

대식세포 활성화 조절을 통한 atorvastatin의 항천식 효과

모요셉,^{1,*} 배보람,^{2,*} 김율담,¹ 강한빛,¹ 이현승,² 조상현,^{1,2,3} 강혜련,^{1,2,3}

¹서울대학교 의과대학 중개외과, ²서울대학교 의학연구원 임상면역연구소, ³서울대학교병원 알레르기내과

Antiasthmatic effect of atorvastatin via modulation of macrophage activation

Yosep Mo,^{1,*} Boram Bae,^{2,*} Yuldam Kim,¹ Hanbit Kang,¹ Hyun Seung Lee,² Sang-Heon Cho,^{1,2,3} Hye-Ryun Kang,^{1,2,3}

¹Department of Translational Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul; ²Institute of Allergy and Clinical Immunology, Seoul National University Medical Research Center, Seoul; ³Division of Allergy and Clinical Immunology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Asthma is a chronic airway inflammatory disorder and is associated with macrophages. Statin, a well-known lipid-lowering agent, has recently been noted for its anti-inflammatory effect on macrophage. This study was designed to evaluate the antiasthmatic effect of atorvastatin via modulation of macrophage activation by using an animal model of allergic asthma.

Methods: Atorvastatin 40 mg/kg was given by gavage once a day for 3 days before challenge of ovalbumin (OVA); airway hyperresponsiveness (AHR), airway inflammatory cells, and cytokines were evaluated in the murine asthma model. The direct effect of atorvastatin on the activation of macrophages *in vitro* was determined using the alveolar macrophage cell line CRL-2456.

Results: Administration of atorvastatin reduced the numbers of total inflammatory cells, macrophages, and eosinophils as well as lung histology enhanced in the murine asthma model. AHR measured by enhanced pause was significantly reduced after atorvastatin administration in the murine asthma model ($P < 0.05$). Atorvastatin administration resulted in the reduction in serum OVA-specific IgE levels and the increase in serum OVA-specific IgG2a levels ($P < 0.05$). The mRNA levels of *Ccr3*, *Il-17*, and *Muc5ac* enhanced by OVA challenge were decreased by treatment with atorvastatin ($P < 0.05$). Along with these improvement in allergic inflammatory changes, the population of CD11c⁺CD206⁺ macrophages as well as the expression of *Ym-1* and *Relm-α* in the lungs were reduced with atorvastatin ($P < 0.05$). *In vitro* test with CRL-2456 showed that atorvastatin reduced the expression of *Cd206*, *Arg-1*, and *Fgf-2* induced by IL-4 stimulation ($P < 0.05$).

Conclusion: This study highlighted the antiasthmatic effect of atorvastatin on the suppression of M2 macrophage activation in allergic asthma. (*Allergy Asthma Respir Dis* 2021;9:27-35)

Keywords: Atorvastatin, Antiasthmatic agents, Macrophage, Asthma

서론

천식은 기도의 만성적인 염증성 질환으로 기도과민성과 기도재형성을 나타내며 알레르겐 특이 immunoglobulin E (IgE) 증가 및 호산구염증을 나타내는 type 2 helper (Th2)형 반응이 대표적인 병

태생리로 꼽힌다.^{1,2} Th2 세포는 Th2 사이토카인을 분비하여 호산구성 기도염증과 기도과민성에 기여할 뿐만 아니라³ M2 대식세포의 활성화에도 영향을 미친다.⁴

폐포 대식세포가 자극으로 활성화될 때 자극의 종류에 따라 M1, M2 두 가지 다른 특징을 가지는 상태로 분화한다. Interferon-γ

Correspondence to: Hye-Ryun Kang  <https://orcid.org/0000-0002-2317-4201>
Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, 101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03080, Korea
Tel: +82-2-2072-0820, Fax: +82-2-764-2199, Email: helenmed@snu.ac.kr

*These authors contributed equally to this study as co-first authors.

• This research was supported by a grant from Daewoong Pharmaceutical Company Ltd.

Received: May 6, 2020 Revised: August 6, 2020 Accepted: August 6, 2020

© 2021 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/>).

(IFN- γ), lipopolysaccharide는 M1 대식세포로의 분화를 촉진하고, interleukin (IL)-4, IL-13와 같은 Th2 사이토카인은 M2 대식세포로의 분화에 관여한다. 특히, M2 대식세포는 상처 치유와 항염증 작용에 관여하는 것으로 알려졌다. 최근 연구에서 알레르기 염증반응 심화 및 섬유화 등 병적인 반응에도 기여함이 밝혀졌다.^{5,6} 알레르기성 천식 마우스 모델에서 M2 대식세포가 중요한 역할을 함이 보고된 바 있는데, IL-4, IL-13으로 활성화된 M2 대식세포는 CCL17, CCL22 등의 케모카인, chitinase-like protein인 *Ym-1/2* 등과 같은 물질들을 분비함으로써 천식 환자의 기도 염증과 기도재형성에 영향을 미친다.^{5,7} 이처럼 대식세포와 천식이 병태생리적으로 깊은 연관성을 가지므로, 대식세포의 분화 조절을 천식 치료에 접목하고자 하는 시도가 있었다.⁸

Statin은 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase의 억제제로 mevalonate의 생성을 저해하여 cholesterol 생합성을 억제한다.⁹ 고지혈증 치료제로 널리 사용되고 있으나 최근 염증 억제제로서 statin의 잠재적인 가능성이 보고되었다. Statin 투여를 통해 폐 조직에서 염증세포의 침윤, CD40, CD40L, VCAM-1 발현이 감소하고 기관지폐포세척액 내 염증세포와 폐 조직에서의 mitogen-activated protein kinase, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 활성 감소가 관찰되었다.^{10,11} 그러나 이러한 statin에 의한 항염증 효과가 어떠한 기전에 의하여 나타나는지는 자세히 알려지지 않았다.

이 연구에서는 ovalbumin (OVA) 천식 동물모델에 atorvastatin을 경구 투여하여 항천식 효과를 확인하는 한편, atorvastatin의 대식세포 활성화에 미치는 영향을 평가하여 대식세포 조절을 통한 atorvastatin의 항천식 효과를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 천식마우스모델 제작 및 atorvastatin 처리

암컷 C57BL/6 마우스를 구입하여(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea) 특정 병원체가 없는 조건에서 유지하였다. 실험에 6주령 마우스를 사용하였고, 서울대학교 실험실 동물 자원 연구소의 Institutional Animal Care and Use Committee 승인(SNU-140123-5) 하에 수행되었다. 각 그룹군은 대조군과 실험군을 기준으로 phosphate-buffered saline (PBS)만 투여한 정상군, atorvastatin 단독 투여 대조군, OVA로 유도된 천식 모델군, 천식 모델군에 atorvastatin을 처리한 실험군을 설정하고 각 그룹별로 4마리 마우스를 설정하였다.

