creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

의학석사 학위논문

미세먼지 노출에 의한 천식 악화: 마우스모델 기반 폐 면역세포 및 식염수 흡입의 치료효과 분석

2022년 8월

서울대학교 대학원

의학과 중개의학 전공

모 요 셉

미세먼지 노출에 의한 천식 악화: 마우스모델 기반 폐 면역세포 및 식염수 흡입의 치료효과 분석

지도교수 강 혜 련

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함
2022년 8월 5일

서울대학교 대학원

의학과 중개의학

모 요 셉

모요셉의 의학석사 학위논문을 인준함
2022년 7월 4일

위 원 장 _____ 강병철 _____ (인)

부위원장 _____ 강혜련 _____ (인)

위 원 _____ 서동인 _____ (인)

초 록

천식은 기침, 호흡곤란, 천명음을 특징으로 하는 기도의 만성 알레르기 질환이다. 최근 대기오염 등 환경적 요인에 의해 천식의 유병률이 증가하고 있는데, 특히 미세먼지(particulate matter, PM)의 주된 구성성분 중 하나인 디젤 분진 입자(diesel exhaust particle, DEP)는 폐기능 감소 및 천식 악화와 관련이 있다. 하지만, DEP가 천식의 악화를 유발하는 면역학적 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않으며, 특히 DEP가 최일선 방어체계인 선천면역계에 어떤 영향을 미쳐 면역반응이 시작되도록 하는지는 아직 모르는 부분이 많다. 근래 미세먼지에 의한 건강 문제가 사회적인 문제가 되고 있으나 노출을 최소화하는 것 외에 해결법이 마련되어 있지 않다. 식염수 세척은 알레르기 비염의 증상을 완화하고 점막 기능을 회복시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 천식에 대해 효과가 입증된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 DEP 기도 자극에 의한 대식세포, 선천성 림프구 세포(innate lymphoid cell, ILC), T세포 아형 및 사이토카인 변화를 확인하여 DEP가 기도 면역계에 미치는 영향을 확인하고, 이러한 면역계 변화에 대한 식염수 흡입의 효과를 평가하였다.

6주령 BALB/c 암컷 마우스를 0일과 7일에 100 μg 난알부민(ovalbumin, OVA)과 2 mg aluminum hydroxide를 복강 내로 투여하여 감작시킨 다음, 14, 15, 16일에 50 μg의 OVA를 비강으로 투여하여 천식을 유발하였다. 그 후 연무 흡입 장치를 이용하여 DEP를 섞거나 섞지 않은 0.5% OVA를 3주에 걸쳐 10일간 투여하였고, 식염수 흡입군은 DEP 노출 후 식염수를 연무 흡입시켰다. 실험 40일째 희생 전 메타콜린 유발 검사를 통해 기도과민성(airway hyperresponsiveness)을 평가한 후, 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)과 조직학적 검사를 통해 폐의 면역세포 변화를 평가하였고, RT-qPCR을 통해 폐실질 내 mRNA 발현을 비교 분석하였다. 폐조직을 이용한 유세포 분석을 통해 대식세포, ILC 및 T세포 아형을 분석하였다. 또한 단핵구 유래 대식세포(monocyte derived macrophage, MoM)의 분석을 위해 마우스 골수에서 단핵구를 추출하여 대식세포로 분화시킨 후 DEP 처리 여부에 따른 mRNA 발현 수준을 비교 분석하였다.

기도과민성은 대조군에 비하여 OVA군과 OVA/DEP군에서 증가하였으며, 식염수 흡입은 OVA/DEP군의 기도과민성을 유의하게 개선했다. BALF로 평가한 기도염증은 OVA군에서는 호산구 우세가 두드러졌던 반면 OVA/DEP군에서는 호중구 염증이 우세하였고, 두 가지 염증세포 유입 모두 식염수 흡입으로 유의하게 감소하였다. 조직학적 분석에서 DEP 노출로 인한 염증세포 침윤 및 술잔 세포 증식, 폐 섬유화

소견의 유의한 증가를 확인하였으며, 이는 식염수 흡입으로 완화되었다. $CD4^+$ T세포 염증은 대조군과 비교하여 OVA 투여 후 유의하게 증가하였으며 DEP 노출은 이를 더욱 악화시켰다. 특히 OVA군과 비교하여 OVA/DEP군에서 $IL-13^+$, $IL-17A^+$ $CD4^+$ T세포 모두 유의하게 증가하여, DEP 노출이 Th2/Th17 혼합 면역반응과 연관성이 있음을 시사하였다. ILC 아형 분석에서도 OVA군보다 OVA/DEP군에서 $IL-5^+$, $IL-13^+$, $IL-17A^+$ ILC의 증가가 확인되었다. 이처럼 DEP 노출에 의해 악화된 T세포와 ILC 염증은 식염수 흡입에 의해 유의하게 개선되었다. 또한 OVA/DEP군에서 수지상 세포(dendritic cell, DC)의 항원 제시능이 제고되었고, Th2 면역반응을 유도하는 $Ly6c^-CD11b^+$ DC cDC2의 증가가 확인되었다. 대식세포의 경우, OVA/DEP군에서 $SiglecF^-CD11c^-$ $CD11b^+$ MoM이 증가하였으며, MoM 중 전형 MoM과 비전형 MoM 모두 증가하였는데 대식세포 분극에 따른 아형 분석에서는 M2c 대식세포가 증가하였다. 또한 *ex vivo* 실험 결과, DEP에 노출된 MoM에서 섬유화를 유도하는 유전자 발현의 증가가 관찰되었다. 식염수 흡입은 OVA/DEP군에서 폐내 DC, MoM을 감소시키는 한편, M2c 활성화를 억제하였다.

결론적으로 DEP는 T2 천식에서 선천면역세포인 ILC 아형들과 MoM의 유입을 증가 및 활성화시켜 호중구성 염증과 Th17 면역반응을 유도한다. 이는 Th2/Th17 복합 천식으로 발전되며 식염수 흡입에 의해 완화될 수 있다.

주요어: 천식, 미세먼지, 선천 림프구 세포, 대식세포, 생리식염수, 흡입

학 번: 2020-21422

목 차

국문 초록 3

목차 5

표 및 그림 목차 6

제 1 장 서론 7

제 2 장 재료 및 방법 9

제 3 장 연구 결과 19

제 4 장 고찰 28

제 5 장 결론 32

참고문헌 33

Abstract 37

표 목차

[Table 1] Physical and chemical properties of diesel exhaust particle products 10

[Table 2] A list of RT-qPCR primers used for murine samples 12

[Table 3] Antibodies used in flow cytometry 13

[Table 4] Primer sequences used in qPCR amplification 16

그림 목차

[Figure 1] Asthma model construction, diesel exhaust particle (DEP) exposure, and saline treatment scheme 11

[Figure 2] T cell and innate lymphoid cell (ILC) gating methods for flow cytometry 14

[Figure 3] Macrophage gating methods for flow cytometry 15

[Figure 4] $Ly6c^{+}$ or $Ly6c^{-}$ monocyte derived macrophage (MoM) *in vitro* experimental scheme 17

[Figure 5] *In vitro* experimental conditions 18

[Figure 6] Asthma exacerbation from diesel exhaust particle exposure and improvement by saline inhalation 19

[Figure 7] Changes in effector cells in the lungs from diesel exhaust particle exposure and the improvement effect by saline inhalation 21

[Figure 8] Changes in cytokines and chemotaxis in the lungs from diesel exhaust particle exposure and the improvement effect by saline inhalation 22

[Figure 9] DC and their subtype changes due to diesel exhaust particle and the improvement effect of saline inhalation 23

[Figure 10] Alterations of macrophage subtype populations in the lung from diesel exhaust particle (DEP) exposure and saline inhalation-mediated control 25

[Figure 11] Changes in macrophage activation from direct exposure to diesel exhaust particle (DEP) 26

[Figure 12] Changes in $Ly6c^{+}$ and $Ly6c^{-}$ MoM populations from diesel exhaust particle (DEP) exposure 27

제 1 장 서 론

천식은 기도의 만성 염증으로 가역적인 기도 폐쇄로 인해 호흡 곤란과 기도 개형이 나타나며 전 세계 3억 5천만명 이상에게 영향을 미치는 질병이다.[1] 병태생리학적으로 기관지 내 림프구, 호산구, 비만세포 등을 포함하는 염증세포의 침윤이 관찰된다. 천식은 다양한 표현형(phenotype)과 내재형(endotype)을 나타내는 이질적인 질환의 집단으로 주로 조력 T세포(helper T cell, 이하 Th세포)가 분비하는 사이토카인의 종류에 따라 T2 천식과 비T2 천식으로 나눈다.[2]

지난 수십년간 천식에서 주로 림프구의 역할에 대해 연구가 되었지만, 최근 대식세포(macrophage)가 천식의 병인 기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.[3] 대식세포는 대표적인 선천면역세포로 폐와 기도 내에 가장 많이 존재하는 염증세포이며 조직 내 항상성(homeostasis) 유지를 담당한다. 대식세포는 다양한 자극원에 반응하며, 자극에 따라 상이한 기능을 가진 M1, M2 대식세포로 분극화(polarization)하여 주어진 주변 상황에 적절하게 대처한다.[4,5] 대표적으로 Th세포가 분비하는 사이토카인은 대식세포에 작용하여 대식세포 분극화를 유도하는데, Th1세포는 M1 대식세포로, Th2세포는 M2 대식세포로 분화를 유도한다.[6] 일반적으로 M2 대식세포는 손상된 조직 복구 및 염증의 확산을 제한한다고 알려져 있다. 하지만, 천식 염증 하에서는 M2 대식세포에서 분비된 염증 매개체들이 기도과민성(airway hyperresponsiveness) 유발과 폐 내 호산구 유입에 관여함이 밝혀졌으며, 여러 연구에서 알레르기 천식 모델에서 M2 대식세포 활성화 표지자로 사용되는 *Chitinase-like protein 1*과 *Found in inflammatory zone protein*의 발현이 증가함이 보고되었다.[7,8] 이처럼 천식의 병인 기전에서 대식세포의 중요성이 대두되어, 천식에서 대식세포의 역할에 관심이 집중되고 있다.

미세먼지(particulate matter, PM)는 황산염, 질산염, 탄소성분 등으로 이루어진 대기 오염물질이다. 직경이 10 μm 이하인 미세먼지(PM_{10})와 2.5 μm 이하인 초미세먼지($PM_{2.5}$)는 기도에서 걸러지지 못하고 폐포(alveoli) 단위까지 침투하여 폐 기능의 저하와 호흡기 질환 악화에 영향을 미친다.[9] 체내에 침투된 PM은 산화 스트레스의 증가, 자율신경계 반응 및 염증 매개체들에 의한 전신 염증 반응을 유발할 뿐만 아니라, 기도 염증 및 개형과 알레르기 과민반응에 관여함으로써 천식이나 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)의 발생과 악화를 촉진한다. 실제로 PM의 노출이 호흡기 질환의 발병 및 악화 그리고 사망률 증가와 관련이 있다는 여러 임상연구결과가 보고되었다.[10,11] 지금까지 PM에 의한 천식의 악화기전을 밝히기 위해 많은 연구가 이루어졌지만, 대부분의 연구에서 기도 내로 직접 PM 용해물을 투여하여 실험 모델을 제작하였고,

이는 생리학적인 것과는 거리가 멀다는 한계가 존재한다. 따라서 본 연구에서는 디젤 분진 입자(diesel exhaust particles, DEP)를 연무(nebulization) 흡입하는 방식으로 보다 생리학적으로 타당한 모델을 만들어 실험을 진행하였다.

기도의 염증을 완화하기 위해서 여러가지 항염증약제들이 사용되고 있다. 식염수 비강 세척과 같은 비약물적 방법도 점막 위생을 개선시켜 알레르기 비염이나 만성비부비동염의 증상을 호전시키는 효과가 있다.[12] 상기도 점막은 하기도 점막과 조직학적으로 매우 유사하여 점막 세척은 하부 호흡기계의 염증에도 효과가 있을 것으로 예상되어 이를 검증하기 위한 연구가 필요하다.

본 연구는 천식 마우스 모델에 미세먼지의 주된 성분인 DEP를 연무 흡입시켜 DEP 노출을 유도하였고, 선천성 림프구 세포(innate lymphoid cell, ILC)와 대식세포를 비롯한 선천 면역세포 중심으로 DEP가 천식의 악화에 미치는 영향을 보았다. 또한 DEP에 의한 천식 악화에 대해 식염수 흡입이 치료 효과가 있는지 확인하였다.

제 2 장 재료 및 방법

마우스 천식 모델 제작

마우스는 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였고 모든 실험은 특정 병원균이 없는 환경에서 진행되었다. 실험은 기관 동물 보호 및 이용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받고 동물실험 윤리규정을 준수하여 진행되었다(19-0249-31A2). 마우스는 처리 조건에 따라 다음과 같이 5마리씩 5개의 군으로 나누었다: (a) phosphate-buffered saline (이하 PBS) 노출군(대조군), (b) ovalbumin (OVA) 유도 천식군(OVA군), (c) DEP를 3주 동안 10회 노출시킨 OVA군(OVA/DEP군), (d) 지속적으로 식염수를 흡입한 OVA/DEP군(OVA/DEP/saline)

천식 모델 제작 및 DEP 또는 식염수 연무 흡입

본 연구에 사용된 DEP (Gaithersburg, MD, USA)는 NIST에서 제작되었다. 10개의 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) 등으로 구성된 DEP 제품의 물리적, 화학적 정보는 아래와 같다(Table 1).

