일어나 초기 천식반응을 유발하게 된다[29]. 또한 항원에 노출된 B 세포는 CD4 T 세포를 자극하여 T helper 2 (Th2) 세포로 분화되고, 분화된 Th2 세포는 IL-4,5,6,9,13 등을 분비하여 호산구를 자극하고 후기 알레르기성 기도반응을 유발한다[5,18,26,30]. 이중 IL-4의 경우 B 세포를 자극하여 IgE 생산을 촉진시키고[13,23,27] 염증세포들을 자극하여 염증매개 물질들을 분비시켜 기관지과민성과

*Corresponding author

Tel : +82-2-450-3709, Fax : +82-2-450-3037

E-mail : nojamaji@hanmail.net

기도폐쇄를 일으켜 천식증상을 일으킨다. 이처럼 천식의 경우 IL-4 등이 관여하는 Th 2 세포반응이 Th 1 세포반응보다 우세하다고 알려져 왔다[12]. 반면 IL-10의 경우도 Th 2 세포 반응을 유발하여 Th1 세포반응을 억제하고 천식을 유발하는 인자로 알려져 왔다[10]. 그러나 최근 연구에 의하면 Th2 세포 반응을 억제하는데 IL-10이 중요한 역할을 하며 그 결과 기관염증과 천식의 반응이 감소한다는 보고가 있다[3]. IL-10의 경우 다기능 cytokine으로서 항염증반응과 면역억제 기능을 수행하며 면역반응의 항상성을 유지하는데 주요한 역할을 수행한다고 알려져 있어[22] IL-10이 천식에 미치는 영향에 대해서는 보다 심도있는 추가연구가 필요하다.

이에 본 연구진은 일차로 BALB/C 마우스를 이용하여 항원으로 ovalbumin을 사용하여 천식을 유발하여 폐 내 세포 구성에 미치는 영향을 살펴보고, 이차적으로 천식 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 IL-4와 IL-10 knock out (KO) BALB/c 마우스에서 천식을 유발하여 천식인자를 가진 개체에서의 반응과 천식관련인자가 결핍된 개체에서의 반응성의 차이와 IL-4 및 IL-10의 발현양상을 비교분석하였다.

재료 및 방법

천식유발

천식유발은 BALB/c 마우스와 BALB/c IL-4 KO 마우스와 IL-10 KO 마우스를 대상으로 각 실험군 당 12마리씩 사용하여 유발하였다. BALB/c 마우스는 (주)오리엔트바이오에서 생후 7주령 암컷을 구입하였으며, IL-4 KO 마우스와 IL-10 KO마우스는 한국생명공학연구원에서 분양받아 건국대학교 수의과대학 동물실험실에서 사육한 후 실험에 사용하였다. 천식을 유발시키기 위해 실험 1일에 20 µg의 ovalbumin (Sigma)을 aluminum hydroxide를 부형제로 하여 PBS에 녹여 복강 내로 투여하여 14일 후 동일한 방법으로 다시 복강 내에 주입하여 재감작을 실시하였다. 실험 28일, 29일 및 30일에 각기 30 ml PBS에 ovalbumin (1%)을 녹여 ultrasonic nebulizer (Sunrise medical, Pulmo-Aide®, LT compressor)를 사용하여 aerosol 상태로 만들어 하루에 20분씩 3번 감작시켰다(Fig. 1). 실험 30일째 마지막으로 감작시킨 후 24시간 지나 안락사를 시켰고 실험에 필요한 시료들을 채취하였다.

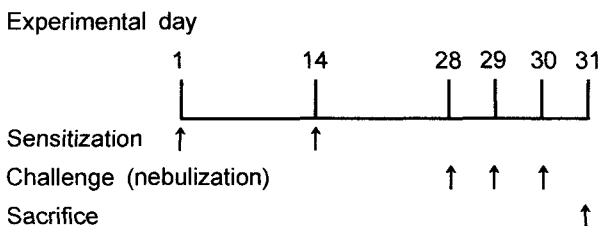


Fig. 1. Experimental protocol.

기관지 폐포 세척술

기관지폐포 세척술은 Kagan [15] 등이 실시한 방법을 따랐으며, 수집된 세포는 1000 rpm에서 10분간 원심 분리를 실시하였다. 기관지 폐포 세척술로 수집된 세포를 원심분리 후, 폐 세포들은 Cytospin® 3 cytocentrifuge (Shandon, Pittsburgh, PA)을 사용하여 slide glass위에 부착하였다. 부착된 세포는 완전히 건조한 후 Diff-Quik® stain (Dade Behring Inc., Newark, DE) 염색을 실시하였다. 염색 후 세포구성비율을 현미경을 통하여 조사하였다.

