

## Effects of Nasal Instillation of *Staphylococcal* Enterotoxin B on Allergic Inflammation in Mice

Yong Min Kim<sup>1,3</sup>, Eung Hyub Kim<sup>1</sup>, Chan-Hee Park<sup>1</sup>, Yeo-Hoon Yoon<sup>1</sup>, Jin-Man Kim<sup>2</sup> and Ki-Sang Rha<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, <sup>2</sup>Pathology, <sup>3</sup>Research Institute for Medical Sciences, Chungnam National University School of Medicine, Daejeon, Korea

포도상구균 장독소의 비접적이 알레르기비염 마우스에서 알레르기 염증반응에 미치는 영향

김용민<sup>1,3</sup> · 김웅협<sup>1</sup> · 박찬희<sup>1</sup> · 윤여훈<sup>1</sup> · 김진민<sup>2</sup> · 나기상<sup>1,3</sup>

충남대학교 의과대학 이비인후과학교실, <sup>1</sup> 병리학교실, <sup>2</sup> 의학연구소<sup>3</sup>

**Background and Objectives** The role of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) in allergic rhinitis remains controversial. We used a mouse model of airway allergy to determine the effects of nasal instillation of SEB on allergic inflammation.

**Materials and Method** BALB/c mice were intranasally sensitized with compound of *Aspergillus melleus* proteinase (AMP) and ovalbumin (ova) in the presence (group 3) or absence of SEB (group 2). Control mice were intranasally sensitized with either phosphate buffered saline (PBS) (group 1) or SEB (group 4) alone. The production of serum antigen-specific antibodies and total IgE, and concentrations of cytokines including interleukin-4 (IL-4), IL-5, interferon-γ (IFN-γ) in nasal lavage fluid (NLF) and broncoalveolar lavage fluid (BALF) were compared among the groups. Pathologic studies for eosinophilic infiltrations in the nasal mucosa and peribronchial area were also conducted.

**Results** Serum ova-specific immunoglobulin E (IgE) & immunoglobulin G1 (IgG1) were significantly increased in group 2 and 3 compared to group 1. The concentrations of IL-4 in BALF were significantly increased in group 2, 3, and 4 compared to group 1. The concentrations of IL-5 in BALF and NLF were significantly increased in Group 2, 3, and 4 compared to group 1. The concentrations of IFN-γ were significantly increased in group 3 and 4 compared to group 2 although there was no significant difference among the groups in NLF. Group 2 demonstrates increased infiltration of eosinophils in the nasal mucosa and peribronchial area compared to group 3 and 4.

**Conclusion** These results suggest that the nasal exposure to SEB did not aggravate inflammation in allergic mice.      Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2009;52:885-92

**Key Words** Allergic rhinitis · *Staphylococcus* · Enterotoxin · Eosinophil.

Received June 18, 2009  
Revised September 16, 2009  
Accepted September 22, 2009

**Address for correspondence**  
Ki-Sang Rha, MD, PhD  
Department of Otorhinolaryngology-  
Head and Neck Surgery,  
Chungnam National University  
School of Medicine,  
33 Munhwa-ro, Jung-gu,  
Daejeon 301-721, Korea  
Tel +82-42-280-7698  
Fax +82-42-253-4059  
E-mail ksrha@cnu.ac.kr

### 서 론

많은 종류의 세균, 바이러스, 진균은 외독소(exotoxins)를 생성할 수 있는데, 이러한 외독소는 항원 제시세포의 주조직 적합복합체 II 분자(MHC II molecule)와 T세포의 베타-가변 부위(variable beta region)에 교차결합을 하여 T림프구를 활성화할 수 있다.<sup>1)</sup> 이러한 외독소들은 림프구를 활성화시키고 세포군을 팽창시켜 막대한 양의 싸이토카인을 생

성하게 하는데, 이를 초항원(superantigen)이라고 한다. 독성쇼크증후군, Kawasaki 병, Rheumatoid Arthritis, 아토피피부염, 비용을 동반한 만성비부비동염 등이 초항원에 의해 일어나는 질병으로 알려져 있다.<sup>1)</sup>

포도상구균에 의해 만들어지는 초항원성 외독소에는 포도상구균장독소(*staphylococcal* enterotoxins), 표피탈락독소(exfoliative toxins), 독성쇼크증후군독소(toxic shock syndrome toxin, TSST-1)가 있으며, 이들 외독소들은 초항원

과 알레르기 항원 모두로 작용할 수 있어서 만성 염증성 기도 질환의 발병기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.<sup>2)</sup>

최근 알레르기비염 환자에서 임상경과와 포도상구균의 외독소 혹은 이에 대한 혈중의 항체 검출이 관련이 있다는 연구가 보고되었고,<sup>3-5)</sup> 동물모델을 이용한 실험에서 포도상구균의 외독소가 알레르기비염의 발생에 영향을 미쳐서 알레르기 반응을 증폭시키는 것으로 알려져 있다.<sup>6,7)</sup> 하지만 독성쇼크증후군, 아토피피부염 등과 같이 초항원에 의해 발생하는 것으로 알려진 질환들에 비해 알레르기비염은 염증반응 정도가 심각하지 않고, 아직까지 포도상구균의 장독소가 알레르기염증 반응에 어떠한 영향을 미치는지 정확히 밝혀지지 않았다. 또한, 그 중요성과 관심이 증가하고 있지만 초항원을 이용한 연구는 아직까지 국내에서는 활발히 이루어지지 않고 있다.

