

담배연기에 의한 선천성 면역반응 자극 및 천식의 발생과 악화

김유진,^{1,2} 김정현,^{1,2} 모요셉,^{1,2} 박다은,² 이현승,² 정재우,³ 강혜련^{1,2,4}

¹서울대학교 의과대학 중개외과, ²서울대학교 의학연구원 알레르기 및 임상면역연구소, ³중앙대학교병원 내과, ⁴서울대학교병원 내과

Cigarette smoke extract contributes to the inception and aggravation of asthmatic inflammation by stimulating innate immunity

Yujin Kim,^{1,2} Jeonghyeon Kim,^{1,2} Yosep Mo,^{1,2} Da Eun Park,² Hyun-Seung Lee,² Jae-Woo Jung,³ Hye-Ryun Kang^{1,2,4}

¹Department of Translational Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul; ²Institute of Allergy and Clinical Immunology, Seoul National University Medical Research Center, Seoul; ³Department of Internal Medicine, Chung-Ang University Hospital, Seoul; ⁴Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Smoking is a risk factor for the development of asthma and worsens the long-term prognosis of asthma. This study investigated the effect of cigarette smoke extract (CSE) on innate immune cells such as innate lymphoid cells (ILCs) and macrophages in a murine model of induced asthma.

Methods: Six-week-old female BALB/C mice were exposed to ovalbumin (OVA) via an intranasal route with or without CSE for 8 weeks to establish a chronic murine asthma model. Airway hyperresponsiveness (AHR), airway inflammatory cells from bronchoalveolar lavage fluid, and the population of CD4⁺ T cells, ILCs, and macrophages in the lungs were studied to evaluate the effect of chronic CSE exposure on asthma.

Results: Mice intranasally exposed to CSE along with OVA treatment (CSE/OVA) had significantly enhanced AHR, eosinophilic inflammation, increased IL-13 and IL-17 producing CD4⁺ T cells compared to mice intranasally exposed to OVA only. On the contrary, the frequency of Foxp3⁺ in CD4⁺ T cells was reduced in the CSE/OVA group. CSE enhanced the dendritic cell (DC) population, especially MHCII⁺ DC with antigen-presenting capacity. Among ILCs, the CSE/OVA group showed a significant increase of IL-13-producing type 2 ILCs, but not interferon- γ ⁺ ILC1s and IL-17⁺ ILC3s. Among macrophages, alveolar macrophage and Ym-1 and FIZZ1 positive M2 macrophage populations were significantly induced by CSE exposure alone and when combined with OVA treatment.


Conclusion: In this study, we showed that long-term exposure to cigarette smoke contributes to the inception and aggravation of asthmatic inflammation by enhancing DCs, ILC2, and M2 alveolar macrophage populations in the mouse model. (*Allergy Asthma Respir Dis* 2022;10:145-152)

Keywords: Asthma, Cigarette smoking, Innate Immunity, Macrophages

서론

천식은 기도과민성과 가역적인 기도 폐쇄를 특징으로 하는 만성적인 기도염증질환이다. 가장 대표적인 천식의 표현형은 2형 조력 T 세포(type 2 helper T cells, Th2)에 의해 매개되는 제2형 알레르기성 염증으로 interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인이

분비되어 호산구 증가와 같은 병태생리를 유발한다.¹ 그러나 천식은 많은 유발 인자가 복합적으로 관여하며, 이에 따라 다양하고 복잡한 표현형을 갖게 된다. 알레르겐 특이적인 IgE 항체 생성에 의한 알레르기성 천식과 비알레르기성 천식으로 구분할 수 있는데, 최근에는 Th2 high와 Th2 low 천식으로 나누기도 한다. Th2 low인 경우 호중구성 기도 염증이 특징적이며, 담배연기, 대기 오염, 바이

Correspondence to: Hye-Ryun Kang  <https://orcid.org/0000-0002-2317-4201>
Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, 103 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03080, Korea
Tel: +82-2-2072-0820, Fax: +82-2-764-2199, Email: helenmed@snu.ac.kr

• This research was supported by Seoul National University Hospital Research Fund (grant no. 04-2010-0990).

Received: October 12, 2021 Revised: December 23, 2021 Accepted: December 23, 2021

© 2022 The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease
The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

러스 감염 그리고 비만과 같은 환경 및 숙주 인자에 의해 유도된다.² 다양한 천식 표현형에 대해 적절히 치료하기 위해서 비알레르기성 천식의 표현형과 이를 유도하는 여러 환경적 요인들의 작용기전에 대한 연구가 필요하다.³

장기간의 담배연기 노출은 면역계의 이상을 일으켜 기도와 폐의 염증반응 및 기도재형성과 같은 병리학적 변화를 유발한다.⁴ 특히 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 발병의 주요 위험 요인으로 알려져 있으나, 담배연기가 천식의 발생 및 악화에도 기여한다는 사실이 여러 연구를 통해 확인되었다. 담배연기에 노출된 천식 마우스 모델에서 호산구성 염증과 Th2 염증반응의 증가가 관찰되었고, 간접흡연으로 인하여 천식 환자의 호중구성 염증과 Th17 면역 반응이 증가하여 담배연기가 천식 악화에 기여함이 보고되었다.^{5,6} 그 동안의 연구는 담배연기에 의한 Th17 세포와 IL-17의 과발현을 설명하기 위한 적응면역 중심으로 진행되었다.^{7,8}

그러나 선천면역세포 또한 천식의 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 선천성 림프구 세포(innate lymphoid cell, ILC)는 염증반응 초기부터 T 세포의 분화 및 적응 면역 반응의 활성화에 이르기까지 중요한 역할을 수행하는 선천면역세포이며, Th 세포와 유사하게 사이토카인을 분비하여 천식을 비롯한 면역질환에 관여한다.⁹ 천식 마우스 모델에서 ILC2가 활성화되고 제2형 사이토카인의 분비가 증가함에 따라 알레르기 유발 천식의 발생과 악화에 관여함이 보고되었다.⁹ 또한 천식 환자의 객담에서 ILC의 하위 아형인 ILC1, ILC2, ILC3 모두 증가함을 확인하였고, 특히 ILC가 대식세포의 분극을 조절하여 천식의 표현형에 기여한다는 것이 알려졌다.¹⁰ 이는 담배연기에 의한 천식의 병인기전을 이해하기 위해서 담배연기와 선천 면역세포의 상관관계에 대한 연구가 필요함을 시사한다. 이 연구에서는 ovalbumin (OVA)으로 유도한 천식 마우스 모델에 담배연기추출물(cigarette smoke extract, CSE)를 비강 투여함으로써, CSE가 천식에 미치는 영향을 확인하고 ILC와 대식세포를 비롯한 선천 면역세포에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 천식 마우스 모델 제작 및 담배연기 추출물

