

Immunoglobulin E and Transcription Factor in Adenoid of Children with Allergy

Young-Gyu Eun¹, Seung Geun Yeo², Hoon Chung², Dae Han Chung²,
Myung Gu Kim¹, Jae Yong Byun², Moon Suh Park² and Chang Il Cha²

¹Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, School of Medicine, Sungkyunkwan University, Masan Samsung Hospital, Masan; and

²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

알레르기 소아의 아데노이드에서 IgE 항체와 항체조절인자

은영규¹ · 여승근² · 정 훈² · 정대한² · 김명구¹ · 변재용² · 박문서² · 차창일²

성균관대학교 의과대학 마산삼성병원 이비인후과학교실,¹ 경희대학교 의과대학 이비인후과학교실²

Received January 4, 2009
Accepted May 15, 2009

Address for correspondence
Seung Geun Yeo, MD, PhD
Department of Otolaryngology-
Head and Neck Surgery,
College of Medicine,
Kyung Hee University,
1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu,
Seoul 130-701, Korea
Tel +82-2-958-8474
Fax +82-2-958-8470
E-mail yeo2park@yahoo.com

Background and Objectives Immunoglobulin E (IgE) production in adenoid has been debated and the role of adenoid in development of allergy remains largely unknown. To examine the production of local IgE in adenoid involved with IgE-mediated sensitization, we evaluated IgE production and the expression of the transcription factor B cell leukemia/lymphoma-6 (BCL-6) and B lymphocyte inducer of maturation program 1 (Blimp-1) in adenoids.

Subjects and Method Ten children with allergic rhinitis (AR) and ten children without any history of AR were enrolled. Immunohistochemical studies of adenoid for IgE, BCL-6 and Blimp-1 were performed.

Results IgE was stained mainly in the germinal center and submucosal area and the staining scores of antibody to IgE did not differ significantly between children with AR and control. BCL-6 was mainly stained in mucosa and germinal center and Blimp-1 in mucosa. The scores of antibody to BCL-6 and Blimp-1 in children with AR and control did not show significant differences.

Conclusion We found that allergic rhinitis was not involved in the production of IgE nor the expression of the transcription factor BCL-6 and Blimp-1 in adenoid.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:594-8

Key Words Adenoid · IgE · BCL-6 · Blimp-1 · Allergy.

서 론

아데노이드는 Waldeyer's ring의 일부분으로서 B세포가 항원에 유도되기 시작하고 항원 특이적인 임파선의 기억세포(antigen-specific lymphoid memory cell)와 효과세포(effector B cell)가 생성되는 조직이다.¹⁾

숨을 쉴 때마다 비점막과 아데노이드는 병원균뿐만 아니라 공기를 통하는 여러가지 알레르기 물질에 노출되어 면역반응이 지속적으로 이루어지는 장소이기도 하다. 상기도의 점막 면역체계에 대한 연구에서 nasal-associated lymphoid tissue(NALT)는 소장에서 gut-associated lymphoid tissue(GALT)처럼 상기도에서 점막 면역계의 주요한 유도기관으로 알려졌다. 인간에서 Waldeyer's ring의 상피 면역조직은 설치류의 NALT와 기능적으로 유사하다.²⁾

편도와 아데노이드는 mucosa-associated lymphoid tissue(MALT)로서 주요한 면역 유도 역할을 하지만 임파선과 비슷한 속성을 보이고, 또한 획득면역(adaptive immunity)에서 점막형(mucosal-type)과 전신형(systemic-type)의 효과기관(effector organ)으로 역할을 한다.³⁾

국소적인 IgE 생산장소에 관하여 알레르기 비염 환자의

비점막에서 국소적인 immunoglobulin E (IgE) 생산 가능성이 알려져 있으며, 또한 IgE를 생산하는 B세포나 형질세포가 아데노이드에서 검출되어 아데노이드가 관여한다는 여러 보고가 있다.⁴⁾ 하지만 아데노이드에서 IgE가 생산되는지는 여전히 논란이 되고 있는 실정으로 알레르기의 발생에서 아데노이드의 역할은 잘 알려져 있지 않다.