0일과 14일에 OVA 75 μ g와 Alum 2 mg을 PBS 200 μ L에 혼합하여 함께 복강 내 투여하여 감작시켰고, 이후 기도내 천식성 염증을 유발하기 위해 21, 22, 23일에 OVA 50 μ g을 PBS 50 μ L에 혼합하여 비강 내로 투여하였다(Fig. 1A).

Atorvastatin은 감작 후 OVA 기도 투여 전 40 mg/kg 조건으로 OVA 투여 시 동시에 3일간 위관(gavage) 투여하였다. 효과적인 용량과 투여 횟수는 statin의 약동학에 근거하여 설정하였다.¹²

2. Methacholine 기도과민성 측정

마지막 OVA 비강 투여 1일 후 OCP3000 (Allmedicus, Anyang, Korea)를 사용하여 기도과민성을 측정하였다. 메타콜린의 농도를 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL로 차례대로 증량하면서 단계별로 3분간 흡입시킨 후, 각각의 농도에서 3분간 30초 간격으로 기도 과민성의 지표인 Penh (enhanced pause)을 측정하였다.¹³

3. 천식 염증반응 분석

기도과민성 평가 후 24시간 뒤에 마우스를 희생시키고 기관지폐포세척액 및 폐조직을 수득하였다. 케타민을 복강 투여하여 마우스를 마취시킨 후 기도내 카테터를 삽관하고 2-mL PBS를 투여하여 기관지폐포세척액을 수득하였다. 수득한 기관지폐포세척액의 세포들을 염색하여 현미경으로 염증세포의 종류별 수를 확인하였다. 폐에서 병리학적인 변화와 특성을 평가하고 비교하기 위해 마우스의 좌측 폐를 PBS로 확장한 후 파라핀에 고정하고 매립시켜 조직 절편을 제작하였다. 제작한 조직 절편으로 hematoxylin & eosin 염색과 periodic acid-Schiff 염색을 시행하여 분석하였다.

이와 함께 기관지폐포세척액 내 IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ 를 효소면역측정법을 이용하여 측정하였다. 또한, 마우스의 심장으로부터 전혈을 얻은 후 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 수득한 혈청 내 OVA-특이 IgE, IgG1, IgG2a를 효소면역측정법으로 측정하였다.

4. 대식세포 활성화 표지자 분석

폐 조직 시료에서 RNA를 추출한 후 cDNA로 역전사시켰다. 획득한 cDNA로 quantitative real-time polymerase chain reaction을 실시하였고 폐 조직 내의 대식세포 활성화 표지자인 *Arg-1*, *Ym-1*, *Cd206*의 mRNA 발현 정도는 SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 통하여 확인하였다. 각 표본 내의 유전자 발현을 *Gapdh*로 정규화하여 분석하였다. 실험에 사용된 각 유전자의 프라이머 서열은 다음과 같다.

Il-17: forward 5'-GTCCAGTAAGGCCCTCAGACT-3', reverse 5'-GGGICTTCATTGCGGTGG-3'

Ccr3: forward 5'-CCCGAAGTGTGACTTTTGCT-3', reverse 5'-CCTCTGTATAGCGAGGACTG-3'

Muc5ac: forward 5'-CCACTGGTTCTATGGCAACACC-3', reverse 5'-GCCGAAGTCCAGGCTGTGCG-3'

Ym-1: forward 5'-GGGCATACCTTTATCCTGAG-3', reverse 5'-CCACTGAAGTCATCCCA-3'