폐조직의 면역화학염색

실험동물에서 폐와 기관지를 절제해 낸 후 10% 포르말린 3 ml을 주입하여 고정한 후 파라핀 블록을 만든다. 파라핀 블록은 5 µm의 절편으로 만든 후 56°C incubator에 30분 처리하여 파라핀을 녹인 후 xylene으로 제거한다. 100%, 90%, 80%, 70% 알코올을 단계별로 거쳐 함수과정을 거친 후 조직의 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위해 0.3% H₂O₂ 로 15분간 처리하였다. PBS로 washing 한 후 항체의 비특이성 결합을 억제하기 위해 3% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 PBS를 이용하여 1시간 동안 반응시켰다. 이후 anti-mouse IL-4 (500 µg at 1 mg/1ml, ENDOGENE®)와 anti-mouse IL-10 (500 µg at 0.5 mg/1ml, Biolegend®)를 각각 1: 40으로 희석하여 4°C에 24시간 처리하였다. DAKO LSBA 2 kit로 이차 항체와 streptavidin-conjugated peroxidase (DAKO, Carpinteria, CA)을 부착시켰다. 발색은 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. Slide glass를 완전히 건조한 후 Harris's hematoxylin (Sigma Chemical Co.)으로 대조염색을 실시하였다[32].

통계처리

통계 프로그램인 SPSS (Ver 10.0 for windows)를 사용하여 실험설계에 대한 분산분석은 ANOVA로, 각 처치군들간의 비교는 Dunkun test를 실시하여 유의성을 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과를 평균±표준오차로 표시하였고, p값이 0.05 이하인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

기관지 폐포 세척술을 통한 총세포수와 세포 조성 비율

BALB/c 마우스의 경우 대조군에서의 총세포수는 0.30±0.10×10⁶개였고, 천식유발군의 총세포수는 1.80±1.01×10⁶개로 통계학적으로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(P<0.01). 세포 조성 비율에 있어 대조군의 경우 폐포대식세포는 99.9±0.2%, 호중구는 0.10±0.2%를 차지하였으나 호산구와 림프구는 관찰되지 않았다(Table 1).

Ovalbumin으로 천식을 유발한 실험군에 있어서는 특히 대조군에서는 발견되지 않았던 호산구의 경우 56.90±11.2%로 50% 이상 증가하였으며, 림프구의 경우 7.70±1.3%, 호중구의 경우 0.20±0.4%로 증가하여 천식의 특징인 염증세포의 증가와 호산구의 증가가 두드러지게 나타났다.

IL-4 knock out (KO) 마우스와 IL-10 KO 마우스의 경우, 기관지폐포 세척술을 통한 총세포수는 각각 0.13±0.06×10⁶개와 0.08±0.06×10⁶개로 BALB/c 대조군 마우스와 BALB/c 천식유발군 보다는 감소하였다. 그러나 IL-4 KO 마우스와 IL-10 KO 마우스를 이용한 천식유발군의 경우 0.39±0.12×10⁶개와 0.49±0.17×10⁶개로 천식이 유발되지 않은 형질전환마우스와 비교하여 모두 증가하였다(Table 2,3).

IL-4 KO 마우스의 경우 호산구가 전혀 출현하지 않았으나 IL-4 KO 마우스를 이용한 천식유발군에서는 7.2±6.7% 출현하였다. 호중구는 3.3±2.8%에서 20.9±10.4%로 비율이 상승하였다(Table 2). IL-10 KO 마우스의 경우 호산구가 전혀 출현하지 않았으나, IL-10 KO 마우스를 이용한 천식유발군에서는 5.4±5.2%가 출현하여 호산구성 천식의 특징이 잘 나타났다(Table 3). 호중구의 출현양상은 대조군를 이용한 천식유발군과 비교했을 때 IL-4 KO 마우스와 IL-10 KO 마우스를 이용한 천식유발군에서 각각 3.3±2.8%에서 20.9±10.4%로, 0.1±0.1%에서 13.4±4.7%로 상대적으로 크게 상승하여 통계학적 유의함을 확인할 수 있었다(P<0.01).

Table 1. Cellular distribution in Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) at 24 hours after final nebulization w/ BALB/c mouse

	No treatment mice (n=6)	Asthma induced mice (n=6)
Total cells (×10 ⁶)	0.30±0.10	1.80±1.00*
Macrophages (%)	99.90±0.20	35.20±10.10*
Neutrophils (%)	0.10±0.20	0.20±0.40
Lymphocytes (%)	0	7.70±1.30*
Eosinophils (%)	0	56.90±11.20*

* P<0.01 versus control.

Table 2. Cellular distribution in BALF at 24 hours after final nebulization w/ IL-4 KO mouse

	IL-4 KO mice (n=6)	Asthma induced IL-4 KO mice (n=6)
Total cells (×10 ⁶)	0.13±0.06	0.39±0.12
Macrophages (%)	89.10±1.80	59.30±15.10
Neutrophils (%)	3.30±2.80	20.90±10.40**
Lymphocytes (%)	7.60±2.60	12.50±5.50
Eosinophils (%)	0	7.20±6.70**

** P<0.01 versus control.

Table 3. Cellular distribution in BALF at 24 hours after final nebulization w/ IL-10 KO mouse

