



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

천식유도 된 마우스에서 예쁜꼬마선충
조항원의 기도염증 억제효과

Suppressive Effect of Crude Extracts of
Caenorhabditis elegans on Airway
Inflammation in Mice After Asthma
Establishment

2012년 10월

서울대학교 대학원

의학과 박사과정

김 성 은

Suppressive Effect of Crude
Extracts of *Caenorhabditis
elegans* on Airway Inflammation
in Mice After Asthma
Establishment

천식유도 된 마우스에서
예쁜꼬마선충 조항원의 기도염증
억제효과

October, 2012

Department of Parasitology and Tropical
Medicine,

Seoul National University

College of Medicine

Sung Eun Kim

Suppressive Effect of Crude
Extracts of *Caenorhabditis elegans*
on Airway Inflammation in Mice
After Asthma Establishment

by

Sung Eun Kim

A thesis submitted
in partial fulfillment of the requirements for the
Degree of Doctor of Science in Medicine at Seoul
National University College of Medicine

December 2012

Approved by Thesis Committee:

Professor _____ Chairman

Professor _____ Vice chairman

Professor _____

Professor _____

Professor _____

학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 제공하는 것에 동의합니다.

1. 동의사항

① 본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.

② 본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제, 배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

2. 개인(저작자)의 의무

본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

3. 서울대학교의 의무

① 서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.

② 서울대학교는 본 논문에 대한 공개의 유보나 해지 신청 시 즉시 처리해야 합니다.

논문 제목 : 천식유도 된 마우스에서 예쁜꼬마선충 조항원의 기도염증 억제효과

학위구분: 석사 · 박사

학 과: 기생충학

학 번: 2008-30556

연 락 처:

저 작 자: 김 성 은 (인)

제 출 일: 2012 년 12 월 28 일

서울대학교총장 귀하

초 록

서론: 최근 기생충 감염과 알레르기 질환의 유병률이 반비례 관계에 있음이 역학적 연구나 실험 연구에서 확인되고 있다. 이 연구는 천식에 이미 이환된 마우스에서 예쁜꼬마선충의 조항원(crude extract of *Caenorhabditis elegans*, CEC)이 ovalbumin (OVA)으로 유도된 기도염증반응에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해 알아보고자 하였다.

방법: BALB/c 마우스를 OVA로 감작 및 자극시켜 천식을 유발한 후 다음 네 가지 방법으로 CEC의 천식 완화효과를 병리학적 관찰, 기도과민성, 폐포세척액 내 염증세포 수, 폐포세척액 내 싸이토카인 분비양상, 혈청 내 총 IgE 항체가를 측정하여 관찰하였다. OVA로 천식을 유발할 때 CEC를 같이 감작시킨 후 가장 천식 완화효과가 좋은 CEC의 농도와 투여방법을 결정하였고 천식을 유발시킨 후 CEC를 다양한 농도와 투여빈도로 처치하여 천식 완화효과를 관찰하였다. 또한 천식이 이미 유발된 마우스를 계속 OVA로 자극하면서 CEC를 처치하였을 때 CEC의 천식 완화효과를 관찰하였다.

결과: 양성대조군인 OVA군에 비해서 CEC를 처치한 실험군에서 모두 공통적으로 기도 주위 염증세포, 특히 호산구의 침윤을 비롯한 병리소견이 완화되었으며, methacholine에 대한 기도과민성이 현저하게 억제되었고($P < 0.01$), 폐포세척액 내 총 염증세포의 수와 호산구의 수도 유의하게 감소하였다($P < 0.01$). 또 IL-4와 IL-13 등 Th2 사이토카인의 분비가 유의하게 감소한 반면 Th1 사이토카인인 IL-12와 IFN- γ 의 분비는 증가하였으며($P < 0.01$), 혈청 내 총 IgE 항체가도 유의하게 감소하는 양상을 보였다($P < 0.01$). 천식 완화에 적합한 CEC 농도를 찾고자 한 실험에서는 가장 높은 투여 농도인 50 μg 을 투여했을 때 좋은 천식 완화효과를 보였으며, CEC 투여 경로에 상관없이 천식 완화효과를 보였다. 천식에 이미 유도된 마우스에 CEC 투여 시 최종 투여용량이 증가할수록 천식 완화효과도 증가하였으나 투여빈도에 의한 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또, 천식이 유도된 마우스를 OVA로 계속 자극하는 상태에서 CEC를 투여하여도 천식 완화효과가 있음을 확인하였다.

결론: 이 연구 결과 예쁜꼬마선충의 조항원이 천식 모델 마우스에서 천식의 유발을 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 이미 천식이 유도된 상태에서도 천식 완화효과가 있음을 확인하였으며, 이러한 효과는 Th1

반응을 증가시킴으로써 Th2 반응이 억제되어 유발되는 것으로 생각된다.

핵심단어: 예쁜꼬마선충, 조항원, 기도염증, 기도과민성, 천식모델마우스,
Th1 반응, Th2 반응

학 번: 2008 - 30556

목 차

| | |
|----------------|----|
| 초록..... | i |
| 목차..... | iv |
| 그림 목록..... | v |
| 서론..... | 1 |
| 실험재료 및 방법..... | 10 |
| 결과..... | 21 |
| 고찰..... | 46 |
| 참고문헌..... | 58 |
| 초록 (영문)..... | 70 |

표 및 그림 목록

- Fig. 1.** The schematic protocols for asthma induction in BALB/c mice and for investigation of the suppressive effect of *C. elegans* crude extract (CEC) on airway inflammation depending on doses (A) or administration routes (B) of CEC.....19
- Fig. 2.** The schematic protocols for observation of the suppressive effect of *C. elegans* crude extract (CEC) on airway inflammation after establishment of asthma by OVA sensitization and challenge in BALB/c mice.....20
- Fig. 3.** Histopathological observation of the lungs of mice sensitized with PBS, OVA, or OVA+CEC.....24
- Fig. 4.** Effect of CEC on phenotype of asthma (A) Airway hyperresponsiveness to increasing concentration of methacholine presented as airway resistance. (B) Total cell counts in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid collected from mice. (C) Differential cell counts of inflammatory cells in BAL fluid.....25
- Fig. 5.** Effect of CEC treatment on cytokine production in BAL

| | |
|--|----|
| fluid..... | 26 |
| Fig. 6. Total IgE titers in sera of mice with OVA–induced airway inflammation..... | 27 |
| Fig. 7. Histopathological observation of the lungs of mice with OVA–induced asthma..... | 30 |
| Fig. 8. Effect of CEC on phenotype of asthma (A) Airway hyperresponsiveness to increasing concentration of methacholine. (B) Total cell counts in BAL fluid. (C) Differential cell counts in BAL fluid..... | 31 |
| Fig. 9. Effect of CEC treatment on cytokine production in BAL fluid according to the route of CEC administration..... | 32 |
| Fig. 10. Effect of CEC treatment on serum total IgE titers of mice with OVA–induced asthma according to the route of CEC administration..... | 33 |
| Fig. 11. Histopathological observation of the lungs of mice treated with different doses and intervals of CEC administration after establishment of asthma..... | 36 |
| Fig. 12. Effect of CEC on phenotype of asthma (A) Airway | |

hyperresponsiveness to increasing concentration of methacholine in experimental mice. (B) Total cell counts in BAL fluid. (C) Differential cell counts in BAL fluid.....37

Fig. 13. Effect of CEC treatment on cytokine production in BAL fluid according to various treatment regimens after establishment of asthma in mice.....38

Fig. 14. Serum total IgE titers in mice according to various treatment regimens after establishment of asthma in mice.....39

Fig. 15. Histopathological observation of the lungs of mice with established asthma.....42

Fig. 16. Effect of CEC on phenotype of asthma (A) Airway hyperresponsiveness to increasing concentration of methacholine. (B) Total cell counts in BAL fluid. (C) Differential cell counts in BAL fluid.....43

Fig. 17. Effect of CEC treatment on cytokine production in BAL fluid of mice with established asthma.....44

Fig. 18. Serum IgE titers in mice with established asthma.....45

서 론

면역반응은 병원체 감염에 대한 숙주방어작용에서 중요한 기전이며 건강을 유지하는데 필수적이다. 그러나 면역반응은 때때로 감염체와 상관 없이 특정 항원에 의해 유도되기도 하며, 심각한 질병을 유발할 수 있다. 일반적으로 알레르기성 과민반응은 꽃가루, 음식, 약물 등과 같이 본래 해롭지 않은 항원에 대해 민감하게 반응하여 일어나며, 이러한 알레르기성 과민반응의 결과로 천식, 알레르기비염, 아토피피부염과 같은 알레르기 질환이 발생한다.

천식, 알레르기비염, 아토피피부염과 같은 알레르기 질환의 유병률이 최근 수십 년 사이에 기생충 감염이 드물거나 성공적으로 관리된 지역 또는 선진국에서 현저하게 증가하였다(1, 2). 천식과 기생충, 특히 연충(helminth) 감염에서 공통적으로 관찰되는 면역반응은 IgE 항체가의 증가, 조직 내 호산구증가증, 점액분비의 증가, IL-4, IL-5, IL-13과 같은 Th2 사이토카인의 증가이다(3). 그러나, 천식은 Th2 사이토카인에 의해 활성화되는 비만세포, 호산구로 인한 기도 조직의 물리적 변화, 기도 과민성 증가, 기도 내 염증과 같은 증상이 나타나는

반면, 연충에 감염된 사람에서는 천식과 같은 특징적 증상이 나타나지 않는 차이점이 있다. 비록 알레르기 질환과 기생충 감염이 모두 Th2 면역반응을 유도한다고 알려져 있지만 최근 연구결과에 의하면 기생충 감염은 알레르기 질환이 있는 사람이나 실험적으로 천식이 유도된 마우스에서 항 염증반응을 유발한다고 보고되었다(1, 3, 4). 기생충이 많은 후진국에서는 알레르기 질환의 유병률이 낮은 역학적 특징을 보이는데, 이러한 기생충 감염과 천식 유병률 사이의 반비례 관계를 위생가설(hygiene hypothesis)로 설명하고 있다. 위생가설은 어릴 때 위생적인 환경에서 자라거나 항생제, 백신 등을 접하게 될수록 자연스럽게 각종 항원에 노출됨으로써 면역력이 증가될 수 있는 기회를 잃게 되어 성장 후 항원에 노출되면 과민반응이 유발되어 천식 및 아토피피부염 등과 같은 알레르기성 질병들에 이환된다는 가설이다. 예를 들면 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)과 *Helicobacter pylori*의 항원에 노출되었을 때 아토피피부염이 유발될 위험성이 60% 이상 감소했다고 한다(5). 실제로 독일과 에디오피아에서는 도심지에서 아토피피부염의 유병률이 도시와 떨어진 지역보다 월등히 높은 것으로 알려졌다(6). 이러한 위생가설은 기생충 감염이 천식과 같은 알레르기 질환의 증상을 완화하거나 억제할 가능성을 시사해주고 있다(7-10).

위와 같은 위생가설을 설명하기 위해 기생충 감염과 알레르기 질환 발병률의 반비례 관계에 대하여 연구한 결과에 의하면 회충(*Ascaris lumbricoides*)에 감염된 사람들은 회충에 감염되지 않은 사람보다 천명(wheezing)의 생김이 적고(11) 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*) 유행지역에 거주하는 사람들이 비유행지역에 사는 사람들에 비해 천식과 같은 폐질환의 발병률이 낮은 것으로 보고되었다(7, 8). 가봉에서는 방광주혈흡충(*Schistosoma haematobium*)에 감염된 아이들에서 집먼지진드기에 의한 아토피성 피부질환이 감염되지 않은 아이들보다 적게 발병되는 것이 확인되었으며, 장기간 장내기생충을 치료하면 집먼지진드기에 대한 아토피성 반응이 증가하는 것으로 확인되었다(10).

숙주의 면역반응을 피하여 숙주 체내에 오랜 기간 서식하는 기생충의 특성상 기생충이 숙주 체내에서 성공적인 정착, 이동, 물질 대사를 위하여 숙주의 면역체계를 조절한다고 생각되며, 기생충의 구성 물질 중 숙주 면역반응을 조절하여 스스로를 보호하는 기능을 가진 물질이 있을 것으로 생각된다(12). 또 기생충에 감염된 사람이나 동물에서 천식 증상이 완화되는 현상은 기생충 감염에 의해 면역관용(immune tolerance)이 유도됨을 시사하며(11, 13), 면역관용은 기생충 감염 시

증가하는 regulatory T cell(조절 T 세포)에 의한 면역조절효과 때문일 것으로도 추측된다(14).

많은 역학 연구와 동물모델을 이용한 실험적인 연구 결과에 의하면 사람과 동물모델에서 기생충 감염이 천식을 억제할 수 있는 것으로 보고되고 있는데, 특히 구충 (hookworms)과 같은 장내 선충류와 주혈흡충 감염이 알레르기 질환의 위험도를 유의하게 감소시켜준다(2, 15). 돼지편충의 충란을 사용하면 궤양성 대장염과 크론병과 같은 염증성 장질환을 치료하는데 효율적인 것으로 알려져 있으며(16, 17), 구충을 천식환자에 실험적으로 감염시키면 통계적으로 유의하지는 않지만 대조군 환자와 비교하여 천식환자의 기도과민성을 개선시키는 효과가 있음이 보고된 바 있다(18). 기생충 항원 외에도 세균에서 분비되는 단백질질을 천식유도 마우스 모델에 처리했을 시 천식이 억제된다는 보고도 있다(19).

기생충 감염 시 유도되는 조절 T 세포는 숙주의 면역반응을 억제함으로써 기생충이 숙주 체내에서 성공적으로 생존할 수 있도록 도와주는 것으로 추측된다(20). 이렇게 유도된 조절 T 세포는 기생충뿐만 아니라 숙주에도 이로운 결과를 유도하는데, 주혈흡충증의 병변 진행을 억제하거나 알레르기 증상을 완화시킬 수 있다. 일본주혈흡충 (*Schistosoma japonicum*)의 충란 항원에 의해 증가한

CD4+CD25+FoxP3+ T 세포는 천식 마우스 모델에서 천식 증상을 억제하는 효과를 보이며(21), 장내 선충인 *Heligomoides polygyrus*를 실험동물에 감염시켰을 때에도 CD4+CD25+FoxP3+ T 세포의 증가와 천식 억제가 확인된 바 있다(22). 또, 기생충 감염자에서 비 감염자에 비해 IL-10의 증가가 관찰되는데, 이러한 현상은 IL-10-secreting Treg이 천식 증상 억제와 관련이 있음을 시사한다(23). 쥐의 장내 선충인 브라질구충(*Nippostrongylus brasiliensis*) 또한 감염시 IL-10의 분비를 유도하여 염증을 완화 시킨다고 보고되었다(13).