따라서 저자들은 마우스를 이용하여 알레르기 모델을 만들고, 이 모델에서 포도상구균장독소 B(*Staphylococcus aureus* enterotoxin B, SEB)가 알레르기 염증반응에서 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

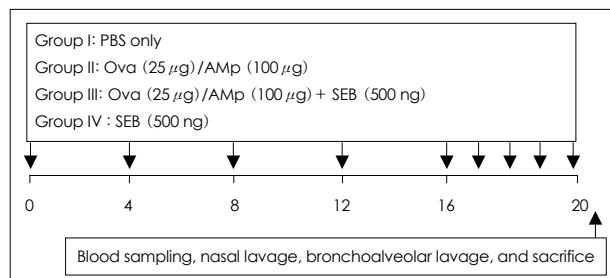
### 실험동물 및 사용 시약

특정 무 병원체 환경에서 사육된 10주 된 BALB/c 마우스 20마리를 사용하였다. 실험 1주 전부터 온도 20~23°C, 습도 45~70%의 실험실에서 사육하여 실험실 환경에 적응하도록 하였으며, 이 기간 내에 상기도 감염의 증상이나 다른 질환이 관찰되는 마우스는 실험에서 제외하였다.

### 마우스 감자

알레르기 모델을 만들기 위해 Kurup 등<sup>8)</sup>의 방법을 이용하였다. 마우스를 enflurane(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)을 이용해 전신마취를 하고, 100 µg의 *Aspergillus Melleus* proteinase (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)와 25 µg의 난알부민(Ovalumin, chicken egg albumin, Sigma Chemical Co. Phillipsburg, NY, USA)을 50 µL phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 후, 피펫을 이용하여 이 혼합물을 마우스의 양쪽 비공에 점적하였다. 비점적 후 마우스가 정상적인 호흡을 유지하게 하면서 약 1~2분간 몸통을 수직으로 세워 놓았다. 비점적은 4일에 한번씩 0일, 4일, 8일, 12일째에 시행하였으며, 16일째부터 20일째까지는 매일 일정한 시간에 비점적을 시행하였다(Fig. 1). 마지막 비점적 후 12시간 후에 마우스를 희생하였다.

포도상구균 장독소 type B(SEB, Enterotoxin type B



**Fig. 1.** Experimental design used to investigate the effect of nasal exposure with *staphylococcal* enterotoxin B (SEB) on allergic mice. PBS: phosphate buffered saline, Ova: ovalbumin, AMp: *Aspergillus melleus* proteinase.

from *S. aureus*, List Biological Laboratories INC., Campbell, CA, USA)는 500 ng을 20 µL의 PBS에 녹여 비점적 하였다. SEB의 용량은 Okano 등<sup>6)</sup>의 방법에 따라 500 ng으로 결정하였다.

### 실험군의 분류

동물은 네 군으로 나누어 각 군에 5마리씩 배정하였다 (Fig. 1).

#### Group 1. 대조군

마우스를 enflurane을 이용하여 전신흡입마취를 한 후 0일, 4일, 8일, 12일째 50 µL의 PBS를 비점적하였으며, 16일부터 20일까지는 비점적을 매일 시행하였다.

#### Group 2. 난알부민 혼합액을 투여한 군

같은 방법으로 PBS 대신 난알부민의 혼합액을 비점적하였다.

#### Group 3. 난알부민 혼합액과 SEB를 함께 투여한 군

같은 방법으로 PBS 대신 난알부민의 혼합물과 SEB를 비점적하였다.

#### Group 4. SEB 투여한 군

PBS 대신 SEB를 같은 방법으로 비점적하였다.

### 항체의 측정

마지막 비점적을 시행하고 나서 12시간이 경과한 후에 케타민(1 mg/kg)을 마우스의 복강 내에 주사하여 마취하였다. 마우스를 개복하여 하대정맥을 노출하고 26G 1 mL 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 4°C에서 2~4시간 보관 후 원심분리(1,200 g, 15분)를 시행하여 혈청만을 분리한 다음 항체측정을 위한 실험 전까지 -70°C의 냉동고에 보관하였다. ELISA kit(Shibayagi co., Gunma, Japan)

를 이용하여 혈청 총 immunoglobulin E(IgE), Ova-specific IgE, Ova-specific immunoglobulin G1(IgG1), Ova-specific IgG2a를 생산자가 권유한 방법대로 측정하였다. 간단히 기술하면, 96 well판을 3차례 세척한 후 Biotin-conjugated anti-IgE, anti-mouse IgE, anti-mouse IgG1, and anti-mouse IgG2a antibody를 각각 50  $\mu$ L씩 분주하고, 표준곡선을 위한 표준샘플과 혈청을 10  $\mu$ L씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 3차례 세척 후 HRP-conjugated avidin 100  $\mu$ L를 분주한 후 실온에서 20분간 배양하였다. 다시 Chromogen substrate reagent 100  $\mu$ L를 분주 후 실온에서 20분간 반응시켰으며, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어 반응정지 후 450 nm에서 흡광도(SPECTRA MAX Plus, Molecular Devicies, Sunnyvale, CA, USA)를 측정하였다.

### 싸이토카인의 측정

혈액을 채취하고 난 후 비세정액(nasal lavage fluid, NLF)과 기관지 폐포 세정액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 채취하였다. 기관절개를 가하고 기관절개창을 통해 cut-down tube를 삽입하여 관의 끝을 기관 분기부에 위치한 후 0.1 M PBS 용액을 1 mL를 5분 이상에 걸쳐 서서히 주입하였다가 빼내어 기관지 폐포 세정액을 얻었다. 이후 비세정액을 받기 위해 머리를 신전하여 전비공이 가장 낮게 위치하도록 한 뒤에 기관절개창을 통해 다시 cut-down tube를 삽입하여 관의 끝을 후비공에 위치하도록 한 다음, 0.1 M PBS 용액 1 mL를 천천히 점적하고 전비공으로 흘러나오는 비세정액을 받았다. 세정액 내의 싸이토카인을 측정하기 위하여 원심분리(100 g, 5분)를 한 다음 상청액만을 채취하여 interleukin-4(IL-4), IL-5, interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )의 양을 ELISA kit(Assay designs, Ann Arbor, Michigan, USA)을 이용하여 측정하였다.