	IL-10 KO mice (n=6)	Asthma induced IL-10 KO mice (n=6)
Total cells (×10 ⁶)	0.08±0.06	0.49±0.17**
Macrophages (%)	92.40±2.60	72.50±8.20
Neutrophils (%)	0.10±0.10	13.40±4.70**
Lymphocytes (%)	7.40±2.50	8.70±3.00
Eosinophils (%)	0	5.40±5.20**

** P<0.01 versus control.

기관지폐포세척액의 Diff-Quik[®] 염색과 폐조직의 H & E 염색양상

BALB/c 마우스의 경우 천식유발군에서만 호산구를 관찰할 수 있었다. 천식유발군의 폐포대식세포의 경우, 세포질이 커져 있고, 세포질내 공포가 생기는 등 활성화되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 대조군의 폐조직 H & E 염색상에서도 특이점이 없었으나 천식유발군에서는 세기관지 주위와 기도 상피 기저부위에 많은 염증세포들과 섬유소가 밀집해있는 것을 관찰할 수 있었으며 기도 상피가 비후된 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 즉, BALB/c 마우스에 ovalbumin

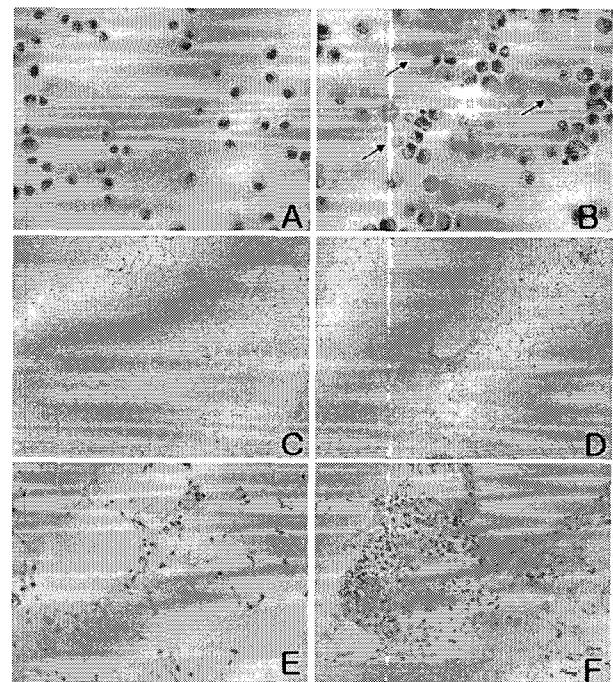


Fig. 2. Diff-Quik[®] staining of BALF and H & E staining of lung tissue from the BALB/c mouse. A: BALF from normal mouse lung (×400). B: BALF from asthma induced mouse lung (×400). C: Normal mouse lung (×100). D: Asthma induced mouse lung (×100). E: Normal mouse lung (×100). F: Asthma induced mouse lung (×400). Arrows indicate eosinophil.

을 복강 내 주입하여 감각시킨 후 비강흡입에 의해 천식을 유발시켰을 경우 기관지폐포 세척액과 폐조직의 염색결과를 대조군과 비교분석한 결과 천식이 성공적으로 유발되었음을 확인할 수 있었다.

IL-4 KO 마우스의 경우 전체세포의 구성비에서 폐포대식세포가 약 90%, 호중구가 약 3%, 림프구가 약 7%의 비율로 관찰되었다. IL-4 KO 마우스를 이용한 천식유발군에서는 전체세포의 구성비에서 폐포대식세포가 약 60%, 호중구가 약 20%, 호산구가 약 7.2%, 림프구가 약 12%의 비율로 관찰되었다(Table 2). BALB/c 마우스를 이용한 천식유발군의 경우 호산구가 약 56%를 차지한 것에 비해 IL-4 KO 마우스를 이용한 천식유발군의 경우 7.2%로 현저히 낮게 발견되는 것을 확인할 수 있었다(Table 1).

IL-10 KO 마우스의 경우 전체 세포의 구성비에서 폐포대식세포가 약 92%, 림프구가 약 7%로 관찰되었고, IL-10 KO 마우스를 이용한 천식유발군에서는 전체세포의 구성비에서 폐포대식세포가 약 72%, 호중구가 약 13%, 호산구가 약 5.4%, 림프구가 약 8%의 비율로 관찰되었다(Table 3). 즉, IL-10 KO 마우스의 경우 호산구는 전혀 관찰할 수 없었고, 호중구는 매우 낮은 비율로 관찰할 수 있었으나 IL-10 KO 마우스를 이용한 천식유발군에서는 호산구와 호중구가 높은

비율로 출현하였으며, 출현정도는 IL-4 KO 마우스를 이용한 천식유발군보다 낮았다.

IL-4 KO 마우스와 IL-10 KO 마우스의 경우에도 세기관지 상피세포 및 결합조직의 비대나 분화가 없고, 결합조직에서도 염증세포의 출현이 관찰되지 않는 정상적인 소견을 보였다. 그러나 천식유발군의 경우 기관지상피세포의 과도한 비대와 기저세포층의 분화 및 천식증상 특유의 호산구의 출현이 결합조직에서 관찰되었다(Fig. 3, Fig. 4).