최근 기생충의 천식에 대한 영향을 밝히기 위한 역학 연구나 실험연구에서 브라질구충(*Nippostrongylus brasiliensis*) 감염시 분비되는 항원이 알레르기성 기도염증 반응을 악화시킨다는 결과도 보고되고 되었고 이와는 반대로 돼지회충(*Ascaris suum*)에서 분비되는 항원은 IL-10 의존적으로 수지상세포의 기능을 억제하여 오히려 점막성 알레르기 염증 반응을 완화시킨다는 상반된 연구결과도 보고되고 있다(24, 25). 이와 비슷한 예로 개회충(*Toxocara canis*) 역시 오히려 ovalbumin(OVA)으로 유도된 알레르기 면역반응을 악화시키는 것으로 알려져 있다(26). 동일 기생충이라 하더라도 단백질의 종류에 따라 상반된 효과를 보이기도 하는데, 돼지회충(*Ascaris suum*)의 조항원 중

APAS-3(allergenic protein of *A. suum*)는 Th2 면역반응을 유도하여 호산구성 기도 염증과 기도과민성을 유발하는 반면, PAS-1(suppressive protein of *A. suum*)은 오히려 염증반응을 억제한다고 보고되었다(27). 비슷한 예로 만손주혈흡충에 감염된 쥐의 면역반응은 충란의 유무에 따라서 다르게 나타난다. 즉, 숙주에게 암컷과 수컷 주혈흡충을 동시에 감염시켰을 때는 OVA로 유도되는 기도염증반응이 더 악화되는 반면, 수컷 충체만 감염시켰을 경우에는 오히려 기도과민성이 억제되었다(23). 이와 같이 기생충 감염과 알레르기 질환 유병률의 관계는 기생충의 종(species), 기생충에서 분비되는 물질, 감염빈도 또는 감염량, 감염 시기 등 여러 요인에 따라 다양한 결과로 관찰된다(26, 28).

최근 알레르기 질환 또는 염증성 질환 치료에 기생충 감염을 적용하고자 하는 시도가 다양하게 진행되고 있다(16-18, 29). 실제로 돼지편충(*Trichuris suis*)의 충란을 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Diseases, IBD) 환자에 인위적으로 감염시켜 IBD 증상을 완화시킬 수 있음이 보고된 바 있다(16, 17). 그러나 기생충을 이용한 치료요법(연충치료요법, helminth therapy)은 기대하는 치료효과 외에 면역억제, 과민반응, 알레르기항원과의 상호작용 등 여러 가지 부작용이 발생할 수 있다(1). 한 예로, 돼지편충의 충란을 사용하여 치료받은 크론병

환자에서 돼지편충 감염이 확인되기도 하였다(30). 또 SPF(specific pathogen free)인 치료용 기생충 충란이나 유충을 만들기 위한 제작과정이 복잡하고, 제작비용이 비싸 치료비용이 증가할 수 있으며, 환자들이 기생충 자체를 치료방법으로 사용하는 사실에 대해 심리적 거부감을 가질 수 있다. 이러한 연충치료요법의 제한점을 극복하기 위해 기생충 유래물질 중 항알레르기성 또는 항염증성 기능을 가진 치료 후보물질을 선정하여 작용기전과 효과를 관찰한 후 치료법으로 사용하는 방안을 모색할 수 있다(29).

이미 동물모델이나 임상실험에서 몇몇의 기생충에서 유래된 항염증물질이 숙주의 면역반응을 조절하고 염증완화에 효과가 있음을 보고한 연구결과가 발표되고 있다(1, 29, 31). 사상충에서 분비되는 단백분해효소 억제제인 cystatin은 OVA로 유도된 Th2 반응을 억제하는 기능이 있는데, 이러한 기능은 조절 T 세포가 아닌 대식세포와 IL-10에 의존적인 것으로 알려져 있다(32). Cystatin의 면역억제 기능은 알레르기성 질환뿐 아니라 황산염으로 유도되는 대장염의 증상도 감소시킨다(33). 쥐의 사상충 (*Acanthocheilonema viteae*)에서 분비되는 ES-62라는 물질 역시 알레르기성 염증반응을 감소시키는 항염증 기능을 가지는 대표적인 기생충 유래 물질 중 하나로 알려져

있다. ES-62는 피부와 폐에서 발생하는 대식세포 의존적인 과민반응을 조절하고(34) 관절염 역시 억제시키는 것으로 확인되었다(35). 이외에도 개심장사상충 (*Dirofilaria immitis*)에서 유래된 항원(DiAg)(36)과 간질에서 생성되는 thioredoxin peroxidase (37) 등과 같이 알레르기성 질환을 완화시킬 것으로 기대되는 기생충 유래물질들이 보고되고 있으나 아직 실제 모델에 적용을 못한 경우가 많다.

천식은 알레르기 항원에 의해 직접 유발되는 Th2 면역반응을 동반하는 복잡한 질환으로서 기도과민성과 기도염증을 유발한다(38-40). 천식의 주요 치료법으로 흡입 코르티코스테로이드제를 사용하거나 함께 지속성 β 2-항진제 등을 사용하는 방법이 있지만 약을 규칙적으로 투여하는 등 지속 관리가 필요하며 중증천식에서 사용할 약제가 많지 않는 등 아직도 해결되지 못한 부분이 많이 있다(38). 천식이 유발되는 초기에 Th2 면역반응을 유도하는 알레르기 항원을 감소시키면 증상이 완화되는 사실은 Th2 반응을 억제 또는 조절하는 물질을 치료 후보물질로 사용할 수 있음을 시사한다(38).

최근 OVA로 천식을 유발시킨 마우스에서 예쁜꼬마선충조항원(Crude extract of *Caenorhabditis elegans*, CEC)이

천식완화 효과를 보임이 보고된 바 있다(41). 즉, 마우스에 천식을 유도하기 위해 OVA로 감작할 때 CEC를 같이 처리하였을 경우 Th2 싸이토카인의 분비가 억제되고 Th1 싸이토카인인 IL-12, IFN- γ 의 분비가 증가하였으며, 기도과민성과 호산구의 증가가 억제되는 등 천식유발이 억제됨이 확인되었다(41). 이러한 결과는 CEC가 천식의 병리기전을 억제함으로써 천식의 유발을 억제하거나 증상을 완화할 수 있음을 시사해준다.

그러나 임상에서 접하는 대부분의 천식 환자들은 이미 질병이 진행된 상태에서 치료를 받기 위해 내원하는 환자들임을 감안할 때 CEC가 천식 치료제로 활용될 수 있기 위해서는 천식이 이미 확립된 모델동물에서 CEC의 천식억제 효과를 관찰하는 것이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 마우스에 OVA로 천식을 유도한 후 CEC를 처리하여 기도염증 발생을 억제하고 이미 생긴 천식을 치유 하는 효과를 관찰함으로써 CEC의 천식 증상에 관한 치료효과가 있을 것이라는 가설을 세우고 이를 증명하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

실험동물은 7주령 암컷 BALB/c 마우스를 KoaTech(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 동물실험계획은 서울대학교 실험동물자원관리원(IRB No. SNU-09-0115-4)과 서울대병원 전임상실험실의 승인(IACUC No. 10-0211)을 받았고, 마우스는 각각 서울의대 기초연구동의 동물실험실과 서울대병원 의생명연구원 전임상실험실에서 specific pathogen-free (SPF) 상태로 사육하면서 실험하였다.

마우스는 실험목적에 따라서 3~5개의 실험군에 각각 5마리씩 구성하였다. 실험 1(Exp. 1)은 OVA를 이용하여 마우스에 천식을 유발시킬 때 다양한 농도의 CEC를 한 달간 처리하여 천식을 완화시키기에 적합한 CEC의 농도를 찾고자 실시하였다(Fig. 1A). 실험 2(Exp. 2)는 실험 1에서 확인한 천식 완화효과를 가지는 적정농도의 CEC를 복강 내 주사와 비강 내 주입, 두 종류의 다른 방법으로 투여하여 천식 완화에 좀

더 효과적인 투여경로를 찾고자 하였다(Fig. 1B). 실험 3(Exp. 3)은 동일 실험기간 내에 투여되는 CEC의 총량이 천식완화효과와 총량이 같을 경우 어느 시간 간격으로 투여하는 것이 천식완화에 더 효과적인지 알아보기 위해 다양한 시간 간격으로 투여방침을 정해 실험을 하였다(Fig. 2A). 마지막으로 실험 4(Exp. 4)에서는 천식에 이환된 마우스를 OVA로 지속적으로 자극함으로써 환자의 실질적인 상황과 비슷한 환경을 만들고, 지속적인 OVA 자극 하에서 CEC를 투여하였을 경우 천식 완화효과가 있는지를 확인하고자 하였다(Fig. 2B).

2. 예쁜꼬마선충 조항원 제작 및 준비

예쁜꼬마선충의 조항원(crude extract of *C. elegans*, CEC)을 제작하기 위해 예쁜꼬마선충 N2 주를 *Escherichia coli* OP50이 포함된 배지에서 배양하였다. 18°C를 유지 중인 배양기에서 4기 유충을 5마리씩 새 배지에 옮겨 7일간 배양한 후 동일한 성장 단계의 충체를 얻기 위하여 충란이 포함된 배지의 일부를 잘라 새 배지에 옮겼다. 이후 3일간 배양한 뒤 배지를 3차 증류수로 5차례 씻어내어 동일한 성장과정의 성충을 회수하였다. 회수한 성충을 4°C, 3,000 rpm으로

15분간 원심분리하고 phosphate buffered saline(PBS)을 첨가하여 회전식 균질기와 초음파 분쇄기를 사용하여 분쇄하였다. 총체 균질액은 4°C, 15,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상층액을 분리하고 Polymixin B(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 내독소(endotoxin, LPS)를 제거하였다. 내독소 제거 처리 후 예쁜꼬마선충 조항원에서 측정된 내독소 농도는 0.1 mg의 CEC 당 1 ng 미만이었다. 또 세균 및 바이러스의 오염을 배제하기 위해 0.22 µm filter로 여과하고 분주하여 -70°C에 보관하였다.

3. 천식 유발 및 CEC 투여

BALB/c 마우스에 천식을 유발시키기 위해서 OVA(Sigma, St. Louis, MO, USA) 75 µg을 3 mg의 aluminum hydroxide(alum, Sigma)와 혼합하여 실험 첫날과 7일째에 복강 내로 주입하였다. 실험 14, 15, 21일째에 OVA 50 µg을 비강 내로 투여하였고, 23일째에 Flexivent(Scireq, Montreal, Canada)를 이용하여 기도과민성을 측정하여 천식이 성공적으로 유도되었는지를 확인하였다. 이후 실험목적에 따라서 천식에 이환된 마우스를 실험목적에 따라 각각

3~5개 실험군으로 나누어 실험에 사용하였다. 음성 대조군의 경우에는 OVA 대신 PBS로 실험 첫날과 7일째에 복강 내로 주사하여 감각하였고, 실험 14, 15, 21일째에 비강 내로 PBS를 투여하여 자극하였다.

실험 1은 음성 대조군과 양성 대조군을 제외한 세 군의 실험군 마우스에 다양한 농도의 CEC(CEC10군: 10 μ g, CEC25군: 25 μ g, CEC50군: 50 μ g)를 OVA와 함께 처리한 후 기도과민성, 폐포세척액 내 염증세포 수 및 싸이토카인 분비양상과 천식의 병리학적, 면역학적 소견을 관찰하여 세 종류의 CEC 농도 중 천식 완화효과를 보이는 적정농도를 결정하였다(Fig. 1A).

실험 2는 투여 경로에 따른 CEC의 천식 완화 효과를 비교하기 위해 실험 1에서 결정된 CEC의 적정농도를 마우스의 복강 내(CECip군) 또는 비강 내(CECin군)로 투여하여 CEC의 천식 완화효과를 관찰하였다(Fig. 1B).

실험 3에서는 천식 증상을 효과적으로 완화시킬 수 있는 CEC 투여 간격을 결정하기 위해 천식이 발생된 실험군 마우스에 적정농도의 CEC를 투여한 후 천식 병리의 완화 정도를 관찰하였다(Fig. 2A). 실험 2에서 투여경로에 관계없이 CEC효과를 보여 복강 내 자극을 실시하였다. PBS군을 제외한 나머지 마우스를 OVA로 감각 및 자극하여

천식을 유도한 후 기도 과민성을 측정하여 천식이 확실히 유도되었음을 확인 한 후 천식이 유도된 마우스를 6개의 실험군으로 나누어 한 달간 동량의 CEC를 처리할 시 어떤 시간 간격으로 CEC를 투여했을 때 천식 완화에 효과적이었는지 확인하고자 하였다. 음성 대조군(PBS군)은 PBS로 감작 및 자극을 실시한 후 한 달 동안 PBS를 매주 1회씩 처리하였으며, 양성 대조군(OVA군)은 OVA로 천식을 유도시킨 후 OVA로 한 번의 재 감작을 실시하였다. CEC W25군은 매주 1회 CEC 25 μg 을 한 달간 투여하여 총 100 μg 을 투여하였고, CEC M100군은 CEC 100 μg 을 한 번 투여하여 한달 뒤 천식 완화효과를 관찰하였다. CEC W25*2군은 매주 2회 CEC 25 μg 을 한 달간 투여하여 총 200 μg 을 투여하였고, CEC W50군은 매주 1회 CEC 50 μg 을 한 달간 투여하여 총 200 μg 을 투여하였다. CEC W50*2군은 매주 2회 CEC 50 μg 을 한 달간 투여하여 총 400 μg 을 투여하였고, CEC W100군은 매주 1회 CEC 100 μg 을 한 달간 투여하여 총 400 μg 을 투여하였다.