3R4F Kentucky 연구용 담배(University of Kentucky Research Cigarettes, USA)를 이용하였다. 가변 유동 연동 펌프(Fisherbrand Variable-Flox Peristaltic Pumps, Shanghai, China)를 이용하여 각 담배를 8-10분 동안 연소시켰고, 필터를 제거한 담배 8개비를 phosphate-buffered saline (PBS) 10 mL에 녹인 뒤, 미세 여과 필터(0.75 μ m)로 미립자를 걸러서 CSE를 제작하였다(Fig. 1A).¹¹

6주령 암컷 BALB/C 마우스를 구입하여(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea) 특정 병원체가 없는 조건(specific pathogen free con-

dition)에서 사육하였다.

각 그룹군은 PBS만 투여한 정상군, CSE 단독 노출군, OVA로 유도된 천식군, CSE에 노출된 OVA 천식군을 설정하였다. CSE (5%) 또는 OVA (100 μ g)을 주 5회, 총 8주 동안 비강 내로 투여하였다(Fig. 1B). 각 그룹별로 6마리 마우스를 설정하여 총 24마리를 실험에 사용하였고, 반복실험을 통하여 재현되는지 확인하였다. 모든 절차는 서울대학교 실험실 동물 자원 연구소의 IACUC 승인(SNU-200429-5-1) 하에 수행되었다.

2. 기도과민성 측정

마지막 비강 투여 24시간 후에 methacholine에 의한 기도과민성을 측정하기 위하여 OCP3000 (Allmedicus, Anyang, Korea)을 이용하였다. 이는 비침습적 방법으로 마우스의 상해 없이 자유로운 상태로 체적변동기록기(whole body plethysmography)를 통해 기도과민성을 측정하였다. 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL 농도의 메타콜린을 흡입기(nebulizer)를 이용하여 3분간 흡입시켰고, 각각의 농도에서 3분간 30초 간격으로 Penh (enhanced pause)를 측정하였다.¹²

3. 염증반응 분석

기도과민성을 측정한 뒤 24시간 후에 마우스를 희생시켜, PBS 2 mL을 기도에 투여하여 기관지폐포세척액을 채취하였다. 기관지폐포세척액의 세포 펠릿을 얻어 100 μ L PBS에 재부유하고, 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 총 세포 수를 측정하였다. 기관지폐포세척액 20 μ L에 PBS 80 μ L을 추가로 넣어 희석하였고, cyto-spin (Shandon CytoSpin III, Shandon, UK)을 이용하여 원심분리로 세포를 슬라이드에 고정하였다. 슬라이드에 부착된 세포를 Diff-quick (Sysmex Co., Kobe, Japan)으로 염색하였고, 광학현미경으로 총 300개 이상의 세포를 세어 대식세포, 림프구, 호중구, 호산구를 구분한 뒤, 각각의 면역 세포 분포도를 확인하였다.¹³

4. 유세포 분석

채취한 폐 조직을 면도칼을 이용하여 작은 조각으로 절단한 후 10% 4형 collagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)가 포함된 5 mL RPMI1640 배지에 넣어 37°C에서 90분 동안 섞어주고, 콜라겐 결합이 끊어진 조직을 40 μ M 무균 cell strainer로 걸러서 단일세포로 분리하였다. 적혈구 용해 용액을 처리하여 적혈구를 제거한 뒤, 세포 개수를 측정하였다. 대식세포 유세포 분석을 위하여 1×10^6 개의 세포를 튜브에 분주한 후 Fc γ R-특이적 차단 단백질항체를 처리하여 Fc수용체를 차단하고 세포 표면 표지자 염색을 시행하였다.¹³ 수지상세포와 대식세포 염색을 위해 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-