Relm- α : forward 5'-CCAATCCAGCTAACTATCCCTCC-3', re-

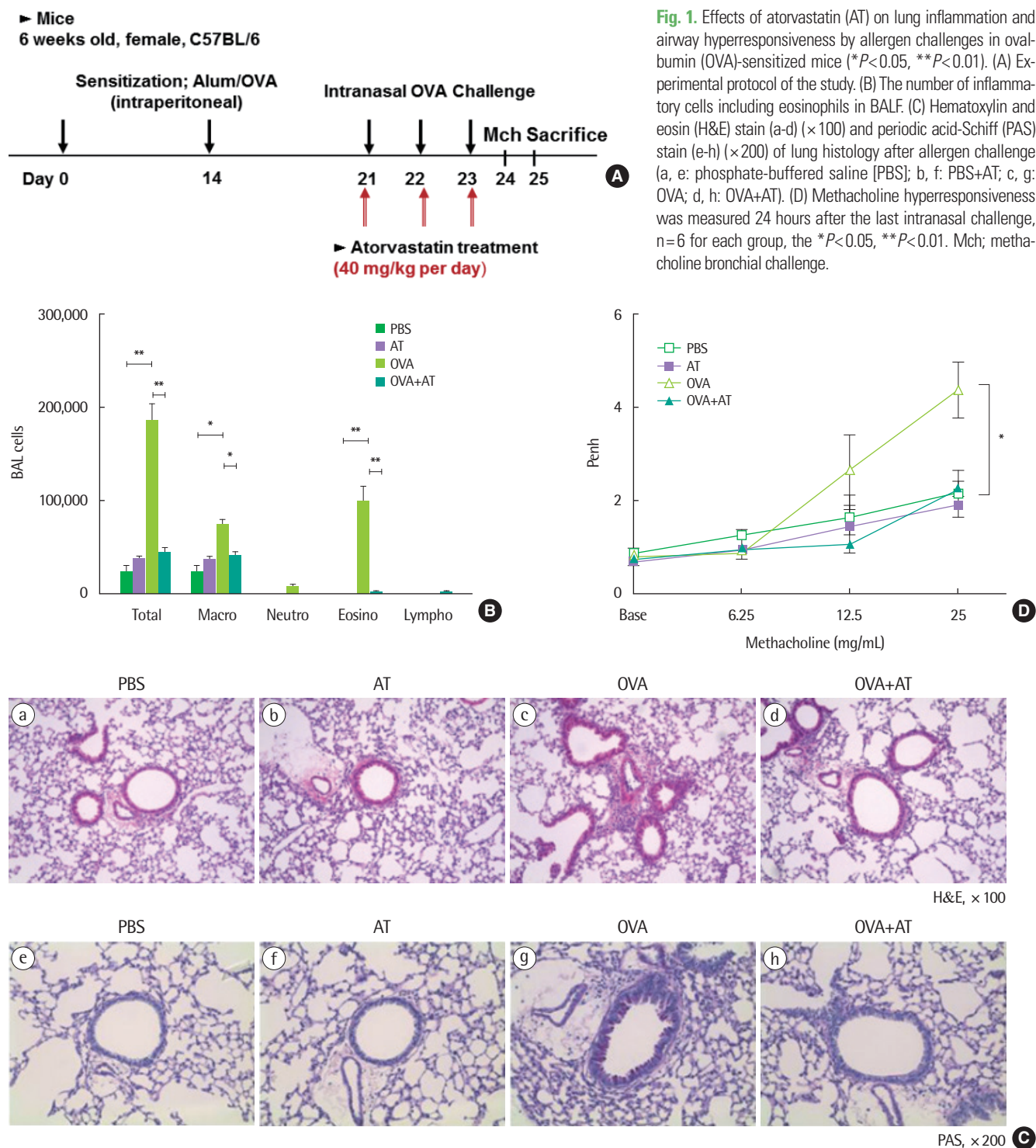


Fig. 1. Effects of atorvastatin (AT) on lung inflammation and airway hyperresponsiveness by allergen challenges in ovalbumin (OVA)-sensitized mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (A) Experimental protocol of the study. (B) The number of inflammatory cells including eosinophils in BALF. (C) Hematoxylin and eosin (H&E) stain (a-d) ($\times 100$) and periodic acid-Schiff (PAS) stain (e-h) ($\times 200$) of lung histology after allergen challenge (a, e: phosphate-buffered saline [PBS]; b, f: PBS+AT; c, g: OVA; d, h: OVA+AT). (D) Methacholine hyperresponsiveness was measured 24 hours after the last intranasal challenge, $n = 6$ for each group, the * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Mch; methacholine bronchial challenge.

verse 5'-ACCCAGTAGCAGTCATCCCA-3'
Irf-5: forward 5'-GGTCAACGGGGAAAAGAACT-3', reverse
 5'-CATCCACCCCTTCAGTGTACT-3'
Cd206: forward 5'-CAAGGAAGGTTGGCATT-3', reverse 5'-
 CCTTTCAGTCCTTTGCAA-3'

Arg-1: forward 5'-CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-3', reverse
 5'-AGGAGCTGTCATTAGGGACATC-3'
Fgf-2: forward 5'-GGCTTCTTCTGCGCATCCA-3', reverse 5'-
 GCTCTTAGCAGACATTGGAAGA-3'
Gapdh: forward 5'-ACGGCAAATTCAACGGCACA-3', reverse

5'-AGACTCCACGACATACTCAG-3'

5. 유세포 분석

염색 전에 수득한 폐 조직을 단일 조직으로 자른 뒤 Collagenase (Washington Biotechnology, Baltimore, USA)를 이용하여 단일 세포로 구성된 세포 현탁액을 제작하고 FcγR-특이적 차단 mAb (2.4G2)와 배양한 후 세척하였다. 염색을 위해 Percp-cy5-conjugated anti-CD45 (eBioscience, San Diego, CA, USA), APC-conjugated anti-F4/80 (eBioscience), PE-cy7 conjugated anti-CD11c (eBioscience), FITC-conjugated anti-CD206 (BioLegend, San Diego, CA, USA), APC-conjugated anti-CD3 (eBioscience), FITC-conjugated anti-CD4 (eBioscience) 이와 같은 항체를 사용하였다. 세포 분석은 FlowJo ver. 10 소프트웨어 (Treestar, Ashland, OR, USA)를 사용하였고 LSRII (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 분석하였다.

6. 세포 배양

CRL-2456, 폐포 대식세포 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하였다. 세포를

10% fetal bovine serum와 1% 항생제를 첨가한 Rosewell Park Memorial Institute 배지를 이용하여, 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 유지하였으며 2-3일 간격으로 배지를 교체하였다. 이렇게 배양한 CRL-2456을 M2 대식세포로 분화시키기 위해 마우스 재조합 IL-4 (20 ng/mL; BioLegend)로 자극하였으며, atorvastatin의 효과를 평가하기 위해 atorvastatin을 농도별(0.1, 1 μM)로 처리하여 비교하였다.¹⁴

7. 통계

모든 데이터는 mean ± standard error of the mean으로 표시하였다. 통계적 유의성을 위해 Mann Whitney U 검정을 시행하여 그룹 간의 차이를 계산하였다. $P < 0.05$ 일 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. Atorvastatin에 의한 기도염증과 기도과민성의 개선