지질다당류로 자극된 B-2세포의 형질세포로의 분화에 대한 연구에서 면역글로불린의 생산은 4개의 전사인자 B cell leukemia/lymphoma-6 (BCL-6), B lymphocyte inducer of maturation program 1 (Blimp-1), paired box gene 5 (PAX-5), X-box binding protein 1 (XBP-1)에 의해 조절된다고 알려져 있다.⁵⁾

이 모델에 의하면 BCL-6와 PAX-5는 면역글로불린 분비를 억제하고 Blimp-1과 XBP-1은 활성화하는 것으로 알려져 있다. 즉, BCL-6는 Blimp-1을 억제하고 Blimp-1은 PAX-5를 억제하며 PAX-5는 XBP-1을 억제하여, BCL-6와 PAX-5가 증가하면 Blimp-1과 XBP-1은 감소하고 BCL-6와 PAX-5가 감소하면 Blimp-1과 XBP-1은 증가하게 된다.⁶⁾ 하지만 이런 연구들은 B-2세포가 많은 비장과 혈액 내에서의 연구로 B-1세포가 많은 복강체액에서는 이와는 다른 paradigm을 보인다고 알려져 있고 아데노이드에서는 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 알레르기 비염이 있는 소아의 아데노이드가 IgE-mediated sensitization에 관여하여 IgE를 국소적으로 생산을 하는지 알아보고, 기존에 알려진 B세포의 형질세포로의 분화에 관여하는 전사인자 Blimp-1과 BCL-6의 발현과 IgE의 연관성을 알아보아 알레르기 비염과 아데노이드의 연관성에 대하여 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

대 상

아데노이드가 비대하여 아데노이드절제술을 시행한 20명의 소아를 대상으로 하였다. 재채기와 수양성 비루, 비폐색 등의 증상이 있으며, 이학적 검사에서 비점막이 창백하거나 수양성 비루의 소견이 있으면서 수술 전에 시행한 multi allergosorbent test (MAST, Hitachi)에서 class 2 이상인 경우 알레르기 비염 소아군으로 하였고, 그렇지 않은 경우 정상 대조군으로 하였다. 하지만 두경부 기형, 전신질환 또는 선천적 혹은 후천성 면역결핍이 의심되는 소아들과 수술 전 상기도 감염이 있었던 소아들은 이 실험에서 제외하였다. 본 연구는 소아의 보호자에게 연구의 목적을 충분히 설명한 뒤 동의를 얻은 경우에만 시행하였다.

방 법

검체 채취

아데노이드를 절제할 때 가능한 한 아데노이드가 부서지지 않도록 큐렛을 이용하여 한 덩어리로 절제했으며 검체의 절반은 영구조직검사에 이용되었고 나머지 절반을 본 실험에 이용했다.

면역조직화학 염색(항체 반응 전 공통과정)

면역조직화학 염색을 위해 우선 10% 중성 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 포매한 후 조직을 4 μ m 두께로 박절하였다. 조직 절단편을 양전하를 띤 슬라이드에 부착시키고 60°C의 항온기에서 한 시간 동안 가온한 뒤 xylene으로 5분간 탈 파라핀을 세 번 반복 시행한 후 순차적으로 낮은 농도의 알코올로 함수시킨 후 증류수로 수세하였다. 3% 과산화수소를 이용하여 10분간 처리한 후 인산염 완충액으로 세척하여 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase) 활성을 억제하였다.

면역조직화학 염색(항체 반응 과정)

IgE는 1 : 2000 비율로 희석시킨 후 각각의 일차항체(Novocastra Laboratories Ltd, UK)를 이용하였고, BCL-6는 1 : 100으로 희석하여 생쥐의 단클론 항체(DAKO, Glostrup, Denmark)를 이용하였고, Blimp-1은 1 : 200으로 희석시킨 후 생쥐의 항체(Affinity BioReagents, Inc., CO, USA)를 이용하였다. 모든 면역조직화학 염색은 Bond MaxTM (Vision BioSystems, MA, USA)를 이용하여 염색하였다.