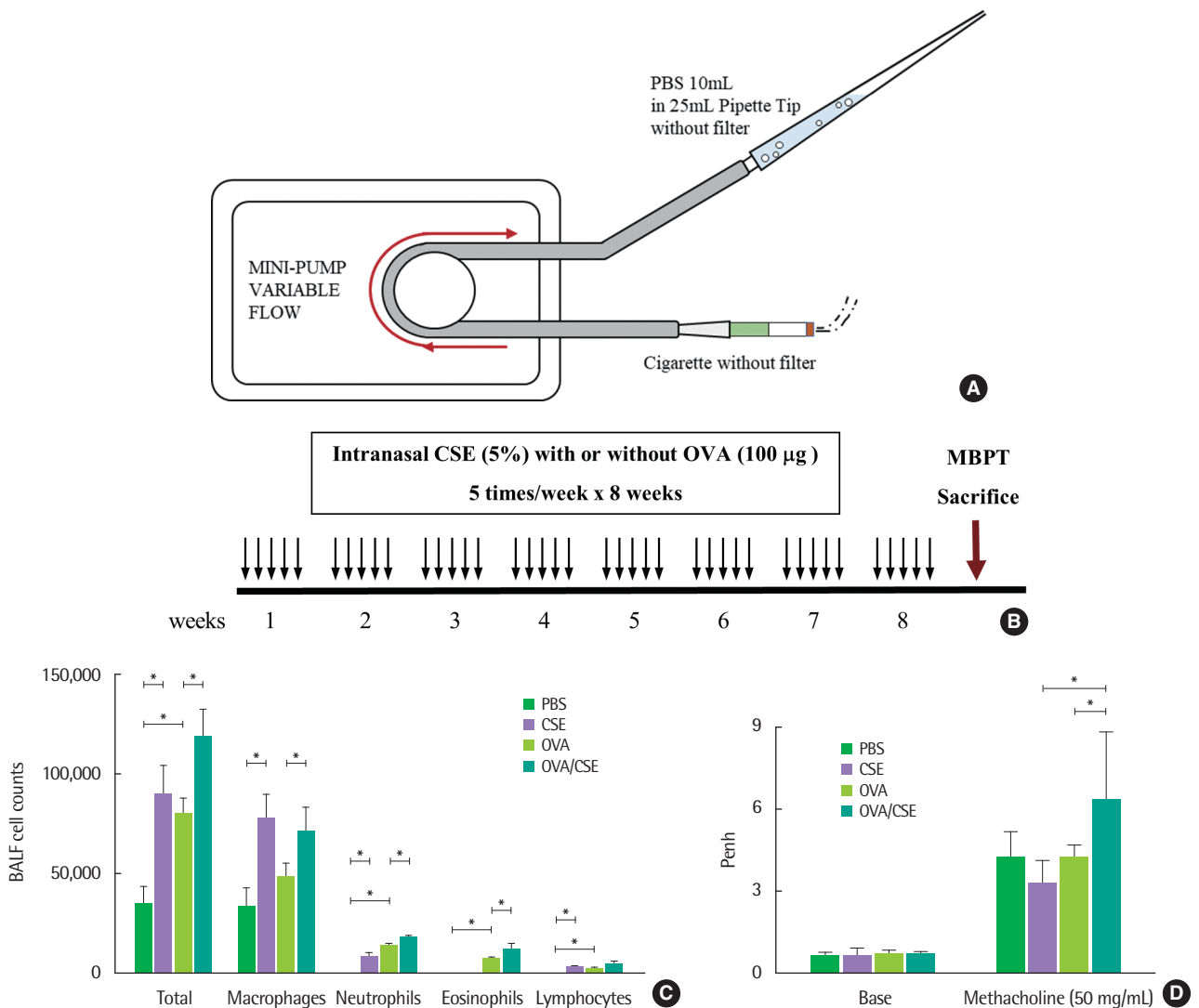


Fig. 1. An experiment protocol for the evaluation of the effect of CSE and changes of asthmatic inflammation and airway hyperresponsiveness by CSE. (A) A schematic diagram of CSE preparation. (B) The protocol of the long-term effects of cigarette smoke in murine OVA-induced asthmatic model. (C) The number of inflammatory cells in BALF. (D) Methacholine hyperresponsiveness was measured 24 hours after the last challenge. CSE, cigarette smoke extract; PBS, phosphate-buffered saline; OVA, ovalbumin; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; MBPT, methacholine bronchial provocation test. T-test, * $P < 0.05$, and $n = 6$.

Ly6C, BV650-conjugated anti-CD45, BV711-conjugated anti-CD11c, BV785-conjugated anti-CD11b, 이와 같은 항체(Biolegend, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

T 세포, ILC 유세포 분석은 1×10^6 개의 세포를 96-well plate에 분주하고 PMA (100 ng/mL; Sigma, Burlington, MA, USA), Ionomycin (1 µg/mL; Sigma), GolgiStop (1 µL/mL; BD Biosciences, East Rutherford, NJ, USA)를 처리하여 자극을 준 다음, 세포들을 수득하여 Fc수용체 차단과 세포 포면 표지자 염색 과정을 시행하였다. 그 후 세포막 및 핵막 투과를 실시하고 사이토카인과 전사인자 염색을 진행하였다. T 세포, ILC 염색을 위해 BV650-conjugated anti-CD45, FITC-conjugated anti-lineage (CD3ε, CD11c, CD19, CD49b,

FcεRa, F4/80, CD11b) or anti-CD3, BV785-conjugated anti-CD4, PE-Cy7-conjugated anti-CD90.2, PE-conjugated anti-CD8, PerCP/Cy5.5-conjugated anti-IFN-γ or anti-Foxp3, APC-conjugated anti-IFN-γ or anti-IL-5, PE-conjugated anti-IL-13, BV421-conjugated anti-CD25 or anti-IL-17A, 이와 같은 항체(Biolegend)를 사용하였다.

5. 통계 분석

모든 데이터는 mean ± standard error of the mean로 표시하였다. 통계적 유의성을 위해 *t*-test를 시행하여 그룹 간의 차이를 계산하였다. $P < 0.05$ 일 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 담배연기가 기도 염증반응과 기도과민성에 미치는 영향

기관지폐포세척액 염증세포 분석을 통하여 CSE 노출이 염증세포의 침윤에 미치는 영향을 확인하였다. CSE 단독노출군은 대조군과 비교하여 총 염증세포, 대식세포, 호중구, 림프구에서 유의하게 증가하였다. OVA군도 대조군과 비교하여 총 염증세포, 호중구, 림프구 수의 유의한 증가와 함께 호산구 증가가 특징적으로 나타

났다. OVA/CSE 복합노출군은 OVA군과 비교하여 총 염증세포를 비롯한 대식세포, 호중구, 호산구 모두에서 유의한 증가를 보였다 ($P < 0.05$) (Fig. 1C).

기도과민성은 Base에서는 그룹 간의 차이를 보이지 않았으나, 메타콜린 50 mg/mL 농도에서 CSE 단독노출군 및 OVA군과 비교하였을 때, OVA/CSE 복합노출군에서 Penh값이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다($P < 0.05$) (Fig. 1D).