광학현미경적 소견으로는 BALB/c 마우스의 대조군과 형질전환 마우스의 차이를 구분할 수 없었으나, 공통적으로 천식유발군의 경우 결합조직에 뚜렷한 호산구의 출현을 관찰할 수 있었다.

면역조직화학염색 결과

1. IL-4 면역조직화학염색결과

BALB/c 마우스의 경우 대조군에서는 염증세포의 세포질 내에 IL-4가 생성된 것을 확인할 수 없었으나 천식을 유발한 실험군에서는 기도 주위, 기도 기저막부위의 염증세포가 군집해 있는 곳에서 강하게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 혈관주위와 폐포 주위에 있는 폐포대식세포도 세포질 내에 IL-4가 많이 형성되어 면역조직화학염색에 대해 강하게

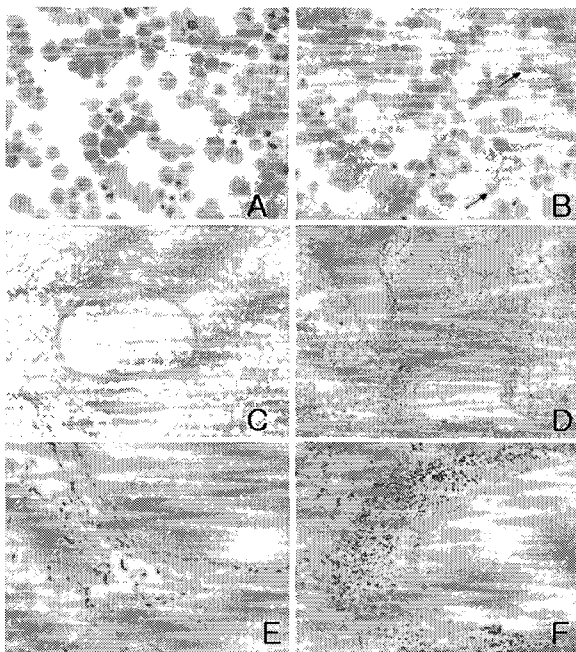


Fig. 3. Diff-Quik[®] staining of BALF and H & E staining of lung tissue from the IL-4 KO mouse. A: BALF from IL-4 KO mouse lung (×400). B: BALF from asthma induced IL-4 KO mouse lung (×400). C: IL-4 KO mouse lung (×100). D: Asthma induced IL-4 KO mouse lung (×100). E: IL-4 KO mouse lung (×400). F: Asthma induced IL-4 KO mouse lung (×400). Arrows indicate eosinophil.

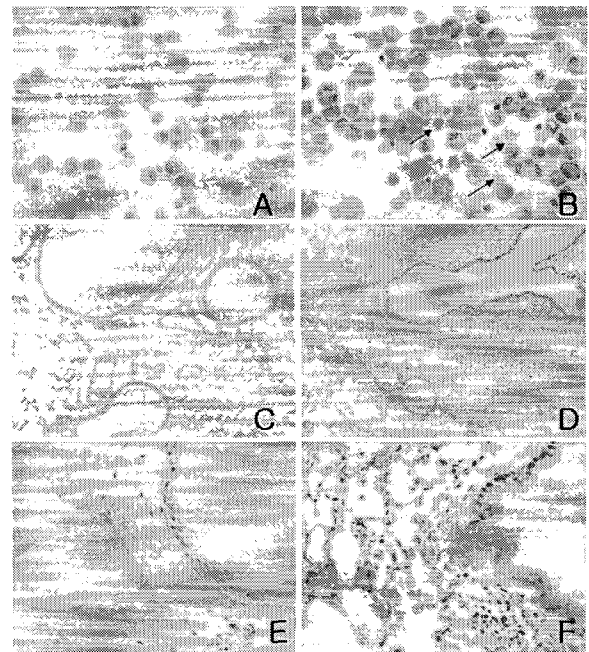


Fig. 4. Diff-Quik[®] staining of BALF and H & E stains of lung tissue from the IL-10 KO mouse. A: BALF from IL-10 KO mouse lung (×400). B: BALF from asthma induced IL-10 KO mouse lung (×400). C: IL-10 KO mouse lung (×100). D: Asthma induced IL-10 KO mouse lung (×100). E: IL-10 KO mouse lung (×400). F: Asthma induced IL-10 KO mouse lung (×400). Arrows indicate eosinophil.