### 조직학적 관찰

마우스의 머리를 몸통에서 절단한 후 비강을 둘러싸고 있는 골을 포함하여 채취한 후 하악, 피부와 근육 등을 제거한 다음 24시간 동안 10% paraformaldehyde 용액에 넣어 고정한 후 탈회를 위해 0.25 M ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA) 용액에 담가두었다. 상절치 바로 뒤에서부터 경구개의 절치유두(inscive papilla)의 약 2 mm 전방 부위까지 절단하여 블록을 만들고 파라핀 포매 후 5  $\mu$ m의 두께로 절편을 만들었다.

폐 조직은 흉부를 절개하여 채취한 후 10% formaldehyde solution 용액을 이용하여 고정하고 paraffin block을 제작하

였다.

비점막과 기관지주변 폐포 내 세포의 침윤을 관찰하기 위해 조직을 잘라서 H&E 염색을 시행하였다. 비강은 상악비갑개와 상악하비갑개 사이의 점막과 비중격에서 각각 3곳을, 폐는 기관지를 포함한 폐포에서 적어도 3곳에서, 실험의 목적과 과정을 모르는 병리과 의사와 실험자가 광학현미경을 이용하여 400배 시야에서 침윤된 호산구의 개수를 세었다.

### 자료 분석 및 통계처리 방법

각 군 사이에 유의한 차이가 있는지를 알아보기 위하여 SPSS version 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL)의 Mann-Whitney U test를 이용하였고, 유의수준은  $p<0.05$ 로 정하였다.

## 결 과

### 혈청 내 Total IgE, Ova-specific IgE, IgG1, and IgG2a의 농도(Fig. 2)

각 군의 total IgE의 평균농도는 1군이 43.92±24.92, 2군이 96.10±59.30, 3군이 69.35±49.74, 4군이 5.05±4.65 ng/mL이었으며, 2군과 3군의 total IgE 농도가 4군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p<0.05$ ) (Fig. 2A).

1, 2, 3군에서 Ova-specific IgE의 평균농도는 각각 1.48±0.28, 6.23±2.97, 4.27±2.30 U/mL였으며, 1군에 비해 2군과 3군의 농도가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p<0.05$ ). 2군이 3군보다 Ova-specific IgE의 농도가 증가하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 2B).

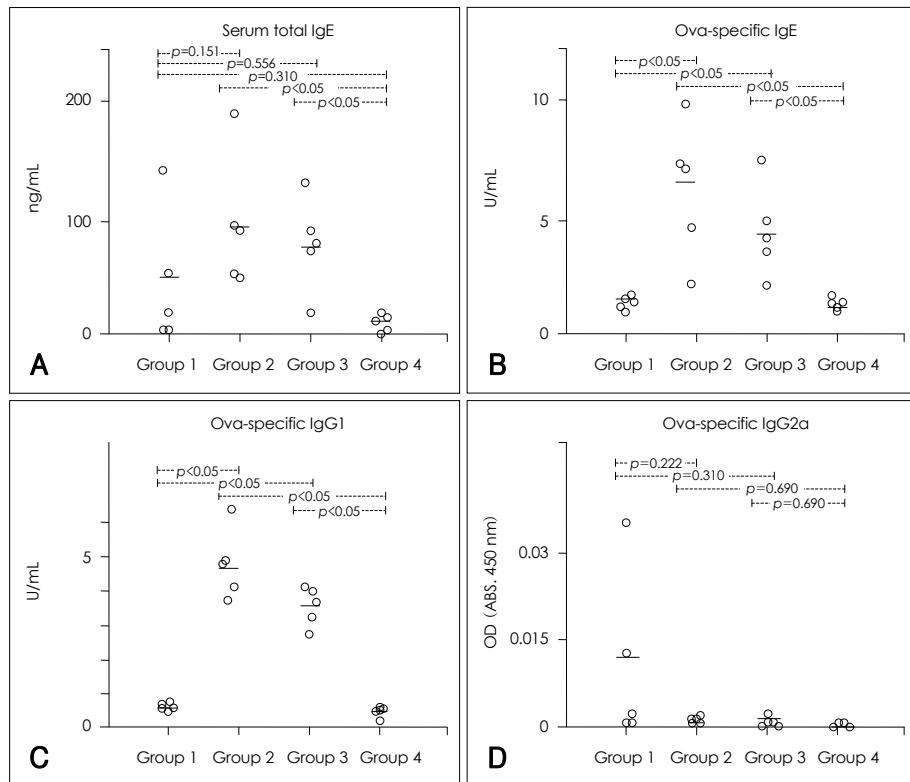
각군의 Ova-specific IgG1의 평균농도는 1군이 0.57±0.14, 2군이 4.79±1.33, 3군이 3.41±0.55였으며, Ova-specific IgE와 비슷하게 2군과 3군이 1군에 비해 흡광도가 통계적으로 유의하게 증가하였고, 2군과 3군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, 2군이 3군에 비해 흡광도가 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2C).

Ova-specific IgG2a의 흡광도는 각 군 사이에 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 2D).