실험 4에서는 실험 3과 같은 실험방법으로 마우스에 천식을 유도한 뒤 천식에 이환된 마우스를 다음 한달 동안 OVA로 지속적으로 자극하는 상태에서 CEC를 투여하였을 경우 천식 완화효과가 있는지 확인하였다(Fig. 2B). PBS군은 음성 대조군으로서 PBS로 자극하였고,

OVA군은 양성 대조군으로 천식이 완전히 이환된 후 OVA로 계속 자극하였다. OVA+CEC군은 처음 한달 간 OVA로 천식을 유도한 뒤 다음 4주 동안 매주 2회씩 OVA 50 μg 과 CEC 25 μg 을 같이 처리하였다. CEC군은 천식 유도 후 4주 동안 매주 2회씩 CEC 25 μg 만 처리하였다.

4. 기도과민성 측정

OVA로 감각시킨 마우스에서 천식이 유도되었는지 확인하기 위하여 OVA로 마지막 자극을 실시한 다음날 혹은 치료목적으로 CEC를 투여하기 전날 methacholine을 농도별로 처리하여 기도과민성을 측정하였다. 마우스를 zoletile (Virbac, Carros, France)로 마취한 후 기도를 확보하여 flexivent 시스템 (Scireq)과 연결한 후 기도를 통해 PBS를 폐에 분사시켜 기본값을 측정하였다. 이후 methacholine의 농도를 6.25, 12.5, 25 mg/ml 순서로 점차 증가시키며 폐에 분무시켜 methacholine 유발성 호흡장애를 측정함으로써 마우스의 기도과민성을 측정하였다.

5. 폐포세척액 수집과 세포 수 측정

폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid)을 얻기 위해 마우스를 zoletile로 마취시킨 다음 마우스의 기관지에 카테타를 삽입, 고정한 후 0.5 ml의 PBS로 세 번씩 세척하여 최종적으로 1.4~1.5 ml의 폐포세척액을 모았다. 이후 4°C, 1,200 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액은 싸이토카인 측정을 위해 -70°C에서 보관하였고, 침전물은 100 µl의 PBS를 섞은 후 혈구계산기를 이용하여 전체 세포 수를 계수하였다. 또 혈구감별계산을 하기 위하여 cytopsin을 이용해 슬라이드 위에 세포를 붙인 뒤 giemsa 염색을 하여 염증세포비율을 측정하였다.

6. 폐포세척액 내 싸이토카인 분비 측정

폐포세척액 내 싸이토카인 분비량은 sandwich ELISA kit(ebioscience, San Diego, USA)를 사용하여 각각 IL-4, IL-5, IL-12p70, IL-13, 그리고 IFN- γ 정량을 측정하였다. 각각의 싸이토카인 측정한계 수준은 IL-4, IL-5, IL-13은 4 pg/ml, IL-12p70과 IFN- γ 는 15 pg/ml이었다.

7. 혈청 내 총 IgE 항체가 측정

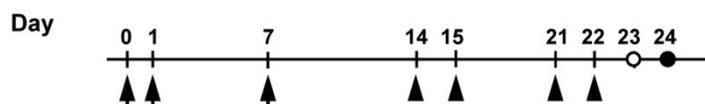
마취된 마우스의 심장천자를 통해 채취한 혈액을 원심분리하여 혈청을 모아 -20°C 에 보관하였다. 혈청 내 총 IgE 항체를 sandwich ELISA(Bethyl, Montgomery, USA)를 통해 측정하였다.

8. 병리학적 관찰

마우스에서 폐를 제거하여 10% phosphate-buffered formalin에 24시간 고정시킨 후 고정된 조직을 파라핀으로 포매한 다음 3~5 μm 의 두께로 조직 절편을 제작하였다. 준비된 조직 절편을 hematoxylin과 eosin으로 염색한 뒤 폐 조직의 염증, 염증세포의 침윤 등 병리학적 소견을 광학현미경으로 관찰하였다.

9. 통계분석

모든 자료는 student t-test 를 사용하여 실험군 사이에 통계적 유의성을 비교하였으며, 95% 신뢰구간($P < 0.05$) 또는 99% 신뢰구간($P < 0.01$)에서 통계학적 유의성을 판정하였다.



A) Exp. 1

| Group | Sensitization (i.p.) | Challenge (i.n.) |
|-------|----------------------|------------------|
| PBS | PBS | OVA |
| OVA | OVA | OVA |
| CEC10 | OVA+CEC 10 μ g | OVA |
| CEC25 | OVA+CEC 25 μ g | OVA |
| CEC50 | OVA+CEC 50 μ g | OVA |

B) Exp. 2

| Group | Sensitization | Challenge (i.n.) |
|-------|---------------------------|------------------|
| PBS | PBS | OVA |
| OVA | OVA | OVA |
| CECip | OVA+CEC 50 μ g (i.p.) | OVA |
| CECin | OVA+CEC 50 μ g (i.n.) | OVA |

Fig. 1. The schematic protocols for asthma induction in BALB/c mice and for investigation of the suppressive effect of *C. elegans* crude extract (CEC) on airway inflammation depending on doses (A) or administration routes (B) of CEC. Mice were sensitized with PBS, OVA, or CEC mixed with aluminum hydroxide on days 0, 1 and then boosted on day 7. Then, they were challenged with OVA by intranasal injection on days 14, 15, 21 and 22. Airway hyper-responsiveness (AHR) to various concentrations of methacholine was measured on day 23. After 24 hr, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and blood were collected from anesthetized mice, and lungs were isolated for histological observation. Each group was consisted of 5 mice. Arrows, OVA sensitization; arrow heads, OVA challenge; open circle, measurement of AHR; filled circle, sacrifice of mice.

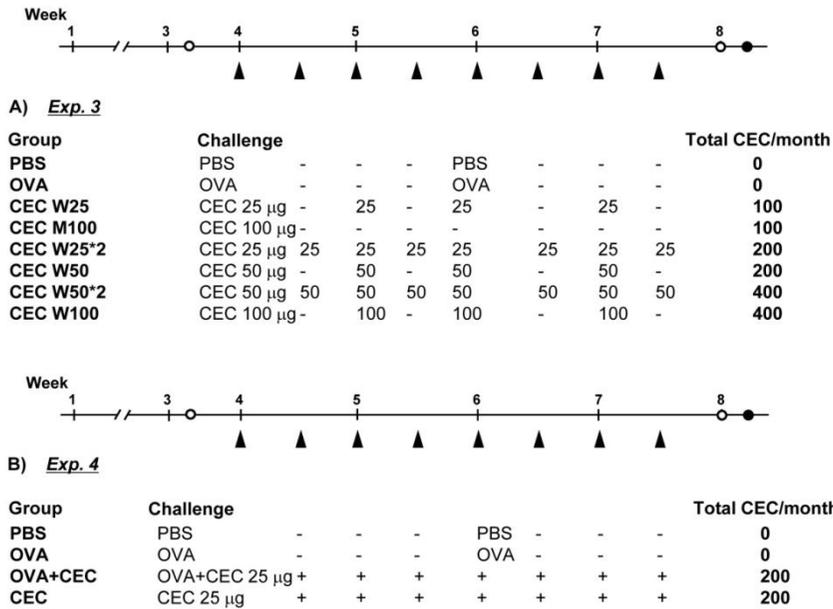


Fig. 2. The schematic protocols for observation of the suppressive effect of *C. elegans* crude extract (CEC) on airway inflammation after establishment of asthma by OVA sensitization and challenge in BALB/c mice. (A) Suppressive effect of CEC was investigated in asthma-induced mice according to the various doses and intervals of CEC administration. (B) Suppressive effect of CEC was also investigated in mice after establishment of asthma using various doses and intervals of CEC administration. Asthma was established in mice by sensitization and challenge with OVA using the same protocol in Fig. 1A, and mice were treated with different doses or intervals of CEC administration according to the experimental schemes; arrow heads, challenge with PBS, OVA and/or CEC; open circle, measurement of AHR; filled circle, sacrifice of mice.

결 과

1. CEC의 천식 억제효과 및 적정농도 확인

천식에 이환된 마우스에 다양한 농도의 CEC를 처리하여 천식 완화에 적합한 CEC 농도를 찾고자 하였다(Fig. 1A). 각 실험군 마우스의 폐조직을 관찰한 결과 PBS군에서는 염증반응이 관찰되지 않은 반면, OVA군에서는 주로 호산구로 구성된 염증세포들이 기관지 주변으로 현저하게 침윤되어 있는 것을 관찰하였다(Fig. 3). 그러나 OVA와 CEC를 함께 감작한 세 군의 실험군(CEC10군, CEC25군, CEC50군)에서는 양성 대조군인 OVA군에 비해 염증세포의 침윤이 현저하게 감소되었다(Fig. 3).

실험 23일째에 다양한 농도의 methacholine을 처리하여 실험군 마우스의 기도과민성을 측정한 결과 OVA군은 methacholine 농도가 증가할수록 기도과민성이 증가하였다(Fig. 4A). CEC를 처리했을 경우에는 methacholine 농도가 증가할수록 기도과민성도 증가하긴 하였으나 OVA군의 경우에 비해 유의하게 감소되었으며($P < 0.01$), CEC의 농도가 높을수록 기도과민성의 증가도 현저하게 억제되었다. 즉 methacholine 최고농도인 25 mg/ml에서 CEC10군은 4.7 ± 0.4 ,

CEC25군은 3.0 ± 0.6 , CEC50군은 2.3 ± 0.5 의 기도과민성을 보였으며, CEC50군은 음성대조군인 PBS군과 비슷한 수준의 기도과민성을 보였다(Fig. 4A).

폐포세척액 내의 염증세포를 계수한 결과 OVA군에서는 $16.0 \pm 0.15 \times 10^6$ 로 PBS군의 $3.8 \pm 0.1 \times 10^6$ 에 비하여 현저하게 증가되어 있음을 확인하였다(Fig. 4B, $P < 0.01$). OVA와 CEC를 함께 감작한 세 군의 실험군(CEC10군, CEC25군, CEC50군)에서는 기도과민성의 경우와 같이 CEC 농도가 증가할수록 염증세포의 수가 감소하여, CEC10군은 $10.4 \pm 0.1 \times 10^6$, CEC25군은 $7.0 \pm 0.1 \times 10^6$, CEC50군은 $3.7 \pm 0.2 \times 10^6$ 로 계수되었다. 염증세포에 대한 감별계수 결과 양성대조군인 OVA군에서 관찰된 염증세포 중 호산구가 주요 세포임을 확인하였으며, PBS군과 CEC를 처리한 세 실험군에서 모두 호산구의 수가 현저하게 감소하였다(Fig. 4C, $P < 0.01$).

CEC의 천식억제 현상을 이해하기 위해 폐포세척액 내의 싸이토카인 분비량을 측정하여 비교한 결과 OVA군에서는 Th2 싸이토카인인 IL-4와 IL-13의 분비량이 PBS군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 5, $P < 0.01$). 반면, Th1 싸이토카인 중 IL-12는 OVA군에서 PBS군에 비하여 유의하게 감소하였으나 IFN- γ 의 분비량은 증가하였다 (Fig. 5, P

< 0.01). CEC를 OVA와 함께 감작시킨 세 군의 실험군(CEC10군, CEC25군, CEC50군)에서는 OVA군과 비교하여 Th2 싸이토카인의 분비가 현저하게 감소하였고($P < 0.01$), Th1 싸이토카인의 분비는 유의하게 증가하였다($P < 0.01$). 이러한 현상은 CEC의 농도가 증가할수록 더 확연하게 관찰되었다.

마우스 혈청 내 총 IgE 항체가는 OVA 군에서 26.7 ± 1.5 ng/ml 로 다른 실험군에 비해 높은 항체가를 보였다(Fig. 6). 반면 PBS 군에서는 1.3 ± 0.9 ng/ml 로 가장 낮은 항체가를 보였고, CEC 농도가 높을수록 총 IgE 항체가가 OVA 군과 비교하여 점차 낮아지는 양상을 보여 CEC10 군은 16.0 ± 7.7 ng/ml, CEC25 군은 9.7 ± 5.2 ng/ml, CEC50 군은 4.0 ± 1.5 ng/ml 의 항체가를 보였다.

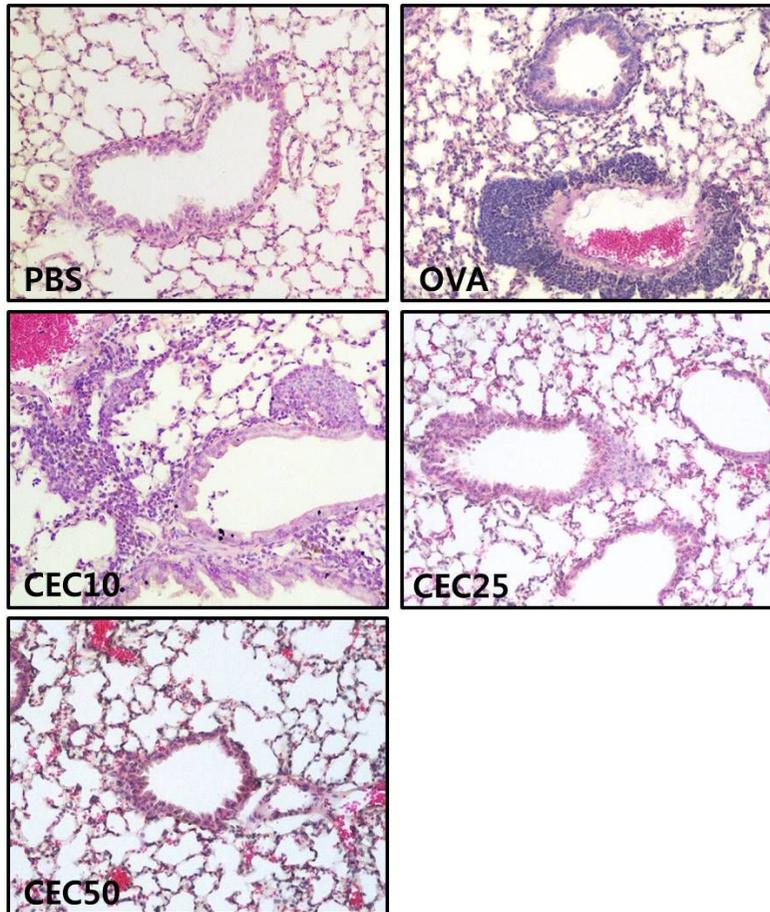


Fig. 3. Histopathological observation of the lungs of mice sensitized with PBS, OVA, or OVA+CEC. Infiltrations of inflammatory cells around the airways were remarkably decreased in CEC-treated mice compared to that in OVA-sensitized and challenged mice. PBS (n=5), mice sensitized with PBS and challenged with OVA; OVA (n=5), mice sensitized and challenged with OVA; CEC10 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 10 μg , and challenged with OVA; CEC25 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 25 μg , and challenged with OVA; CEC50 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 50 μg , and challenged with OVA. (X100)