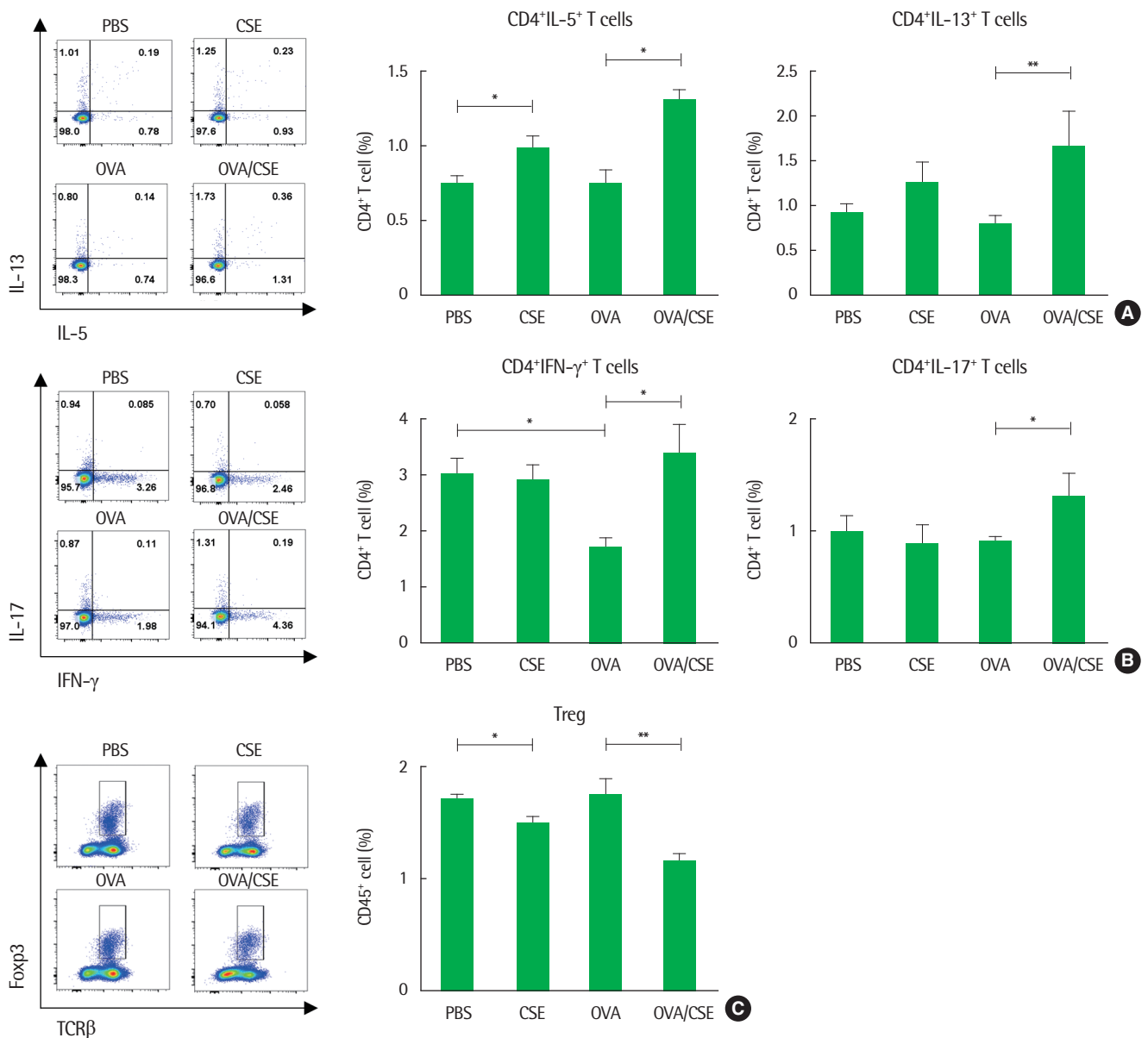


Fig. 2 Effect of CSE on CD4+ T cells and Tregs in the lung tissues of each group. (A, B) A flow cytometric representation of IL-5+, IL-13+, IL-17+, and IFN-γ+ T cells, and percentages of each population in CD4+ T cells. (C) A flow cytometric representation of Foxp3+TCRβ+ T cells, and percentages of each population in CD45+ cells. PBS, phosphate-buffered saline; CSE, cigarette smoke extract; IL, interleukin; OVA, ovalbumin; IFN, interferon; TCR, T-cell receptor; Treg, regulatory T cell. T-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and $n = 6$.

2. 담배연기가 조절 T 세포와 조절 T 세포에 미치는 영향

Th2 세포 분율을 비교하였을 때 대조군에 비해 OVA군에서는 상대적인 증가를 보이지 않았으나, CSE 단독노출군과 OVA/CSE 복합노출군에서는 유의한 증가를 보였고, OVA/CSE 복합노출군에서 가장 큰 변화를 보였다($P < 0.01$) (Fig. 2A).

CD4⁺IFN- γ ⁻ Th1 세포는 OVA군에서 유의하게 감소하였으나, OVA와 CSE가 함께 노출될 경우 OVA 단독 노출에 비해 유의한 증가를 보였고, CD4⁺IL-17⁺ Th17 또한 OVA와 CSE가 함께 노출될 때 증가하였다($P < 0.05$) (Fig. 2B).

조절 T 세포(regulatory T cell, Treg)는 CSE 단독노출군과 OVA/CSE 복합노출군에서 각각 대조군과 OVA군에 비해 유의한 감소를 보였다($P < 0.01$) (Fig. 2C).

3. 담배연기가 선천성 림프구 세포에 미치는 영향

OVA/CSE 복합노출군은 OVA군과 비교하여 IL-5⁺ ILC2와 IL-13⁺ ILC2의 발현이 유의하게 증가하였다($P < 0.01$) (Fig. 3A). CSE 노출에 따른 IFN- γ ⁺ ILC1과 IL-17⁺ ILC3의 유의미한 변화는 확인되지 않았다(Fig. 3B).

4. 담배연기가 수지상세포와 대식세포에 미치는 영향

CSE 단독투여군 또는 OVA 단독투여군은 대조군과 비교하여 CD11c⁺ DC가 유의하게 증가하였고, OVA/CSE 복합투여군에서도 OVA 단독투여군과 비교하여 CD11c⁺ DC의 유의한 증가를 확인하였다($P < 0.05$) (Fig. 4A). CD11c⁺MHCII⁺ DC는 CSE 단독노출군과 OVA군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다($P < 0.05$) (Fig. 4B).

F4/80⁺CD11c⁺ 폐포 대식세포(alveolar macrophage)는 CSE 단독노출군과 OVA/CSE 복합노출군에서 각각 대조군과 OVA군에 비해 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$) (Fig. 4C). 특히, CD206⁺ M2 대식세포가 CSE 단독노출군과 OVA/CSE 복합노출군에서 CSE 노출에 따른 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$) (Fig. 4D).