천식 모델 제작 및 흡입 프로토콜은 다음과 같다(Fig 1). OVA 100 μg과 aluminum hydroxide 2 mg (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 PBS 100 μL에 녹여 0일과 7일에 복강 내 감작시키고 재노출은 50 μg OVA로 14, 15, 16일간 비강 투여하여 천식 모델을 제작하였다. 이후 OVA 흡입 노출은 0.5% 농도로 3주 동안 이틀 간격으로 매회 1시간씩 10회 노출하였다. OVA/DEP군과 OVA/DEP/saline군은 노출 챔버의 부피를 고려하여 100 μg/m^3 농도로 50 mL PBS에 담아 1시간 했다. 이때, 입자크기의 균질성은 고려하지 않았다. *In vitro* 처리 시, 처리하기 전 6% DMSO (Sigma)에 녹인 후 10분간 초음파로 분쇄하여 사용하였다. OVA/DEP/saline 군에서는 DEP 노출 1시간 후 0.9% 생리식염수(JW Pharmaceutical Corporation, Seoul, Korea)을 1시간 동안 흡입시켰다. DEP와 식염수 모두 실온에서 노출하였으며 폐쇄된 챔버 시스템을 사용하였다(Fig. 1).

Table 1. Physical and chemical properties of diesel exhaust particle products

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES	
Descriptive Properties: Carbon Black	
Molecular Formula	Not applicable
Molar Mass (g/mol)	Not applicable
Odor: odorless	Not applicable
Odor threshold	Not applicable
pH	Not applicable
Evaporation rate	Not applicable
Melting point/freezing point (°C)	3680 (6656 °F)
Relative Density as Specific Gravity (water = 1)	1.7 to 2.1
Vapor Pressure (mmHg)	Negligible at 20 °F
Vapor Density (air = 1)	Not applicable
Viscosity (cP)	Not applicable
Solubility(ies)	Insoluble in organic solvents and water
Partition coefficient (n-octanol/water)	Not applicable
Particle Size (if relevant)	Not applicable
Thermal Stability Properties	
Autoignition Temperature (°C)	900 (1652 °F) layer
Thermal Decomposition	Not applicable
Initial boiling point and boiling range (°C)	4200 (7592 °F)
Explosive Limits, LEL	Not applicable
Explosive Limits, UEL	Not applicable
Flash Point	>500 °C PMCC
Flammability (solid, gas)	Not applicable

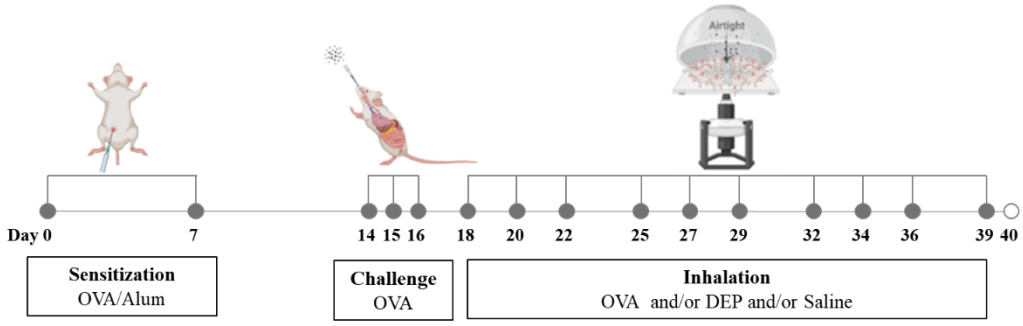

Fig. 1 Asthma model construction, diesel exhaust particle (DEP) exposure, and saline treatment scheme
After initial sensitization, mice were challenged with 0.5% OVA solution. Treatment groups were given 100 μg/m^3 DEP solution only or DEP in addition to normal saline by inhalation, 10 times for each group. DEP, diesel exhaust particle; OVA, ovalbumin.

기도과민성 평가

39일째 마지막 DEP 노출 24시간 뒤 기도저항성을 측정하였다. 기도저항성은 Buxco® FinePointe Resistance and Compliance (Data Sciences international, New Brighton, USA)를 사용하여 침습적으로 측정하였다. Entobar (Hanlim, Seoul, Korea)를 이용하여 50 mg/kg 조건으로 마우스를 마취시킨 후, PBS를 5분간 노출시키고 3분간 측정하였고 이후 methacholine (Sigma) 0, 10, 20, 40 mg/mL를 연무시켜 노출시킨 뒤 기도저항(lung resistance, R_L)을 측정하였다. 측정한 R_L값은 기저치로부터 변화량을 백분율로 환산하여 그래프화 하였다.

기관지폐포세척액 수득 및 분석

기도저항성 측정 후 마취된 마우스에서 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 수득하고 폐를 분리하여 조직을 얻었다. 총 1.8 mL PBS를 기관 내 삽관을 통해 주입하여 BALF를 얻고 4℃에서 15분간 3,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 이후, 0.1 mL PBS에 세포를 풀고 혈구계산기를 이용하여 총 세포수를 측정하였다. 염증세포 분획 계수를 위해 cytocentrifugation 기계(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 이용하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하고, Diff-Quik (Systmex Co., Kobe, Japan)으로 염색한 뒤 각 슬라이드 내 300개 이상의 세포에서 대식세포, 호산구, 호중구, 림프구 수를 평가하였다.

조직학적 분석

폐 내 염증상태를 확인하기 위해 마우스 왼쪽 폐를 2% paraformaldehyde에 고정하고 파라핀에 매립하여 샘플을 제작하였다. 제작한 샘플을 4 μm 두께로 절단하여 hematoxylin & eosin (H&E)과 periodic acid–Schiff (PAS)와 masson trichrome (MT) 염색하였다. 각 염색에

대한 정량화는 염증세포 침윤, PAS 양성, 폐 섬유화 정도를 기준으로 나타냈다(Table 2).[13-15]

Table 2. Score standard for histological analysis

Scocring system			
Score	Histologic scores	PAS scores	Fibrosis scores
	Standard	Standard	Standard
0	Normal	< 0.5% PAS positive cells	No fibrosis
1	Few cells	< 25% PAS positive cells	Mild fibrosis
2	A ring of inflammatory cells 1 cell layer deep	25-50% PAS positive cells	Moderate fibrosis
3	A ring of inflammatory cells 2-4cell layer deep	50-75% PAS positive cells	Severe fibrosis
4	A ring of inflammatory cells of > 4 cells	> 75% PAS positive cells	

유세포 분석

단일 세포 준비를 위해 마우스 폐 조직을 잘게 다진 후 37℃에서 1시간 30분 동안 1 mg/mL collagenase type 4 (Worthington, Lakewood, USA)와 0.5 mg/mL DNase I (Sigma)를 함께 반응시켰다. 이후 RBC lysis buffer (Sigma) 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 단일 세포 현탁액에서 세포 배양 플레이트에 1×10^6 cell/well 조건으로 배양한 후, 수득하여 LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences)과 FlowJo 10 software (TreeStar, Woodburn, USA)를 통해 분석하였고 각 면역세포 분석을 위해 사용된 mAb는 Table 3과 같다. 각 세포별 염색 방법은 아래와 같다.

1. T 세포 및 ILC 분석

T 세포 내 사이토카인과 전사인자 염색은 $1x10^6$개를 96 well plate에 분주한 후 100 ng/mL phorbol myristate acetate (Sigma), 1 μg/mL ionomycin (Sigma), 0.75 μL/mL GolgiStop (BD science, San Jose, USA) 조건으로 3시간 자극하였다. 배양이 끝난 후 세포 수득하여 5분간 Fc receptor binding inhibitor antibody (BD science)를 4˚C 처리한 후 세척하여 다음의 항체들로 세포 표면을 염색한 후 세척하였다: BV650-conjugated anti-CD45, FITC-conjugated anti-lineage (CD3ε, CD11c, CD19. CD49b, FcεRa, F4/80, CD11b) or anti-CD3, BV78-conjugated anti-CD4, PE-Cy7-conjugated anti-CD90.2, PE-conjugated anti-CD8. 그 후 세포막 및 핵막 투과화를 Cytofix/Cytoperm kit (BD science)를 이용해 permeabilization을 4℃에서 30분간 실시하였다. 세척 후 다음의 항체로 사이토카인과 전사인자 염색을 진행하였다: PerCP/Cy5.5-conjugated anti-IFN-γ 또는 anti-Foxp3, APC-conjugated anti-IL-5, PE-conjugated anti-IL-13, BV421-conjugated anti-IL-17A. T세포와 ILC의 게이팅 방법은 Fig. 2에 제시하였다.

2 대식세포 분석

1x10^{6}개로 분주한 세포를 Fc receptor binding inhibitor antibody (BD science)를 4˚C에 5분간 처리한 후 세척하여 다음의 항체들(Biolegend, San Diego, USA)로 표면을 염색하였다. FITC-conjugated anti-CD86, PE/Cy7-conjugated anti-CD206, PE-conjugated anti-F4/80, APC-conjugated anti-MHC II (I-Ab), BV421-conjugated anti-SiglecF, BV510-conjugated anti-Ly6C, BV650-conjugated anti-CD45, BV711-conjugated anti-CD11c, BV785-conjugated anti-CD11b. 대식세포의 게이팅 방법은 Fig. 3에 제시하였다.

Table 3. Antibodies used in flow cytometry

Macrophage staining		
Name	**Fluorescence**	**Company**
CD45	BV650	Biolegend (Biolegend, San Diego, CA)
MHCII(I-Ad)	APC	
SiglecF	BV421	
Ly6c	BV510	
CD11c	BV711	
CD11b	BV785	
CD86	FITC	
F4/80	PE	
CD206	PE-Cy7	

CD8$^+$ T cell & T regulatory cell staining		
Name	**Fluorescence**	**Company**
CD45	BV650	Biolegend (Biolegend, San Diego, CA)
IFN-γ	APC	
CD25	BV421	
CD4	BV785	
CD3	FITC	
CD8	PE	
Foxp3	PerCP-Cy5.5	

CD4$^+$ T cell & ILC staining		
Name	**Fluorescence**	**Company**
CD45	BV650	Biolegend (Biolegend, San Diego, CA)
IL-5	APC	
IL-17	BV421	
IFN-γ	PerCP-Cy5.5	
CD4	BV785	
Lineage	FITC	
IL-13	PE	
CD90.2	PE-Cy7	

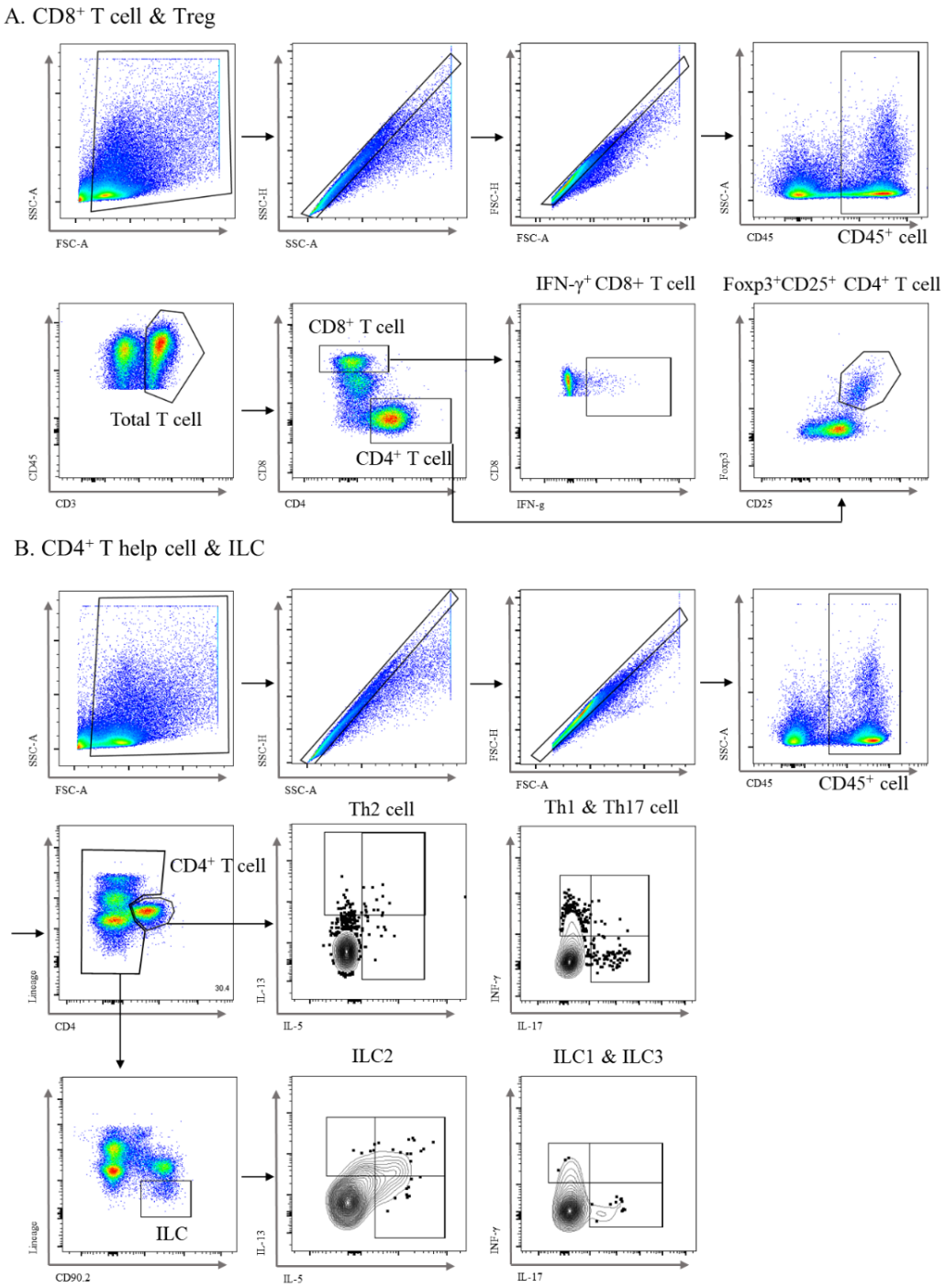

Fig. 2 T cell and innate lymphoid cell (ILC) gating methods for flow cytometry

Gating strategy for T cells and ILCs. (A) Single cell suspensions prepared from OVA-induced mouse lungs were stained with antibodies against T cell markers. CD45 was used to define the lymphocyte population. After live lymphocytes were gated from CD45 cell, CD3 was used to define the total T cells. T cells were further subdivided into $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells. Tregs were then defined by gating $Foxp3^+CD25^+$ cells from $CD4^+$ cells in CD4 versus CD8 scatter plots. (B) Similarly, CD45 was used to define the lymphocyte population. Then, $CD4^+$ cells were defined from lineage versus $CD4^+$ T cell scatter plots, and ILCs were defined from lineage versus CD90.2 scatter plots. Both effector $CD4^+$ T cells and ILCs were determined by IL-5, IL-13, IL-17, and IFN-γ positivity. Fluorescence minus one controls were used for cytokine secreting cell gating. ILC, innate lymphoid cell; OVA, ovalbumin; Treg; regulatory T cell; IL, interleukin; IFN, interferon.