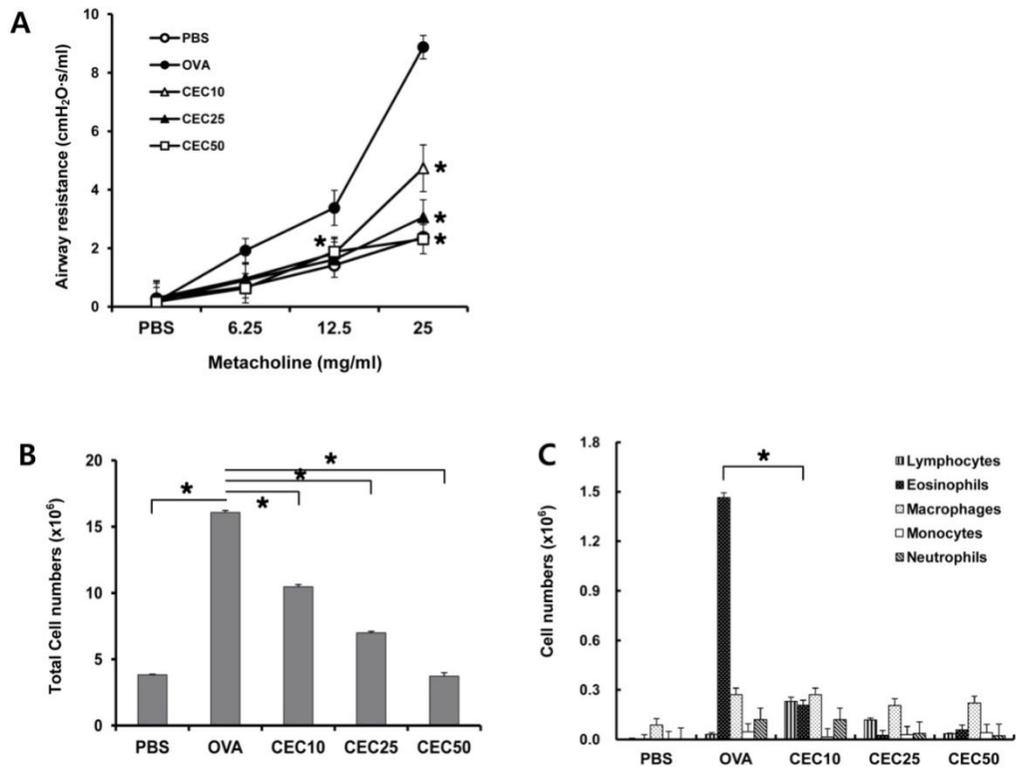


Fig. 4. (A) Airway hyper-responsiveness to increasing concentration of methacholine presented as airway resistance. (B) Total cell counts in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid collected from mice. (C) Differential cell counts of inflammatory cells in BAL fluid. Numbers of eosinophils were significantly reduced by treatment with various doses of CEC. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5), mice sensitized with PBS and challenged with OVA; OVA (n=5), mice sensitized and challenged with OVA; CEC10 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 10 μ g, and challenged with OVA; CEC25 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 25 μ g, and challenged with OVA; CEC50 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 50 μ g, and challenged with OVA. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

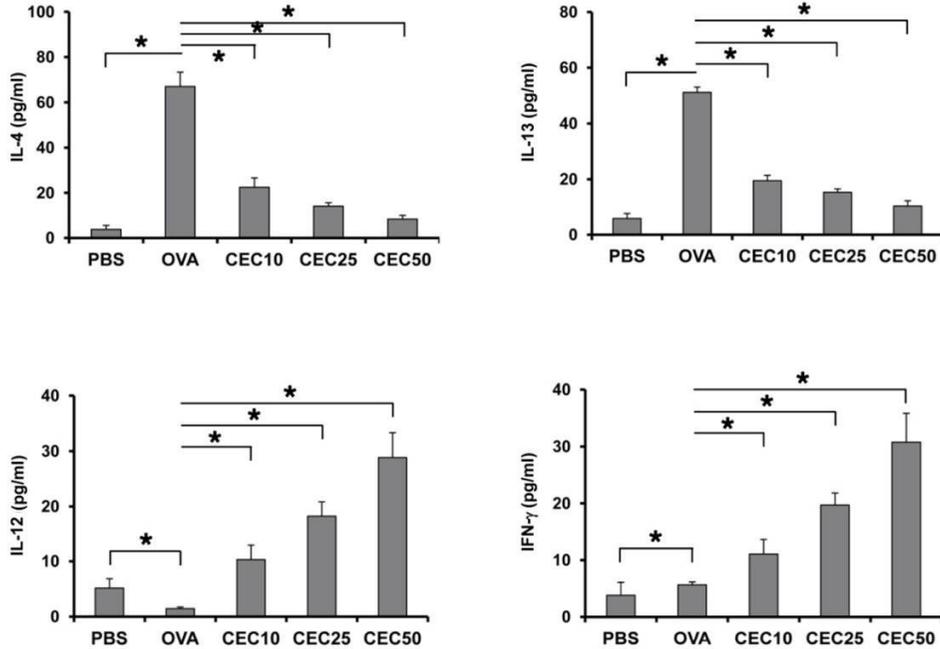


Fig. 5. Effect of CEC treatment on cytokine production in BAL fluid. In contrast to OVA-treated mice, productions of Th2 type cytokines such as IL-4 and IL-13 were significantly decreased, but those of Th1 type cytokines such as IL-12 and IFN- γ were significantly increased in BAL fluid of CEC-treated mice. The effect of CEC on cytokine production depended on the dose of CEC. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5), mice sensitized with PBS and challenged with OVA; OVA (n=5), mice sensitized and challenged with OVA; CEC10 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 10 μ g, and challenged with OVA; CEC25 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 25 μ g, and challenged with OVA; CEC50 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 50 μ g, and challenged with OVA. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

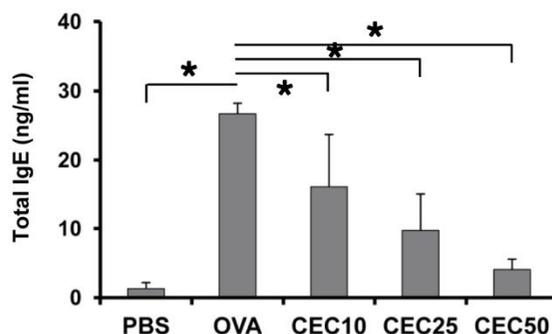


Fig. 6. Total IgE titers in sera of mice with OVA-induced airway inflammation. The production of total IgE was significantly decreased by CEC treatment, which was positively correlated with the dose of CEC. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5), mice sensitized with PBS and challenged with OVA; OVA (n=5), mice sensitized and challenged with OVA; CEC10 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 10 μ g, and challenged with OVA; CEC25 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 25 μ g, and challenged with OVA; CEC50 (n=5), mice sensitized with OVA and CEC 50 μ g, and challenged with OVA. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

2. 투여경로에 따른 CEC의 천식 병변 완화효과

실험 2에서는 마우스를 OVA로 감작시켜 천식을 유도할 때 같이 주입되는 CEC의 투여 경로에 따른 천식 억제효과를 관찰하였다(Fig. 1B). OVA군에서는 PBS군에 비해 기관지 주변으로 염증세포의 침윤이 현저하게 증가되어 있었으나 OVA와 CEC를 함께 감작한 CECin(intranasal injection)군과 CECip(intraperitoneal injection)군의 경우 투여경로에 상관없이 두 군 모두 OVA군에 비해 염증세포의 침윤이 현저하게 감소되었다(Fig. 3).

Methacholine에 대한 기도과민성 역시 OVA군에서는 methacholine 농도가 증가할수록 증가하여 최고 농도인 25 mg/ml에서 8.9 ± 0.3 의 기도과민성이 관찰되었다(Fig. 8A). 그러나 CEC를 처리했을 경우에는 투여경로에 상관없이 CECin군과 CECip군 모두 기도과민성의 증가도 현저하게 억제되어 음성대조군인 PBS군과 비슷한 수준을 보였다. 즉 methacholine 최고 농도인 25 mg/ml에서 PBS군은 2.4 ± 0.6 , CECin군은 2.5 ± 0.3 , CECip군은 2.3 ± 0.3 의 기도과민성이 관찰되었다(Fig. 8A).

CEC투여 경로에 따른 폐포세척액 내 염증세포의 수 역시 CEC를 두 가지 다른 경로로 처리했을 시 OVA군의 $16.0 \pm 0.9 \times 10^6$ 개에 비하여 유의하게 감소하여 CECin군은 $5.7 \pm 1.2 \times 10^6$, CECip군은 $5.7 \pm 0.9 \times$

10^6 개의 세포가 계수되었다(Fig. 8B, $P < 0.01$). OVA군에서 관찰된 염증 세포의 대부분을 차지하는 호산구 역시 OVA군에 비해 PBS군과 CEC를 처리한 실험군에서 모두 현저하게 감소하였다(Fig. 8C, $P < 0.01$).

사이토카인 분비양상도 OVA군에서는 IL-4와 IL-13의 분비량이 PBS군에 비하여 유의하게 증가한 반면(Fig. 9, $P < 0.01$), IL-12는 PBS군에 비하여 유의하게 감소하였으나 IFN- γ 의 분비량은 증가하였다(Fig. 9, $P < 0.01$). 그러나 CEC를 OVA와 함께 감작시킨 CECin군과 CECip군의 경우 투여경로에 상관없이 두 군 모두 OVA군에 비해 Th2 사이토카인의 분비가 현저하게 감소하였으며($P < 0.01$), Th1 사이토카인의 분비는 유의하게 증가하였다($P < 0.01$). 총 IgE 항체가는 OVA군에서 924.5 ± 240.9 ng/ml로 가장 높게 관찰되었으나 PBS군, CECin군과 CECip군 모두 OVA군에 비해 유의하게 감소되었다(Fig. 10, $P < 0.01$).

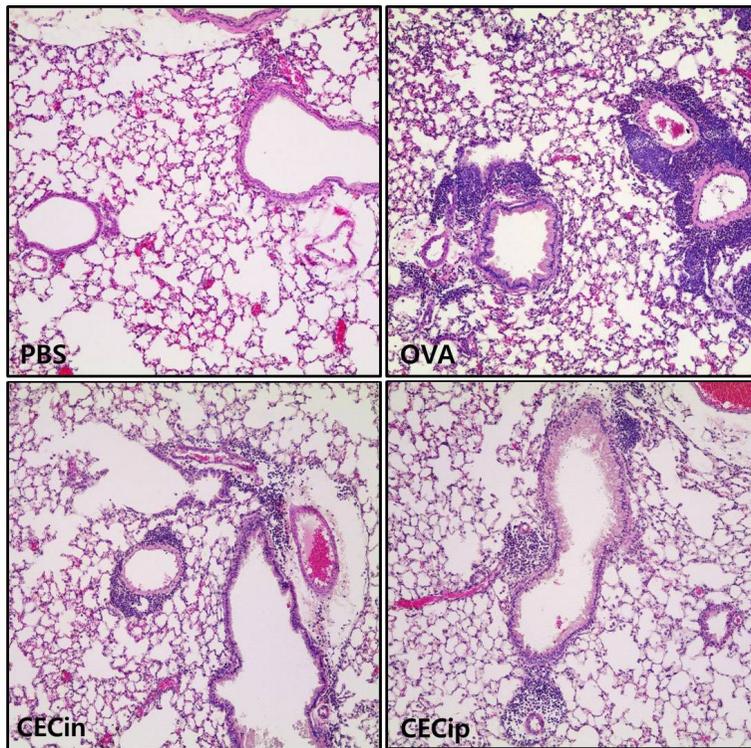


Fig. 7. Histopathological observation of the lungs of mice with OVA-induced asthma. Infiltrations of inflammatory cells around the airways were significantly decreased in CEC-treated mice compared to that in mice with OVA-induced asthma, irrespective of administration route of CEC: intraperitoneal or intranasal injection. PBS (n=5) mice sensitized with PBS and challenged with OVA; OVA (n=5), mice sensitized and challenged with OVA; CECin (n=5), mice sensitized with OVA together with CEC 50 μ g by intranasal injection and challenged with OVA; CECip (n=5), mice sensitized with OVA together with CEC 50 μ g by intraperitoneal injection and challenged with OVA. (X100)

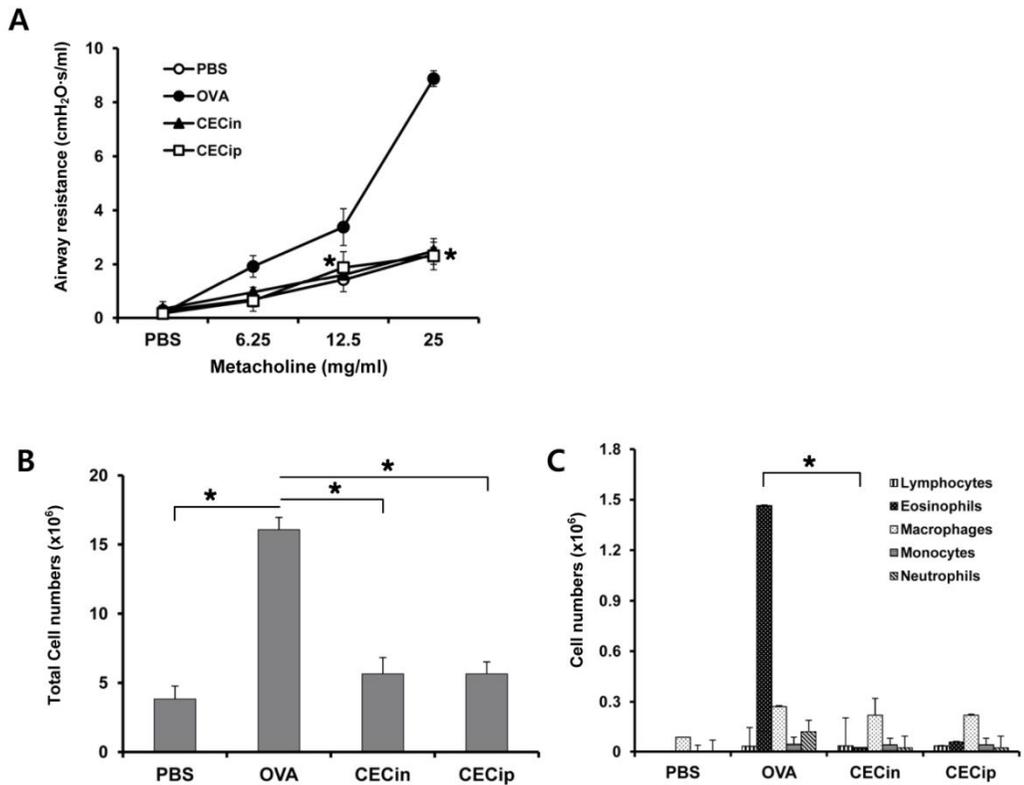


Fig. 8. (A) Airway hyper-responsiveness to increasing concentration of methacholine. (B) Total cell counts in BAL fluid. (C) Differential cell counts in BAL fluid. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5) mice sensitized with PBS and challenged with OVA; OVA (n=5), mice sensitized and challenged with OVA; CECin (n=5), mice sensitized with OVA together with CEC 50 μ g by intranasal injection and challenged with OVA; CECip (n=5), mice sensitized with OVA together with CEC 50 μ g by intraperitoneal injection and challenged with OVA. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