각 군의 폐염증 정도를 기관지폐포세척액의 염증세포 분석으로 조사하였다. OVA로 유도된 천식마우스모델에서 atorvastatin을 투

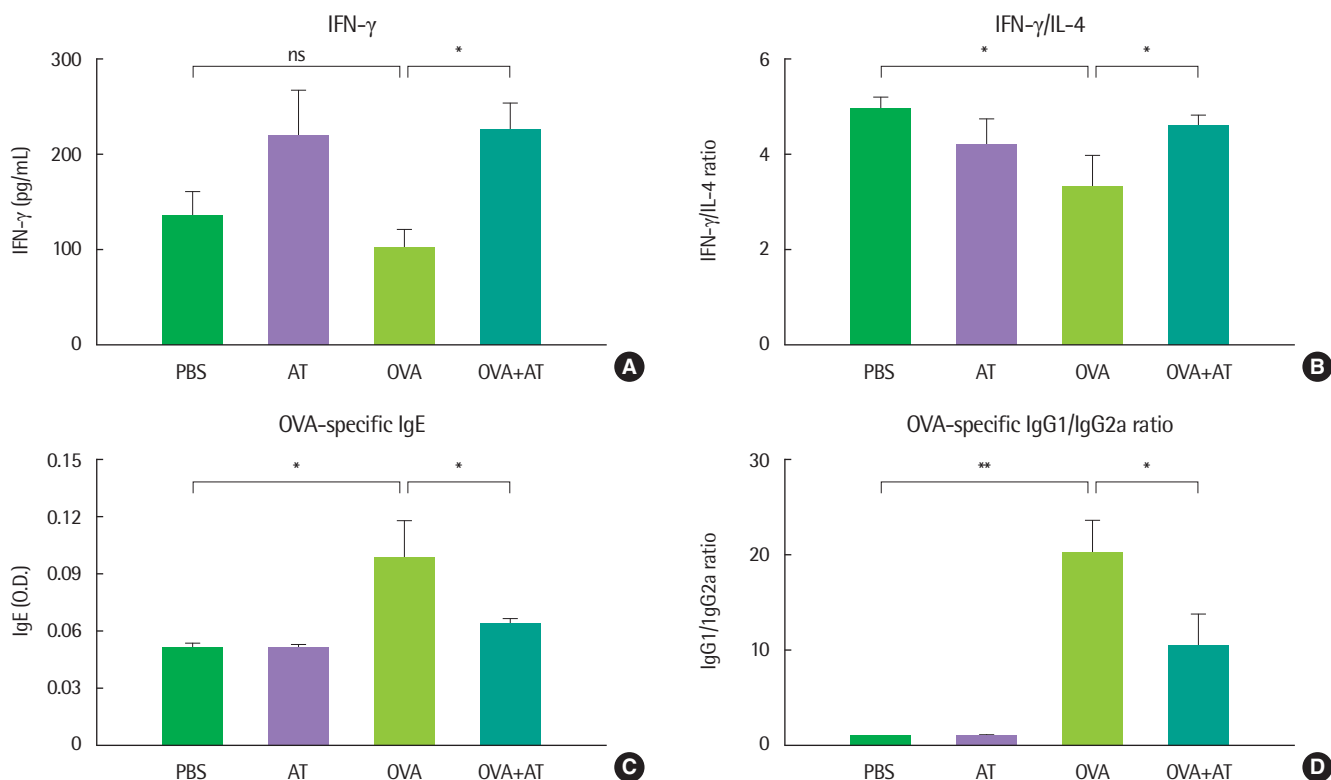


Fig. 2. Effect of atorvastatin (AT) treatment on cytokine level and serum allergen-specific antibodies in BALF ovalbumin (OVA)-sensitized mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). The upper low shows the levels of interferon-gamma (IFN-γ) (A) and the ratio of IFN-γ/interleukin (IL)-4 (B) 48 hours after the last challenge. The lower low shows the levels of serum OVA-specific IgE and the ratio of OVA-specific IgG1/IgG2a 48 hours after the last challenge. Serum OVA-specific IgE (C) and the ratio of OVA-specific IgG1/IgG2a (D) after OVA challenge. PBS, phosphate-buffered saline. $n = 6$ for each group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

여하였을 때 천식 모델 내 증가했던 기관지폐포세척액의 총 염증세포 수가 감소하였고 대식세포와 호산구가 유의미하게 감소함을 확인하였다($P < 0.05$) (Fig. 1B). 폐 조직을 조직학적 분석으로 확인한 결과 천식마우스모델의 폐에서 염증세포의 침윤이 atorvastatin 투여로 감소하였고 goblet cell의 mucus 분비 역시 감소함을 확인하였다(Fig. 1C).

메타콜린에 대한 기도과민성을 측정한 결과 천식마우스모델에서 Penh값이 의미 있게 증가하였으나, atorvastatin 투여군에서는 OVA 감작에도 불구하고 대조군과 비슷한 수준의 기도과민성을 보였다($P < 0.05$) (Fig. 1D). 이를 통해 atorvastatin이 과민성 반응을 억제함을 확인하였다.

2. Atorvastatin에 의한 Th2 반응의 감소

OVA로 유도된 천식마우스모델에서 atorvastatin을 투여하였을 때 기관지폐포액의 IFN- γ 수준이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다($P < 0.05$) (Fig. 2A). IFN- γ /IL-4 비율 역시 atorvastatin에 의해 증가하는 것을 확인하였다($P < 0.05$) (Fig. 2B).

Atorvastatin 투여 여부에 따라 OVA 특이 IgE, IgG1, IgG2a 항체량을 비교한 결과, 천식마우스모델에서 OVA 처리 시 OVA 특이

IgE 항체가 atorvastatin 투여군에서는 OVA 처리에도 불구하고 atorvastatin 투여로 유의하게 감소함을 확인하였고, OVA특이 IgG1/IgG2a의 비율 또한 유의하게 감소함을 확인하였다($P < 0.05$) (Fig. 2C, D).

3. Atorvastatin에 의한 폐조직 mRNA 발현 변화

OVA로 유도한 천식마우스모델에서 증가를 보였던 *Ccr3*의 mRNA 발현이 atorvastatin 처리로 유의하게 감소하였고 또한, 천식 마우스에서 증가하였던 *Il-17*, *Muc5ac*의 발현 역시 atorvastatin 처리에 의해 유의한 감소를 보였다($P < 0.05$) (Fig. 3A-C).

4. Atorvastatin에 의한 M2 대식세포 억제

대식세포 활성화 표지자인 *Ym-1*, *Relm- α* , *Irf-5*의 mRNA 발현을 폐 조직을 통해 확인한 결과, 천식마우스에서 증가를 보였던 M2 대식세포 활성화 표지자 *Ym-1*, *Relm- α* 이 atorvastatin 투여 후 유의하게 감소함을 확인하였다($P < 0.05$) (Fig. 3D, E). 반면 M1 대식세포 활성화 표지자인 *Irf-5*의 발현은 atorvastatin 투여 시 증가하였다($P < 0.05$) (Fig. 3F).