염색 판독

염색결과 판독은 병리전문의에 의하여 과거의 조직 병리학적, 임상적 정보 없이 시행되었으며 IgE 염색의 경우 세포질 염색, 그리고 BCL-6와 Blimp-1의 경우 핵 염색을 시행하였다. IgE, BCL-6와 Blimp-1에 대한 면역조직화학 염색의 경우 염색 양성도를 염색 강도와 빈도로 세분화한 후 두 수치를 곱한 수치로 정하였다. 염색 세포 빈도는 25% 이하의 양성세포는 1점, 26~50%는 2점, 51~75%는 3점, 76% 이상은 4점으로 하였고, 염색 강도는 강(strong)은 3점, 중(moderate) 2점, 약(weak)은 1점으로 하였다. 그리고 현미경 400배율에서 서로 다른 부위 4곳에서 각각의 점수를 계산하여 평균을 내서 비교하였다.

통계분석

Mann-Whitney test를 이용하여 각 군 간의 연령과 IgE,

Blimp-1과 BCL-6의 염색 정도를 비교하였다. p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

실험군과 대조군의 연령 및 성별

알레르기 비염군은 10명이었으며 나이는 6.6 ± 2.4 세였고 5명의 남아와 5명의 여아였다. 대조군은 10명이었으며 나이는 6 ± 1.1 세이며 남아 5명과 여아 5명으로 나이와 성비는 알레르기 비염군과 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

IgE 염색 결과

아데노이드에서 IgE에 염색된 부위는 주로 배중심과 점막하 부위로 양 군에서 비슷한 양상을 보였고, 4곳에서 측정한 염색 강도와 염색 빈도의 평균은 각각 알레르기 비염군이 1.2와 1.2였고, 대조군이 1.3과 1.1이었다. 총점은 알

레르기 비염군이 1.4 ± 0.5 였고, 대조군은 1.3 ± 0.5 으로 두 군 간의 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

Blimp-1 염색 결과

Blimp-1이 염색된 부위는 주로 점막층으로 양 군에서 비슷한 양상으로 분포하였고, 4곳에서 측정한 염색 강도와 염색 빈도의 평균은 각각 알레르기 비염군이 2.3과 1.3였다. 대조군이 2.5와 1.9로 총점은 알레르기 비염군이 3.4 ± 2.9 , 대조군이 4.7 ± 3.6 으로 두 군 간의 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

BCL-6 염색 결과

BCL-6의 염색된 부위는 양 군에서 주로 배중심과 점막층에 분포하여 유의한 차이를 보이지 않았고, 4곳에서 측정한 염색 강도와 염색 빈도의 평균은 각각 알레르기 비염군이 1.2와 1.1이었고, 대조군이 1.2와 1.2로 총점은 알레

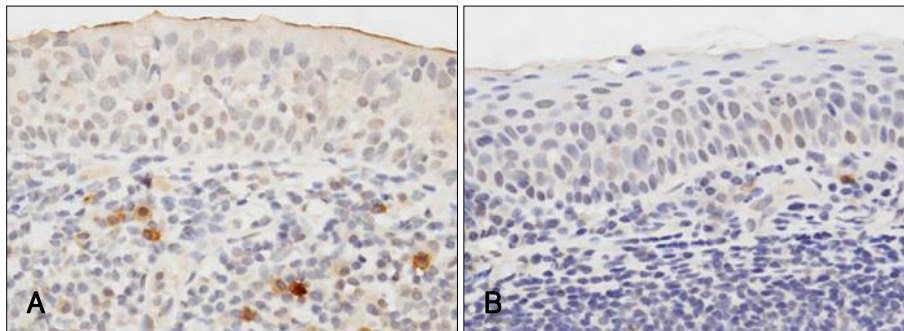


Fig. 1. IgE immunohistochemistry. Brown colored stained cells show IgE positive cells. IgE in submucosal area in children with allergic rhinitis (A) was not significantly different with control (B). $\times 400$. IgE: immunoglobulin E.