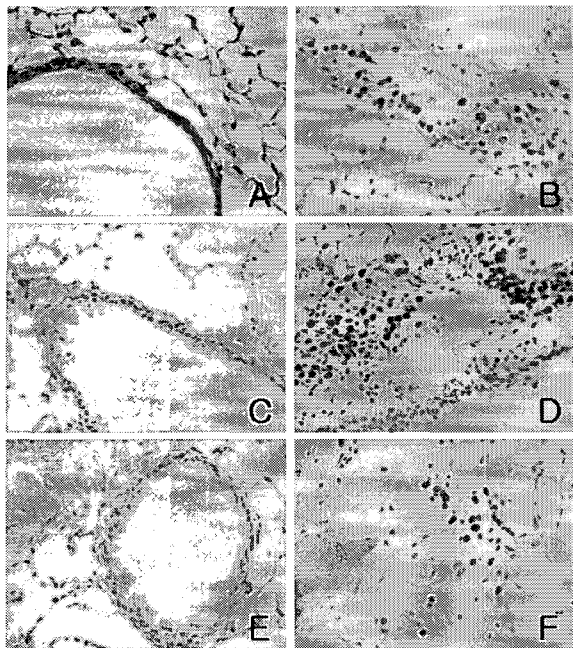


Fig. 5. Immunohistochemistry staining for IL-4 in lung tissue ($\times 400$). A: BALB/c mouse, B: Asthma induced BALB/c mouse, C: IL-4 KO mouse, D: Asthma induced IL-4 KO mouse, E: IL-10 KO mouse, F: Asthma induced IL-10 KO mouse.

반응한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

이는 앞에서 살펴본 기관지폐포 세척액에서의 총세포수의 증가 및 호산구의 증가와 일반염색에서 살펴본 조직양상과 더불어 천식유발이 성공적으로 이루어졌음을 확인해주는 결과로 해석된다.

IL-4 KO 마우스의 대조군의 경우 IL-4에 양성을 보이는 세포는 거의 찾아볼 수 없었던 반면 천식유발군의 경우 IL-4에 양성을 보이는 염증세포가 세기관지 기저부와 폐포 내에서 다수 관찰되었다(Fig. 5). IL-4 KO 마우스의 경우 IL-4 인자를 제거한 형질전환마우스로서 IL-4에 양성을 보이는 부위를 찾아볼 수 없었으나 천식을 유발한 경우 세기관지 기저부와 혈관주위에서 IL-4에 양성을 띠는 많은 염증세포들을 관찰할 수 있었다.

IL-10 KO 마우스의 경우 IL-4 KO 마우스와 마찬가지로 IL-4에 양성을 띠는 세포를 관찰할 수 없었으나, 천식유발군의 경우 IL-4 KO 마우스보다 IL-4에 양성을 띠는 세포를 현미경 검사를 통해 확인할 수 있었다(Fig. 5).

2. IL-10 면역조직화학염색 결과

BALB/c 마우스의 경우 대조군에서는 양성반응을 확인할 수 없었으나, 천식유발군에서는 IL-10이 IL-4의 경우보다 세기관지 기저막하 및 폐포대식세포에서 아주 강하게 발현되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

IL-4 KO 마우스의 경우에도 대조군에서는 IL-10에 대한

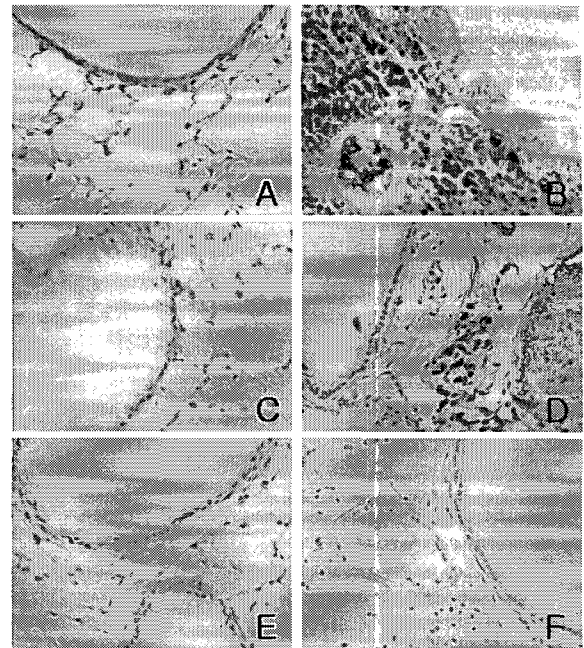


Fig. 6. Immunohistochemistry staining for IL-10 in lung tissue ($\times 400$). A: BALB/c mouse, B: Asthma induced BALB/c mouse, C: IL-4 KO mouse, D: Asthma induced IL-4 KO mouse, E: IL-10 KO mouse, F: Asthma induced IL-10 KO mouse.

양성반응을 나타내는 세포를 찾아볼 수 없었으나, 천식유발군에서는 아주 뚜렷하게 발현됨을 확인할 수 있었다. IL-4 KO 마우스에 천식을 유발시킨 실험군의 경우, IL-4에 양성 반응을 보이는 염증세포가 다수 관찰되었다(Fig. 5). 반면, IL-10 KO 마우스에 천식을 유발시킨 실험군의 경우 IL-4 KO 마우스에 천식을 유발시킨 실험군에 IL-4 면역조직화학염색을 실시했을 때보다 양성반응을 보이는 세포가 아주 적어 거의 찾아볼 수 없었다.

IL-4 KO 및 IL-10 KO 마우스의 경우 IL-10이 세기관지주위에서 발현되는 양상을 거의 찾아볼 수 없었으나 혈관주위와 혈관과 연계된 기관지 주위에서 강한 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

천식유발과정에서 중요한 하나의 인자로 작용하는 IL-10에 대한 면역염색결과, 대조군에서는 염증성 세포의 세포질 내에 IL-10에 대한 양성반응을 확인할 수 없었으나 천식유발군에서는 강하게 발현하는 것을 관찰할 수 있었다.