폐조직에서 유세포분석법(flow cytometry)으로 대식세포의 분

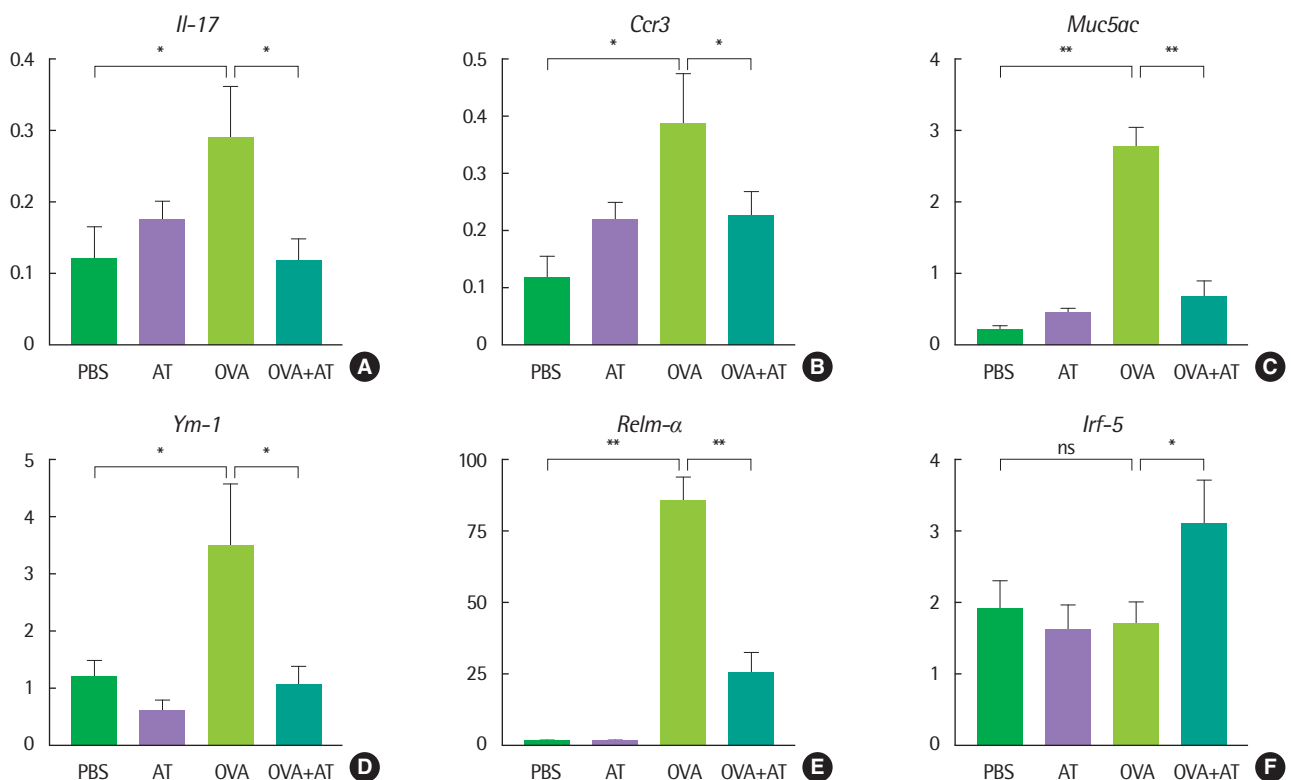


Fig. 3. Effect of atorvastatin (AT) on the change of mRNA expressions in the lung tissues from ovalbumin (OVA)-sensitized mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction was performed to determine the changes in mRNA levels of interleukin (*Il*)-17 (A), *Ccr3* (B), *Muc5ac* (C), *Ym-1* (D), *Relm- α* (E), and *Irf-5* (F) from lung tissues. PBS, phosphate-buffered saline. The levels of mRNA are represented as the ratio to *Gapdh*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

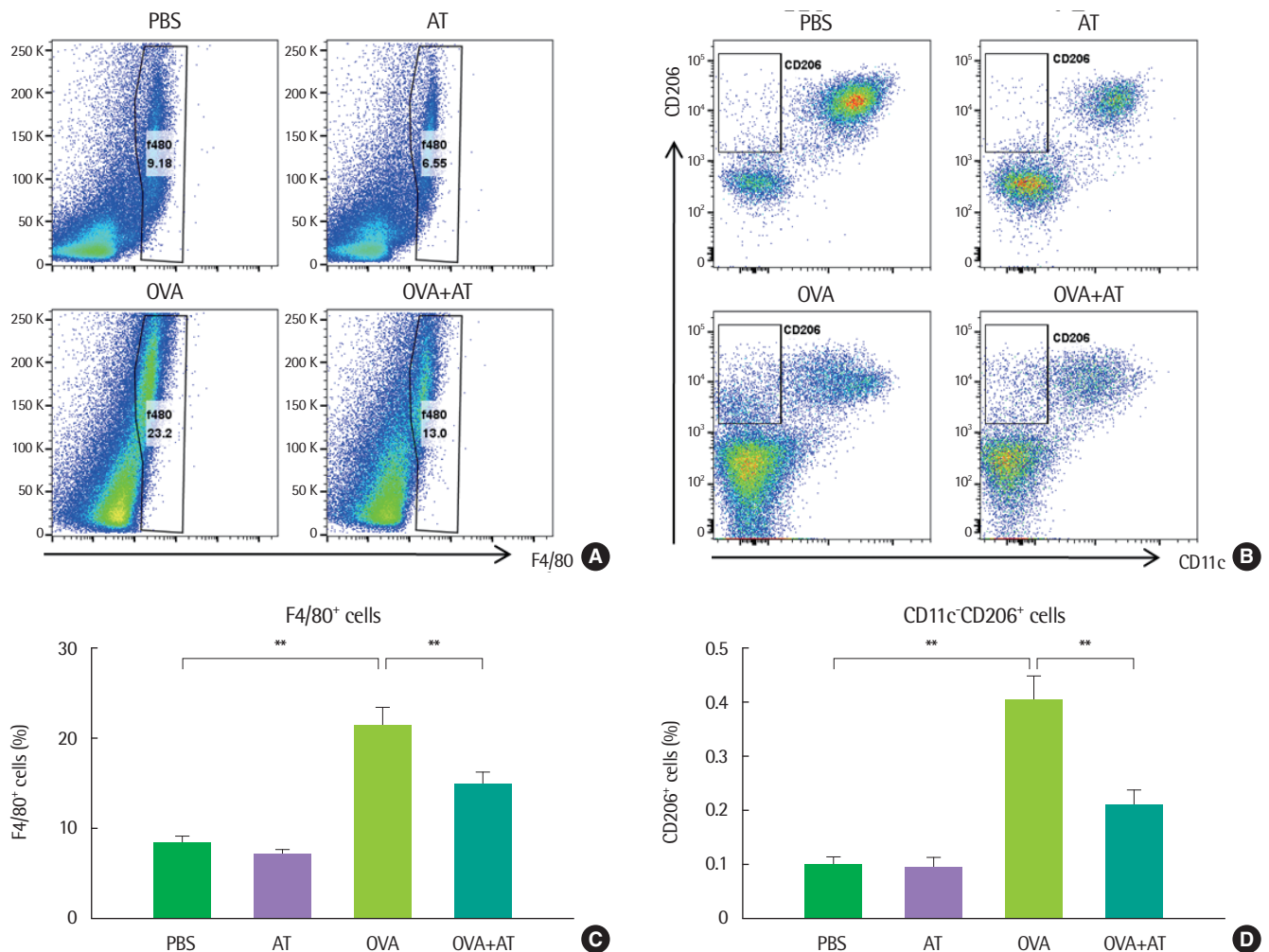


Fig. 4. Effect of atorvastatin (AT) on CD11c⁺CD206⁺ M2 macrophage in the lung tissues of ovalbumin (OVA)-sensitized mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Representative dot plot shows the expression of F4/80 (A) in CD45⁺ cells from lung and CD206 (B) in F4/80⁺ macrophage cells. The frequencies of total F4/80⁺ macrophage cells (C) in CD45⁺ cells and CD206 (D) producing F4/80⁺ macrophage cells are shown. ** $P < 0.01$.