고찰

이번 연구에서 OVA로 유도한 천식 마우스 모델을 통해 담배연기가 ILC2와 M2 폐포 대식세포 등 선천 면역계를 자극하여, 천식의 발생 및 악화에 기여함을 확인하였다.

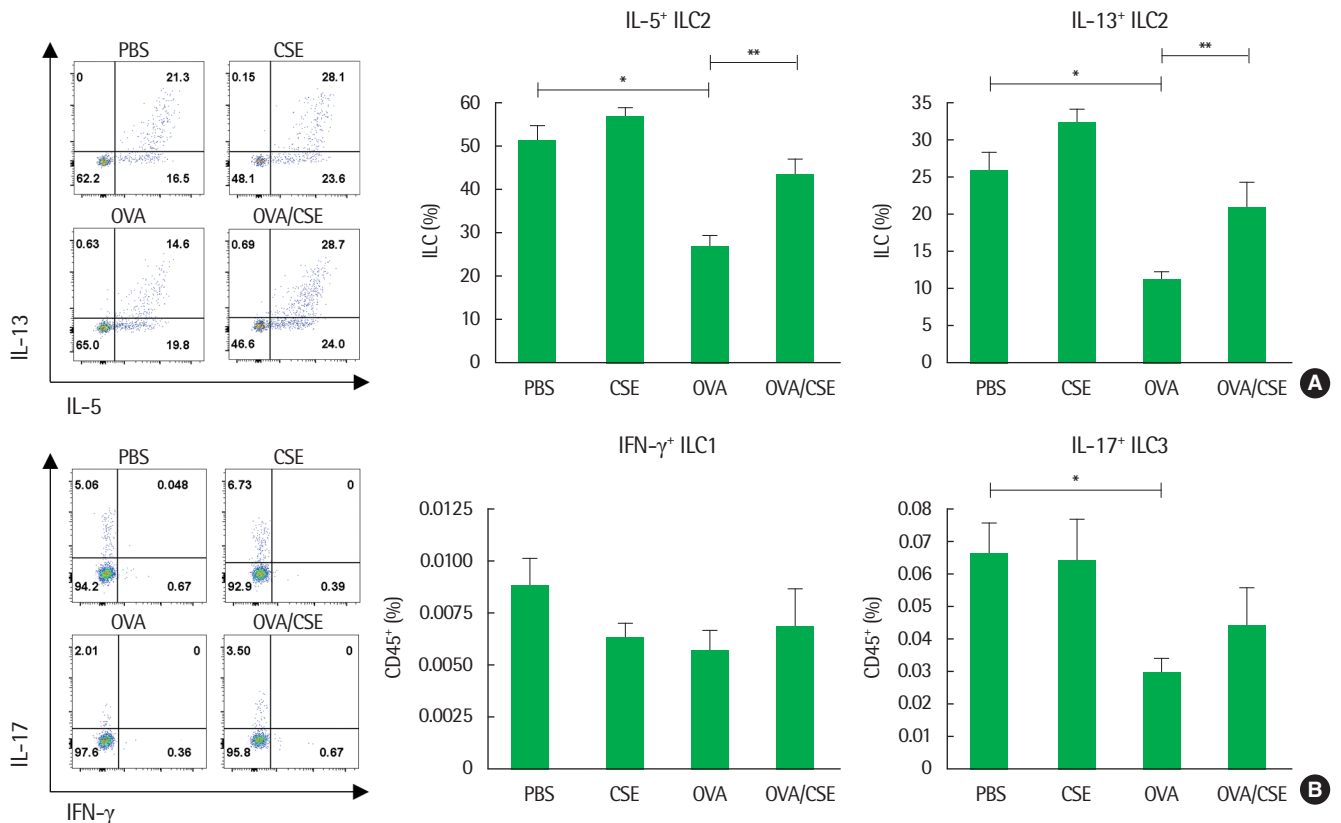


Fig. 3. Effect of CSE on ILCs in the lung tissues of each group. (A) A flow cytometric representation of IL-5⁺ and IL-13⁺ ILCs, and percentages of each population in ILCs. (B) A flow cytometric representation of IL-17⁺ and IFN- γ ⁺ ILCs, and percentages of each population in CD45⁺ cells. PBS, phosphate-buffered saline; CSE, cigarette smoke extract; IL, interleukin; OVA, ovalbumin; IFN, interferon; ILC, innate lymphoid cell. T-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and $n = 6$.