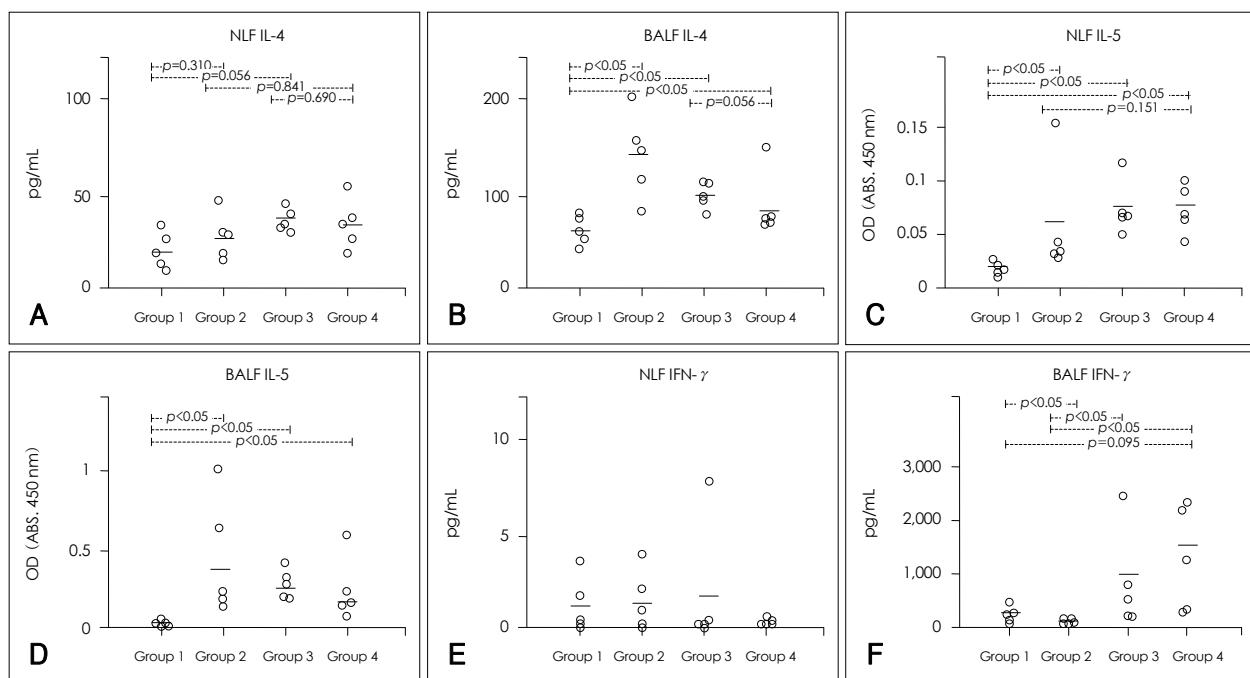
### 싸이토카인의 농도

#### IL-4

각 군에서 비세정액 내의 IL-4의 평균농도는 1군이 21.43±10.16, 2군이 30.65±12.90, 3군이 36.83±6.95, 4군이 35.72±16.76 pg/mL였으며, 각 군 IL-4 농도 사이에 통계적으로 의미 있는 차이는 없었다(Fig. 3A).



**Fig. 2.** Serum antibody production in experimental Groups. Serum total IgE (A), ova-specific IgE (B), ova-specific IgG1 (C), and ova-specific IgG2a (D) were determined by ELISA. IgE: immunoglobulin E, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay.



**Fig. 3.** The production of cytokines in nasal lavage fluid (NLF) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The concentration of IL-4 in NLF (A) and in BALF (B), the optical density (OD) of IL-5 in NLF (C) and in BALF (D), and the concentration of IFN- $\gamma$  in NLF (E) and in BALF (F) were also measured by ELISA. IL-5: interleukin-5, IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$ , ELISA: enzyme linked immunosorbent assay.

기관지 폐포세정액 내의 IL-4의 평균농도는 1, 2, 3, 4군 (Fig. 3B). 각각  $69.25 \pm 18.59$ ,  $145.86 \pm 49.59$ ,  $102.01 \pm 10.68$ ,  $94.59 \pm 30.55$  pg/mL였으며, 1군에 비해 2군, 3군, 4군에 서 IL-4의 농도가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p<0.05$ )

(Fig. 3B).

IL-5

비세정액 내의 IL-5의 평균흡광도는 1, 2, 3, 4군이 각각

$0.022 \pm 0.0049$ ,  $0.056 \pm 0.055$ ,  $0.071 \pm 0.029$ ,  $0.071 \pm 0.020$ 이었으며, 1군에 비해 2군, 3군, 4군에서 IL-5의 흡광도가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 3C).

기관지 폐포세정액 내의 IL-5의 평균흡광도는 1, 2, 3, 4군이 각각  $0.017 \pm 0.0025$ ,  $0.42 \pm 0.39$ ,  $0.26 \pm 0.12$ ,  $0.24 \pm 0.15$ 였으며, 1군에 비해 2군, 3군, 4군에서 IL-5의 흡광도가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 3D).

#### IFN- $\gamma$

각 군에서 비세정액 내의 IFN- $\gamma$  평균농도는 1군이  $0.40 \pm 2.34$ , 2군이  $1.42 \pm 2.36$ , 3군이  $1.92 \pm 7.67$ , 4군이  $0 \text{ pg/mL}$  였으며, 각 군 IFN- $\gamma$  농도 사이에 통계적으로 의미