고 찰

천식의 발병율과 천식으로 인한 사망률이 꾸준히 증가하고 있는 추세이나[16,19] 천식의 정확한 발생 기전은 아직 밝혀진 바가 없다[14,20]. 실험동물에 천식을 유발시키기 위해서는 일반적으로 계란 난백을 이용하여 복강 내로 주입하거나 천식의 원인으로 알려져 있는 집먼지 진드기나 여러 화학

물질 등을 다량으로 직접 비강 내로 노출시키는 방법 등이 사용되었다[36,37]. 위와 같은 방법으로 실험동물에서 천식을 유발할 경우 노출된 물질에 의해 호흡기가 직접 자극될 뿐만 아니라, 실험동물을 밀폐된 작은 용적의 공간 내에 가두게 되어 지나친 스트레스를 주고 이물성 자극으로 호흡기계의 불필요한 반응을 유발할 수 있는 단점이 있다. 이물반응을 배제하기 위해 비강 흡입을 통해 천식을 유발한 Zhang 등(1997)은 세기관지에서의 과민성 반응의 증가를 관찰할 수 없었다고 보고하였다[35]. 다른 앞선 연구자들에 의하여 실험동물을 이용한 다양한 천식모델이 개발되었지만, 천식유발물질을 비강 내로 흡입시켜 천식을 유발한 연구는 거의 없었다. 이런 이유로 본 연구진은 BALB/c 마우스와 IL-4 KO 마우스 및 IL-10 KO 마우스에 복강 내로 ovalbumin을 감작시킨 후 nebulizer를 이용하여 자발호흡을 통해 재감작하였다. 즉, 사람이 자연스런 상태에서 호흡을 통하여 천식유발물질을 흡입하는 것처럼 실험동물이 호흡을 통해 ovalbumin을 흡입할 수 있도록 하였다. 본 연구에서는 소량의 ovalbumin을 비강내로 흡입시켜 이물성 반응으로 인한 호흡기 자극을 최소화하였고, 세기관지염증과 호산구의 증가를 유발하여 천식을 유발하는데 성공하였다.

실험동물을 이용하여 천식을 유발할 경우 천식 유발 여부의 확인 기준은 호산구의 증가와 조직 내 호산구 침윤, 천식 관련 인자의 발현 및 세기관지 과민성의 증가에 있다[37]. 본 연구에서는 BALB/c 마우스와 IL-4 KO 마우스 및 IL-10 KO 마우스를 이용하여 천식을 유발한 후 기관지폐포 세척술과 폐조직의 H & E 염색을 통해 호산구의 증가와 침윤 정도를 측정하였고, 면역조직화학염색을 통해 천식관련 인자로 알려진 IL-4와 IL-10의 발현을 관찰하였다. BALB/c 마우스를 이용한 천식유발군에서는 BAL 총세포수가 6배 이상 증가하였고, 호산구는 50% 이상 증가하였으며 천식관련 인자로 알려진 IL-4 및 IL-10이 세기관지 주위와 폐간질 조직에서 양성으로 발현되어 본 연구에서는 ovalbumin의 자발적인 호흡을 통한 천식유발에 성공하였음을 확인하였다.

천식에 있어 IL-4는 Th2 세포반응을 매개하는 중요한 인자이며, IL-10은 세기관지 과민성에 관여하는 중요한 인자로 알려져 있다[20]. 특히 IL-10의 경우 세기관지염증을 줄여주는 역할을 한다고 알려져 있었으나[20] 최근 오히려 세기관지염증을 악화시킨다는 연구도 있어[11,16] 본 연구에서는 천식 유발에 중요한 역할을 하는 IL-4와 IL-10을 제거한 IL-4 KO 마우스와 IL-10 KO 마우스를 이용하여 천식을 유발할 경우, 대조군과 비교했을 때 호산구의 증가와 폐조직의 변화양상에 미치는 영향을 살펴보았다. IL-4 KO 마우스와 IL-10 KO 마우스를 이용한 천식유발군의 경우 BALB/c 마우스를 이용한 천식유발군보다 호산구의 증가 정도가 미약하게 관찰되었고, 폐조직 내 염증세포의 침윤 정도도 감소하였다. 천식매개 인자인 IL-4와 IL-10의 면역조직화학염색 결과에서도 양성반

응이 거의 나타나지 않았다. 본 연구 결과, IL-10이 IL-4와 같이 천식과 관련하여 세기관지 염증 반응을 증가시키는 역할을 하는 것으로 생각된다.