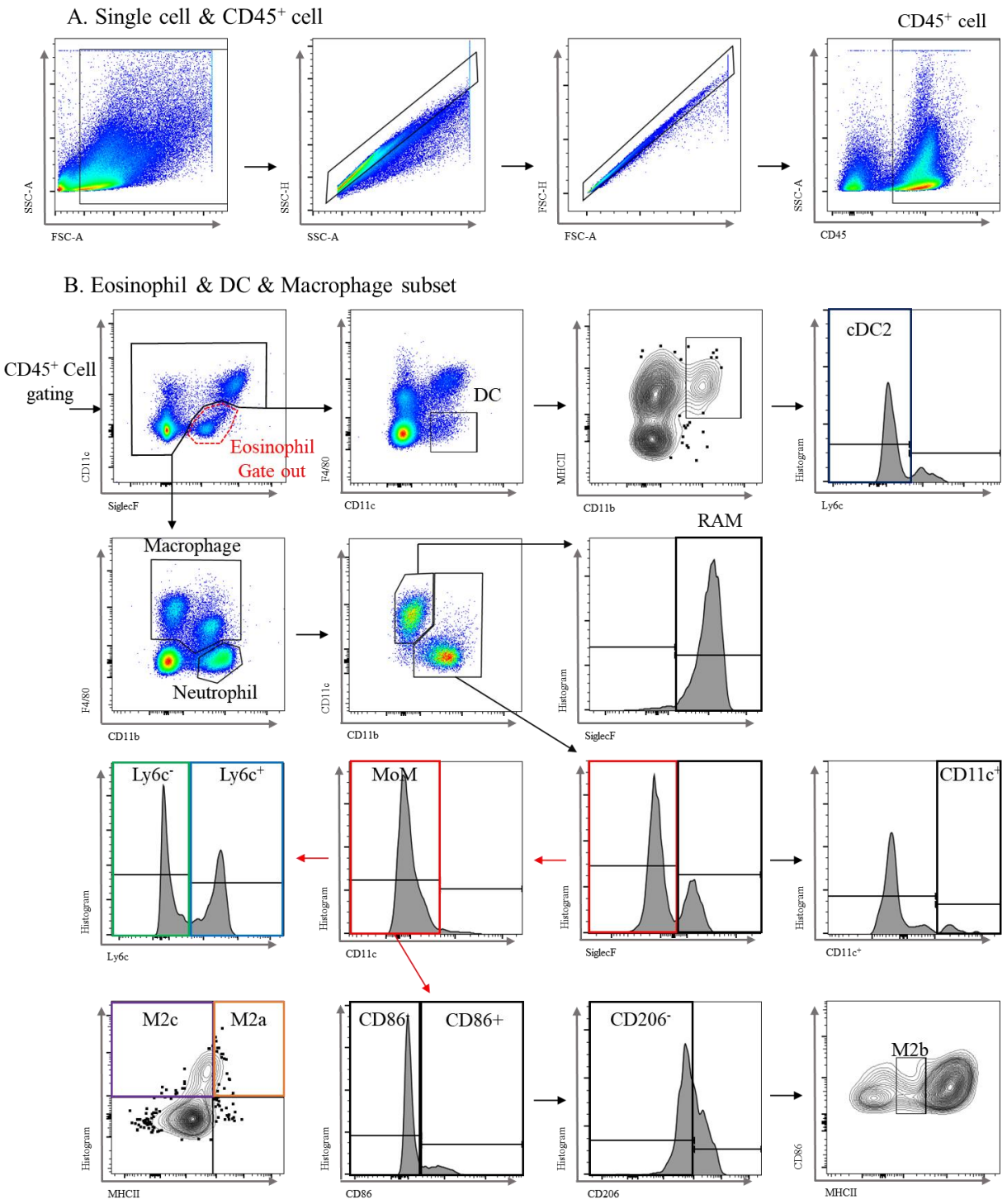

Fig. 3 Macrophage gating methods for flow cytometry

Gating strategy for macrophages. Single cell suspensions prepared from OVA-induced mouse lungs were stained with antibodies against macrophage markers. CD45 was used to define the lymphocyte population. After eosinophils were excluded from the CD11c versus SiglecF scatter plot, F4/80 was used to define the total macrophages. Macrophages were further analyzed by dividing by the CD11c versus CD11b marker. $CD11c^{+}CD11b^{-}$ and $CD11b^{+}$ macrophages were subdivided based on SiglecF $SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{+}$ and Ly6c marker expression; M2a, M2c, and M2b were further investigated within determined MoM. Fluorescence minus one controls were used for gating of macrophage subtypes. OVA, ovalbumin; MoM, monocyte-derived macrophages.

실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative real-time PCR)

Trizol (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 세포 및 조직의 RNA를 분리하였고, SensiMix II probe kit (Bioline, London, UK)를 이용하여 cDNA로 전환하였다. 전환한 cDNA는 각 Primer와 SYBR Green (Bioline)으로 함께 반응시켰고 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA)으로 측정하였다. ΔΔCt = (Ct mRNA - Ct GAPDH) 계산법을 사용하여 세포유지유전자(housekeeping gene)의 발현량과 비교 후 표준화하였으며 시료별 유전자 발현을 비교분석하였다. 이때 사용한 primer들은 Table 4에 제시하였다.

Table 4. Primer sequences used in qPCR amplification

Gene	Primer sequence
Gapdh	Forward primer: 5'-AGACTCCACGACATACTCAG-3'
	Reverse primer: 5'-ACGGCAAATTCAACGGCACA-3'
Il-13	Forward primer: 5'-GATCTGTGTCTCTCCCTCTGA-3'
	Reverse primer: 5'-GTCCACACTCCATACCATGC-3'
Ccl-11	Forward primer: 5'-TCC ACA GCG CTT CTA TTC CTG-3'
	Reverse primer: 5'-GGA GCC TGG GTG AGC CA-3'
Ccl-22	Forward primer: 5'-TAC ATC CGT CAC CCT CTG CC-3'
	Reverse primer: 5'-CGG TTA TCA AAA CAA CGC CAG-3'
Cxcl1	Forward primer: 5'-CTG GCC ACA GGG GCG CCT ATC-3'
	Reverse primer: 5'-GGA CAC CTT TTA GCA TCT TT-3'
Cxcl5	Forward primer: 5'-GGT CCA CAG TGC CCT ACG-3'
	Reverse primer: 5'-GCG AGT GCA TTC CGC TTA-3'
Il-10	Forward primer: 5'-AGA AAA GAG AGC TCC ATC ATG C-3'
	Reverse primer: 5'-TTA TTG TCT TCC CGG CTG TAC T-3'
Il-17a	Forward primer: 5'-GAA GGC AGG AAT CAC AAT C-3'
	Reverse primer: 5'-GCC TCC CAG ATC ACA GA-3'
Il-22	Forward primer: 5'-GAC CAA ACT CAG CAA TCA GCT C-3'
	Reverse primer: 5'-TAC AGA CGC AAG CAT TTC TCA G-3'
Il-23a	Forward primer: 5'-TCC GTT CCA AGA TCC TTC G-3'
	Reverse primer: 5'-GAA CCT GGG CAT CCT TAA GC-3'
Gata3	Forward primer: 5'-CCA GCT CAC AGT ATG GG-3'
	Reverse primer: 5'-CCA GCT CAC AGT ATG GG-3'
Tbx-21	Forward primer: 5'-AGC AAG GAC GGC GAA TGT T-3'
	Reverse primer: 5'-GGG TGG ACA TAT AAG CGG TTC-3'
Rorc	Forward primer: 5'-CCG CTG AGA GGG CTT CAC-3'
	Reverse primer: 5'-TGC AGG AGT AGG CCA CAT TAC A-3'
Ifn-γ	Forward primer: 5'-GGC CAT CAG CAA CAA CAT AAG CGT-3'
	Reverse primer: 5'-TGG GTT GTT GAC CTC AAA CTT GGC-3'
Muc5ac	Forward primer: 5'-CCATGCAGAGTCCTCAGAACAA-3'
	Reverse primer: 5'-TTACTGGAAAGGCCCAAGCA-3'
Irf-4	Forward primer: 5'-AGA TTC CAG GTG ACT CTG TG-3'
	Reverse primer: 5'-TGC CCT GTC AGA GTA TTT C-3'
Klf-4	Forward primer: 5'-CTG AAC AGC AGG GAC TGT CA-3'
	Reverse primer: 5'-GTG TGG GTG GCT GTT CTT TT-3'
Ccl1	Forward primer: 5'-CCATGAAACCCACTGCCAT-3'
	Reverse primer: 5'-GGAAGCTCTTTCTTCAAGGTG-3'
Il-6	Forward primer: 5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3'
	Reverse primer: 5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'
Itax	Forward primer: 5'-ACG TCA GTA CAA GGA GAT GTT GGA-3'
	Reverse primer: 5'-ATC CTA TTG CAG AAT GCT TCT TTA CC-3'

Table 4. (continued)

Cd86	Forward primer: 5'-CAGACTCCTGTAGACGTGTTC-3' Reverse primer: 5'-AACAGCATCTGAGATCAGCA-3'
Mrc-1	Forward primer: 5'-TATCTCTGTCATCCCTGTCTCT-3' Reverse primer: 5'-CAAGTTGCCGTCTGAACTGA-3'
Arg-1	Forward primer: 5'-GAATGGAAGAGTCAGTGTGGT-3' Reverse primer: 5'-AGTGTTGATGTCAGTGTGAGC-3'
Retnla	Forward primer: 5'-TGCCAATCCAGCTAACTATCC-3' Reverse primer: 5'-CACACCCAGTAGCAGTCATC-3'
Chi3l3	Forward primer: 5'-AGAAGCAATCCTGAAGACACC-3' Reverse primer: 5'-ACTGGTATAGTAGCACATCAGC-3'
Tnfsf-14	Forward primer: 5'-AGAAGCTGATACAAGATCAACGA-3' Reverse primer: 5'-CCATAACAGAGGTCCACCAAT-3'
Itgam	Forward primer: 5'-ACG TCA GTA CAA GGA GAT GTT GGA-3' Reverse primer: 5'-TCC CCA TTC ACG TCT CCC A-3'
Pparg	Forward primer: 5'-CTGCTCCACACTATGAAGACAT-3' Reverse primer: 5'-TGCAGGTTCTACTTTGATCGC-3'
Axl	Forward primer: 5'-AAC CTT CAA CTC CTG CCT TCT CGT-3' Reverse primer: 5'-ACA CAT CGC TCT TGC TGG TGT AGA-3'

단핵구 분리 및 배양

OVA 모델과 대조군의 골수를 얻고, 골수 내 세포는 주사기를 이용하여 획득한다. 획득한 골수 세포는 MojoSort™ Mouse Monocyte Isolation Kit (Biolegend)를 이용하여 단핵구만을 분리한다. 분리된 단핵구는 PE-conjugated Ly6c antibody (Biolegend)로 염색한 뒤 MojoSort Mouse anti-PE Nanobeads (Biolegend)를 이용하여 Ly6c 마커의 발현에 따라 두 군으로 분리한다. 분리한 두 군은 마우스 재조합 M-CSF (Biolegend)를 25 ng/mL 조건으로 5일 배양하여 단핵구 유래 대식세포 (monocyte derived macrophage, MoM)로 분화시켰다. 분화된 MoM은 하루동안 DEP 100 μg/m3을 노출한 후 분석하였다. 개요는 아래 Fig. 4와 같다.

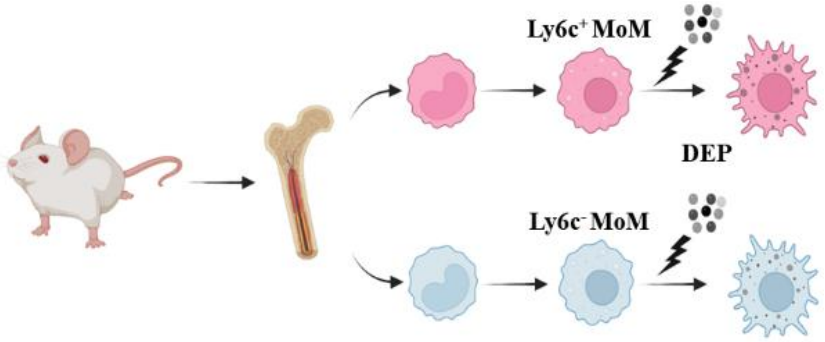

Fig. 4 Ly6c$^+$ or Ly6c$^-$ monocyte derived macrophage (MoM) *in vitro* experimental scheme

Monocytes extracted from mouse bone marrow were divided according to Ly6c marker expression, into Ly6c$^+$ or Ly6c$^-$ MoM, and exposed to DEP.

세포 배양

폐포 대식세포(alveolar macrophage, AM)의 *in vitro* 분석을 위해 CRL-2019 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 이용하였고 배지는 Roswell Park Memorial Institute 1640 (Biowest, Riverside, MO, USA)에 10% Fetal bovine serum (Biowest), 1% Penicillin-Streptomycin (Biowest) 조건으로 제작하였다. 세포 배양은 CO_2 5%, 37℃ 조건에서 3일마다 media를 교체하였고 자극 전 48 well plate에 1 x 10^5 cell/well 조건으로 배양하였다. 24시간 배양 후, DEP 50 또는 100 μg/mL 조건으로 24시간 처리하였다(Fig. 5).