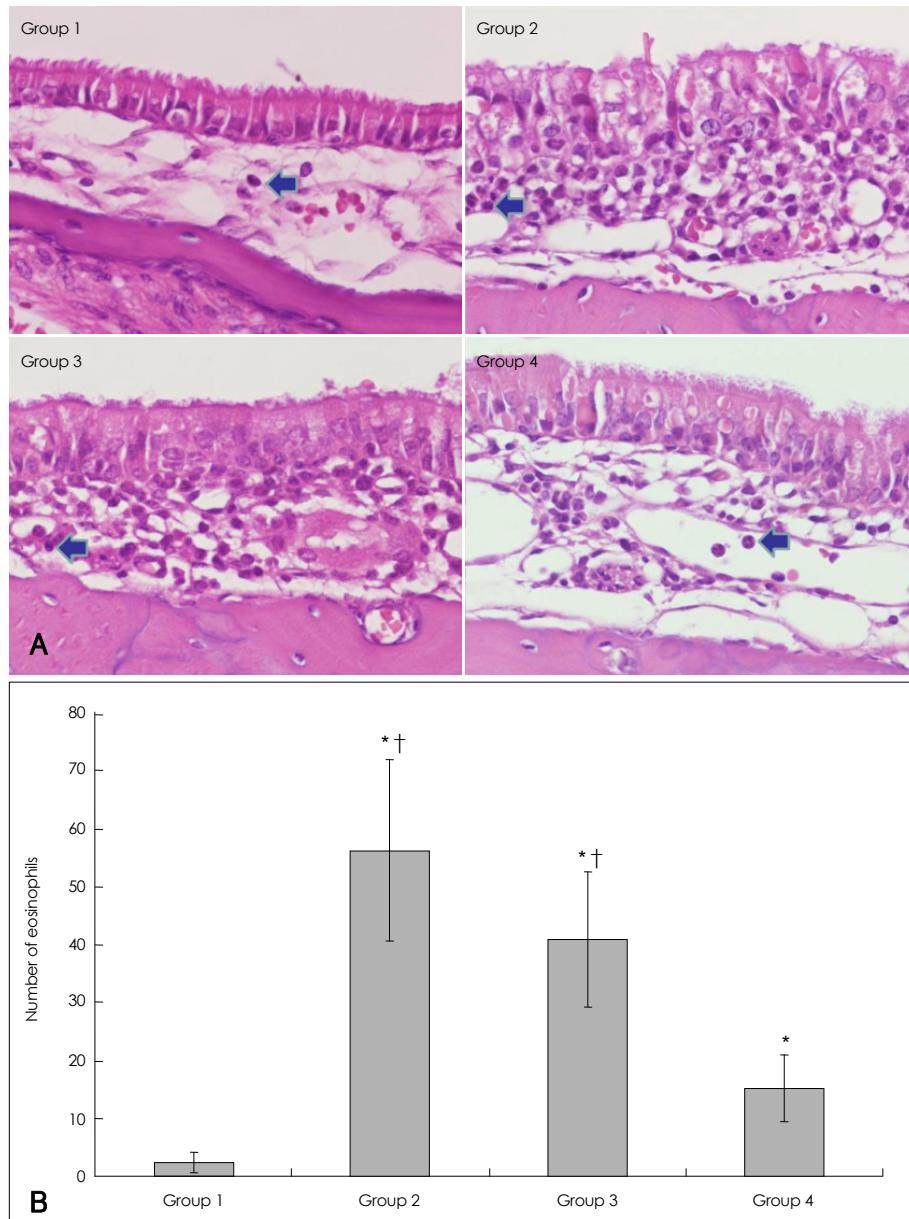
있는 차이는 없었다(Fig. 3E).

기관지 폐포세정액 내의 IFN- $\gamma$ 의 평균농도는 1, 2, 3, 4군이 각각  $216.08 \pm 142.67$ ,  $54.39 \pm 21.43$ ,  $1038.87 \pm 1517.454$ ,  $1604.45 \pm 1550.66 \text{ pg/mL}$  였으며, 2군 비해 3군과 4군에서 IFN- $\gamma$ 의 평균농도가 통계적으로 유의하게 증가하였고 3군과 4군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 3F).