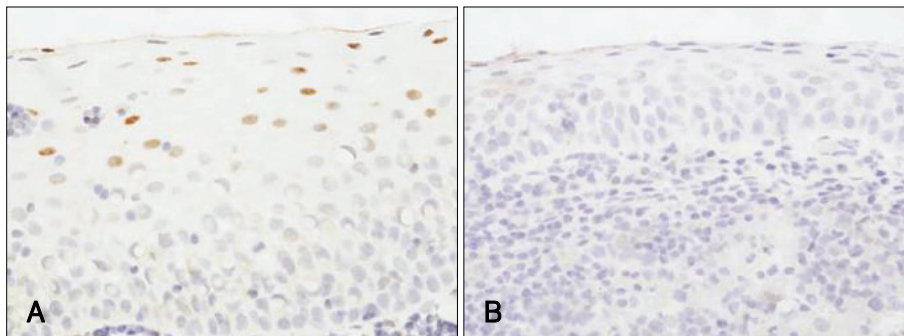


Fig. 2. Blimp-1 immunohistochemistry. Blimp-1 at mucosa in children with allergic rhinitis (A) was similar in control (B). $\times 400$. Blimp-1: B lymphocyte inducer of maturation program 1.

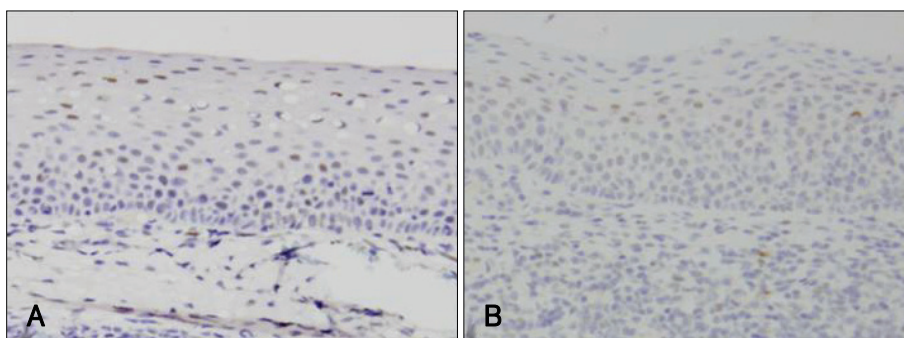


Fig. 3. BCL-6 immunohistochemistry. Brown colored stained cells show BCL-6 positive cells. BCL-6 at mucosa in children with allergic rhinitis (A) was similar in control (B). $\times 400$. BCL-6: B cell leukemia/lymphoma-6.

르기 비염군이 1.3 ± 2.6 , 대조군이 1.4 ± 1.5 로 두 군 간의 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

고 찰

아데노이드는 비인강의 상벽에 위치하고 있기 때문에 코로 흡입되는 공기에 의해 알레르기 항원과 항상 접촉한다. 점막에 위치한 알레르기 항원의 일부는 섬모운동에 의해 비인강으로 이동하고 삼킴운동에 의해 인두의 아랫부분으로 이동하게 된다. 점액은 비강과 부비동에서 섬모상피로 덮혀 있는 아데노이드로 직접적으로 이동하게 된다. 이런 점에서 알레르기 항원이 아데노이드 조직의 주요 구성성분 중 하나인 면역세포와 접촉할 수 있다.⁷⁾ 아데노이드에서 B 림프구는 주로 배중심과 외투층에 분포하고 있다. 외투층에 존재하는 B 림프구는 주로 안정화된 B 림프구이거나 기억 B 림프구라고 생각되고 배중심에 있는 세포는 주로 활성화되는 B 림프구라고 알려져 있다.