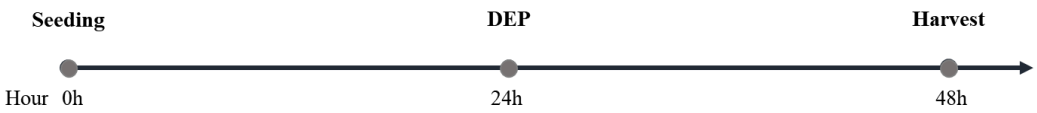

Fig. 5 *in vitro* experimental conditions

DEP was treated for one day, and the treatment conditions are 50 or 100 μg. DEP, diesel exhaust particle.

통계적 분석

모든 데이터는 평균과 표준오차(mean ± standard error of the mean)로 표현되었다. GraphPad Prism 10 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, USA)를 사용하여 통계값을 도출했으며 One-way ANOVA 검정을 사용하였다. 0.05보다 작은 P값을 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

3. 연구 결과

DEP에 의한 천식 악화 및 식염수 흡입의 개선 효과

기도과민성은 대조군에 비해 OVA군과 OVA/DEP군 모두 유의하게 증가하였으며 식염수 흡입은 OVA/DEP군의 기도과민성을 효과적으로 개선하였다(Fig. 6A). BALF 내 총세포수 역시 OVA군과 OVA/DEP군에서 증가했으며, 식염수 흡입은 두군 모두에서 총세포수의 감소효과를 나타냈다. 대식세포 수는 OVA/DEP군에서 유의하게 증가하였으나 식염수 흡입에 의한 감소효과는 확인되지 않았다. OVA군에서는 호산구 수 증가가 우세하였고, OVA/DEP군은 호중구 우세 염증을 보였는데, 이들 염증은 모두 식염수 흡입으로 개선되었다. 림프구는 OVA군에서만 높게 관찰되었다(Fig. 6B). 조직학적 분석 결과, 염증세포 침윤 및 점액의 분비 그리고 폐 섬유화 정도가 OVA/DEP군에서 가장 심했으며 이들 소견은 식염수 흡입에 의해 개선되었다(Fig. 6C, D).

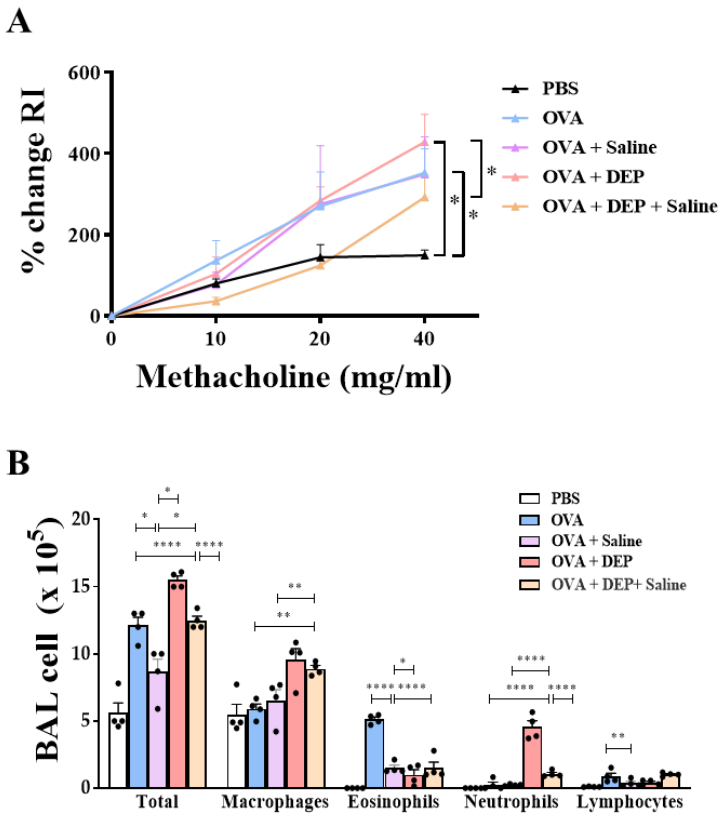

Fig. 6 Asthma exacerbation by diesel exhaust particle and improvement by saline inhalation

(A) Airway hyperresponsiveness was measured 24 h after the last challenge. (B) The number of total inflammatory cells, including macrophages, neutrophils, eosinophils, and lymphocytes in BALF.

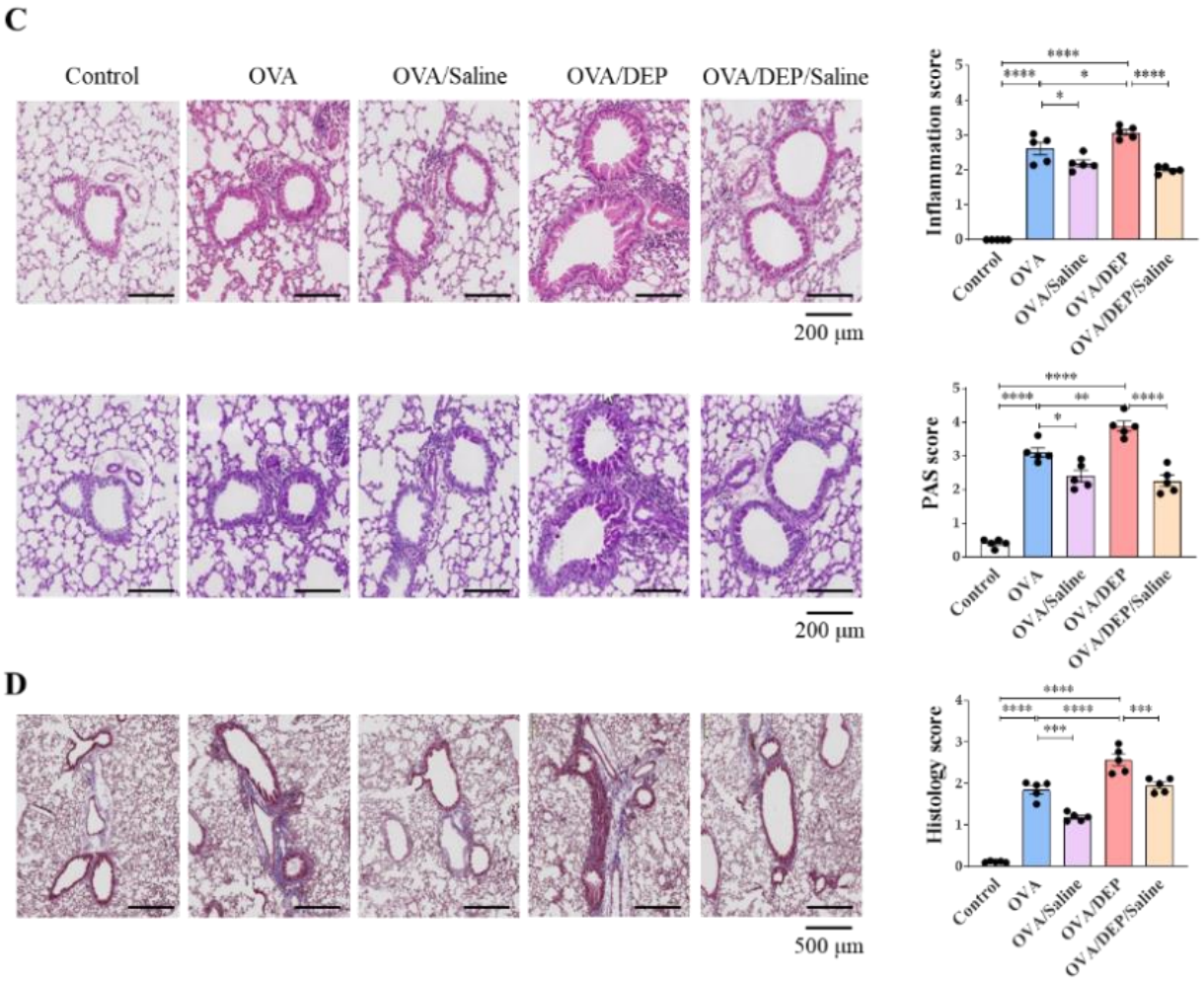

Fig. 6 Asthma exacerbation by diesel exhaust particle and improvement by saline inhalation (continued)

(C) H&E (100×), PAS staining (100×) and MT staining (4x) for lung histology and their respective inflammation scores in a murine asthma model. n = 5 for each group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; H&E, hematoxylin and eosin; PAS, periodic acid-schiff; MT, masson's trichrome.

DEP에 의한 T세포 및 ILC 활성화와 식염수 흡입에 따른 개선

$CD4^+$ T세포는 OVA군과 OVA/DEP군 모두에서 유의한 증가를 보였는데, 식염수 흡입은 OVA/DEP군의 T세포 증가를 유의하게 개선했다(Fig. 7A). OVA군과 비교하였을 때 OVA/DEP군에서 IL-13^+ Th2세포 및 Th1/Th17세포가 유의하게 증가했으며 식염수 흡입은 이를 완화시켰다(Fig. 7B). ILC의 경우, OVA군과 비교하여 OVA/DEP군에서 ILC2와 ILC3의 증가가 관찰되었으며 이는 식염수 흡입에 의해 개선되었다(Fig. 7C, D).

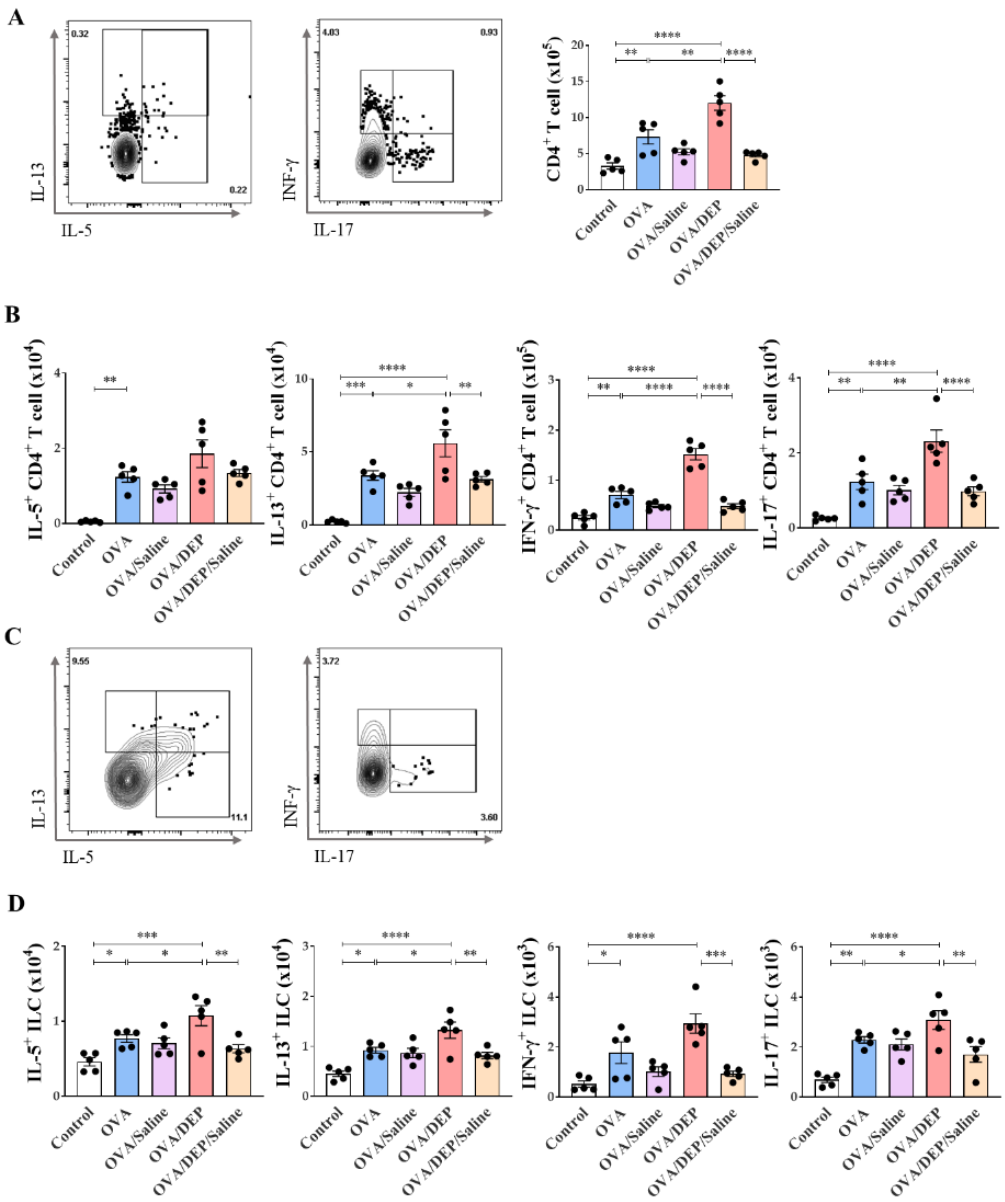

Fig. 7 Changes in innate and adaptive lymphoid cells in the lungs from diesel exhaust particle exposure and the improvement effect of saline inhalation

The number of (A) $CD4^+$ T cells, (B) IL-5^+ $CD4^+$ T cells, IL-13^+ $CD4^+$ T cells, IFN-γ^+ $CD4^+$ T cell and IL-$17A^+$ $CD4^+$ T cells in the lungs and their dot plots. (C, D) The number of IL-5^+ ILCs, IL-13^+ ILCs, IFN-γ^+ ILCs and IL-$17A^+$ ILCs in the lungs and their dot plots. n = 5 for each group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. IL, interleukin; IFN, interferon; ILC, innate lymphoid cell

DEP에 의한 폐 내 염증 관련 사이토카인 발현 증가와 식염수 흡입에 의한 개선

사이토카인 분비 증가를 폐 내 mRNA 수준으로 확인하였다. OVA군과 비교하여, Th2와 Th17 관련 사이토카인 및 마스터 조절인자가 OVA/DEP군에서 유의하게 증가했으며, 식염수 흡입에 의해 유의하게 개선되었다(Fig. 8A-C). *Il10* 발현은 OVA군에 비해 OVA/DEP군에서 유의하게 감소하였는데, 식염수 흡입은 저하된 *Il10* 발현을

회복시켰다(Fig. 7A). 호산구의 화학주성 관련인자인 *C-C motif chemokine 11* (*CCL11*)과 *CCL22*발현은 OVA군과 OVA/DEP군 간 차이가 없었으나, 호중구의 화학주성 관련 인자인 *C-X-C Motif Chemokine Ligand 5* (*Cxcl5*)과 *Cxcl1* 발현은 OVA/DEP군에서 유의한 증가를 보였으며, 식염수 흡입은 화학주성 관련 인자들의 발현을 의미있게 감소시켰다(Fig. 8D).