포를 관찰한 결과 천식마우스에서 증가를 보였던 CD45⁺ 세포 중 F4/80를 발현하는 대식세포의 수가 atorvastatin 처리 시 유의하게 감소하였다($P < 0.01$) (Fig. 4A, C). 특히, F4/80⁺ 대식세포 중 Cd206을 발현하는 M2 대식세포가 천식마우스에서 유의한 증가를 나타내는데, atorvastatin 처리한 후 감소하였다($P < 0.01$) (Fig. 4B, D).

폐포대식세포 세포주인 CRL-2456 세포를 사용하여 천식에서 대식세포에 대한 atorvastatin의 작용을 *in vitro*에서 평가하였다. CRL-2456 cell에 재조합 IL-4로 Th2 자극을 주고 atorvastatin을 농도별로 처리한 결과, 폐포 대식세포에서 재조합 IL-4 자극으로 인하여 Cd206, Arg-1, Fgf-2의 발현이 증가하였지만 atorvastatin을 처리한 경우 IL-4 자극에도 불구하고 유전자들의 발현이 감소하였다($P < 0.05$) (Fig. 5A, C, D).

고찰

이번 연구에서 OVA로 유도한 마우스 천식 모델을 통해 atorvastatin이 기도염증 및 기도과민성 개선의 항천식 효과가 있으며 폐포 대식세포 활성화를 직접적으로 억제함을 밝혔다. 또한 atorvastatin은 폐포세척액 내 Th1 사이토카인을 증가시키고, 혈청 OVA-특이 IgE 감소 및 OVA-특이 IgG2a 증가를 유도하여 Th1-Th2 면역균형을 Th1 우세로 변화시킴을 관찰하여 항천식약제로서의 잠재성을 확인하였다. 이와 함께 atorvastatin을 투여한 천식 모델 폐의 mRNA 및 세포의 M2 표지자 수준과 *in vitro*에서 대식세포의 M2 표현형 감소를 통하여 atorvastatin의 대식세포 조절능력을 확인하였다.

대식세포는 태아의 난황, 간, 그리고 골수에서 기원하는 대표적인 선천면역세포로, 조직의 형성 및 발달, 항상성, 복구에도 관여하

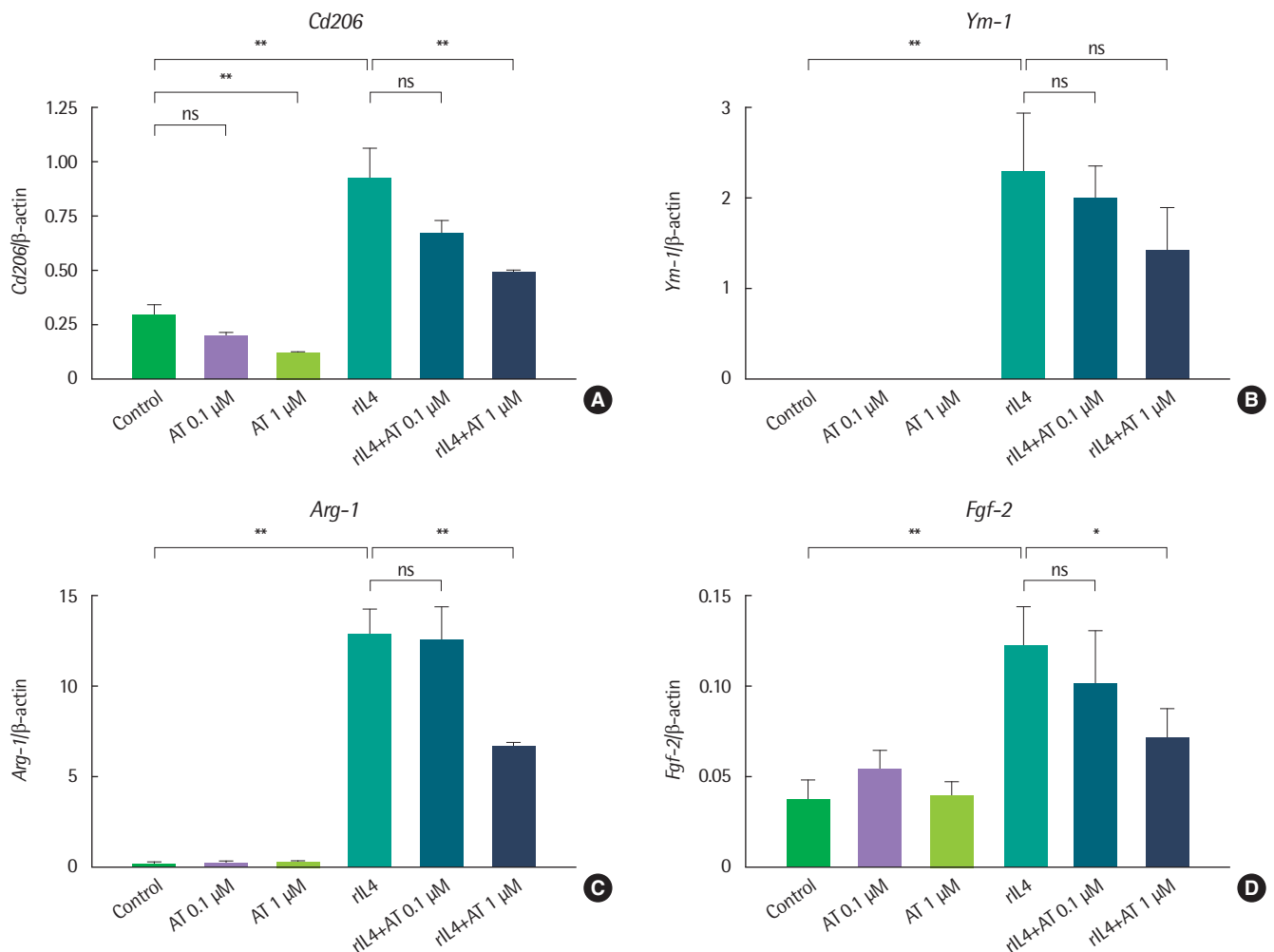


Fig. 5. Effect of atorvastatin (AT) on M2 macrophage markers and *Fgf-2* mRNA expressions in interleukin (IL)-4 stimulated alveolar macrophage cell line (* $P<0.05$, ** $P<0.01$). The mRNA levels of *Cd206* (A), *Ym-1* (B), *Arg-1* (C), and *Fgf-2* (D) were detected in recombinant IL-4 stimulated mouse alveolar macrophages cell line. The levels of mRNA are represented as the ratio to β -actin. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