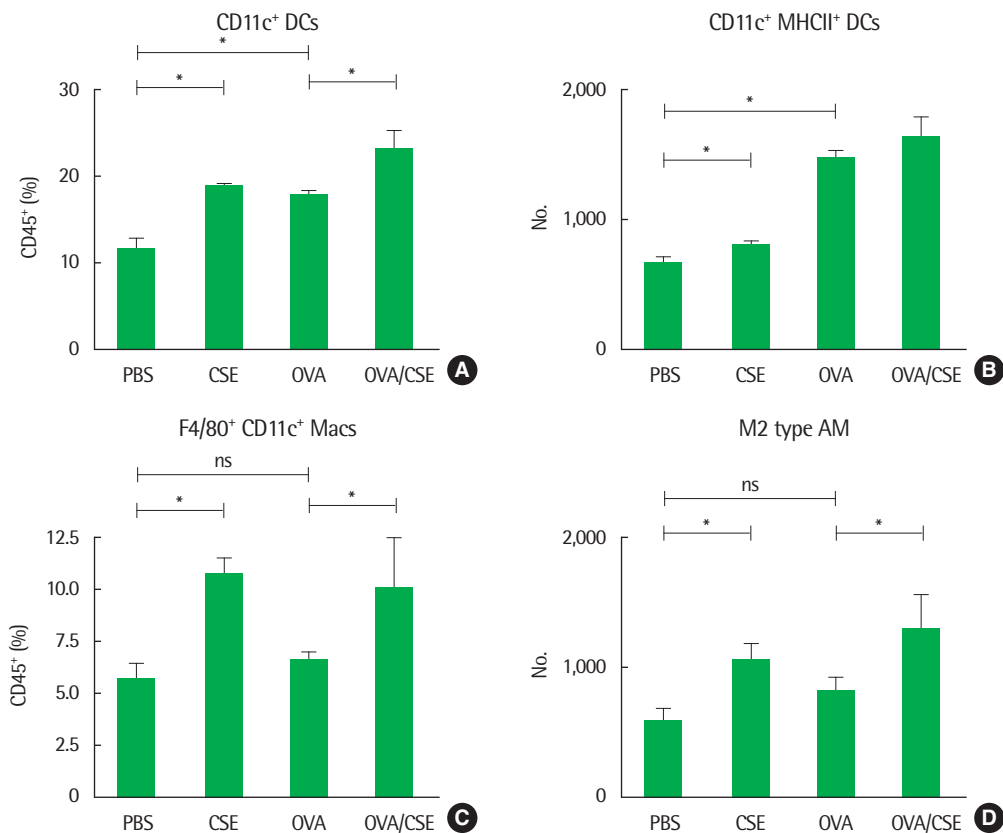


Fig. 4. Effect of CSE on DCs and alveolar macrophages in the lung tissues of each group. (A) The percentages of CD11c⁺ DCs in CD45⁺ cells. (B) The counts of CD11c⁺MHCII⁺ dendritic cells. (C) The percentages of F4/80⁺CD11c⁺ alveolar macrophages in CD45⁺ cells. (D) The counts of CD206⁺ M2 alveolar macrophages. PBS, phosphate-buffered saline; CSE, cigarette smoke extract; IL, interleukin; OVA, ovalbumin; DC, dendritic cell; AM, alveolar macrophage. T-test, **P*<0.05, and n=6.

이 연구에서는 5% CSE를 비강을 통해 기도에 노출시켜 흡연과 유사한 모델을 구축하였으며, 장기간 담배연기 노출이 선천면역계에 미치는 영향을 확인하고자 8주간 반복하였다. 이 연구는 천식의 발생에 있어 CSE에 의한 선천면역 활성화가 기여함을 확인하기 위해 OVA/alum 복합 투여 프로토콜 대신 OVA 단독 비강 투여 모델을 사용하였다. 일반적으로 천식 연구에 사용하는 마우스 모델은 OVA나 house dust mite (HDM)를 알레르겐으로 사용한다. HDM은 dectin-2를 통해 pattern recognition receptor (PRR)를 자극하여 기도 상피세포에서 IL-33 발현을 유도함으로써 ILC2 분화를 촉진하고 전형적인 2형 반응을 유도한다.¹⁴ 반면, OVA는 기도로 직접 투여하였을 때 PRR을 자극하지 않아 면역반응 개시를 유도하지 못하기 때문에 유의한 천식 표현형을 유도하기 어렵다. 따라서 OVA를 이용한 마우스 모델에서는 inflammasome을 통해 적응면역체계를 강화하는 aluminum hydroxide (alum)와 같은 Th2 면역증강보조제(pro-Th2 adjuvant)를 함께 섞은 후 복강 내로 주사하여 OVA에 대한 감작을 유도한다.¹⁵ 이 연구는 천식 발생(inception)에 CSE가 기여함을 입증하고자 일반적으로 널리 사용되는 천식 마우스 모델이 아닌 OVA 단독 비강 투여 모델을 사용하였다. 이전에도 OVA

단독 비강 투여 모델을 사용하여 천식에서 CSE의 역할을 확인한 연구가 있었다.¹⁶ OVA 100 µg을 주 5회, 총 8주 동안 비강 내로 투여 하더라도 명확한 천식 표현형이 유발되지 않았으나, CSE를 함께 투여할 경우 상피세포에서 thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 발현이 유도되어 Th2 반응과 천식성 기도염증이 나타남을 보고하였다. 이 연구에서도 예상했던 대로 OVA 단독 비강 투여만으로는 전형적인 천식이 생기지 않지만, CSE를 함께 투여하면 선천면역계가 활성화되어 기도염증과 기도과민성이 유의하게 항진됨을 확인하였다. 즉, 기도 면역계가 PRR 자극 없이 무해한 단백에 반복 노출되면 면역반응이 일어나지 않지만, CSE에 함께 노출되면 선천면역계, 특히 선천성 림프구와 대식세포를 자극하여 면역계를 활성화하고 OVA에 대한 감작을 일으켜 천식이 발생함을 시사하였다. 일반적으로 담배연기가 면역 체계에 미치는 영향은 광범위하며 다양한 성분으로 이루어져 있기에 작용 기전이 복잡하다.¹⁷ 일반적으로 담배연기에 포함된 활성산소종(reactive oxygen species)은 기도 내벽 상피 세포를 손상시키고 DNA 손상 및 염증성 유전자를 활성화시켜 염증을 촉진시킨다.⁴ 장기적인 담배연기 노출은 T 세포를 조절하는 것으로 알려져 있으며 그 외에 면역세포들의 활성화를 유도하

는 세포 신호 전달 경로에도 관여한다.⁴ 담배연기는 COPD 발병의 주요 위험 요인으로 알려져 있다.¹⁸ 천식과 COPD의 병리학적 특징이 공존하는 천식-COPD 중첩 증후군(asthma-COPD overlap syndrome, ACOS)의 경우 담배연기 및 대기 오염에 노출된 천식환자에서 ACOS로 발전되는 비율이 더 높다는 것이 연구를 통해 밝혀졌다.^{19,20} 이렇듯 담배연기는 기도질환을 야기하는 위험 인자이며, 천식의 발생 및 중증도 증가에도 기여한다는 결과가 다수 보고되었다.^{9,10} 담배 연기의 노출은 T 세포의 하위 집합의 비율에 영향을 미치며, 특히 흡연자에게서 CD4⁺ T 세포와 기억 T 세포가 증가한다.²¹ CSE는 Th1/Th17 면역 반응의 증가를 유도하여 COPD의 발병 및 중증도 증가에 영향을 미친다고 알려져 있으나, Th2 면역 반응 약화에도 관여함으로써 알레르기 감작 및 천식에 기여한다.²¹ 환자연구 결과에 따르면, 간접흡연의 환경에서 생활하는 어린이 천식 환자는 Treg의 비율은 감소하고 Th17 세포의 비율이 증가하여 천식 악화에 기여함이 보고되었다.⁶ 이 연구에서도 이전에 보고된 바와 같이 담배연기에 노출된 천식 마우스 모델에서 Th1, Th2, Th17 세포의 증가와 Treg 세포의 감소가 관찰되어 담배로 야기된 적응면역계의 교란이 천식 악화와 관련이 있음을 알 수 있었다.