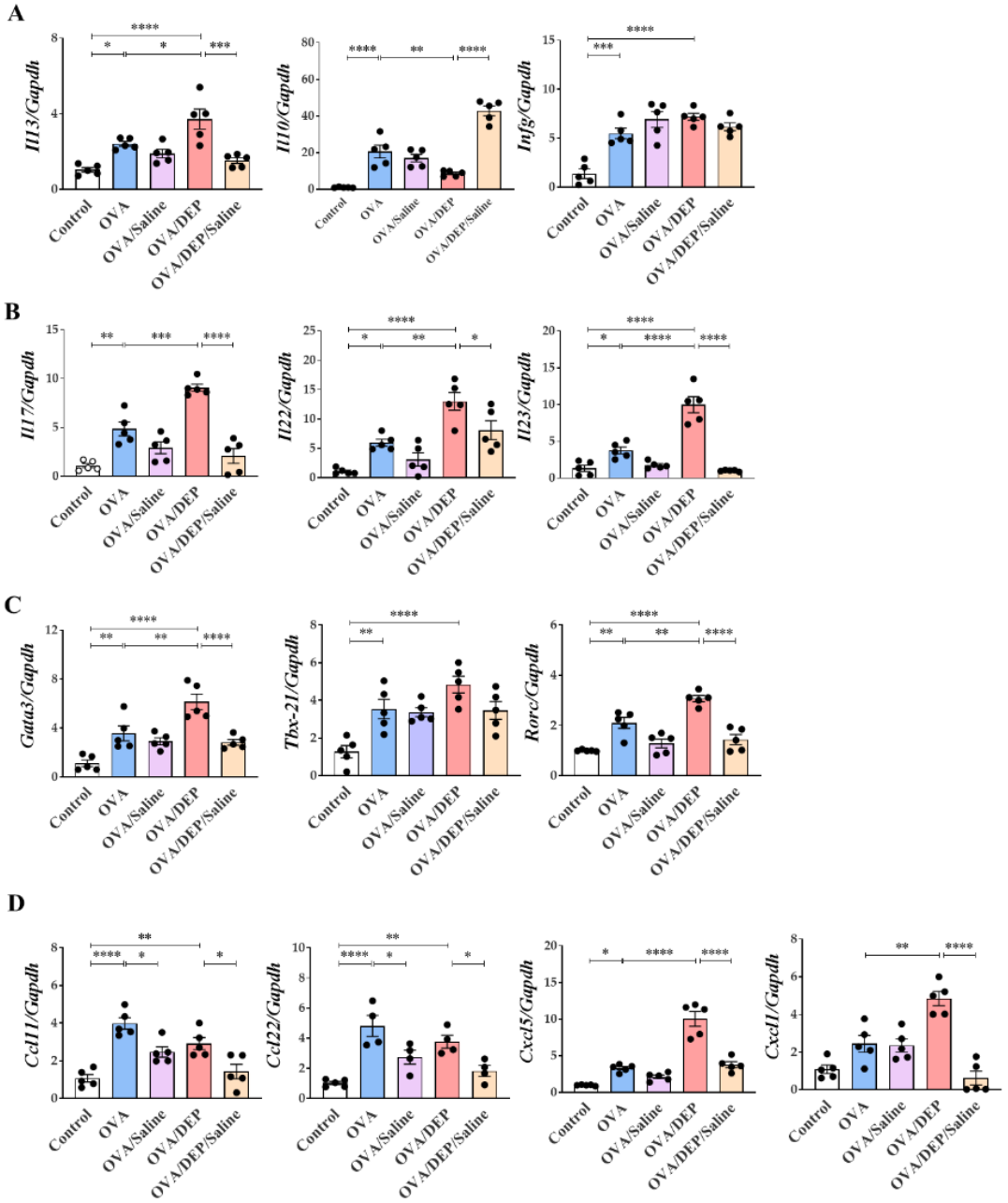

Fig. 8 Changes in cytokines and chemotaxis in the lungs from diesel exhaust particle exposure and the improvement effect of saline inhalation

(A) Changes in *Il13*, *Il10*, *Ifng*, (B) *Il17*, *Il22*, *Il23* (C) *Gata3*, *Tbx-21*, *Rorc*, (D) *Ccl11*, *Ccl22*, *Cxcl5* and *Cxcl1* gene expression in the lungs. n = 5 for each group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. *Il*, interleukin; *Ifn*, interferon; *Ccl*, C-C motif chemokine; *Cxcl*, C-X-C Motif Chemokine Ligand.

DEP에 의한 수지상세포 (dendritic cell, DC) 증가 및 식염수 흡입을 통한 개선

폐 내 DC의 변화를 유세포 분석으로 확인한 결과 OVA군에 비해 OVA/DEP군에서 F4/80$^-$ CD11c$^+$ DC가 유의하게 증가하였고, 특히 Ly6c$^-$MHCII$^+$CD11b$^+$ cDC2 증가가 두드러졌으며 cDC2 관련 유전자 발현여부에 영향을 미치는 master regulator로 알려진 *Irf4*, *Krf4*의 mRNA발현이 OVA/DEP군의 폐조직에서 상향 조절되었다(Fig. 9A-C). 이러한 OVA/DEP군에서 증가한 DC 및 관련 master regulator의 발현은 식염수 흡입으로 완화되었다.

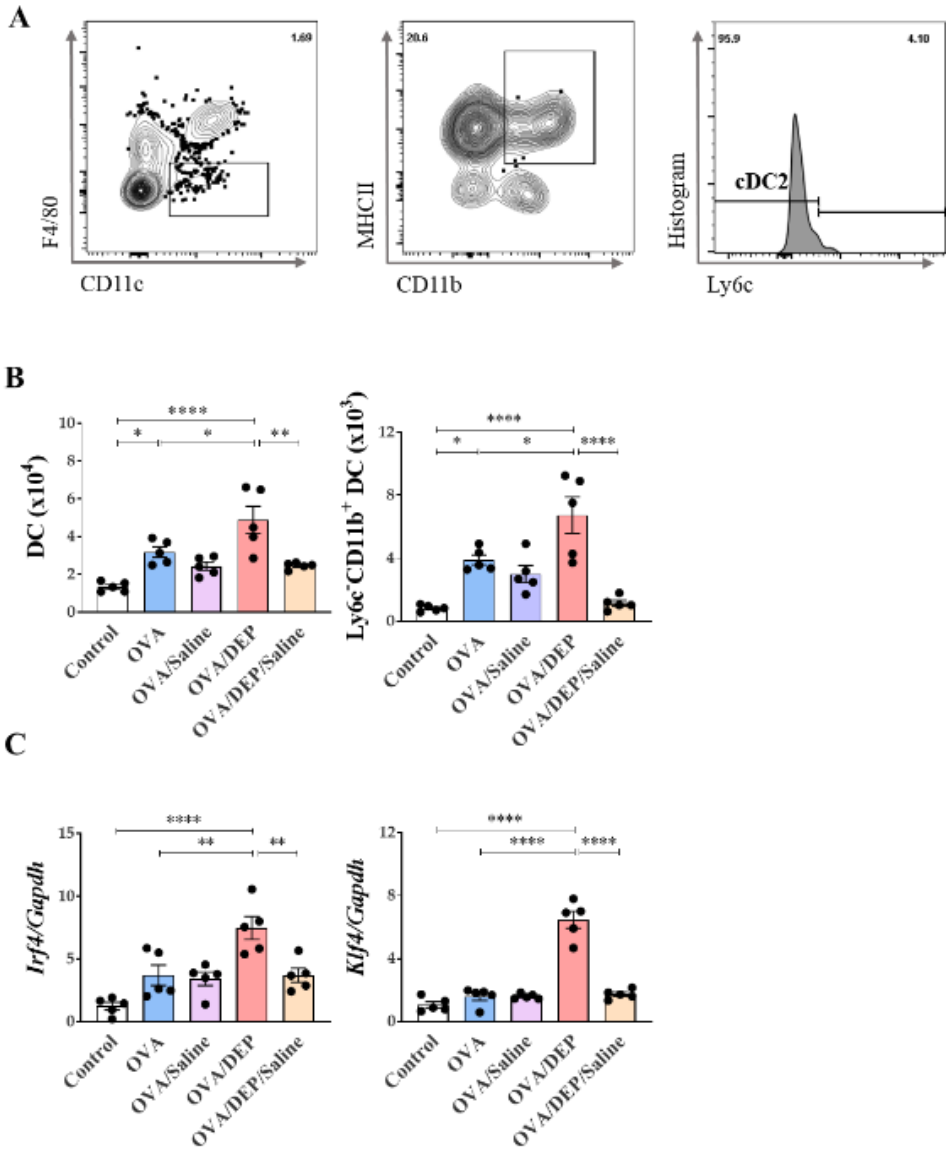

Fig. 9 DC and their subtype changes from diesel exhaust particle exposure and the improvement effect of saline inhalation

(A) Dot plot and histogram showing DCs and cDC2s population (B, C) The number of lung DCs and cDC2s and mRNA expression of master regulators regulating them. n = 5 for each group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. DC, dendritic cell; cDC2; type 2 conventional DC.

대식세포 활성화에 대한 DEP의 영향 및 식염수 흡입을 통한 개선

폐 조직 상주 대식세포(tissue resident macrophage)인 SiglecF^{+}CD11c^{+}CD11b^{-} 대식세포 수는 대조군에 비하여 모든 OVA 천식군들에서 유의미하게 감소하였다(Fig. 9A). 이행기 폐포대식세포(transient alveolar macrophage)인 SiglecF^{+}CD11c^{+}CD11b^{+} 대식세포의 수는 OVA/DEP군에서 가장 높았으며 이는 식염수 흡입에 의해 개선되었다(Fig. 10A). MoM인 SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{+} 대식세포는 OVA/DEP군에서 가장 높았으며 이들 역시 식염수 흡입에 의해 개선되었다(Fig. 10B). MoM은 Ly6c 발현 정도에 따라 세부 아형으로 나누었다. Ly6c^{+}SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{-}와 Ly6c^{-}SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{-} 대식세포 모두 OVA/DEP군에서 큰 폭으로 증가하였으며, 식염수 흡입이 이를 현저히 개선하였다(Fig. 10B). 이어 CD86과 CD206의 발현 정도에 따라 MoM의 세부 분극 아형을 분석하였다. M2a 대식세포로 알려진 MHCII^{+}CD206^{+}CD86^{-}의 수는 OVA군과 OVA/DEP군 모두 대조군에 비하여 증가하였고, OVA/DEP군에 식염수 흡입을 시켰을 때 개선 효과를 보였다. M2c 대식세포로 알려진 MHCII^{-}CD206^{+}CD86^{-} 대식세포는 OVA/DEP군에서만 대폭 증가하였으며, 식염수 흡입에 의해서 대조군 수준으로 감소하였다. M2b 대식세포로 알려진 MHCII^{+}CD206^{-}CD86^{+} 대식세포는 대조군과 비교하여 OVA로 유도된 천식군에서 유의하게 증가했지만 식염수에 의한 개선효과는 관찰되지 않았다(Fig. 10C).

DEP의 농도에 따른 대식세포 활성화 조절

DEP에 의해 조절되는 대식세포의 변화를 *in vitro* 실험으로 확인하였다(Fig. 10A). DEP 농도가 증가함에 따라 M1 대식세포의 활성화 표지자인 *Il6*, *Ifng*, *Itgax*, *Inos*의 mRNA 발현이 증가하였다(Fig. 11B). 반면, M2 대식세포 활성화 표지자인 *Mrc1*, *Arg1*의 mRNA 발현이 감소하였고 특히 M2b 대식세포의 활성화 표지자인 *Ccl1*, *Tnfsf14*, *Il10*의 mRNA 발현이 감소하였다(Fig. 11B). MoM 표지자인 *Itgam*의 발현은 DEP 농도에 비례하여 증가하였다(Fig. 11C).