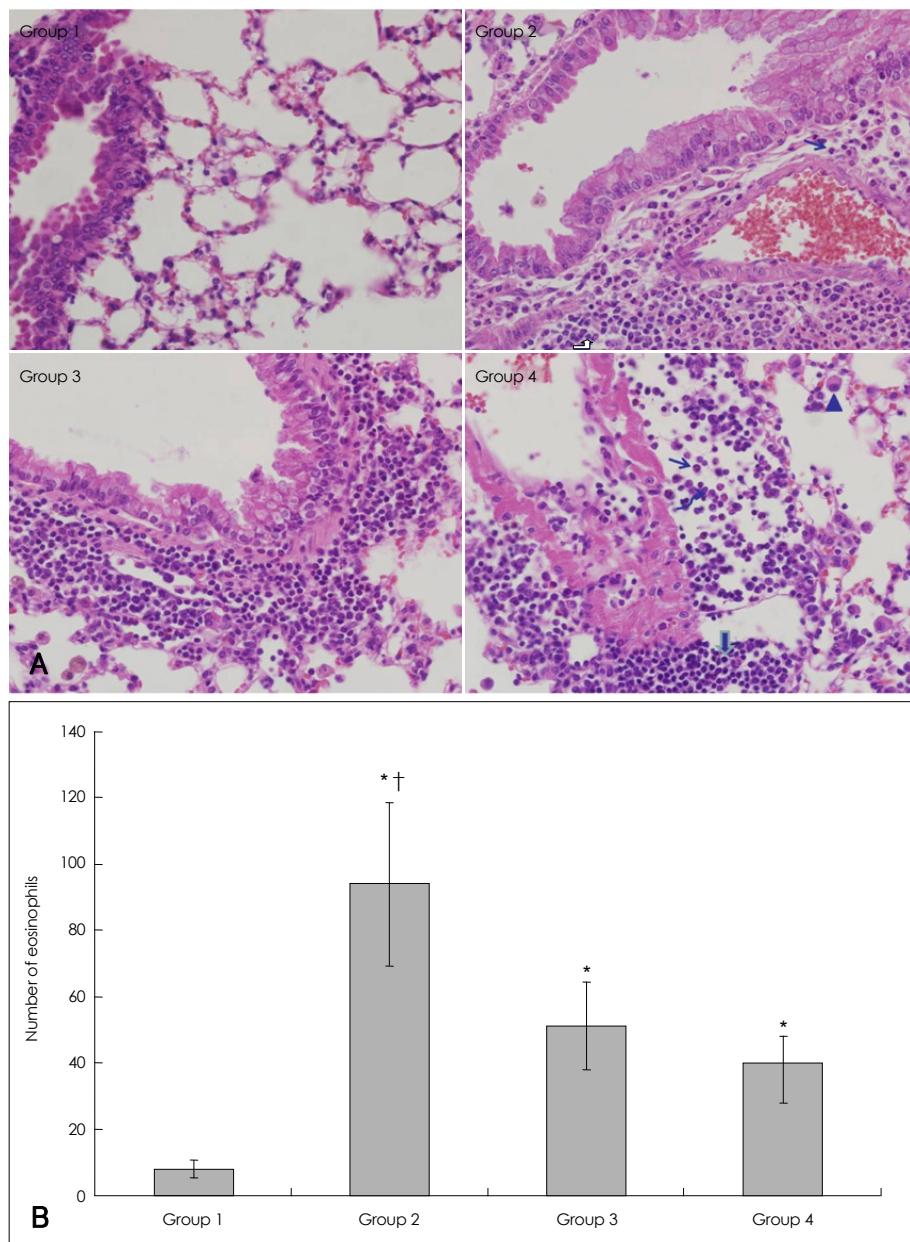
#### 조직학적 관찰

##### 비점막에서 호산구의 침윤(Fig. 4A)

비점막에서 호산구의 침윤을 관찰하기 위해 400배 시야에



**Fig. 4.** Effect of nasal exposure with *staphylococcal* enterotoxin B (SEB) on the induction of nasal eosinophilia (H&E stain, original magnification  $\times 400$ ) (A). Histologic sections of nose of experimental Groups shows that the eosinophilic infiltrations (arrow) in lamina propria and epithelium were significantly increased in Group 2, 3, and 4 compared to Group 1. In Group 2 and 3, eosinophilic infiltrations were significantly increased compared to Group 1 and 2 (B). \* $p < 0.05$  vs. Group 1, † $p < 0.05$  vs. Group 4.



**Fig. 5.** Histologic sections of lung of experimental Groups. Section from lung of Group 2, 3 and 4 shows that prominent interstitial inflammatory infiltrates consisting of lymphocytes (large arrow), plasma cells (angled arrow), histiocytes (arrowhead), neutrophiles (curved arrow), and focal aggregates of eosinophiles (straight arrow)(H&E stain, original magnification  $\times 400$ )(A). Eosinophilic infiltrations were significantly increased in Group 2, 3, and 4 compared to Group 1. In Group 2, eosinophilic infiltrations were significantly increased compared to Group 3 and 4 (B). \* $p<0.05$  vs. Group 1, † $p<0.05$  vs. Group 3 and 4.

서 호산구의 수를 측정한 결과 1군의 평균 침윤호산구 수는  $2.4 \pm 1.67$ , 2군은  $56.2 \pm 15.48$ , 3군은  $40.8 \pm 11.71$ , 4군은  $15.17 \pm 5.74$ 개였으며, 1군에 비해 2군, 3군, 4군의 침윤호산구 수가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p<0.05$ ). 2군이 3군보다 침윤호산구 수가 증가하는 경향을 보였지만 통계적인 차이는 없었고, 두 군 모두 4군에 비해 침윤호산구 수가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p<0.05$ ) (Fig. 4B).

#### 폐조직의 염증세포 침윤

폐 절제 조직에서 호산구의 침윤을 관찰하기 위해 400배 시야에서 호산구의 수를 측정한 결과 1군의 평균 침윤호산

구 수는  $7.8 \pm 2.82$ , 2군은  $94 \pm 24.42$ , 3군은  $51.3 \pm 13.25$ , 4군은  $37.8 \pm 10.2$ 개였으며, 1군에 비해 2군, 3군, 4군의 침윤호산구 수가 통계적으로 유의하게 증가하였다( $p<0.05$ ). 2군이 3군과 4군 비해 침윤호산구 수가 통계적으로 유의하게 증가하였지만( $p<0.05$ ), 3군과 4군 사이에는 통계적인 차이는 없었다(Fig. 5B). 1군에 비해 2군, 3군, 4군에서 폐간질조직에 많은 수의 염증세포의 침윤을 관찰할 수 있고, 2군은 3군과 4군에 비해 염증세포의 침윤이 더욱 두드러졌다(Fig. 5A). 특히 폐간질조직 내 염증세포는 비점막과 달리 호산구를 포함하여 많은 수의 림프구, 혈질세포, 조직구, 중성구 등의 침윤을 관찰할 수 있었다(Fig. 5A).

## 고 칠

진균을 이용한 알레르기 동물모델은 Kurup 등에 의해 처음 소개되었는데, 이 후 여러 연구에서 *Aspergillus* 항원의 비접촉만으로도 혈중의 특이 IgE 항체가 증가하고 조직에 호산구증다증이 유발됨을 보고하였다.<sup>8-11)</sup> 저자들은 본 연구에서 기존의 동물모델과는 달리 *Aspergillus Melleus*에서 기인한 proteinase(AMP)를 보조제(adjuvant)로 사용하여 ovalbumin(ova)을 복강 내에 주입하지 않고 비접촉만으로 전신감작이 일어나게 하는 알레르기 모델을 만들었다. 그 결과 알레르기 동물모델(2군)의 혈청 내 anti-ova IgE, anti-ova IgG1 등의 항체가 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가함을 알 수 있었고, 비강조직과 폐조직에서 호산구의 침윤이 증가함을 알 수 있었다. 그리고 이 동물모델에서 SEB를 추가적으로 비접촉하였을 때 ova에 대한 특이항체 생성, 비강 및 폐포에서 싸이토카인의 생성과 함께 조직에서 호산구의 침윤이 어떻게 변화하는지 알아보기 하였다.