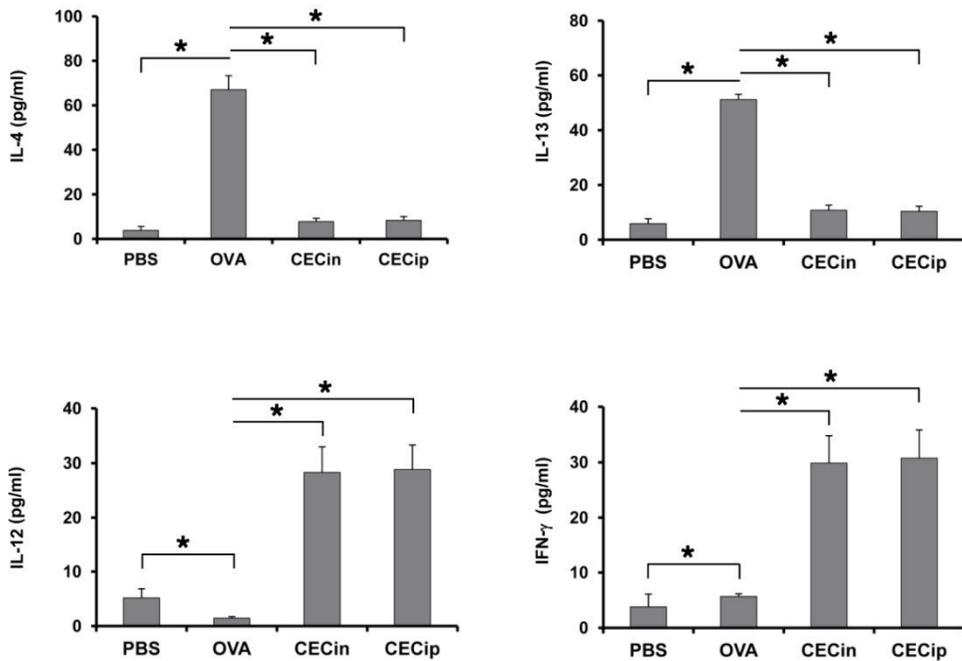


Fig. 9. Effects of CEC treatment on cytokine production in BAL fluid according to the route of CEC administration. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5) mice sensitized with PBS and challenged with OVA; OVA (n=5), mice sensitized and challenged with OVA; CECin (n=5), mice sensitized with OVA together with CEC 50 μ g by intranasal injection and challenged with OVA; CECip (n=5), mice sensitized with OVA together with CEC 50 μ g by intraperitoneal injection and challenged with OVA. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

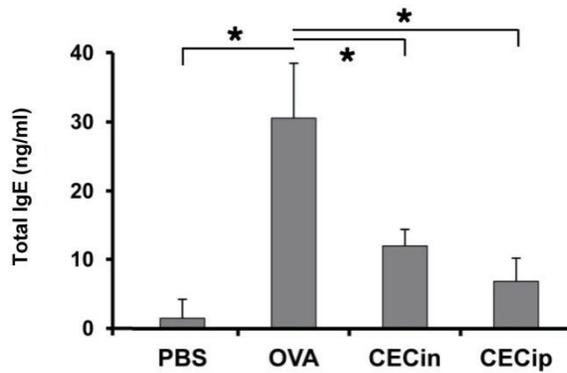


Fig. 10. Effects of CEC treatment on serum total IgE titers of mice with OVA-induced asthma according to the route of CEC administration. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5) mice sensitized with PBS and challenged with OVA; OVA (n=5), mice sensitized and challenged with OVA; CECin (n=5), mice sensitized with OVA together with CEC 50 μ g by intranasal injection and challenged with OVA; CECip (n=5), mice sensitized with OVA together with CEC 50 μ g by intraperitoneal injection and challenged with OVA. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

3. CEC 투여방법에 따른 기도염증 완화효과

실험 3은 한달 동안 마우스를 OVA로 감작 및 자극시켜 천식을 유발시킨 후 다음 한달 동안 CEC를 처리하여 천식 완화효과가 있는지를 알아보고, 한 달 동안 투여한 총 CEC의 양과 투여방법에 따른 천식 완화효과를 관찰함으로써 천식 완화에 가장 효율적인 CEC 투여방법을 찾고자 하였다(Fig. 2A). 폐조직에서 병리학적 관찰을 실시한 결과 CEC를 처치한 실험군에서 OVA군에 비해 염증세포의 침윤이 현저하게 감소되긴 하였으나 여전히 기도 주위 염증이 지속되고 있었다(Fig. 11). 또, 한 달간 투여 총량이 같은 CEC W50*2군과 CEC W100군의 병리학적 소견이 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 11).

Methacholine 최고 농도인 25 mg/ml에서 PBS군의 기도과민성은 2.4 ± 0.0 이었고, OVA군은 12.9 ± 0.6 이었다(Fig. 12A). CEC를 투여한 실험군에서는 CEC의 투여용량을 늘릴수록 기도과민성 억제효과가 더 컸으며, 한 달간 투여한 CEC 최종농도가 같은 경우에는 투여빈도는 기도과민성 억제에 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 12A). 즉 한 달간 총 100 μg 의 CEC를 투여한 CEC W25군과 CEC M100군의 기도과민성은 각각 $3.5 \pm \text{SD}$, 4.4 ± 0.5 이었으며, 한 달간 총 200 μg 의 CEC를 투여한 CEC W25*2군과 CEC W50군의 기도과민성은 $4.7 \pm \text{SD}$ 및 $3.1 \pm \text{SD}$ 이

었다. 또 한 달간 총 400 μg 의 CEC를 투여한 CEC W50*2군과 CEC W100군의 기도과민성은 각각 2.3 ± 0.7 , 2.5 ± 1.1 이었다.

폐포세척액 내 염증세포의 수 역시 OVA군의 염증세포수에 비해 CEC를 투여한 실험군에서 한 달간 투여된 CEC의 총 용량에 비례하여 감소하였으나 투여빈도는 유의한 차이를 유발하지 못하였다(Fig. 12B). 호산구 역시 OVA군에 비해 CEC를 투여한 실험군에서 모두 현저하게 감소하였다(Fig. 12C, $P < 0.01$).

사이토카인 분비양상도 OVA군에서 관찰된 Th2 사이토카인(IL-4, IL-13)의 증가와 Th1 사이토카인(IL-12, IFN- γ)의 감소현상이 CEC를 투여한 실험군에서는 정반대로 관찰되어 Th2 사이토카인의 감소와 Th1 사이토카인의 증가양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 13). 혈청 내 총 IgE 항체가 역시 OVA군에 비해 CEC를 투여한 실험군에서는 유의하게 감소하였다(Fig. 13, $P < 0.01$).

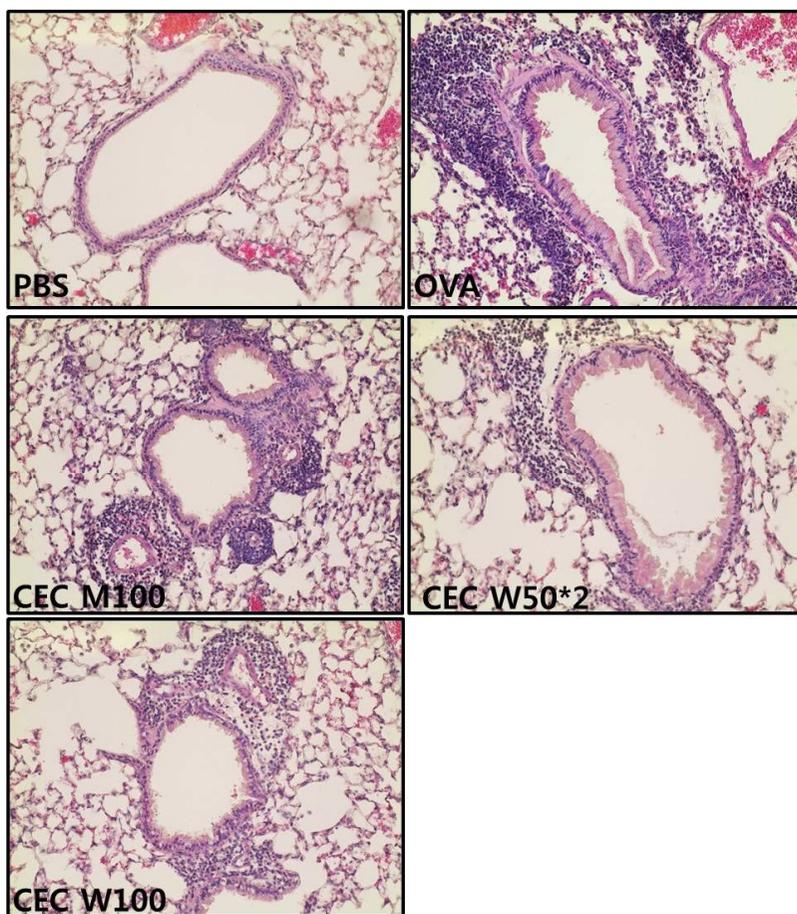


Fig. 11. Histopathological observation of the lungs of mice treated with different doses and intervals of CEC administration after establishment of asthma. PBS (n=5) mice challenged with PBS biweekly after establishment of asthma; OVA (n=5), mice challenged with OVA biweekly after establishment of asthma; CEC M100 (n=5), mice challenged with CEC 100 μg once after establishment of asthma; CEC W50*2 (n=5), mice challenged with CEC 50 μg two times a week for one month after establishment of asthma; CEC W100 (n=5), mice challenged with CEC 100 μg weekly for one month after establishment of asthma. (X200)

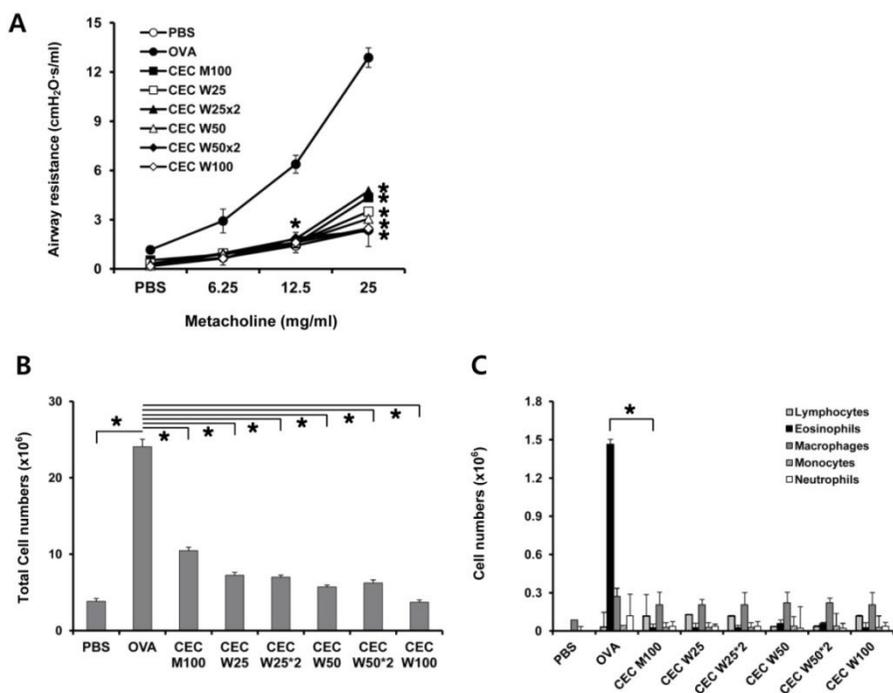


Fig. 12. (A) Airway hyper-responsiveness to increasing concentration of methacholine in experimental mice. (B) Total cell counts in BAL fluid. (C) Differential cell counts in BAL fluid. PBS (n=5) mice challenged with PBS biweekly after establishment of asthma; OVA (n=5), mice challenged with OVA biweekly after establishment of asthma; CEC W25 (n=5), mice challenged with CEC 25 μ g weekly after establishment of asthma; CEC M100 (n=5), mice challenged with CEC 100 μ g once after establishment of asthma; CEC W25*2 (n=5), mice challenged with CEC 25 μ g two times a week for one month after establishment of asthma; CEC W50 (n=5), mice challenged with CEC 50 μ g weekly after establishment of asthma; CEC W50*2 (n=5), mice challenged with CEC 50 μ g two times a week for one month after establishment of asthma; CEC W100 (n=5), mice challenged with CEC 100 μ g weekly for one month after establishment of asthma. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