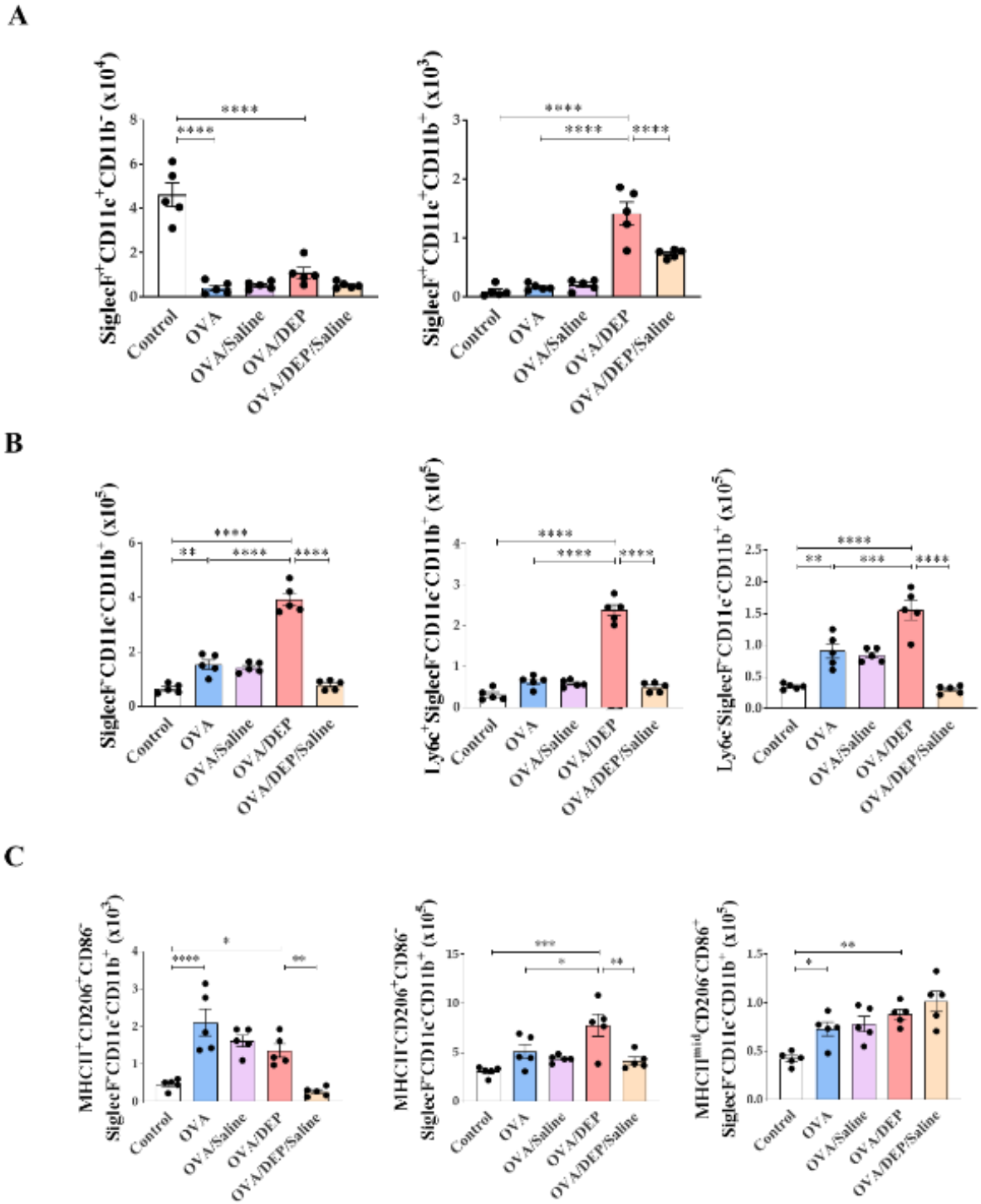

Fig. 10 Alterations of macrophage subtypes in the lung from diesel exhaust particle (DEP) exposure and saline inhalation-mediated control

(A) Change of $SiglecF^{+}CD11c^{+}CD11b^{-}$ macrophage and $SiglecF^{+}CD11c^{+}CD11b^{+}$ macrophage populations in the lungs. (B) Change of $SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{+}$ macrophages and their subtype populations in the lungs. (C) Change of M2 macrophage subtype populations in the lungs induced by DEP. n = 5 for each group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. DEP, diesel exhaust particle.

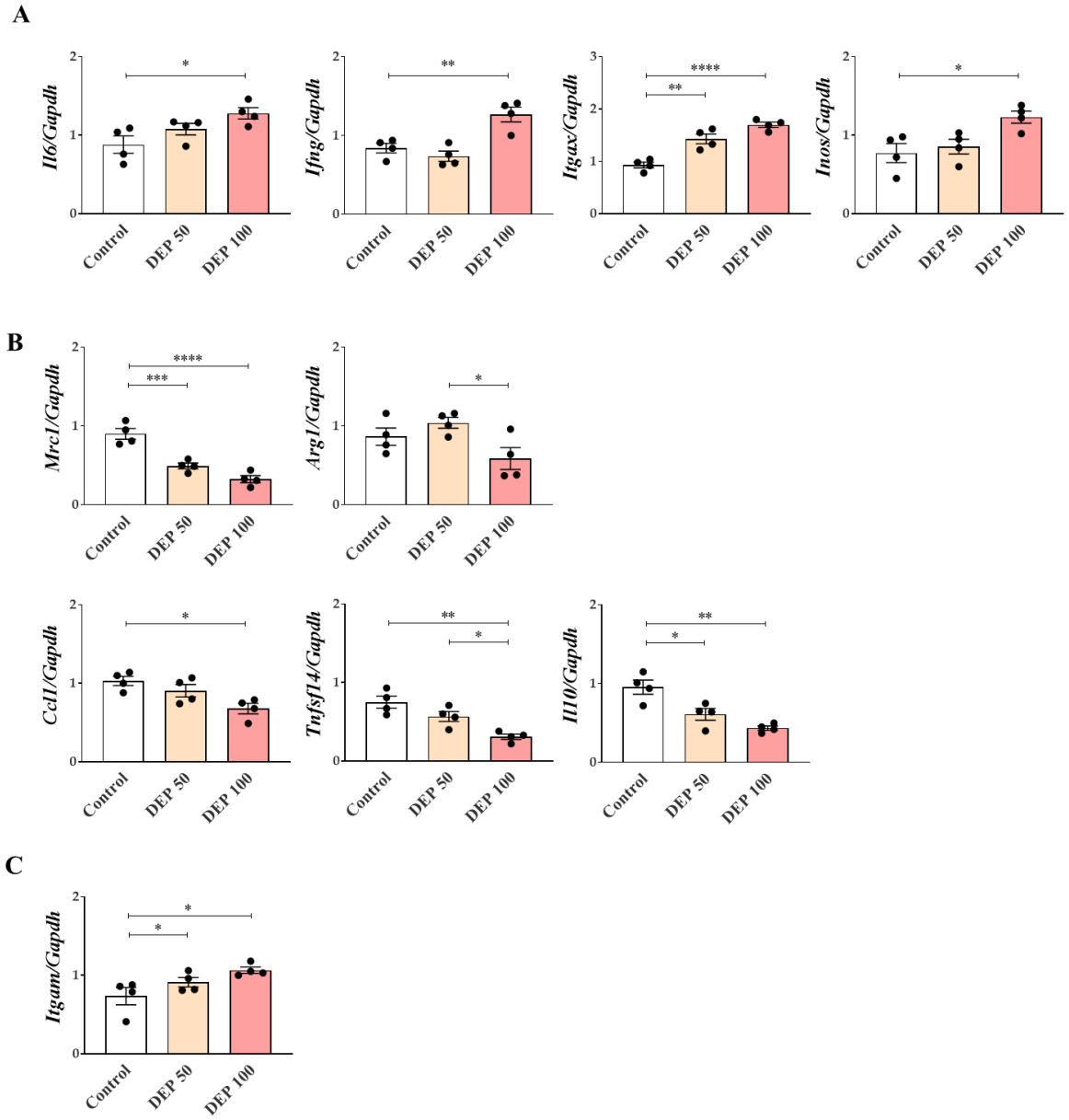

Fig. 11 Changes in macrophage activation from direct exposure to diesel exhaust particle (DEP).

Changes in mRNA expression of (A) *Il6*, *Ifng*, *Itgax*, *Inos*, (B) *Mrc1*, *Arg1*, *Ccl1*, *Tnfsf14*, *Il10*, (C) *Itgam* according to the amount of DEP exposure. n = 5 for each group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. *Il*, interleukin; *Ifn*, interferon.

DEP에 의한 Ly6c$^+$ 또는 Ly6c$^-$ MoM의 M2 대식세포 분화와 섬유화 항진

Ly6c 발현 정도에 따라 MoM 집단을 세부 아형으로 나누어, DEP가 각각의 아형에 미치는 영향을 비교분석 하였다. 대조군과 OVA 유도 천식 마우스의 골수에서 Ly6c$^+$ 또는 Ly6c$^-$ 단핵구를 분리하여 대식세포로 분화시킴으로써, 생체 외에서 MoM을 재현하였다. OVA 유도 천식 마우스 유래 MoM의 경우, DEP에 노출된 Ly6c$^+$ MoM과 Ly6c$^-$ MoM에서 *Mrc1*발현이 증가하였으며, 특히 Ly6c$^-$ MoM은 DEP 노출 후 *Chil3*와 *Arg1*의

발현이 증가하였다. 또한 Ly6c^{+} MoM과 Ly6c^{-} MoM 모두 DEP에 노출된 후, *Mmp12*, *Tgfb1* 발현이 증가함으로써 섬유화 유도능이 항진되었음을 알 수 있었다(Fig. 12A). 대조군에서 유래한 MoM의 경우에도 *Mrc1* 발현을 제외하고 유사한 결과를 보였다(Fig. 12B).

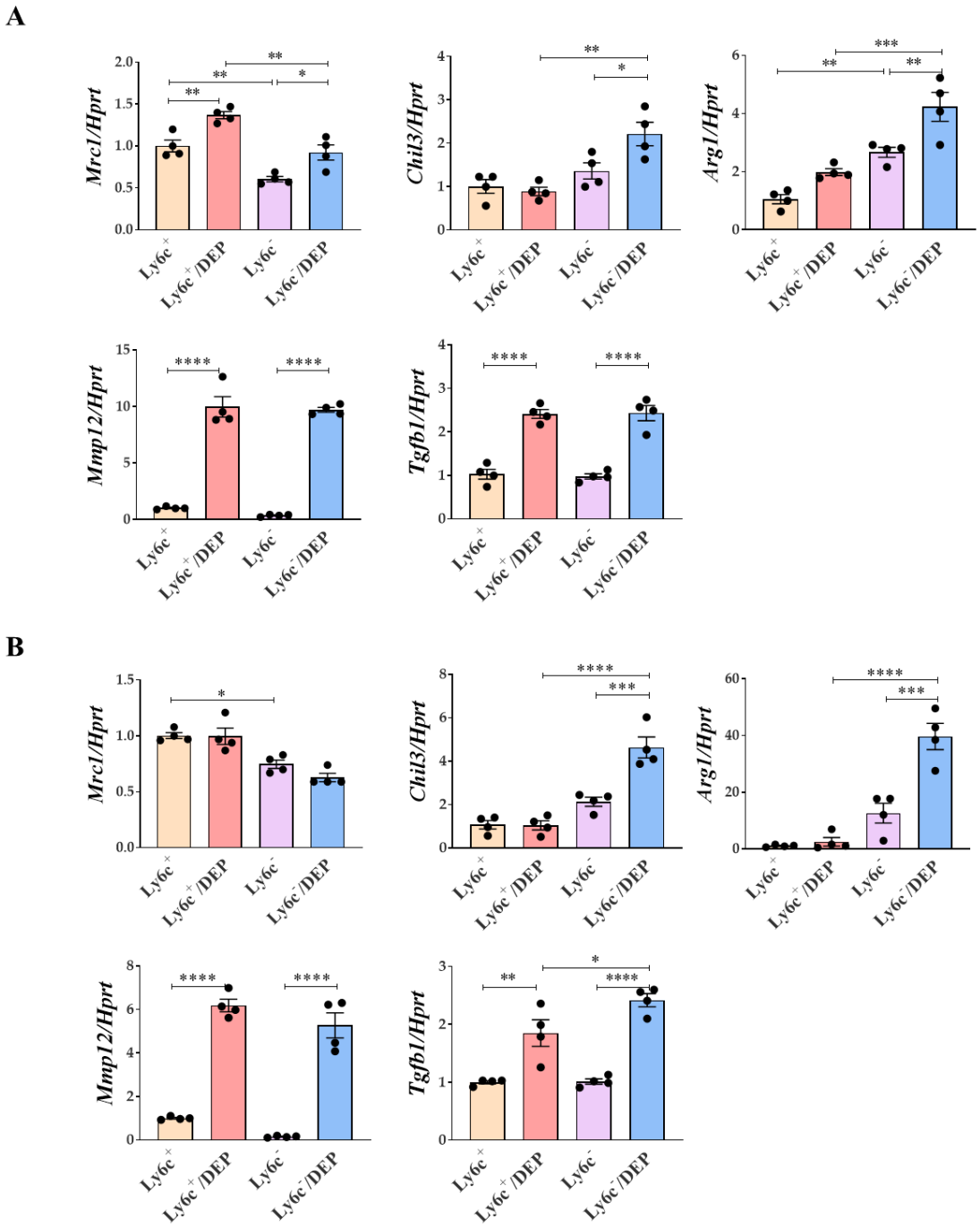

Fig. 12 Changes in Ly6c^{+} and Ly6c^{-} MoM populations from diesel exhaust particle (DEP) exposure

(A) Changes in *Mrc1*, *Chil3*, *Arg1*, *Mmp12*, *Tgfb1* mRNA expression in Ly6c^{+} and Ly6c^{-} MoM from OVA model according to DEP exposure. (B) Changes in *Mrc1*, *Chil3*, *Arg1*, *Mmp12*, *Tgfb1* mRNA expression in Ly6c^{+} or Ly6c^{-} MoM from the control group. n = 4 for each group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001. DEP, diesel exhaust particle; *Mmp*, matrix metallopeptidase; OVA, ovalbumin; MoM, monocyte derived macrophage.