본 연구진은 BALB/c 마우스를 이용하여 복강 내로 ovalbumin을 감작한 후, 소량의 ovalbumin의 자발적인 호흡을 통하여 천식을 유발하는데 성공하였다. IL-4 KO 마우스 및 IL-10 KO 마우스를 이용하여 천식을 유발시키고 BALB/c 마우스 천식유발군에서의 결과와 비교한 바, IL-4와 IL-10이 천식과 관련한 세기관지 염증을 악화시킬 수 있음을 확인하였다. 이는 IL-4와 IL-10의 발현을 억제할 경우 천식과 관련한 세기관지 염증을 개선시킬 수 있음을 의미하며, IL-4와 IL-10에 대한 항체요법이 천식의 치료에 쓰일 가능성을 시사한다.

요 약

본 연구진은 일차로 BALB/C 마우스를 이용하여 항원으로 ovalbumin을 사용하여 천식을 유발하여 폐 내 세포구성에 미치는 영향을 다른 실험방법에 의해 만들어진 천식모델과 비교하여 살펴보았고 이차로 천식 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 IL-4와 IL-10 knock out (KO) 마우스를 이용하여 천식모델을 구축하여 천식인자를 가진 개체에서의 반응과 천식관련인자가 결핍된 개체에서의 반응성의 차이를 살펴보았다. 천식의 유발은 실험 1일째 20 μ g ovalbumin으로 감작시킨 후 실험 14일에 재감작을 시켰다. 그 후 nebulizer를 이용하여 nasal inhalation을 28일, 29일, 30일에 실시하여 천식을 유발시켰다. 천식 유발의 확인은 기관지폐포 세척술로 채취한 폐 내 세포액을 이용하여 총 세포수 및 염증세포의 증가와 폐 내 세포와 폐조직의 염색을 통해 분포율을 확인하였다. 천식의 발병 과정에서 IgE 관련 과민반응을 주도하는 IL-4와 Th2 세포의 기능을 억제한다고 알려진 IL-10의 면역화학염색을 통해 그 발현정도를 관찰하였다.

BALB/c 마우스의 천식유발군의 경우 천식의 특징인 염증세포의 증가와 호산구의 증가와 세기관지 주위 염증세포의 침윤 및 기도 상피의 비후를 관찰할 수 있었다. 따라서 본 실험에 응용된 천식유발 방법은 적합하였으며 천식유발 절차가 성공적으로 수행되었음을 확인하였다.

IL-4 및 IL-10 KO 마우스를 이용한 천식유발군의 경우 BALB/c 마우스를 이용한 천식유발군보다 호산구의 증가 정도가 미약하게 관찰되었고, 폐조직 내 염증세포의 침윤 정도도 감소하였다. 천식매개인자인 IL-4와 IL-10의 면역조직화학염색 결과에서도 양성반응이 거의 나타나지 않았다. 본 연구 결과, IL-10이 IL-4와 같이 천식과 관련하여 세기관지 염증 반응을 증가시키는 역할을 하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 신진교수연구과제지원사업