흡연 경험이 있는 천식 환자는 폐기종 및 기도 폐쇄의 증상이 악화되고 폐기능이 감소하는 등 천식의 중증도가 증가하였고, IgE 증가 소견을 보였다.²² 이 연구에서는 OVA 특이 IgE를 직접 측정하지는 않았으나 유세포분석에서 CSE 노출에 따른 DC 증가 소견을 확인하여 담배가 감작 과정을 촉진시킬 수 있음을 시사하였다.

이 논문 연구진은 담배연기 노출에 따른 과도한 면역 반응의 활성화에서 선천 면역세포의 역할을 확인하고자, CSE에 노출된 천식 마우스 모델을 통해 선천 면역세포의 발현과 세부 아형을 확인하였다. 폐 조직 내 선천 면역세포인 ILC2와 폐포 대식세포가 유의하게 증가하는 것을 관찰하였고, 담배연기 노출에 의한 천식 기도염증 및 기도재형성 작용기전 중 하나로 선천성 면역반응의 조절이 있음을 제시하였다.

ILC는 여러 조직에 상주하는 선천 면역 세포로 조직의 면역 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다. ILC1, ILC2, ILC3 아형으로 나뉘는데 각각의 ILC 아형은 Th1, Th2, Th17 세포와 유사한 표현형을 가지며, 각 아형 별로 발현하는 전사인자 및 사이토카인이 상이하다.²³ ILC는 감염 및 손상에 따른 IL-33, IL-25 등의 신호전달물질에 의해 면역 반응 초기에 빠르게 활성화되며, 사이토카인을 분비하는 특성으로 인해 천식의 병인기전에도 핵심적인 역할을 할 것으로 기대 되었다.²³ 실제로 천식 환자에서 채취한 객담에서 ILC1, ILC2, ILC3의 수가 증가함으로써 천식과의 연관성이 확인되었다.¹⁰ 담배연기의 노출은 상피 세포의 손상을 야기함에 따라 기도 상피 세포의 투과성이 증가하고, IL-33, TSLP 등의 신호전달물질이 분비되어 ILC2의 활성화를 유도한다.²¹ 환자연구 결과에 따르면 담배연기가 IL-17A 및 Th17세포의 증가를 유도하는데, 실제로 CSE에 노

출된 염증성 장질환 마우스 모델에서 Th17, ILC3, 호중구가 함께 증가함을 관찰되었다.²⁴ 흡연자와 COPD 환자의 폐에서도 NR1P⁺ ILC3의 증가와 IL-17A, IL-22 분비의 증가가 확인된 바 있으며, 마우스 실험에서 CSE로 ILC3가 증가하여 만성 염증을 유도할 수 있음이 보고되었다.²⁵ 담배연기에 노출된 COPD 마우스 모델에서 세 가지 ILC 아형이 모두 증가하였으며, 특히 ILC1의 증가가 두드러졌다.^{26,27} 이 연구에서는 OVA로 유도한 천식 마우스 모델에 담배연기를 장기간 노출시킨 결과, IL-5⁺ ILC2와 IL-13⁺ ILC2의 유의한 증가를 관찰하였고, 예상과 다르게 IFN- γ ⁺ ILC1과 IL-17⁺ ILC3는 통계적으로 유의하지는 않지만 다소 증가하는 경향을 확인하였다. 이는 폐 질환에 따라 CSE가 작용하는 병인 기전이 다를 수 있음을 시사하며, 또는 담배연기 노출 프로토콜 및 적용한 천식모델 등의 차이로 인한 결과일 것으로 추정한다.

대식세포 역시 조직의 면역 항상성에 관여하는 선천 면역세포로 주변의 미세환경에 따라 M1, M2의 두 표현형으로 분화되어 각기 다른 기능을 수행하게 되는데, M1 대식세포는 전염증성 사이토카인을 생성하여 박테리아와 바이러스로부터 면역 반응을 유도하고 M2 대식세포는 항염증성 사이토카인 및 염증 매개 물질을 분비하여 천식 환자의 기도 염증과 기도재형성에 관여한다.²⁸ 이때, ILC가 분비하는 사이토카인이 대식세포와의 상호작용을 통해 대식세포의 분극화에 관여하며, ILC2가 M2 대식세포로의 분화를 유도하고 ILC1/ILC3는 M1 대식세포로의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다.¹⁰ M1, M2 대식세포는 표면 단백질과 분비하는 사이토카인들을 이용하여 구분할 수 있다. M1 대식세포의 분화에 관여하는 주요한 전사인자인 IRF5는 마우스와 인간의 M1 대식세포 활성화 표지자로 사용되며 특히 중증도가 심한 천식환자에서 증가하는 것으로 알려져 있다.²⁹ Ym-1, FIZZ1은 세포외기질의 침착에 관여하는 단백질로 마우스의 폐 섬유화를 유도하며 M2 대식세포 활성화 표지자로 사용된다.²⁸ 인간의 기도상피에서 발현되는 FIZZ2와 마우스의 FIZZ1이 상동성이 높다는 것이 보고되었으며, FIZZ2는 인간의 섬유성 폐질환에 관여하며 특히 천식 환자에서 발현이 증가한다.³⁰ 이 연구에서는 폐포 대식세포 및 M2 대식세포가 OVA 단독 투여군과 비교하여 OVA/CSE 투여 군에서 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다. 이에 따라 담배연기 노출로 유도된 ILC2와 M2 대식세포의 증가가 천식의 병인 기전 중 하나임을 제시하였으며, ILC2와 M2 대식세포 간에 상관관계가 존재할 가능성을 제시하였다.