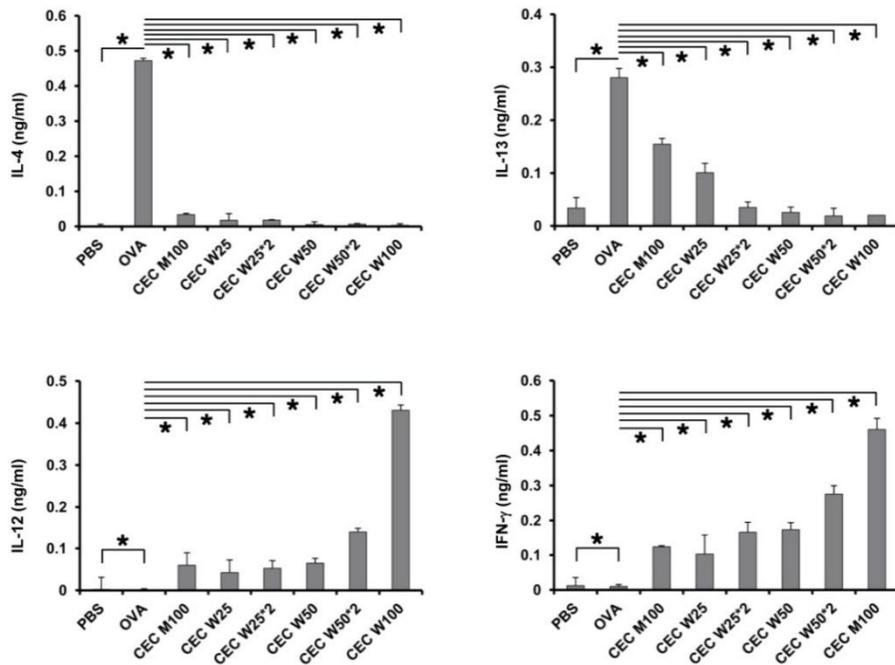


Fig. 13. Effect of CEC treatment on cytokine production in BAL fluid according to various treatment regimens after establishment of asthma in mice. PBS (n=5) mice challenged with PBS biweekly after establishment of asthma; OVA (n=5), mice challenged with OVA biweekly after establishment of asthma; CEC W25 (n=5), mice challenged with CEC 25 μ g weekly after establishment of asthma; CEC M100 (n=5), mice challenged with CEC 100 μ g once after establishment of asthma; CEC W25*2 (n=5), mice challenged with CEC 25 μ g two times a week for one month after establishment of asthma; CEC W50 (n=5), mice challenged with CEC 50 μ g weekly after establishment of asthma; CEC W50*2 (n=5), mice challenged with CEC 50 μ g two times a week for one month after establishment of asthma; CEC W100 (n=5), mice challenged with CEC 100 μ g weekly for one month after establishment of asthma. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

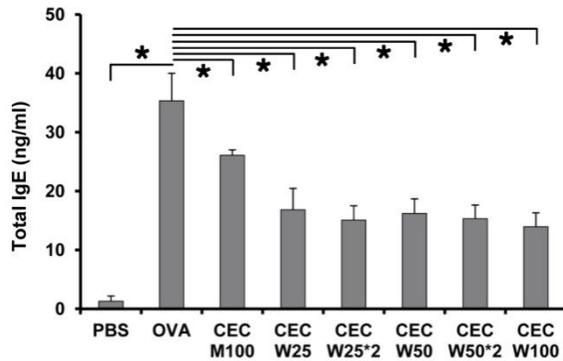


Fig. 14. Serum total IgE titers in mice according to various treatment regimens after establishment of asthma in mice. PBS (n=5) mice challenged with PBS biweekly after establishment of asthma; OVA (n=5), mice challenged with OVA biweekly after establishment of asthma; CEC W25 (n=5), mice challenged with CEC 25 μg weekly after establishment of asthma; CEC M100 (n=5), mice challenged with CEC 100 μg once after establishment of asthma; CEC W25*2 (n=5), mice challenged with CEC 25 μg two times a week for one month after establishment of asthma; CEC W50 (n=5), mice challenged with CEC 50 μg weekly after establishment of asthma; CEC W50*2 (n=5), mice challenged with CEC 50 μg two times a week for one month after establishment of asthma; CEC W100 (n=5), mice challenged with CEC 100 μg weekly for one month after establishment of asthma. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

4. 천식 이환 후 OVA 노출 시 CEC의 효과

실험 4는 천식에 이환된 마우스가 OVA 항원에 계속 자극받는 환경에서 CEC를 투여하였을 때 천식 완화효과가 있는지를 확인하고자 실시하였다(Fig. 2B). CEC를 OVA와 함께 또는 단독으로 천식에 이환된 마우스에 투여했을 때 OVA군에서 관찰되었던 염증세포의 기도 주위 침윤은 현저하게 감소 하였으나, 염증반응이 여전히 지속되고 있음이 관찰되었다(Fig. 15). 그러나 기도과민성은 OVA군에 비해 유의하게 감소하여 ($P < 0.01$) methacholine 25 mg/ml에서 OVA와 CEC를 함께 4주간 투여한 OVA+CEC군은 3.2 ± 0.8 이었다(Fig. 16A). 또, CEC만 단독으로 투여한 CEC군은 2.4 ± 0.1 로 PBS군(2.0 ± 0.0)과 비슷한 수준의 기도과민성을 보였다. 폐포세척액 내 염증세포의 수도 CEC를 OVA와 함께 또는 단독 투여한 두 실험군에서 모두 OVA군에 비해 유의하게 감소하였으며(Fig. 16B, $P < 0.01$), 염증세포 중 호산구 수도 유의하게 감소한 반면 단핵구 세포가 증가하는 양상을 보였다(Fig. 16C).

Th2 싸이토카인의 분비량은 CEC를 OVA와 함께 또는 단독 투여한 두 실험군에서 모두 OVA군에 비해 유의하게 감소하였으나(Fig. 17, $P < 0.01$), Th1 싸이토카인의 경우에는 CEC를 단독 투여한 CEC군에서만 OVA군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 17, IL-12, $P < 0.01$; IFN- γ ,

$P < 0.05$) 또, 혈청 내 총 IgE 항체가는 CEC를 OVA와 함께 또는 단독 투여한 두 실험군 모두 OVA군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 18, $P < 0.01$).

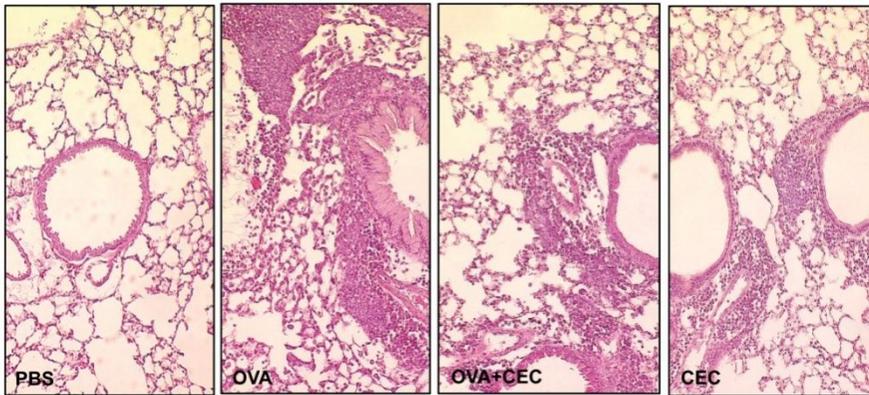


Fig. 15. Histopathological observation of the lungs of mice with established asthma. PBS (n=5) mice challenged with PBS after establishment of asthma; OVA (n=5), mice challenged with OVA after establishment of asthma; OVA+CEC (n=5), mice challenged with OVA+CEC after establishment of asthma; CEC (n=5), mice challenged with CEC after establishment of asthma. (X200)

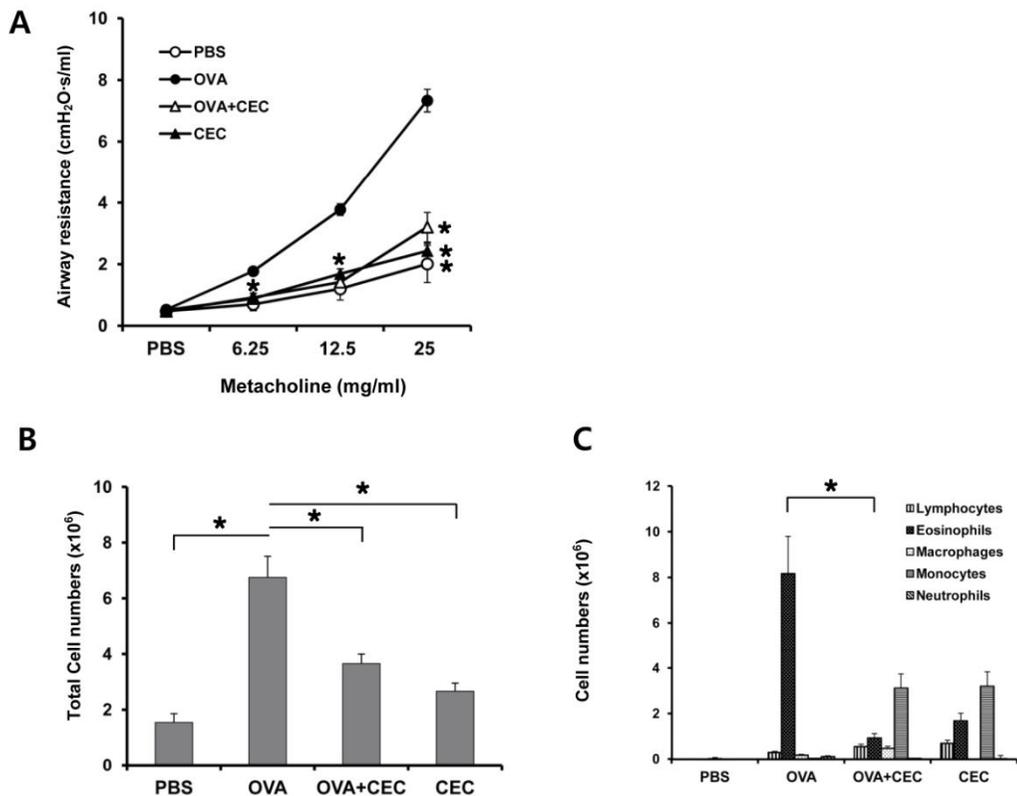


Fig. 16. (A) Airway hyper-responsiveness to increasing concentration of methacholine. (B) Total cell counts in BAL fluid. (C) Differential cell counts in BAL fluid. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5) mice challenged with PBS after establishment of asthma; OVA (n=5), mice challenged with OVA after establishment of asthma; OVA+CEC (n=5), mice challenged with OVA+CEC after establishment of asthma; CEC (n=5), mice challenged with CEC after establishment of asthma. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

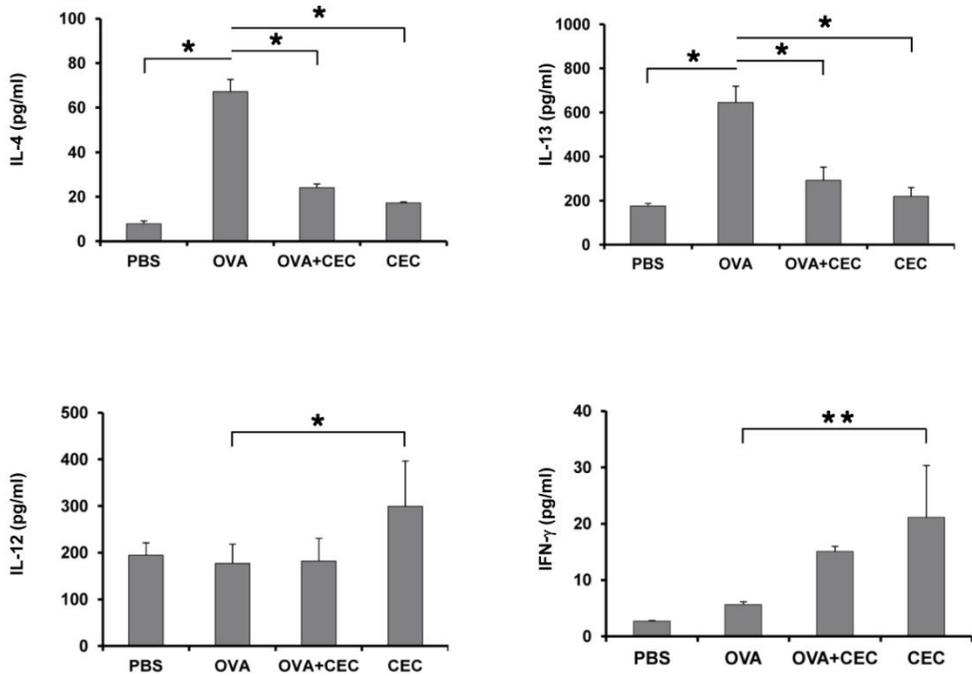


Fig. 17. Effects of CEC treatment on cytokine production in BAL fluid of mice with established asthma. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5) mice challenged with PBS after establishment of asthma; OVA (n=5), mice challenged with OVA after establishment of asthma; OVA+CEC (n=5), mice challenged with OVA+CEC after establishment of asthma; CEC (n=5), mice challenged with CEC after establishment of asthma. *, $P < 0.01$ vs. OVA group. **, $P < 0.05$ vs. OVA group.

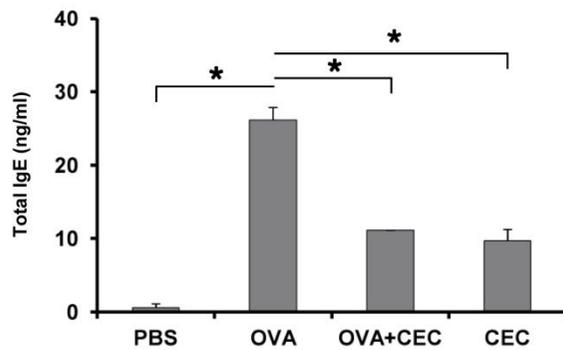


Fig. 18. Serum IgE titers in mice with established asthma. Data from individual mice are presented as arithmetic means in histograms. PBS (n=5) mice challenged with PBS after establishment of asthma; OVA (n=5), mice challenged with OVA after establishment of asthma; OVA+CEC (n=5), mice challenged with OVA+CEC after establishment of asthma; CEC (n=5), mice challenged with CEC after establishment of asthma. *, $P < 0.01$ vs. OVA group.