는 등 다양한 역할을 한다. 대식세포는 어느 조직에서 기원하였는지, 어느 조직에 상주하는지에 따라 장기별로 각각 특화된 기능을 나타낸다.^{15,16} 그중 폐포 대식세포는 기도 면역세포 중 대다수를 차지하며 외부에 직접 노출되어 있는 기도의 선천면역계를 담당한다. 최근 대식세포의 기능적 분류를 위해 활성화 특성에 따라 정의하고자 하는 연구가 다수 진행되었으며, 이러한 대식세포의 활성화에 따른 아형 구분은 천식의 내재형(endotype)과도 관련이 있을 것으로 추정된다.¹⁷⁻²⁰ 선행 연구를 통해 M2 대식세포의 증감이 천식 염증의 악화 또는 개선과 관련됨이 밝혀진 바 있고, 특히 M2 대식세포 중 CD206⁺/MHCII⁺의 표현형을 갖는 M2a 대식세포가 천식의 증증도에 따라 증가하는 것이 확인되어 천식의 병태생리에 있어 M2a 대식세포가 중요할 것으로 생각한다.^{21,22} 이 연구에서도 역시 OVA로 유도된 천식 모델에서 M2a 표지자 중 하나인 CD206⁺ 대식세포의 증가를 확인하였으며, 이전 연구들에서 M2 증감이 천식 염

증의 악화 또는 개선과 관련됨을 확인한 바 있다.²³⁻²⁵ 이번 연구에서 atorvastatin의 대식세포 M2 분화 억제 및 항천식 효과를 확인하여, 향후 항천식약제로서의 가능성을 시사하였다.

Statin은 HMG-CoA 환원효소를 억제하여 콜레스테롤의 생성을 막아 혈중 지질을 낮추는 효과를 나타내 심혈관계 이상 증상과 사망률을 유의하게 낮추는 효과가 입증된 약제로 심혈관계 질환 환자 및 고위험군 환자에서 널리 사용되고 있다. Statin의 지질 하강 효과 외에 항염증 효과를 나타내어 천식 치료에도 효과가 있을 것으로 예상되어 여러 연구들이 이루어졌다. 실제 statin을 복용하는 천식 환자에서 천식 발작이 감소함이 보고된 바 있고, 흡입 스테로이드를 사용 중인 비만환 증증 천식 환자에서 statin 복용으로 천식의 임상지표가 개선됨이 확인되었다.^{26,27} 이러한 소견들을 종합해 볼 때 치료적 대안이 제한적인 증증 스테로이드 의존성 천식에서 statin을 잠재적 대안으로 고려해볼 수 있으리라 생각한다.²⁸

Statin 투여는 천식의 임상 지표 개선뿐만 아니라 병태생리학적 측면에서도 항염증 및 면역 제어 효과가 입증되었다.²⁹ 이전 연구에 따르면 statin을 OVA로 감작시킨 천식마우스모델에 경구로 투여하였을 때, 기도과민성이 완화되고 혈청 내 OVA-특이 IgE 항체가 감소하였으며, 기관지폐포세척액에서 IL-4, IL-5, IL-17 등의 사이토카인의 감소 및 IL-10의 증가가 관찰되었다.³⁰⁻³² 이 연구에서도 천식마우스모델에 statin 투여 시 증가했던 기도저항성의 감소, Th1/Th2 사이토카인의 비율이 증가했기에 기존 보고와 부합하는 결과를 확인할 수 있었다. 또한 atorvastatin은 천식모델에서 경구투여할 경우 transglutaminase 2 및 triggering receptor expressed on myeloid cells 1의 발현 감소를 통하여 평활근 비후와 섬유화 등 기도개형을 완화시키는 효과를 나타내었다.³³

기존 연구들은 statin에 의한 Th2 염증반응의 억제에 초점이 맞춰져 있었다. 하지만 최근 대식세포의 다양한 기능에 statin이 영향을 미친다는 연구가 보고되었다. Statin 처리는 대식세포의 plectin 발현을 증가시킴으로써 세포골격구조에 영향을 미치며, statin 장기 처리할 경우 대식세포 수가 감소하는데 이는 세포 사멸에 의한 대식세포의 감소보다는 외부에서 대식세포 유입을 억제하는 효과에 기인함이 밝혀졌다.^{34,35} 또한, 천식 환자를 대상으로 한 연구에서 statin 투약군의 객담 대식세포 수가 대조군에 비해 감소하는 것이 확인된 바 있다.³⁶ 천식 환자가 statin을 복용할 경우 스테로이드 흡입으로 유발된 폐포 대식세포 내 비정형적인 nuclear factor-kappa B 경로의 활성화를 항진시켜 결과적으로 IL-10 생성을 촉진하는 indoleamine 2,3-dioxygenase 전사 및 효소 활성을 향상시킨다.³⁷ 또한 atorvastatin은 IL-1 β , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL-6 및 tumor necrosis factor- α 를 포함한 폐포 대식세포에서 중요한 선천성 면역 매개체 생성 및 유도를 억제한다.³⁸ 이처럼 statin은 폐포 대식세포의 활성 조절을 통한 면역반응 조절 기능이 있으나, 아직까지 폐포 대식세포의 M2 분화에 미치는 영향은 잘 알려져 있지 않다.

이 연구에서는 천식마우스모델에서 atorvastatin의 폐포 대식세포 분화에 대한 직접적인 영향을 확인하였다. Statin 투여 시 천식마우스의 폐에서 M2 대식세포 표지자인 *Ym-1*, *Relm- α* 의 mRNA 발현이 감소하며, 또한 유세포분석을 통해 폐 내에 존재하는 CD206⁺ M2 대식세포가 감소함을 확인하였다. 반면, M1 대식세포 활성화 표지자인 알려진 *Irf-5*의 발현은 증가하여, atorvastatin이 M1/M2 분화를 조절함을 시사하였다. 특히 *in vitro*에서 폐포 대식세포에 atorvastatin을 처리하여 M2 표지자인 *Cd206*, *Ym-1*, *Arg-1*, *Fgf-2*의 발현이 감소함을 확인함으로써 atorvastatin이 직접 대식세포 활성화에 영향을 미치며 M2 대식세포의 감소를 유도함을 확인하였다.