이번 연구는 그동안 제대로 논의되지 않았던 흡연이 천식 기도의 선천 면역세포에 미치는 영향을 확인하였다는 데 의의가 있다. 하지만 담배연기 노출에 의한 ILC2의 증가가 천식의 병인기전에서 어떠한 역할을 하는지에 대한 추가 연구가 필요하며, 특히 ILC와 대식세포 간 긴밀한 관련성이 있음이 보고됨에 따라 ILC2와 M2 대식세포의 상관관계를 확인하는 연구가 필요하다. 또한 이 연구에서는 천식 마우스 모델 제작을 위해 OVA를 이용하였지만, OVA는 실

제로 인간에서 천식을 일으키는 항원이 아니기 때문에 임상적으로 적용하기 어려우며, 순수한 OVA만 단독으로 지속적으로 주입시킬 경우 면역관용을 일으킬 가능성이 있다.³¹

결론적으로 이 연구는 담배연기가 ILC와 대식세포에 미치는 영향을 규명하고자 담배연기 추출물과 OVA로 유도한 천식 마우스 모델을 통해, 장기적인 담배연기의 노출이 ILC2와 M2 대식세포를 활성화할 수 유도함으로써 천식의 발생 및 악화에 기여할 수 있음을 확인하였다.

REFERENCES

- Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol* 2015;15:57-65.
- Boonpiyathad T, Sözen ZC, Satitsuksanoa P, Akdis CA. Immunologic mechanisms in asthma. *Semin Immunol* 2019;46:101333.
- Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 2002;57:643-8.
- Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res* 2012;91:142-9.
- Thomson NC, Chaudhuri R, Livingston E. Asthma and cigarette smoking. *Eur Respir J* 2004;24:822-33.
- Jing W, Wang W, Liu Q. Passive smoking induces pediatric asthma by affecting the balance of Treg/Th17 cells. *Pediatr Res* 2019;85:469-76.
- Siew LQC, Wu SY, Ying S, Corrigan CJ. Cigarette smoking increases bronchial mucosal IL-17A expression in asthmatics, which acts in concert with environmental aeroallergens to engender neutrophilic inflammation. *Clin Exp Allergy* 2017;47:740-50.
- Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P, et al. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest* 2010;138:1140-7.
- Kim HY, Umetsu DT, Dekruyff RH. Innate lymphoid cells in asthma: will they take your breath away? *Eur J Immunol* 2016;46:795-806.
- 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.
- Lee HS, Park DE, Lee JW, Kim HN, Song WJ, Park HW, et al. Critical role of interleukin-23 in development of asthma promoted by cigarette smoke. *J Mol Med (Berl)* 2019;97:937-49.
- Lee HS, Kwon HS, Park DE, Woo YD, Kim HY, Kim HR, et al. Thalidomide inhibits alternative activation of macrophages in vivo and in vitro: a potential mechanism of anti-asthmatic effect of thalidomide. *PLoS One* 2015;10:e0123094.
- Shim JS, Lee HS, Park DE, Lee JW, Bae B, Chang Y, et al. Aggravation of asthmatic inflammation by chlorine exposure via innate lymphoid cells and CD11c(intermediate) macrophages. *Allergy* 2020;75:381-91.
- Clarke DL, Davis NH, Campion CL, Foster ML, Heasman SC, Lewis AR, et al. Dectin-2 sensing of house dust mite is critical for the initiation of airway inflammation. *Mucosal Immunol* 2014;7:558-67.
- Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008;181:3755-9.
- Nakamura Y, Miyata M, Ohba T, Ando T, Hatsushika K, Suenaga F, et al. Cigarette smoke extract induces thymic stromal lymphopoietin expression, leading to T(H)2-type immune responses and airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:1208-14.
- Bhalla DK, Hirata F, Rishi AK, Gairola CG. Cigarette smoke, inflammation, and lung injury: a mechanistic perspective. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009;12:45-64.
- Churg A, Cosio M, Wright JL. Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L612-31.
- Tu X, Donovan C, Kim RY, Wark PAB, Horvat JC, Hansbro PM. Asthma-COPD overlap: current understanding and the utility of experimental models. *Eur Respir Rev* 2021;30:190185.
- To T, Zhu J, Larsen K, Simatovic J, Feldman L, Ryckman K, et al. Progression from asthma to chronic obstructive pulmonary disease. Is air pollution a risk factor? *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:429-38.
- Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco smoke induces and alters immune responses in the lung triggering inflammation, allergy, asthma and other lung diseases: a mechanistic review. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15:1033.
- Jang AS, Park JS, Lee JH, Park SW, Kim DJ, Uh ST, et al. The impact of smoking on clinical and therapeutic effects in asthmatics. *J Korean Med Sci* 2009;24:209-14.
- Panda SK, Colonna M. Innate lymphoid cells in mucosal immunity. *Front Immunol* 2019;10:861.
- Kim M, Gu B, Madison MC, Song HW, Norwood K, Hill AA, et al. Cigarette smoke induces intestinal inflammation via a Th17 cell-neutrophil axis. *Front Immunol* 2019;10:75.
- Shikhagaie MM, Björklund ÅK, Mjösberg J, Erjefält JS, Cornelissen AS, Ros XR, et al. Neuropilin-1 is expressed on lymphoid tissue residing LTi-like group 3 innate lymphoid cells and associated with ectopic lymphoid aggregates. *Cell Rep* 2017;18:1761-73.
- Blomme EE, Provoost S, De Smet EG, De Grove KC, Van Eeckhoutte HP, De Volder J, et al. Quantification and role of innate lymphoid cell subsets in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Transl Immunology* 2021;10:e1287.
- Silver JS, Kearley J, Copenhaver AM, Sanden C, Mori M, Yu L, et al. Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat Immunol* 2016;17:626-35.
- Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 2014;14:81-93.
- Oriss TB, Raundhal M, Morse C, Huff RE, Das S, Hannum R, et al. IRF5 distinguishes severe asthma in humans and drives Th1 phenotype and airway hyperreactivity in mice. *JCI Insight* 2017;2:e91019.
- Liu T, Baek HA, Yu H, Lee HJ, Park BH, Ullenbruch M, et al. FIZZ2/RELM-β induction and role in pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2011;187:450-61.
- Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kiliç A, Sudowe S, Lunow M, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy* 2009;39:1246-54.