제 4 장 고 찰

본 연구는 DEP의 천식 악화 효과를 T세포, ILC, 대식세포 등의 면역세포에 초점을 맞추어 평가하였다. DEP는 천식 모델 폐 내에 Th2/Th17의 혼합된 면역반응을 악화시킴과 동시에 대식세포의 경우 AM의 감소 및 MoM의 증가를 유도하였다. 특히, 실생활에서 미세먼지에 노출되는 것과 유사하게 DEP를 흡입하는 방식을 사용하였으며, DEP에 의한 기도염증 악화에 식염수 흡입이 효과적임을 확인하여 치료적인 중재 가능성을 보여주었다. DEP는 기도에서 호중구 염증을 촉발하였는데, 호중구 염증은 코르티코스테로이드에 잘 반응하지 않으며 아직까지 효과적인 치료제가 없기 때문에 이번에 확인한 식염수 흡입의 기도 호중구 염증 개선 효과는 향후 비T2천식에서 치료제로서 잠재성이 있다.[16]

일반적인 환경에서 PM의 성분은 유기(다환 방향족 탄화수소, 다이옥신, 벤젠, 1-3 부타디엔) 또는 무기(탄소, 염화물, 질산염, 황산염, 금속 등) 물질 등으로 존재한다.[17] 이러한 성분을 갖는 PM은 노출 기간에 따라서 개개인의 건강 악화뿐만 아니라 지역사회의 질병 유병률을 높인다. 특히 호흡기 질환이 있는 환자와 면역계에 이상이 있는 사람은 PM 노출에 더 취약하다. 이러한 미세먼지의 영향에는 입자의 크기도 중요한데, 입자의 크기에 따라 신체내로 침투하는 정도가 상이하기 때문이다.[18,19] PM_{10}이 다양한 호흡기 질환에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고, $PM_{2.5}$ 역시 호흡기 질환에 크게 악영향을 끼치는 것으로 밝혀져 최근 연구에서는 $PM_{2.5}$를 중점으로 많은 연구가 진행되고 있다.[20,21] 본 연구는 특정 입자 크기에 따른 제한을 두지 않았다.

여러 연구에서 PM 노출로 인한 천식 악화가 확인되었다. DEP 노출 시 전체적인 기도 염증 세포의 변화를 유도하는데, DEP를 집먼지 진드기(house dust mite, HDM)와 함께 기관 내 투여한 경우 기존의 Th1, Th2, Th17 반응 항진과 함께 호산구 및 호중구 증가가 유도되어 T2 유형 천식 및 비T2 유형 천식을 악화시키는 것으로 보인다.[22,23] DEP 노출로 인한 T2 유형 천식 및 비T2 유형 천식 악화는 호중구 염증과 연관이 있음이 밝혀졌는데, 이전 연구에 따르면, DEP 노출에 의해 인간 상피세포의 IL-8 생산이 증가하여 호중구 모집 역시 증가됨이 밝혀졌다.[24-26] 특히, 호중구가 Th1 및 Th17 적응 면역 반응을 프라이밍 할 수 있다는 점에서 DEP 노출로 인한 비T2 유형 천식으로의 악화 기전으로 호중구 증가가 제시되었다.[22,27] 실제로, 본 연구에서도 BALF 분석 및 유세포 분석 결과 OVA군에 비해 OVA/DEP군에서 호중구의 수가 증가하였는데 이는 DEP 노출로 인한 비T2 유형 천식으로의 악화가 호중구와 연관이 있음을 이번 연구에서도 확인하였다.

DEP로 인한 천식악화 기전에 선천면역계도 관여할 것으로 생각된다. ILC는 선천면역세포이지만, Th세포와 유사한 특징을 가지고 있다.[28] 이전 연구에 따르면, ILC2 및 ILC3는 Th2, Th17 사이토카인을 분비하여 T2 유형 천식 및 비T2 유형 천식에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며 최근에는 폐 섬유증 발생에도 관여하는 것으로 확인되었다.[29-31] 본 연구결과에서 ILC2와 ILC3가 DEP 노출로 인하여 증가한 것을 확인하였는데, 이들 세포들은 DEP 노출로 인한 기도과민성 항진과 폐 섬유증 발생에도 관여할 것으로 보인다.[32]

선천면역계의 또다른 주요세포인 대식세포는 기도 염증세포 중 가장 많은 부분을 차지한다. 대식세포는 기원과 상주 위치에 따라 여러 아형으로 구분되며 기관별로 염증 반응에 의해 유도되는 대식세포의 변화는 상이한데 천식과 관련하여 폐 내 대식세포의 변화에 대한 연구가 주로 이뤄지고 있다.[33] AM은 안정 시 폐 내 항상성을 유지하는 역할을 가지는데, 천식 모델에서는 AM이 현저히 감소한다.[34,35] 본 연구에서도 $SiglecF^{+}CD11c^{+}CD11b^{-}$ 대식세포로 대변되는 AM은 OVA군 모두에서 감소함을 확인하였지만, DEP 노출에 따른 유의미한 차이는 없어 DEP로 인한 천식 악화의 기전으로 폐 상주 대식세포의 역할은 미미할 것으로 보인다.

MoM은 천식을 비롯한 염증 질환에서 외부 자극에 따라 유입되는데 최근, 중증천식에서 $CD11c^{+}CD11b+$ 대식세포 증가와 함께 $CD206^{+}CD86^{-}$ 대식세포가 증가하였고 폐 섬유증에서는 $SiglecF^{+}CD11c^{+}CX3CR1^{+}$ 대식세포와 $SiglecF^{-}CD64^{+}Ly6c^{+}$ 대식세포에서 PDGF, M-CSF 같은 섬유증 유도 인자들의 발현이 증가하였다.[4,36-38] 본 연구에서는, $SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{+}$ 대식세포가 OVA 모델에서 증가하여 천식에서의 MoM 증가가 동일하게 관찰되었다. 흥미로운 점은, DEP 노출 시 $SiglecF^{+}CD11c^{+}CD11b^{+}$ 대식세포와 $SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{+}$ 대식세포가 현저히 증가하게 되는데 이는 DEP 노출로 인해 $CD11b^{+}$ MoM이 증가와 함께 세부 아형에서도 중증 천식과 관련한 $CD11c^{+}CD11b^{+}$ MoM, 섬유화 반응과 관련 있는 $SiglecF^{+}$ 대식세포 또는 $SiglecF^{-}$ 대식세포의 증가를 의미하였다. 이를 통해, DEP 노출이 MoM 증가뿐만 아니라 그 안에서도 천식 악화 및 섬유화 유도능을 갖는 세부 아형의 증가를 유도하는 것을 확인하였다.

단핵구는 혈액에서 순환하는 골수 유래 백혈구로 대식세포나 DC로 분화할 수 있으며, 선천 및 적응 면역반응에 영향을 준다. 단핵구 유래 세포들은 매우 이질적이고 가소성(plasticity)이 높아 질환마다 다양한 아형들이 작용한다. 인간 단핵구의 아형은 Toll-like Rece (TLR) 4에 대한 공동 수용체이자 lipopolysaccharide 신호 전달에 관여하는 CD14의 발현과 FcγRIIIa인 CD16의 발현을 기반으로 $CD14^{++}$ $CD16^{-}$, $CD14^{+}$ $CD16^{+}$ 및 $CD14^{+}$ $CD16^{++}$ 단핵구로 나눌 수 있다.[39] $CD14^{++}$ $CD16^{-}$ 전형 단핵구(classical monocyte)는

순환 단핵구의 약 80-95%를 차지하며, 활발한 식작용을 나타내 청소부(scavenger)로 알려져 있다. $CD14^{+}CD16^{+}$ 중간형 단핵구(intermediate monocyte)는 순환 단핵구의 약 2-8%를 구성하는데, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성, 항원 제시, T세포 자극 및 증식, 염증반응 및 혈관신생에 관여한다. $CD14^{+}CD16^{++}$ 비전형 단핵구(non-classical monocyte)는 순환 단핵구의 약 2-11%를 구성하며, 손상된 부위를 찾아 꾸준히 내피(endothelium)를 따라 순찰한다. 전염증성 특성을 가지며, 감염에 대한 반응으로 염증성 사이토카인을 분비하며, 항원 제시 및 T세포 자극에 관여한다.

마우스 단핵구는 Ly6c의 발현에 따라 두 아형인 전형 단핵구와 비전형 단핵구로 나뉜다. 마우스 단핵구는 외부 자극에 따른 화학주성에 의해 조직에 침입하여 대식세포가 된다.[40] $Ly6C^{hi}$ 전형 단핵구는 조직에 침입하는 주요 단핵구 집단 중 하나이며 감염에 대한 즉각적인 반응을 담당하고 있다.[41] 또한, 단핵구의 특성은 질환마다 상이하며 폐섬유증에서 변화된 단핵구가 섬유화 유발과 관련이 있음이 보고되었다.[42] 본 연구에서는 DEP 노출로 인해 MoM이 증가하였으며 두 아형인 $Ly6c^{+}$ MoM과 $Ly6c^{-}$ MoM 두가지 모두 증가하였으며 골수유래 단핵구를 이용한 $Ly6c^{+}$ MoM과 $Ly6c^{-}$ MoM 분석을 통해 DEP 노출이 M2 대식세포의 활성화 유도와 함께 섬유화 유도에 기여함을 알 수 있었다. 이는 DEP 노출이 Ly6c 마커의 발현 차이에 상관없이 MoM의 섬유화 유도능을 증가시키는 것을 의미한다.

대식세포 활성화와 천식 발생 및 악화의 관계를 뒷받침하는 연구 결과도 제시되었다. 천식 환자의 중증도에 따라 $CD206^{+}/MHCII^{+}$의 표현형을 갖는 M2a 대식세포가 증가함이 보고되어 천식의 병인 기전에 M2a 대식세포가 관여함을 시사하였고 특정 대식세포를 분류하여 천식 모델에 적용하는 연구도 보고되었다.[43,44] 반면, M2c 대식세포는 섬유화 유도와 관련이 있다.[45] 이처럼 다양한 M2 대식세포 활성화가 천식 및 신장 질환 등 만성염증 질환에 중요하다는 것이 강조되고 있다.[46,47] DEP 기도 노출은 대식세포 활성화에 영향을 주는데 DEP 노출은 대식세포의 TLR2 및 TLR4 경로를 통해 선천면역계를 자극하며, 대식세포의 활성화에 영향을 미쳐 ROS에 의해 M1 대식세포 활성화를 강화하는 것으로 밝혀졌다.[48,49] 본 연구에서 *in vivo* 모델에 DEP 노출 시, MoM 내 M2c MoM이 증가하였는데 이는 DEP 노출로 인한 MoM의 섬유화 유도능 증가가 M2c MoM 증가와 연관성이 있음을 고려할 수 있다. 실제로, $Ly6c^{+}$ 또는 $Ly6c^{-}$ MoM에서는 DEP 노출 시 M2 대식세포 활성화 증가 및 그중에서도 섬유화와 연관이 있는 M2c 대식세포의 특징이 증가함을 확인하여 DEP 노출은 MoM을 M2c 대식세포 활성화로 유도함을 확인하였다.

알레르기 비염이나 만성비부비동염 환자에게 식염수 비강 세척을 적용하면 코증상 완화에 도움이 된다. 식염수 비강 세척의 정확한 효과 기전은 알려지지 않았지만, 직접적인 점막 세정(cleansing), 염증 매개체 제거, 섬모 박동 빈도 증가에 따른 점막의 섬모 기능 개선 등이 역할을 할 것으로 추정된다.[50] 하기도 질환에서 식염수 흡입의 치료적 효과는 아직 알려진 바가 없다. 이번 연구에서 고장성 식염수는 기도 자극 효과가 있을 수 있어, 본 연구에서는 생리식염수를 사용하여 치료 효과를 알아보았으며 식염수 흡입이 다양한 염증세포의 유입을 감소시키는 효과가 있음이 확인되었다.[51] 특히, 대식세포와 선천성 림프구의 활성화 경향을 유의하게 억제함이 확인되어, 식염수 흡입이 기도의 선천 면역 반응 조절 효과가 있음을 알 수 있었다. 화학주성 인자는 염증 부위로 농도 구배(concentration gradient)를 증가시켜 단방향 백혈구 이동을 유도한다. 식염수 흡입을 한 경우 호산구와 호중구 화학주성 인자의 발현이 감소함을 확인하여, 화학주성 인자 감소가 염증 완화에 기여하였을 가능성을 시사하였다.

본 연구에서는 DEP 노출로 인한 MoM 증가 및 섬유화 유도 증가에 대한 잠재적인 가능성을 확인하였다. 그러나, DEP에 의해 영향을 받은 MoM의 특징과 기능에 대한 추가적인 연구가 필요하며 실제로 DEP에 노출된 MoM이 천식 모델에서 천식의 악화와 폐섬유증을 유도하는지에 대한 평가가 필요하다. 더 나아가, DEP 노출에 따라 특이적으로 증가한 M2c MoM과 함께 $Ly6c^{+}$, $Ly6c^{-}$ MoM의 기능에 대한 평가 역시 진행되어야 한다. 이와 함께, DEP의 천식 악화에 대한 정확한 기전 조사가 필요한데 특히, PM_{10}, $PM_{2.5}$, $PM_{0.1}$로 나누어 미세먼지 입자 크기에 따라 변화하는 천식의 악화와 그에 따른 면역반응의 변화에 대한 추가적인 조사가 필요하다. 또한, 이러한 입자크기별 공기역학질량중위지름(mass median aerodynamic diameter)에 대한 규명이 보충되어 마우스 DEP 노출에 대한 정확한 노출값 산출이 필요하다. 최종적으로, 본 연구와 후속 연구 결과를 바탕으로 미세먼지에 의한 천식 악화를 실제 환자 기도 시료를 이용하여, 미세먼지가 심한 날과 그렇지 않은 날의 기도 염증을 비교 분석하고, 어떤 염증반응이 악화하였는지 확인하여 미세먼지에 의한 인체 기도면역계의 반응기전을 밝히는 것이 필요하다. 또한, 본 연구에서는 *in vivo* 실험에서 진행한 식염수 흡입을 *in vitro*나 *ex vivo*에서 재현할 수 있는 방법을 찾지 못하여 식염수 흡입의 효과 기전에 대한 향후 후속 연구가 필요하고 실제 천식환자에서 식염수 흡입을 시행하여 기도의 염증 정도 및 천식 증상 개선 여부를 평가하는 시도가 필요하다.