이번 연구를 통해 atorvastatin이 Th2 자극에 의해 활성화된 M2 대식세포의 활성화를 억제함으로써 항천식 효과를 나타냄을 확인

하여 향후 약물재창출(drug repurposing) 가능성을 시사하였지만, M2 대식세포 활성화를 조절하는 기전에 대한 추가 연구가 필요하다. 이와 함께 M2 대식세포의 아형 분석을 통하여 statin에 의해 감소되는 M2 대식세포의 특리아형을 규명하고 이에 따른 항천식 효과를 재검증하여 대식세포 조절을 통한 항천식 효과의 기전을 밝히는 것이 필요하리라 생각된다.³⁹

결론적으로 atorvastatin의 작용기전을 규명하기 위해 대식세포 세포주를 이용하였고 atorvastatin이 천식 기전과 관련 있는 alternatively activated macrophage, M2 대식세포 활성화 경로에 어떻게 영향을 미치는지 확인하였다. 이러한 결과들은 천식마우스에서 atorvastatin에 의한 M2 대식세포 활성화 억제가 천식기도염증 및 기도과민성의 개선을 가져오는 하나의 항염증 기전으로 설명될 수 있으며 이를 통해 본 연구진은 atorvastatin이 알레르기 반응을 완화하는 알레르기성 천식의 치료제로서의 잠재적 가능성을 제시하였다.

REFERENCES

- Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res* 2010;690:24-39.
- Platts-Mills TA. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:S1-5.
- Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl* 2001;34:24s-33s.
- Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol* 2014;5:603.
- Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu QL, Gao P. Macrophage polarization and allergic asthma. *Transl Res* 2018;191:1-14.
- Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 2013;121:e57-69.
- Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 2004;304:1678-82.
- Fricker M, Gibson PG. Macrophage dysfunction in the pathogenesis and treatment of asthma. *Eur Respir J* 2017;50:1700196.
- Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med* 2001;5:378-87.
- Kim DY, Ryu SY, Lim JE, Lee YS, Ro JY. Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model. *Eur J Pharmacol* 2007;557:76-86.
- Balli U, Keles GC, Cetinkaya BO, Mercan U, Ayas B, Erdogan D. Assessment of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in the periodontium of rats treated with atorvastatin. *J Periodontol* 2014;85:178-87.
- McKay A, Leung BP, McInnes IB, Thomson NC, Liew FY. A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma. *J Immunol* 2004;172:2903-8.
- Xu WH. Repetitive measurements of enhanced pause (Penh). *Respir Physiol Neurobiol* 2015;206:41-4.
- Coward WR, Marei A, Yang A, Vasa-Nicotera MM, Chow SC. Statin-in-

- duced proinflammatory response in mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *J Immunol* 2006;176:5284-92.
15. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013;496:445-55.
16. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 2015;15:731-44.
17. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 2013;14:986-95.
18. Chakarov S, Lim HY, Tan L, Lim SY, See P, Lum J, et al. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific sub-tissular niches. *Science* 2019;363:eaau0964.
19. Gibbings SL, Thomas SM, Atif SM, McCubrey AL, Desch AN, Danhorn T, et al. Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;57:66-76.
20. 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:eaax8756.
21. 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.
22. Draijer C, Boersma CE, Robbe P, Timens W, Hylkema MN, Ten Hacken NH, et al. Human asthma is characterized by more IRF5+ M1 and CD206+ M2 macrophages and less IL-10+ M2-like macrophages around airways compared with healthy airways. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:280-3.e3.
23. Shim JS, Lee HS, Park DE, Won Lee J, 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.
24. 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.
25. 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.
26. Huang CC, Chan WL, Chen YC, Chen TJ, Chou KT, Lin SJ, et al. Statin use in patients with asthma: a nationwide population-based study. *Eur J Clin Invest* 2011;41:507-12.
27. Zeki AA, Oldham J, Wilson M, Fortenko O, Goyal V, Last M, et al. Statin use and asthma control in patients with severe asthma. *BMJ Open* 2013;3:e003314.
28. Tse SM, Li L, Butler MG, Fung V, Kharbanda EO, Larkin EK, et al. Statin exposure is associated with decreased asthma-related emergency department visits and oral corticosteroid use. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1076-82.
29. Rosenberg JL. Antilipid agents may provide allergy protection. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013;110:1.
30. Huang CF, Peng HJ, Wu CC, Lo WT, Shih YL, Wu TC. Effect of oral administration with pravastatin and atorvastatin on airway hyperresponsiveness and allergic reactions in asthmatic mice. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013;110:11-7.
31. Imamura M, Okunishi K, Ohtsu H, Nakagome K, Harada H, Tanaka R, et al. Pravastatin attenuates allergic airway inflammation by suppressing antigen sensitisation, interleukin 17 production and antigen presentation in the lung. *Thorax* 2009;64:44-9.
32. Firinci F, Karaman M, Cilaker-Micili S, Bagriyanik A, Uzuner N, Karaman O. The effect of atorvastatin on lung histopathology in a murine model of chronic asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2014;42:355-61.
33. Liu MW, Liu R, Wu HY, Chen M, Dong MN, Huang YQ, et al. Atorvastatin has a protective effect in a mouse model of bronchial asthma through regulating tissue transglutaminase and triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression. *Exp Ther Med* 2017;14:917-30.
34. Kamal AHM, Chakrabarty JK, Udden SMN, Zaki MH, Chowdhury SM. Inflammatory Proteomic Network Analysis of Statin-treated and Lipopolysaccharide-activated Macrophages. *Sci Rep* 2018;8:164.
35. Croons V, De Meyer I, Houten SM, Martinet W, Bult H, Herman AG, et al. Effect of statins on the viability of macrophages and smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;55:269-75.
36. Hothersall EJ, Chaudhuri R, McSharry C, Donnelly I, Lafferty J, McMahon AD, et al. Effects of atorvastatin added to inhaled corticosteroids on lung function and sputum cell counts in atopic asthma. *Thorax* 2008;63:1070-5.
37. Maneechotesuwan K, Ekjitrakul W, Kasetsinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes PJ. Statins enhance the anti-inflammatory effects of inhaled corticosteroids in asthmatic patients through increased induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:754-62.e1.
38. Sakamoto N, Hayashi S, Mukae H, Vincent R, Hogg JC, van Eeden SF. Effect of atorvastatin on PM10-induced cytokine production by human alveolar macrophages and bronchial epithelial cells. *Int J Toxicol* 2009;28:17-23.
39. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. *Front Immunol* 2019;10:792.