최근의 연구 결과들은 비강과 기도에서 검출된 SEB가 심한 천식 및 알레르기 질환과 연관이 있으며, 특히 SEB에 대한 특이 항체가 검출이 되는 경우에는 더욱더 심한 임상경과와 관련이 있다고 보고하고 있다.<sup>12-14)</sup> 동물모델을 이용한 연구에서는 SEB만 비접촉한 경우 BALB/c 마우스와 C57BL/6 마우스의 BALF에서 호산구를 포함한 염증세포와 IL-4가 증가하고, 기관주위로 염증세포 침윤이 증가하고, 메타콜린 유발검사에서 기도반응성이 증가하는 것으로 보고하고 있다.<sup>15)</sup> Okano 등<sup>6)</sup>은 SEB만으로는 혈청 특이 항체가 증가하지 않았지만 *Schistosoma mansoni* egg 항원(SmEA)을 이용한 알레르기 비염모델에서는 비접촉한 SEB의 농도가 증가함에 따라 혈청 특이 IgE, IgG1과 총 IgE 항체가 증가하고, 비강 조직 내에 호산구의 침윤도 증가한다고 보고하였는데, 이것은 함께 사용한 SmEA가 SEB에 대한 보조제 역할을 하여 나타난 현상이라고 하였다. 저자들은 이들의 연구에 따라서 가장 큰 효과를 나타낸 SEB의 농도(500 ng/20 μL)를 본 실험에 사용하였다. 제한적인 국내의 연구환경으로 인해 본 연구에서는 SEB에 대한 특이 항체를 측정하지 않았지만, 그 대신에 ova에 대한 특이 항체와 비강과 폐에서 생성된 싸이토카인과 호산구의 침윤 등을 알레르기 염증 정도의 지표로 삼고자 하였다. 그 결과 본 연구에서는 알레르기모델의 생성과정에서 SEB에 의해 ova 특이 항체와 호산구의 침윤 등의 알레르기 염증반응이 더 증가하지 않았다(3군). 따라서 본 연구는 동물모델을 이용하여 진행된 기존의 연구결과들과 다른 결과를 보이는 연구라고 생각한다.

Hellings 등<sup>7)</sup>은 SEB의 효과를 보기 위해 BALBc 마우스

를 이용한 난알부민-알레르기 천식 모델을 사용하였는데, SEB의 비접촉이 혈청에서 IL-4와 IL-5뿐만 아니라 IFN-γ의 생성도 증가시켜, SEB가 알레르기 천식의 염증반응을 더욱 악화시킨다고 하였다. Okano 등<sup>6)</sup>의 연구 결과에서도 IFN-γ의 생성이 SEB의 농도가 증가할수록 더욱더 증가하는 것을 볼 수 있다. 또한 SEB를 전신적으로 투여한 후 배양한 splenocyte에서 IFN-γ의 생성이 증가함이 최근 연구에서 보고되기도 하였다.<sup>16,17)</sup>

본 연구에서도 NLF에서는 의미 있는 차이가 없었지만, SEB를 비접촉한 군(4군)에서 그렇지 않은 군(1군, 2군)에 비해 BALF에서 IFN-γ의 생성이 의미 있게 증가함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 SEB의 비접촉으로 인한 IFN-γ 생성의 증가가 2군에 비해 3군에서 알레르기 염증반응이 감소한 원인 중 하나일 것으로 생각하였고, 따라서 통계적인 유의성은 없었지만, 3군에서 총 IgE, ova-specific IgE, IgG1의 혈청 농도가 2군에 비해 감소하는 경향을 보였을 것으로 추측하였다.

IFN-γ의 생성만큼 두드러진 차이는 없었지만 SEB에만 노출된 마우스(4군)는 노출되지 않은 마우스(1군)에 비해, IL-4, IL-5의 생성 또한 BALF에서 통계적으로 의미 있게 증가하였고, 조직 내 호산구의 침윤도 증가하였다. 이것은 SEB 자체가 초항원으로써 갖는 다양한 능력 때문에 나타난 현상일 것이다.<sup>7,17)</sup>

본 실험에서 NLF에서 측정된 싸이토카인의 농도는 BALF의 농도와 연관성이 없고 농도도 낮게 측정이 되었는데, 이것은 세정액을 얻는 과정에서 비강 분비물이 세척액에 많이 희석이 되었고, 폐포에 비해 비강이 차지하는 부피가 상대적으로 작기 때문에 나타난 현상으로 생각하였다.

최근에 Ahn 등<sup>18)</sup>은 rat에서 SEB를 비접촉하였을 경우 비강조직에서 호산구의 침윤 대신 중성구의 침윤이 증가한다고 하였고, 따라서 SEB 자체가 Th2 반응을 일으키지 않는다고 보고하였지만, SEB의 비접촉 회수와 방법이 다르고 실험동물로써 rat를 사용하였기 때문에 보인 결과라고 생각된다.