고 찰

본 연구에서는 천식 억제효과를 가진다고 보고된 구충과 같은 기생충을 실험대상으로 사용하는 대신 자유생활을 하는 예쁜꼬마선충의 조항원을 대상으로 선택하여 실험을 진행하였다. 예쁜꼬마선충은 생활사를 실험실에서 쉽게 유지할 수 있고, 생명체 중 맨 처음으로 전계놈 서열이 밝혀지는 등 신경과학, 생태 발생학, 노화 등과 같은 다양한 연구분야에서 매우 유용하게 이용되고 있는 자유생활 선충이다(42). 예쁜꼬마선충은 수명이 대략 2~3주로 길지 않고 OP50이라는 대장균이 포함된 액체 또는 아가배지에서 배양이 용이하므로 실험실 내 생활사 영위가 쉽지 않은 기생충 보다는 실험에 사용될 대상을 다량으로 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. 또 전 유전자 서열이 규명되어 있기 때문에 예쁜꼬마선충의 물질 중 염증억제효과를 가진 물질을 찾을 수 있다면, 재조합단백질 제작 등 후속 연구가 훨씬 더 원활해질 것으로 기대된다.

이번 연구결과에서 예쁜꼬마선충의 조항원(CEC)이 천식 마우스 모델에서 OVA에 의해 유도되는 천식의 발병을 효과적으로 억제할 뿐만

아니라 이미 천식이 발병한 마우스에서도 천식 완화효과가 있음을 관찰하였다. 이 동물모델에서 유발되는 숙주 면역반응을 관찰한 결과 양성대조군인 OVA군에서는 기관지 주위의 염증세포의 침윤, 호산구-매개 천식의 특징적인 소견인 기도과민성 증가, 폐포세척액 내 총 세포수 및 호산구의 증가, Th2 사이토카인의 증가, 알레르기성 천식환자들에게서 확인되는 대표적인 현상인 혈청 내 총 IgE 항체가의 증가 등이 관찰되었으나, CEC를 처치한 실험군에서 모두 공통적으로 기도 주위 염증세포의 침윤을 비롯한 병리소견이 많이 완화되었으며, methacholine에 대한 기도과민성이 현저하게 억제되었고, 폐포세척액 내 총 염증세포의 수와 호산구의 수도 유의하게 감소하였다. 또 IL-4와 IL-13 등 Th2 사이토카인의 분비가 유의하게 감소한 반면 Th1 사이토카인인 IL-12와 IFN- γ 의 분비는 증가하였으며, 혈청 내 총 IgE 항체가도 유의하게 감소하는 양상을 보였다. 급성 천식을 유도하면서 OVA와 CEC를 함께 처리했을 때 CEC의 농도의존적으로 천식유도가 억제되었고 CEC의 투여 경로에 상관없이 천식 완화효과를 보였다. 또한 천식을 먼저 유도한 마우스에 치료목적으로 CEC를 처리하였을 때는 투여되는 최종용량이 증가할수록 천식 완화효과도 증가하였고, 마우스가 천식에 이미 이환된 후 OVA로 계속 자극 받는 상황에서 CEC를 투여하여도 천식 완화효과가 있음을 확인하였다.

기도과민성은 천식의 특징 중 대표적인 것으로 규명되어 있다(43). 본 연구에서는 현재 기도과민성 등 기도의 기능을 평가하기 위해서 주로 이용되고 있는 penh method와 flexivent system을 이용한 측정방법 중 flexivent system을 이용하여 측정하였다. 그 이유로 과거에는 penh method가 비용을 최소화하고 시간을 절약하며 희생되는 마우스 수를 줄일 수 있고, 사용하기에도 용이해서 보편적으로 폐 기능 측정에 사용되었으나(44, 45) 최근 penh 값이 기도저항성을 항상 정확하게 반영하는 것은 아니라는 증거들이 밝혀지면서 기도과민성을 더욱 더 정확하게 측정할 수 있는 방법의 필요성이 대두되었고(44, 45) flexivent system은 기도에 직접 관을 삽입한 후 컴퓨터를 이용하여 기도과민성을 측정하기 때문에 기도과민성을 정확하게 측정할 수 있는 방법으로 인정되고 있다. 한편 폐의 염증세포 중 특히 호산구의 증가는 기도과민성을 증가시키는데 중요한 역할을 한다고 보고되었다(46). 본 연구결과, 양성대조군에서 관찰되었던 폐포세척액 내의 호산구증가와 기도과민성의 증가가 CEC를 처리했을 시 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 또한 폐 조직의 병리학적 소견을 관찰하였을 때 기관지 주변의 염증세포의 침윤이 현저하게 감소한 것이 확인되었다. 이는 CEC가 천식 표현형의 대표적인 증상인 염증세포 즉, 호산구 증가와 그로 인해 유도되는 기도과민성을 억제함으로써 천식을 완화시킨다는

것을 시사할 수 있다.

IL-4는 Th2 반응을 대표하는 싸이토카인으로 B세포로부터의 IgE 생성을 활성화 시키고 호산구의 침윤을 촉진하며 미경험 T세포를 Th2 면역반응 관련 세포로 분화를 유도하는 등 염증반응에서 매우 중요한 역할을 한다고 알려졌다(47). IL-13 역시 IL-4와 함께 Th2 반응에 있어 대표적인 싸이토카인이다. 본 연구에서 CEC를 처리하였을 시 OVA로 유도 된 천식의 특징적인 반응인 Th2 싸이토카인 IL-4와 IL-13의 분비양상이 억제되는 것을 확인 하였다. 반면 CEC를 처리한 실험군 모두 Th1 싸이토카인인 IL-12와 IFN- γ 가 증가하였다. 이번 연구에서 시료물질로 사용된 예쁜꼬마선충에서 분비되는 단백질 중 하나인 cystatin은 사람의 말초혈액 단핵구의 IFN- γ 와 IL-12 생산을 증가시키고 카텡신 B를 억제하여 Th1 세포의 발현을 활성화시킨다고 알려졌다(48). 이러한 연구결과는 예쁜꼬마선충의 조항원이 Th1 반응을 강화하여 Th2 반응으로 인해 유발되는 알레르기성 기도 염증반응을 억제할 수 있을 것이라는 가능성을 제시해준다(49). 이러한 추론은 최근에 발표된 연구결과에 의해 증명되었는데, 예쁜꼬마선충의 조항원을 천식모델 마우스에 OVA와 함께 감각시켰을 때 천식의 유발이 억제됨이 확인되었다(41).

IgE는 알레르기성 천식을 유도하고 발전시키는데 매우 중요한 역할을 하는 요소로 알려져 있다(50). 혈청 내 증가된 IgE는 비만세포와 호염기성세포 표면에 있는 Fc ϵ Receptor I에 결합하게 되고(51) 이러한 결합으로 인해 사이토카인과 케모카인으로 잘알려진 히스타민, 프로스타글란딘, 류코트라이엔의 분비를 촉진한다(52, 53). 이렇게 분비된 히스타민은 염증을 유도하는 사이토카인과 B세포의 항체를 생성하는데 영향을 미친다고 알려졌다(54). 본 연구에서 CEC를 처리했을 시 양성대조군에 비교하여 혈청 내 총 IgE의 항체가가 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 이번 결과 역시 CEC의 투여가 천식의 대표적인 증상인 IgE의 증가를 억제하여 천식을 완화 시킨다는 것을 증명해주며 IgE 증가와 관련된 사이토카인인 IL-4의 감소 결과 역시 이 결과와 부합한다는 것을 설명하고 있다.

본 연구에서 예쁜꼬마선충 배양 시 OP50이라는 대장균을 영양원으로 사용하기 때문에 예쁜꼬마선충 조항원을 제작할 때 내독소(LPS)의 오염가능성을 배제할 필요가 있다. 따라서 조항원을 제작할 때 충체를 증류수로 5차례 이상 세척한 후 균질액을 만들었으며, 내독소 제거 젤을 사용하여 CEC에 오염되었을지도 모르는 내독소를 최대한 제거하고자 하였다. 이후 CEC 내의 내독소 농도를 측정된 결과

마우스 감작 시 사용되는 10 μg 의 CEC 내에 1 endotoxin unit/mg 미만임을 확인하여 내독소가 본 실험결과에 미치는 영향은 무시해도 좋은 것으로 판단되었다.

천식 모델 마우스에서 기도과민성, 기도 주위 염증, 호산구 증가, IgE 항체의 증가 등 천식의 다양한 표현형이 지속되는 기간은 표현형의 종류에 따라 차이가 있다. 한 연구결과에 의하면 BALB/c 마우스에서 OVA로 감작과 자극을 통해 천식을 유발한 뒤 5, 7, 9, 12주 후에 다시 OVA로 자극하여 기도과민성, 호산구증가 등 다양한 천식의 표현형을 관찰한 결과 기도과민성은 첫 OVA 자극시점으로부터 7주까지 유지된 반면(55) 호산구증가, 기도 염증, 혈청 내 OVA-특이 IgE 항체가 증가 등의 표현형은 첫 자극으로부터 12주까지도 지속됨이 관찰되었다(55). 이러한 연구결과를 바탕으로 본 연구에서는 천식에 이환된 마우스에서 최소 4주 동안은 기도과민성, 기도 주위 염증, 호산구 증가, IgE 항체가 증가 등 천식의 표현형이 지속될 것으로 생각하여 실험 3에서 마우스에 OVA를 이용하여 천식을 유발시킨 후 한 달 동안 추가적인 OVA 자극이 없는 상태에서 CEC의 천식 완화효과를 관찰하였다. 그 결과 한 달간 투여된 CEC의 총 용량에 비례하여 천식의 표현형이 모두 감소하였으나 투여빈도는 유의한 차이를 유발하지는 못하였다.

천식은 알레르기 항원에 대한 Th2 반응이 과도하게 활성화되어 유발되는 질환이므로 Th1 반응을 강화시키는 방법으로 알레르기성 기도 염증반응을 억제할 수 있을 것으로 기대된다(38). 따라서 Th1 반응을 강화하는 전략이 알레르기성 기도 염증반응을 개선하기에 좋은 치료법으로 사용될 수 있다. BALB/c 마우스에 천식을 유발할 때 OVA 감작 3일전부터 감작하는 동안 IFN- γ 를 기도에 분무하면 OVA-특이 IgE 항체의 감소, OVA-특이 IgG2a의 증가, OVA에 대한 피부반응 감소와 함께 정상 폐기능이 관찰되었다(44). 또, 1차 OVA 감작으로 인해 염증반응이 잘 유도된 26일~30일째에 IFN- γ 를 처리하였을 경우에도 OVA-특이 IgE 반응이 억제되고, OVA-특이 IgG2a가 증가하면서 기도과민성 유도가 억제되었다(44). 이러한 결과는 IFN- γ 를 기도에 전달함으로써 설령 OVA에 의한 1차 감작이 성공적으로 유도되었을지라도 알레르기 항원에 대한 이차 감작을 막아줄 수 있음을 의미하며, 이러한 효과에 CD4+ T 세포가 주 역할을 할 것으로 판단된다(56). 천식에 대한 IFN- γ 의 억제효과는 IFN- γ knockout 마우스를 사용한 실험에서도 증명되고 있다. IFN- γ knockout 마우스를 OVA로 감작 및 자극하고 8주 후에 관찰한 결과 기도과민성, 폐포세척액 내 호산구증가, 폐조직 내에 CD4+ T 세포가 증가하였으나 재조합 IFN- 을 OVA 자극 후 4주째에 시작하여 1주일 동안 치료하면 정상

마우스 수준으로 회복되었다(57). 이 결과는 IFN- γ 가 알레르기 항원으로 인해 유도된 기도 염증과 기도과민성을 정상 수준으로 회복하는 데에 중요한 역할을 함을 의미하며, 천식을 비롯한 알레르기 질환의 치료에 IFN- γ 를 사용할 수 있음을 시사해준다. 본 연구에서 CEC가 천식의 전형적인 면역반응인 Th2 싸이토카인의 증가와 Th1 싸이토카인의 감소현상을 역전시켜 천식 완화효과를 보이는데, IFN- γ 를 비롯한 Th1 면역반응이 천식 억제에 매우 중요한 역할을 함을 시사한다.

OVA로 천식이 유도된 OVA군에서 폐포세척액 내 염증세포가 PBS군에 비해 현저하게 증가하였는데 주로 호산구로 구성되어 있었다. 그러나 실험 1~3에서 CEC를 처치한 실험군 마우스에서는 폐포세척액의 염증세포가 유의하게 감소하긴 하였으나, 염증세포 중 대부분이 호산구 대신 대식세포로 구성되어 있었다(Figs. 4C, 8C, 12C). 폐포 내의 대식세포는 폐의 선천 면역반응에 중요한 역할을 하는 세포이지만, IFN- γ 와 IL-12와 같은 물질을 분비하거나 다른 세포와 직접 상호작용함으로써 알레르기성 천식을 억제할 수 있을 것으로 제안되고 있기도 하다(58). OVA로 감작시킨 마우스에서 폐포 대식세포를 제거하면 Th1 반응이 억제되고 Th2 반응이 더 유도되어 항원의 비강 내 자극으로 인해 염증반응과 기도과민성이 심해진 반면, 반대로

대식세포를 이입해주면 Th1 반응을 선택적으로 촉진하고 호산구증가를 유발하지 않음이 보고된 바 있다(59). 본 연구에서 CEC를 처리한 실험군에서 폐포세척액 내 호산구가 감소하고 대식세포가 증가함으로써 IL-12 분비가 증가하고 Th1 반응이 유도되어 천식의 유발과 진행을 억제했을 것으로 추측되나 대식세포의 역할에 대해서는 추후 연구를 통해 규명할 필요가 있다고 생각된다.

기생충 감염이 알레르기성 질환의 발달을 억제하는 면역학적 메커니즘을 관찰 할 때 IL-10이나 조절 T세포의 변화가 관찰되는데 마찬가지로 대식세포의 활성화 또는 면역억제성 B세포가 포함된다(1). 예를 들면 마우스에 선충의 하나인 *Acanthocheilonema viteae* 가 감염되었을 때 분비되는 시스타틴은 마우스를 알레르기성 기도염증으로부터 보호하고 소듐 텍스트란 설페이트로 유도된 대장염에서는 조절 T세포는 변화가 없지만 대식세포에 의한 IL-10의 생산을 증가시켜 질환을 완화시킨다(33). IL-10에 의해 조절된 알러르겐 유도성 기도 호산구 증가는 마우스에 OVA를 기도 감작시키기 4주 혹은 8주전에 *N. brasiliensis*를 감염시키면 감소한다(13). 그러나 선행연구에서 CEC를 처리한 천식모델 마우스 그룹의 폐포 세척액 내에서 IL-10의 증가는 관찰되지 않은 것으로 볼 때 이 과정에서 IL-

10이 CEC에 의한 천식유발 억제기전에 중요한 역할을 하지 않을 것으로 추측된다. 향후 연구에서는 CEC에 의해 천식의 유발이 억제되는 기전에서 IL-10의 역할을 명확히 밝히는 것이 필요하다고 생각된다.