제 5 장 결 론

본 연구는 DEP 노출을 통한 천식 악화를 여러 면역세포 관점으로 설명하였다. 특히, 대식세포 활성화를 세부적으로 분석하였고, 실제 생활과 유사한 노출 환경을 조성하여 실험함으로써 대기 노출에 의한 미세먼지의 천식 악화를 대변했다는 의의가 있다. DEP 노출 시 선천면역계를 이루는 세포 집단인 ILC2/ILC3와 DC 그리고 MoM이 유의하게 증가하였다. 증가한 MoM에서는 섬유화 유도와 관련이 있는 M2c MoM의 유의한 증가가 관찰되었다. 특히, Ly6c 발현에 따른 MoM의 유전형은 DEP 노출에 따라 M2 대식세포 및 섬유화 유도의 증가를 유도했는데 이는 M2c MoM의 증가와 관련이 있을 것으로 생각된다. 이러한 MoM 및 아형들의 증가는 식염수 흡입을 통하여 유의하게 개선되었는데, 식염수 흡입을 통한 천식 개선 효과는 MoM이 주된 타겟임을 시사하였다. 더불어 이번 연구를 통해 식염수 흡입이 기존에 알려진 상기도 질환 치료에 국한되지 않고 미세먼지로 유발되는 천식 악화를 치료하는 치료제로써 천식 환자에게 적용될 수 있으리라 예상할 수 있다.

참고 문헌

1. Athari SS. Targeting cell signaling in allergic asthma. Signal Transduct Target Ther 2019; 4:45.
2. Kuruvilla ME, Lee FE, Lee GB. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. Clin Rev Allergy Immunol 2019; 56:219-33.
3. Ural BB, Yeung ST, Damani-Yokota P, Devlin JC, de Vries M, Vera-Licona P, et al. Identification of a nerve-associated, lung-resident interstitial macrophage subset with distinct localization and immunoregulatory properties. Sci Immunol 2020; 5.
4. van der Veen TA, de Groot LES, Melgert BN. The different faces of the macrophage in asthma. Curr Opin Pulm Med 2020; 26:62-8.
5. Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu QL, Gao P. Macrophage polarization and allergic asthma. Transl Res 2018; 191:1-14.
6. Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? Front Immunol 2014; 5:603.
7. Abdelaziz MH, Abdelwahab SF, Wan J, Cai W, Huixuan W, Jianjun C, et al. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma. J Transl Med 2020; 18:58.
8. Moreira AP, Cavassani KA, Hullinger R, Rosada RS, Fong DJ, Murray L, et al. Serum amyloid P attenuates M2 macrophage activation and protects against fungal spore-induced allergic airway disease. J Allergy Clin Immunol 2010; 126:712-21 e7.
9. Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. J Med Toxicol 2012; 8:166-75.
10. Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Millecchia L, Rao KM, Marvar PJ, et al. Systemic microvascular dysfunction and inflammation after pulmonary particulate matter exposure. Environ Health Perspect 2006; 114:412-9.
11. Gray DL, Wallace LA, Brinkman MC, Buehler SS, La Londe C. Respiratory and cardiovascular effects of metals in ambient particulate matter: a critical review. Rev Environ Contam Toxicol 2015; 234:135-203.
12. Garavello W, Romagnoli M, Sordo L, Gaini RM, Di Berardino C, Angrisano A. Hypersaline nasal irrigation in children with symptomatic seasonal allergic rhinitis: a randomized study. Pediatr Allergy Immunol 2003; 14:140-3.
13. Chang J, Nie H, Ge X, Du J, Liu W, Li X, et al. Vitamin D suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by targeting the local renin-angiotensin system in the lung. Sci Rep 2021; 11:16525.
14. Hu X, Tian Y, Qu S, Cao Y, Li S, Zhang W, et al. Protective effect of TM6 on LPS-induced acute lung injury in mice. Sci Rep 2017; 7:572.
15. Hu Z, Chen R, Cai Z, Yu L, Fei Y, Weng L, et al. Salmeterol attenuates the inflammatory response in asthma and decreases the pro-inflammatory cytokine secretion of dendritic cells. Cell Mol Immunol 2012; 9:267-75.
16. Fahy JV. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. Proc Am Thorac Soc 2009; 6:256-9.

17. Cheung K, Daher N, Kam W, Shafer MM, Ning Z, Schauer JJ, et al. Spatial and temporal variation of chemical composition and mass closure of ambient coarse particulate matter (PM10-2.5) in the Los Angeles area. Atmospheric Environment 2011; 45:2651-62.
18. Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. Front Public Health 2020; 8:14.
19. Wilson WE, Suh HH. Fine particles and coarse particles: concentration relationships relevant to epidemiologic studies. J Air Waste Manag Assoc 1997; 47:1238-49.
20. Kappos AD, Bruckmann P, Eikmann T, Englert N, Heinrich U, Hoppe P, et al. Health effects of particles in ambient air. Int J Hyg Environ Health 2004; 207:399-407.
21. Williams AM, Phaneuf DJ, Barrett MA, Su JG. Short-term impact of PM2.5 on contemporaneous asthma medication use: Behavior and the value of pollution reductions. Proc Natl Acad Sci U S A 2019; 116:5246-53.
22. Brandt EB, Kovacic MB, Lee GB, Gibson AM, Acciani TH, Le Cras TD, et al. Diesel exhaust particle induction of IL-17A contributes to severe asthma. J Allergy Clin Immunol 2013; 132:1194-204 e2.
23. Acciani TH, Brandt EB, Khurana Hershey GK, Le Cras TD. Diesel exhaust particle exposure increases severity of allergic asthma in young mice. Clin Exp Allergy 2013; 43:1406-18.
24. Seagrave J, Knall C, McDonald JD, Mauderly JL. Diesel particulate material binds and concentrates a proinflammatory cytokine that causes neutrophil migration. Inhal Toxicol 2004; 16 Suppl 1:93-8.
25. Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, et al. Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162:161-6.
26. Holgate ST, Sandstrom T, Frew AJ, Stenfors N, Nordenhall C, Salvi S, et al. Health effects of acute exposure to air pollution. Part I: Healthy and asthmatic subjects exposed to diesel exhaust. Res Rep Health Eff Inst 2003:1-30; discussion 51-67.
27. Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. Int Immunol 2011; 23:317-26.
28. Borger JG, Lau M, Hibbs ML. The Influence of Innate Lymphoid Cells and Unconventional T Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease. Front Immunol 2019; 10:1597.
29. McKenzie AN. Type-2 innate lymphoid cells in asthma and allergy. Ann Am Thorac Soc 2014; 11 Suppl 5:S263-70.
30. Hams E, Armstrong ME, Barlow JL, Saunders SP, Schwartz C, Cooke G, et al. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111:367-72.
31. Zhang Y, Tang J, Tian Z, van Velkinburgh JC, Song J, Wu Y, et al. Innate Lymphoid Cells: A Promising New Regulator in Fibrotic Diseases. Int Rev Immunol 2016; 35:399-414.
32. Kim HY, Lee HJ, Chang YJ, Pichavant M, Shore SA, Fitzgerald KA, et al. Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. Nat Med 2014; 20:54-61.
33. Jiang Z, Zhu L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. J Asthma Allergy 2016; 9:101-7.
34. Hou F, Xiao K, Tang L, Xie L. Diversity of Macrophages in Lung Homeostasis and Diseases. Front

Immunol 2021; 12:753940.
35. Zaslona Z, Przybranowski S, Wilke C, van Rooijen N, Teitz-Tennenbaum S, Osterholzer JJ, et al. Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. J Immunol 2014; 193:4245-53.
36. Hung CH, Wang CC, Suen JL, Sheu CC, Kuo CH, Liao WT, et al. Altered pattern of monocyte differentiation and monocyte-derived TGF-beta1 in severe asthma. Sci Rep 2018; 8:919.
37. Aran D, Looney AP, Liu L, Wu E, Fong V, Hsu A, et al. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. Nat Immunol 2019; 20:163-72.
38. Joshi N, Watanabe S, Verma R, Jablonski RP, Chen CI, Cheresh P, et al. A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages. Eur Respir J 2020; 55.
39. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. Front Immunol 2018; 9:1726.
40. Yang P, Liu L, Sun L, Fang P, Snyder N, Saredy J, et al. Immunological Feature and Transcriptional Signaling of Ly6C Monocyte Subsets From Transcriptome Analysis in Control and Hyperhomocysteinemic Mice. Front Immunol 2021; 12:632333.
41. Terrazas C, Varikuti S, Oghumu S, Steinkamp HM, Ardic N, Kimble J, et al. Ly6C(hi) inflammatory monocytes promote susceptibility to Leishmania donovani infection. Sci Rep 2017; 7:14693.
42. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. J Exp Med 2017; 214:2387-404.
43. Girodet PO, Nguyen D, Mancini JD, Hundal M, Zhou X, Israel E, et al. Alternative Macrophage Activation Is Increased in Asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 2016; 55:467-75.
44. Kim J, Chang Y, Bae B, Sohn KH, Cho SH, Chung DH, et al. Innate immune crosstalk in asthmatic airways: Innate lymphoid cells coordinate polarization of lung macrophages. J Allergy Clin Immunol 2019; 143:1769-82 e11.
45. Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. Skelet Muscle 2011; 1:21.
46. Lis-Lopez L, Bauset C, Seco-Cervera M, Cosin-Roger J. Is the Macrophage Phenotype Determinant for Fibrosis Development? Biomedicines 2021; 9.
47. Lu J, Cao Q, Zheng D, Sun Y, Wang C, Yu X, et al. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. Kidney Int 2013; 84:745-55.
48. Shoenfelt J, Mitkus RJ, Zeisler R, Spatz RO, Powell J, Fenton MJ, et al. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. J Leukoc Biol 2009; 86:303-12.
49. Zhao Q, Chen H, Yang T, Rui W, Liu F, Zhang F, et al. Direct effects of airborne PM2.5 exposure on macrophage polarizations. Biochim Biophys Acta 2016; 1860:2835-43.
50. Succar EF, Turner JH, Chandra RK. Nasal saline irrigation: a clinical update. Int Forum Allergy Rhinol 2019; 9:S4-S8.
51. Boek WM, Keles N, Graamans K, Huizing EH. Physiologic and hypertonic saline solutions impair ciliary

activity in vitro. Laryngoscope 1999; 109:396-9.

Abstract

Murine asthma exacerbation by dust exhaust particle exposure: analysis of lung immune cells and assessment of the therapeutic potential of saline inhalation

Yosep Mo
Department of Translational medicine
College of Medicine
Seoul National University

Asthma is a chronic allergic airway disease characterized by coughing, shortness of breath, and wheezing. Recently, the prevalence of asthma due to environmental factors such as air pollution is increasing. In particular, exposure to diesel exhaust particles (DEP), one of the main components of particulate matter (PM), reduces lung function, and is significantly associated with the exacerbation of asthma. However, the immune mechanism by which DEP exposure exacerbates asthma has not been clearly elucidated. Clinically, saline irrigation is commonly used to alleviate the nasal symptoms of allergic rhinitis. Saline washing is known to be effective in alleviating the symptoms of allergic rhinitis and restoring mucosal function. However, it has not been confirmed whether saline washing is effective in alleviating the symptoms of DEP-induced asthma or controlling the innate immune system. To this end, we have analyzed macrophages, innate lymphoid cells (ILCs), T cell subpopulations and cytokine responses to DEP and evaluated the therapeutic effect of saline inhalation.

Six-week-old BALB/c mice were sensitized to 100 μg ovalbumin (OVA) and 2 mg alum intraperitoneally on day 0 and 7, and then boosted with 50 μg of OVA

intranasally on days 14, 15, and 16. The animals were divided into five groups following a ten-day challenge protocol over three weeks. 0.5% OVA was administered via inhalation in the absence and presence of DEP exposure or saline nebulization. Airway hyperresponsiveness (AHR) was assessed through a methacholine challenge test on day 40 before sacrifice. Immune cell changes in the lung were examined in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and through histological examination. In addition, gene expression in the lung was evaluated at the mRNA level through RT-qPCR. Flow cytometry analysis was used to identify macrophages, ILCs, and T cell populations. Finally, to analyze the characteristics of monocyte-derived macrophages, monocytes were extracted from mouse bone marrow and differentiated into macrophages, and mRNA expression levels according to DEP treatment were analyzed.

AHR was increased in the OVA model and OVA/DEP model compared to the control group, and airway hyperresponsiveness of the OVA/DEP model was significantly alleviated by inhalation of saline. Eosinophil recruitment significantly increased in BALF upon OVA administration. While exposure to DEP displayed a neutrophil-dominant inflammatory response, it was decreased by saline inhalation. In histological analysis, inflammatory cell infiltration and goblet cell activation and lung fibrosis were significantly increased due to DEP exposure, as observed through hematoxylin and eosin staining, periodic acid-Schiff staining, Masson's trichrome staining. It was confirmed that this was alleviated by saline inhalation. Compared to the control group, $CD4^+$ T cells increased significantly following OVA administration and increased furthermore with DEP exposure. While augmented secretion of the Th2 cytokine IL-5 occurred in both OVA and OVA/DEP, increases in IL-17A in OVA/DEP characterized its shift to a mixed Th2/Th17 response. Also, similarly, $IL-5^+$, $IL-13^+$, and $IL-17A^+$ ILCs were further increased with DEP exposure, which was ameliorated by saline inhalation. OVA/DEP additionally enhanced the antigen presenting ability of dendritic cells. In macrophages especially, $SiglecF^-CD11c^-CD11b^+$ monocyte-derived macrophages (MoM) were increased in the OVA/DEP model. Among the subpopulations of MoM macrophages, M2c macrophages increased with an increase in classical monocyte-derived MoMs and non-classical monocyte-derived MoMs. In addition, from *in vitro* experiments, it was observed that the

expression of genes inducing fibrosis in MoM exposed to DEP were increased. Saline inhalation decreased DCs and macrophages in the OVA/DEP model.

In conclusion, through the results of this study, it was demonstrated that DEP contributes to asthma exacerbation by inducing neutrophilic inflammation and Th2/Th17 immune response, and also confirmed to be involved in the activation of subpopulations of ILCs and macrophages, which are innate immune cells. DEP-induced asthma exacerbation was demonstrated to be reversed through saline inhalation.

Keywords: Asthma, Diesel Exhaust Particle, Innate lymphoid cell, Macrophages, Saline, inhalation

Student Number: 2020-21422