동물모델을 이용한 기존의 연구들은 SEB를 추가적으로 비접촉하는 경우 비강 및 상기도 조직에서 호산구의 침윤이 더욱더 증가하는 것으로 보고하고 있다.<sup>6,7)</sup> 비용에서도 *S. aureus*의 외독소에 대한 항체가 발견되는 경우에는 조직 내의 호산구의 침윤이 증가함이 밝혀져 있다.<sup>2,19)</sup> 본 연구에서도 SEB만을 비접촉한 4군에서 대조군(1군)에 비해 조직 내 호산구의 침윤이 상대적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 하지만 본 연구에서는 SEB를 접촉하지 않은 알레르기비염 마우스(2군)에서 SEB를 접촉한 알레르기비염 마우스(3군)에 비해 호산구의 침윤이 더욱 증가하여 나타났는데, 이것 역시

SEB가 초항원으로써 갖는 여러 가지 특성상 나타난 결과로 볼 수 있다. 즉, SEB가 T세포의 베타-가변 부위(variable beta region)에 교차 결합, CD4+와 CD8+ T림프구 모두를 활성화하여 이 중 2군에서는 나타나지 않은 Th1반응이 3군에 나타나 알레르기 염증반응을 억제할 수 있다.<sup>20)</sup>

위에서 기술한 원인들이 본 연구결과가 기존의 연구결과들과 다른 이유를 충분히 설명할 수는 없지만 본 연구의 조직학적인 소견이 혈청 항체의 농도와 BALF에서의 싸이토카인 농도와 일치하고 일관된 결과를 보이므로 이에 대한 정확한 기전을 밝히기 위해 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### Acknowledgments

This study was financially supported by research fund of Chungnam National University in 2008.

### REFERENCES

- 1) Bernal A, Proft T, Fraser JD, Posnett DN. Superantigens in human disease. *J Clin Immunol* 1999;19(3):149-57.
- 2) Bachert C, Gevaert P, van Cauwenberge P. Staphylococcus aureus superantigens and airway disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2(3):252-8.
- 3) Okano M, Takishita T, Yamamoto T, Hattori H, Yamashita Y, Nishioka S, et al. Presence and characterization of sensitization to staphylococcal enterotoxins in patients with allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 2001;15(6):417-21.
- 4) Rossi RE, Monasterolo G. Prevalence of serum IgE antibodies to the Staphylococcus aureus enterotoxins (SAE, SEB, SEC, SED, TSST-1) in patients with persistent allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;133(3):261-6.
- 5) Yoon JH, Kim SY, Gang IG, Kim ST. The Correlation Study between the Specific IgE for Staphylococcus Aureus Exotoxin and Nasal Mucus Culture in Allergic Rhinitis. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2008;51(2):148-52.
- 6) Okano M, Hattori H, Yoshino T, Sugata Y, Yamamoto M, Fujiwara T, et al. Nasal exposure to Staphylococcal enterotoxin enhances the development of allergic rhinitis in mice. *Clin Exp Allergy* 2005;35(4):506-14.
- 7) Hellings PW, Hens G, Meyts I, Bullens D, Vanoirbeek J, Gevaert P, et al. Aggravation of bronchial eosinophilia in mice by nasal and bronchial exposure to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Clin Exp Allergy* 2006;36(8):1063-71.
- 8) Kurup VP, Mauze S, Choi H, Seymour BW, Coffman RL. A murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis with elevated eosinophils and IgE. *J Immunol* 1992;148(12):3783-8.
- 9) Grünig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med* 1997;185(6):1089-99.
- 10) Lee SH, Prince JE, Rais M, Kheradmand F, Shardonofsky F, Lu H, et al. Differential requirement for CD18 in T-helper effector homing. *Nat Med* 2003;9(10):1281-6.
- 11) Lee SH, Prince JE, Rais M, Kheradmand F, Ballantyne CM, Weitz-Schmidt G, et al. Developmental control of integrin expression regulates Th2 effector homing. *J Immunol* 2008;180(7):4656-67.
- 12) Bachert C, Gevaert P, Howarth P, Holtappels G, van Cauwenberge P, Johansson SG. IgE to Staphylococcus aureus enterotoxins in serum is related to severity of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5):1131-2.
- 13) Bachert C, van Zele T, Gevaert P, De Schrijver L, Van Cauwenberge P. Superantigens and nasal polyps. *Curr Allergy Asthma Rep* 2003;3(3):523-31.
- 14) Seiberling KA, Conley DB, Tripathi A, Grammer LC, Shuh L, Haines GK 3rd, et al. Superantigens and chronic rhinosinusitis: detection of staphylococcal exotoxins in nasal polyps. *Laryngoscope* 2005;115(9):1580-5.
- 15) Herz U, Rückert R, Wollenhaupt K, Tscherneig T, Neuhaus-Steinmetz U, Pabst R, et al. Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness--a model for non-allergic asthma. *Eur J Immunol* 1999;29(3):1021-31.
- 16) Fooladi AA, Sattari M, Hassan ZM, Mahdavi M, Azizi T, Horii A. In vivo induction of necrosis in mice fibrosarcoma via intravenous injection of type B staphylococcal enterotoxin. *Biotechnol Lett* 2008;30(12):2053-9.
- 17) Muralimohan G, Rossi RJ, Guernsey LA, Thrall RS, Vella AT. Inhalation of Staphylococcus aureus enterotoxin A induces IFN-gamma and CD8 T cell-dependent airway and interstitial lung pathology in mice. *J Immunol* 2008;181(5):3698-705.
- 18) Ahn SK, Jeon SY, Khalmuratov R, Kim DJ, Kim JP, Park JJ, et al. Rat model of Staphylococcal Enterotoxin B-induced Rhinosinusitis. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2008;1(1):24-8.
- 19) van Zele T, Gevaert P, Watelet JB, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, et al. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(4):981-3.
- 20) Tripathi A, Kern R, Conley DB, Seiberling K, Klemens JC, Harris KE, et al. Staphylococcal exotoxins and nasal polyposis: analysis of systemic and local responses. *Am J Rhinol* 2005;19(4):327-33.