이 연구에서 예쁜꼬마선충의 조항원이 급성 천식을 유도하면서 CEC를 함께 처리했을 때와 천식을 먼저 유도한 마우스에 치료목적으로 CEC를 처리했을 경우 모두 Th2 반응을 Th 1반응으로 유도하면서 알레르겐 특이적인 Th2 반응을 억제한다는 점이 관찰되었다. 그러나 기생충 항원의 종류에 따라 Th1과 Th2의 균형 조절은 다르게 나타난다. 예를 들어 *A. viteae*의 물질 중 하나인 ES-62는 기생충에서 얻을 수 있는 면역 조절 분자 중 최고로 꼽히며(1, 31) 마우스에서 기도염증을 억제시키고(34) 콜라겐으로 인해 유도되는 관절염에서는 콜라겐 특이적인 초기 염증 Th1 사이토카인의 분비를 억제한다(35). 반면 돼지회충의 두 가지 단백질 분획은 마우스에 실험적으로 유도시킨 천식에서 반대되는 영향을 미치는 결과를 보인다고 알려졌다(27). 알레르기를 유발하는 단백질분획인 APAS-3은 기도 내 호산구 침윤을 유발하며 IL-4와 IL-5, 그리고 AHR 유도과 같은 Th2 반응을 활성화시키는 반면 억제 단백질분획인 PAS-1은 APAS-3으로 유도된 기도 염증을 감소시킨다(27, 60). 본 연구에서 명확하게 밝히지는

못했지만 CEC내에도 기도 염증을 억제하는 구성요소가 있을 것이라 예상된다. 천식을 억제 시키는 CEC 내의 후보 물질로는 프로테아제 억제제인 시스테인, 포스포콜린이 포함된 단백질, 글리칸과 당지질 등이 있다(29, 33). 향후 연구에서는 CEC에서 천식을 억제하는 물질이 무엇인지 명확하게 밝혀내기 위하여 후보 단백질을 포함한 여러 물질로 실험을 진행할 필요가 있다.

이 연구에서 예쁜 꼬마 선충의 조항원이 마우스 천식 모델에서 알레르기 기도 염증을 완화시킨다는 것을 처음 밝혔다. 그러나 동물 모델에서 적용했던 이러한 결과를 사람의 질병에 적용하여 해석할 때에는 주의가 필요하고, 마우스에게서 발견되었던 현상을 사람의 천식질환에 응용하여 시도하기까지는 더 많은 연구가 뒷받침되어야 한다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서 관찰된 예쁜꼬마선충 조항원의 천식 증상 완화효과는 기생충 유래물질에 의해 유도되는 숙주 면역조절현상을 이해할 수 있는 기초지견을 제공하였고, 예쁜꼬마선충 조항원 중 천식완화기능을 가진 물질을 더 검색하여 규명한다면 천식질환을 조절할 수 있는 새로운 후보물질을 개발할 수 있는 가능성을 시사한다고 판단된다.

본 연구결과 예쁜꼬마선충의 조항원이 천식 모델 마우스에서 천식의

유발을 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 이미 천식이 유도된 상태에서도 천식 완화효과가 있음을 확인하였으며, 이러한 효과는 예쁜꼬마선충의 조항원에 의하여 Th1 반응이 증가됨으로써 천식으로 유도된 Th2 반응이 상대적으로 억제되는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Erb KJ. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? *Trends Immunol.* 2009 Feb;30(2):75-82.
2. Flohr C, Quinnell RJ, Britton J. Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease? *Clin Exp Allergy.* 2009 Jan;39(1):20-32.
3. Fallon PG, Mangan NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 2007 Mar;7(3):220-230.
4. Capron M. Effect of parasite infection on allergic disease. *J Allergy.* 2011 Jul;66 Suppl 95:16-18.
5. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ.* 2000 Feb;320(7232):412-417.
6. Kramer U, Behrendt H, Dolgner R, Ranft U, Ring J, Willer H, et

- al. Airway diseases and allergies in East and West German children during the first 5 years after reunification: time trends and the impact of sulphur dioxide and total suspended particles. *Int J Epidemiol.* 1999 Oct;28(5):865–873.
7. Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M, Jr., Alcantara L, Almeida MC, Schriefer A, et al. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth–infected patients with asthma. *J Infect Dis.* 2004 Nov;190(10):1797–1803.
 8. Medeiros M, Jr., Figueiredo JP, Almeida MC, Matos MA, Araujo MI, Cruz AA, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 May;111(5):947–951.
 9. Dagoye D, Bekele Z, Woldemichael K, Nida H, Yimam M, Hall A, et al. Wheezing, allergy, and parasite infection in children in urban and rural Ethiopia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 May;167(10):1369–1373.
 10. van den Biggelaar AH, Rodrigues LC, van Ree R, van der Zee JS, Hoeksma–Kruize YC, Souverijn JH, et al. Long–term treatment of intestinal helminths increases mite skin–test reactivity in

- Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis.* 2004 Mar;189(5):892–900.
11. Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, Tilahun D, Girma S, Ali S, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case–control study. *Lancet.* 2001 Nov;358(9292):1493–1499.
 12. Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol.* 2009 Sep;167(1):1–11.
 13. Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, Ritze Y, Grunewald S, Tatsch U, et al. Helminth infection modulates the development of allergen–induced airway inflammation. *Int Immunol.* 2004 Apr;16(4):585–596.
 14. Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CA, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth–induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005 Nov;202(9):1199–1212.

15. Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Sep;174(5):514–523.
16. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*. 2005 Jan;54(1):87–90.
17. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson RA, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4):825–832.
18. Feary JR, Venn AJ, Mortimer K, Brown AP, Hooi D, Falcone FH, et al. Experimental hookworm infection: a randomized placebo-controlled trial in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2010 Feb;40(2):299–306.
19. Han ER, Choi IS, Choi HG, Kim HJ. Therapeutic effects of mycobacterial secretory proteins against established asthma in BALB/c mice. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012 Jul;4(4):214–221.
20. Taylor MD, LeGoff L, Harris A, Malone E, Allen JE, Maizels RM.

- Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol.* 2005 Apr;174(8):4924–4933.
21. Yang J, Zhao J, Yang Y, Zhang L, Yang X, Zhu X, et al. *Schistosoma japonicum* egg antigens stimulate CD4 CD25 T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. *Immunology.* 2007 Jan;120(1):8–18.
22. Kitagaki K, Businga TR, Racila D, Elliott DE, Weinstock JV, Kline JN. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol.* 2006 Aug;177(3):1628–1635.
23. Mangan NE, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J Immunol.* 2006 Jan;176(1):138–147.
24. Marsland BJ, Camberis M, Le Gros G. Secretory products from infective forms of *Nippostrongylus brasiliensis* induce a rapid allergic airway inflammatory response. *Immunol Cell Biol.* 2005 Feb;83(1):40–47.
25. McConchie BW, Norris HH, Bundoc VG, Trivedi S, Boesen A,

- Urban JF, Jr., et al. *Ascaris suum*-derived products suppress mucosal allergic inflammation in an interleukin-10-independent manner via interference with dendritic cell function. *Infect Immun*. 2006 Dec;74(12):6632-6641.
26. Pinelli E, Brandes S, Dormans J, Gremmer E, van Loveren H. Infection with the roundworm *Toxocara canis* leads to exacerbation of experimental allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2008 Apr;38(4):649-658.
27. Itami DM, Oshiro TM, Araujo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, et al. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy*. 2005 Jul;35(7):873-879.
28. Choi MH, Chang YS, Lim MK, Bae YM, Hong ST, Oh JK, et al. *Clonorchis sinensis* infection is positively associated with atopy in endemic area. *Clin Exp Allergy*. 2011 May;41(5):697-705.
29. Adisakwattana P, Saunders SP, Nel HJ, Fallon PG. Helminth-derived immunomodulatory molecules. *Adv Exp Med Biol*. 2009;666:95-107.
30. Kradin RL, Badizadegan K, Auluck P, Korzenik J, Lauwers GY. Iatrogenic *Trichuris suis* infection in a patient with Crohn

- disease. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 May;130(5):718–720.
31. Harnett W, Harnett MM. Therapeutic immunomodulators from nematode parasites. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e18.
 32. Vray B, Hartmann S, Hoebeke J. Immunomodulatory properties of cystatins. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Sep;59(9):1503–1512.
 33. Schnoeller C, Rausch S, Pillai S, Avagyan A, Wittig BM, Loddenkemper C, et al. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *J Immunol.* 2008 Mar;180(6):4265–4272.
 34. Melendez AJ, Harnett MM, Pushparaj PN, Wong WS, Tay HK, McSharry CP, et al. Inhibition of Fc epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes. *Nat Med.* 2007 Nov;13(11):1375–1381.
 35. McInnes IB, Leung BP, Harnett M, Gracie JA, Liew FY, Harnett W. A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *J Immunol.* 2003 Aug;171(4):2127–2133.

36. Imai S, Tezuka H, Fujita K. A factor of inducing IgE from a filarial parasite prevents insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice. *Biophys Res Commun.* 2001 Sep;286(5):1051–1058.
37. Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun.* 2005 Jan;73(1):166–173.
38. Bosnjak B, Stelzmueller B, Erb KJ, Epstein MM. Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses. *Respir Res.* 2011;12:114.
39. Yu M, Eckart MR, Morgan AA, Mukai K, Butte AJ, Tsai M, et al. Identification of an IFN-gamma/mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest.* 2011 Aug;121(8):3133–3143.
40. de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med.* 2004 Jul;200(1):89–98.
41. Kim SE, Kim JH, Min BH, Bae YM, Hong ST, Choi MH. Crude

extracts of *Caenorhabditis elegans* suppress airway inflammation in a murine model of allergic asthma. PLoS One. 2012;7(4):e35447.

42. Markaki M, Tavernarakis N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. Biotechnol J. 2010 Dec;5(12):1261–1276.
43. Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC, O'Byrne PM, Latimer K, Juniper EF, et al. Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance. J Allergy Clin Immunol. 1981 Nov;68(5):347–355.
44. Finkelman FD. Use of unrestrained, single-chamber barometric plethysmography to evaluate sensitivity to cholinergic stimulation in mouse models of allergic airway disease. J Allergy Clin Immunol. 2008 Feb;121(2):334–335.
45. Inman MD. Trends and recommendations in studies of mouse airway function. Clin Exp Allergy. 2010 Apr;40(4):524–527.
46. Horvat JC, Beagley KW, Wade MA, Preston JA, Hansbro NG, Hickey DK, et al. Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. Am J Respir

- Crit Care Med. 2007 Sep;176(6):556–564.
47. Chan LS, Robinson N, Xu L. Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2001 Oct;117(4):977–983.
48. Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, Schilling K, Hartmann S. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun.* 2003 May;71(5):2422–2429.
49. Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol.* 2003 Sep;33(11):1291–1302.
50. Hamelmann E, Tadedo K, Oshiba A, Gelfand EW. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness—a murine model. *Allergy.* 1999 Apr;54(4):297–305.
51. Gilmartin L, Tarleton CA, Schuyler M, Wilson BS, Oliver JM. A comparison of inflammatory mediators released by basophils of asthmatic and control subjects in response to high-affinity IgE receptor aggregation. *Int Arch Allergy Immunol.*

- 2008;145(3):182–192.
52. Zheng Y, Shopes B, Holowka D, Baird B. Dynamic conformations compared for IgE and IgG1 in solution and bound to receptors. *Biochemistry*. 1992 Aug;31(33):7446–7456.
53. Zheng Y, Shopes B, Holowka D, Baird B. Conformations of IgE bound to its receptor Fc epsilon RI and in solution. *Biochemistry*. 1991 Sep;30(38):9125–9132.
54. Oyoshi MK, He R, Kumar L, Yoon J, Geha RS. Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis. *Adv Immunol*. 2009;102:135–226.
55. Chang YS, Kim YK, Kim TB, Kang HR, Kim SS, Bahn JW, et al. Airway inflammation and allergen specific IgE production may persist longer than airway hyperresponsiveness in mice. *J Korean Med Sci*. 2004 Feb;19(1):69–73.
56. Lack G, Bradley KL, Hamelmann E, Renz H, Loader J, Leung DY, et al. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol*. 1996 Aug;157(4):1432–1439.
57. Yoshida M, Leigh R, Matsumoto K, Wattie J, Ellis R, O'Byrne PM,

- et al. Effect of interferon-gamma on allergic airway responses in interferon-gamma-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Aug;166(4):451-456.
58. Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Jul;31(1):3-7.
59. Tang C, Inman MD, van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, et al. Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol.* 2001 Feb;166(3):1471-1481.
60. Araujo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN-gamma, but not IL-12. *Cytokine.* 2008 Dec;44(3):335-341.

Abstract

Introduction: Epidemiological studies suggest an inverse relationship between helminth infections and allergic disease, and several helminth-derived products have been shown to suppress allergic responses in animals. This study was undertaken to evaluate the effect of a crude extract of *Caenorhabditis elegans* on allergic airway inflammation in a murine model of asthma.

Methods: Allergic airway inflammation was induced in BALB/c mice by sensitization with ovalbumin. The effect of *C. elegans* crude extract on the development of asthma and on established asthma was evaluated by analyzing airway hyperresponsiveness, serum antibody titers, lung histology and cell counts and cytokine levels in the bronchoalveolar lavage fluid.

Results: When mice were sensitized with ovalbumin together with the crude extract of *C. elegans* cellular infiltration into the lung was dramatically reduced in comparison with the ovalbumin-treated group. Treatment of mice with the *C. elegans* crude extract

significantly decreased methacholine-induced airway hyperresponsiveness and the total cell counts and level of IL-4, IL-5 and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid but increased the level of IFN- γ and IL-12. Moreover, injection of the *C. elegans* crude extract significantly diminished the total IgE response.

Conclusions: The crude extract of *C. elegans* also suppressed the airway inflammation associated with established asthma. This study provides new insights into immune modulation by the *C. elegans* crude extract, which suppressed airway inflammation in mice not only during the development of asthma but also after its establishment by skewing allergen-induced Th2 responses to Th1 responses.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, asthma, airway hyperresponsiveness, airway inflammation, asthma induced mice, Th1 responses, Th2 responses

Student number: 2008 – 30556