알레르기 비염과 아데노이드의 연관성에 대해서는 림프구의 아형이나 아데노이드에서 분비하는 사이토카인 등에 대해 아직까지 상당히 다른 의견들이 존재하고 있다. 소아의 아데노이드 경우, 반복되는 세균 감염이 발생할 경우 아데노이드에서의 사이토카인 분비가 방해 받고, 알레르기 항원의 자극 정도 차이에 의해서도 사이토카인 분비가 차이가 날 수 있다.^{8,9)} 따라서 알레르기 비염으로 인해 아데노이드의 국소 면역이 변할 가능성이 있다. 또한 알레르기 비염이 존재할 경우 아데노이드 비대가 발생할 수 있다고 알려져 있다.¹⁰⁾

알레르기 환자에서 기도점막은 IgE가 부착된 IgE⁺ mast cell을 가지지만, 상기도에서 이 IgE가 생산되는 위치는 여전히 알려져 있지 않다.¹¹⁾ Fokkens 등¹²⁾은 아데노이드에서 CD1a⁺ cell이 알레르기 질환에 관여한다고 보고하였고, Papatziamos 등¹³⁾은 아데노이드에서 IgE⁺ cell과 Fc ϵ RI⁺ cell 수의 증가가 알레르기와 관계가 있다고 보고하였다. 또한, FasL과 CTL4의 세포 내 표현(intercellular expression)이 있는 세포가 아데노이드의 매사이 공간(interfollicular space)에서 증가하는 것이 알레르기 비염의 발생과 관련이 있을 수 있다는 보고도 있다.¹⁴⁾ 하지만 계절성 알레르기 비염 환자에서 IgE와 연관된 림프구소포(lymphoid follicle)가 아데노이드와 구개편도, 경부 임파선에서 비점막보다 많이 발견되었다. 이 결과를 통해 Waldeyer's ring의 임파조직과 경부임파절에서 IgE 합성이 일어나고 비만 세포가 비점막으로 specific IgE를 이동시켜 알레르기 반응을 매개한다고 보고도 있다.¹⁵⁾ 본 연구에서는 이전 연구

에서와 다르게 면역형광 염색을 이용하여 소아의 아데노이드에서 IgE의 생산을 확인하였다. 또한 알레르기 발생에서 아데노이드의 역할에 대한 이전 연구들에서는 여러 세포들을 대상으로 하였기 때문에 아데노이드의 역할은 명확하지 않았지만, 본 연구에서는 나이와 성별에 차이가 없는 두 군, 즉 알레르기가 있는 소아와 알레르기가 없는 소아의 아데노이드에서 IgE의 비교를 통해 유의한 차이를 발견하지 못하여 알레르기 비염과 아데노이드의 연관성이 없을 것으로 생각된다.

소아의 아데노이드에는 3세 이전에는 B-1세포가 많고 3세 이후에는 B-2세포가 많다.¹⁶⁾ 본 연구에서는 4세 이상의 소아들로 B-2세포가 많은 아데노이드를 대상으로 하였으며, B세포의 항체 생성에 관여하는 인자인 BCL-6과 Blimp-1을 면역조직화학 염색을 통해 알아보았다. 전사억제인자 BCL-6는 배중심에서 B세포의 분화에 관여하고, 배중심의 B세포에서 높게 발현된다.¹⁷⁾ 배중심의 BCL-6의 주요 기능은 B세포 활성화에 관여하는 유전자와 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p27과 p21를 억제하여 세포 분화를 억제하고 Blimp-1을 억제하여 형질세포로의 분화를 억제한다.¹⁸⁾ Blimp-1은 형질세포로 분화하는 데 필요한 cdk inhibitor p18과 proapoptotic genes인 GADD45와 GADD153의 발현을 유도한다.¹⁹⁾ 형질세포는 마지막으로 분화한 세포이기 때문에 특별한 생존신호를 받지 않는 한 빠르게 자멸하기 때문에 Blimp-1은 증식에 필요한 유전자를 억제하고 proapoptotic gene을 유도한다.⁵⁾ 또한, Blimp-1은 면역글로불린 분비에 관계하는 유전자-면역글로불린 유전자, J chain, XBP-1, HSP-70-을 조절한다.⁵⁾ 본 연구는 기존에 알려진 이런 paradigm이 세포를 이용한 RNA나 protein level에서가 아닌 아데노이드 조직에서 BCL-6과 Blimp-1의 발현을 측정한 연구로서 의미가 있다. 이번 연구에서 알레르기 비염이 있는 소아와 대조군 모두에서 BCL-6과 Blimp-1의 발현에 차이가 없었다. 알레르기 비염이 있는 소아와 없는 소아의 아데노이드에서 IgE의 발현과 형질세포로의 분화를 조절하는 BCL-6와 Blimp-1의 발현이 차이가 없는 본 연구의 결과는 알레르기 비염과 아데노이드의 연관성이 없는 것을 나타낸다. 그러나 본 연구의 제한점으로 대상수가 적고 면역조직화학 염색 방법의 방법적인 한계가 있어 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Jahnsen FL, Brandtzaeg P. Antigen presentation and stimulation of the immune system in human airways. *Allergy* 1999;54 Suppl 57:37-49.
- 2) Kiyono H, Bienenstock J, McGhee JR, Ernst PB. The mucosal im-