(2003-003-E00245) 지원으로 수행되었음

참 고 문 헌

1. Avtandilov, G. G. and Y. D. Batsura. 1974. Morphometric study of the lungs of experimental animals. *Bull. Exp. Biol. Med.* **144**, 4651-4656.
2. Bellofiore, S. and J.G. Martin. 1994. Antigen challenge of sensitized brown Norway rats. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **150**, 218-226.
3. Borish, L. 1998. IL-10: evolving concepts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**, 293-297.
4. Cibulas, W. 1988. Toluene diisocyanate induced airway hyperreactivity in guinea pigs depleted of granulocytes. *J. Appl. Physiol.* **64**, 1773.
5. Daser, A., N. Meissner, U. Herz and H. Renz. 1995. Role and modulation of T-cell cytokines in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 762-770.
6. Derksen, F. J., N. E. Robinson, R. F. Slocumbe, T. W. Riebold and D. B. Brunson. 1982. Pulmonary function tests in standing ponies : reproducibility and effect of vaginal blockade. *Am. J. Vet. Res.* **43**, 598-602.
7. Dye, J. A. 1992. Feline bronchopulmonary disease. *Vet. Clin. N. Am.* **22**, 1187-1201.
8. Fahy, J. V., H. Wong, J. Liu and H. A. Boushey. 1995. Comparison of samples collected by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am. J. Respir. Care. Crit. Med.* **152**, 53-58.
9. Fels, A. O. and Z. A. Cohn. 1986. The alveolar macrophages. *J. Appl. Physiol.* **60**, 355-369.
10. Fiorentino, D. F., M. W. Bond and T. R. Mosmann. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* **170**, 2081-2095.
11. Fu, C. L., Y. L. Ye, Y. L. Lee and B. L. Chiang. 2006. Effects of overexpression of IL-10, IL-12, TGF-beta and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness. *Respir. Res.* **7**, 72.
12. Grünig, G., M. Warnock, A. E. Wakil, R. Venkayya, F. Brombacher, D. M. Rennick, D. Sheppard, M. Mohrs, D. D. Donaldson, R. M. Locksley and D. B. Corry. 1998. Requirement for IL-13 Independently of IL-4 in Experimental Asthma. *Science* **282**, 2261-2263.
13. Hamelmann, E., A. Oshiba, J. Schwarze, K. Bradley, J. Loader, G. L. Larsen and E. W. Gelfand. 1997. Allergen specific IgE and IL-5 are essential for the development of airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **16**, 674-682.
14. Herrick, C. A., L. Xu, A. V. Wisniewski, J. Das, C. A. Redlich and K. Bottomly. 2002. A novel mouse model of diisocyanate-induced asthma showing allergic type inflammation in the lung after inhaled antigen challenge. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **109**, 873-878.
15. Kagan, E., Y. Oghiso and D. P. Hartmann. 1983. The effects of chrysotile and crocidolite asbestos on the lower respiratory tract: analysis of bronchoalveolar lavage constituents. *Environ. Res.* **32**, 382-397.
16. Komai, M., H. Tanaka, T. Masuda, K. Nagao, M. Ishizaki, M. Sawada and H. Nagai. 2003. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma. *Br. J. Pharmacol.* **138**, 912-920.
17. Korea National Statistical Office(KNSO). News release : Summary report of the cause of death statistics in 2003. Available at : kosis.nso.go.kr/Magazine/YD/VD0002.xls [accessed : 3 Jan 2005]
18. Larche, M., D. S. Robinson and A. B. Kay. 2003. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 450-463.
19. Masoli, M., D. Fabian, S. Holt and R. Beasley. 2004. Global Initiative for Asthma(GINA) Program. The global burden of asthma : executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy.* **59**, 469-478.
20. Mäkelä, M. J., A. Kanehiro, L. Borish, A. Dakhama, J. Loader, A. Joetham, Z. Xing, M. Jordana, G. L. Larsen and E. W. Gelfand. 2000. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *P. N. A. S.* **97**, 6007-6012.
21. Matheson, J. M., R. Lemus, R. W. Lange, M. H. Karol and M. I. Luster. 2002. Role of tumor necrosis factor in toluene diisocyanate asthma. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **27**, 396-405.
22. Moore, K. W., A. O' Garra, R. W. Malefyt, P. Vieira and T. R. Mosmann. 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 165-190.
23. Nakajima, H., I. Iwamoto, S. Tomoe, R. Matsmura, H. Tomioka, K. Takatsu and S. Yoshida. 1992. CD4+ T-lymphocytes and IL-5 mediated antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 374-377.
24. National Heart, Lung and Blood Institute, NIH. 1997. Guideline for the diagnosis and management of asthma. *Expert panel report II.*
25. Ninan, T. K. and G. Russell. 1992. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren : evidences from two survey 25 years apart. *B. J. M.* **304**, 873-875.
26. Ohkawara, Y., X. F. Lei, M. R. Stampfli, J. S. Marshall, Z. Xing and M. Jordana. 1997. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **15**, 305-311.
27. Oshita, A., E. Hamelmann, A. Haczku, K. Takeda, D. H. Conrad, H. Kikutani, E. and W. Gelfand. 1997. Modulation of antigen-induced B and T cell responses by antigen-specific IgE antibodies. *J. Immunol.* **159**, 4056-4063.
28. Patterson, R. and J. F. Kelly. 1974. Animal models of the asthmatic state. *Annu. Rev. Med.* **25**, 53-68.
29. Prussin, C. and D. D. Metcalfe. 2006. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**,

- S450-456.
30. Romagnani, S. 2001. T-cell responses in allergy and asthma. *Curr. Opin. allergy Clin. Immunol.* **1**, 73-78.
 31. Sugita, M., K. Kuribayashi, T. Nakagomi, S. Miyata, T. Matsuyama and O. Kitada. 2003. Allergic bronchial asthma: airway inflammation and hyperresponsiveness. *Intern. Med.* **42**, 636-643.
 32. Tanaka, S., N. Choe, D. R. Hemenway, S. Zhu, S. Matalon and E. Kagan. 1998. Asbestos inhalation induces reactive nitrogen species and nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat. *J. Clin. Invest.* **102**, 445-54.
 33. Upton, M. N., A. McConnachie, C. McSharry, C. L. Hart, G. D. Smith, C. R. Gillis and G. C. Watt. 2000. Intergenerational 20 year trends in the prevalence of asthma and hay fever in adults : the Midspan family study surveys of parents and offspring. *B. M. J.* **321**, 88-92.
 34. Yunginger, J. W., C. E. Reed, E. J. O'Connell, L. J. III. Melton, W. M. O'Fallon and M. D. Silverstein. 1992. A community-based study of the epidemiology of asthma. Incidence rates, 1964-1983. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146**, 888-894.
 35. Zhang, Y., W. J. Lamm, R. K. Albert, E. Y. Chi, W. R. Henderson and D. B. Lewis. 1997. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **155**, 661-669.
 36. 권순석, 김치홍, 안중현, 김승준, 이숙영, 김영균, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학, 김영실. 2004. 집먼지 진드기 유도성 기도개형의 기관지 천식 마우스 모델. *천식 및 알레르기* **24**, 310-317.
 37. 이동근. 2003. 항원 야기 경로에 따른 마우스 천식모델에서의 기도염증 및 기도과민반응의 차이. *소아알레르기 및 호흡기* **13**, 263-270.