- mune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg Immunol* 1992; 4 (2) :54-62.
- 3) Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003;67 Suppl 1:S69-76.
 - 4) Smurthwaite L, Durham SR. Local IgE synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2 (3) :231-8.
 - 5) Lin KI, Tunyaplin C, Calame K. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunol Rev* 2003;194:19-28.
 - 6) Tumang JR, Francés R, Yeo SG, Rothstein TL. Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *J Immunol* 2005;174 (6) :3173-7.
 - 7) Vohlonen I, Terho EO, Koivikko A, Vanato T, Holmén A, Heinonen OP. Reproducibility of the skin prick test. *Allergy* 1989;44 (8) :525-31.
 - 8) Bernstein JM, Ballow M, Xiang S, O'Neil K. Th1/Th2 cytokine profiles in the nasopharyngeal lymphoid tissues of children with recurrent otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998;107 (1) :22-7.
 - 9) Lindberg K, Rynnel-Dagoo B, Sundqvist KG. Cytokines in nasopharyngeal secretions; evidence for defective IL-1 beta production in children with recurrent episodes of acute otitis media. *Clin Exp Immunol* 1994;97 (3) :396-402.
 - 10) Modrzynski M, Azwisza E. An analysis of the incidence of adenoid hypertrophy in allergic children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71 (5) :713-9.
 - 11) Brandtzaeg P. Immunocompetent cells of the upper airway: functions in normal and diseased mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995;252 Suppl 1:8-21.
 - 12) Fokkens WJ, Vinke JG, De Jong SS, Bogaert DP, Kleinjan A, Eichhorn E. Differences in cellular infiltrates in the adenoid of allergic children compared with age- and gender-matched controls. *Clin Exp Allergy* 1998;28 (2) :187-95.
 - 13) Papatziagos G, van der Ploeg I, Hemlin C, Patwardhan A, Scheynius A. Increased occurrence of IgE⁺ and FcεpsilonRI⁺ cells in adenoids from atopic children. *Allergy* 1999;54 (9) :916-25.
 - 14) Zakrzewska A, Gryczyńska D, Kobos J, Górski P. Expression of Fas ligand and CTLA4 in adenoids has a predictive value for allergic rhinitis development in children. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;140 (3) :223-30.
 - 15) Ganzer U, Bachert C. Localization of IgE synthesis in immediate-type allergy of the upper respiratory tract. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1988;50 (4) :257-64.
 - 16) Arita M, Kodama S, Suzuki M, Mogi G. Single cell analysis of adenoid CD5⁺ B cells and their protective contributions to nasopharyngeal immunity. *Laryngoscope* 2003;113 (3) :484-91.
 - 17) Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997;276 (5312) :589-92.
 - 18) Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000;13 (2) :199-212.
 - 19) Tourigny MR, Ursini-Siegel J, Lee H, Toellner KM, Cunningham AF, Franklin DS, et al. CDK inhibitor p18 (INK4c) is required for the generation of functional plasma cells. *Immunity* 2002;17 (2) :179-89.