



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](#)

이학석사 학위논문

아토피피부염 마우스 모델에서
장내 마이크로바이옴 *Ruminococcus gnavus*
효능과 기전 규명

Effects of gut microbiota *Ruminococcus gnavus*
in atopic dermatitis mouse model

울산대학교대학원
의학과
안재린

아토피피부염 마우스 모델에서
장내 마이크로바이옴 *Ruminococcus gnavus*
효능과 기전 규명

지도교수 홍수종

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2020년 02월

울산대학교대학원
의학과
안재린

안재린의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 김 봉 수 인

심사위원 오 혜 영 인

심사위원 홍 수 중 인

울 산 대 학 교 대 학 원

2020 년 02 월

국문 초록

배경 및 목적: 아토피피부염은 만성 염증성 피부질환으로 유전적 요인과 함께 다양한 환경적인 요인의 상호작용이 면역체계에 영향을 주어 발생하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 환경적 요인, 특히 분만 방법, 서구화된 식습관, 어린 시기의 항생제 사용 등이 숙주의 면역계 조절과 관련된 장내 미생물총의 변화에 영향을 주어 아토피피부염 발생의 주된 요인임이 밝혀지고 있다.

Ruminococcus gnavus (*R. gnavus*)는 장내에 무신을 분해하는 공생균으로 장내 미생물의 군락 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 국내 연구를 통해 영유아 아토피피부염 환자에서 장내 미생물총의 다양성에 변화가 있으며, 특히 *R. gnavus*의 빈도가 크게 감소되어 있음을 확인하였다. 이는 감소된 *R. gnavus*가 장내 미생물의 군락 형성을 감소시켜 면역 발달에 영향을 주어 아토피피부염 발생과 관련될 가능성이 있음을 시사하고 있다. 그러나 장내 *R. gnavus*에 따른 장내 면역학적 변화가 아토피피부염 발생에 영향을 미치는지에 관한 연구는 아직까지 부족하다. 따라서, 본 연구는 항생제 노출을 통해 장내 미생물총의 불균형을 유발시키고, 이와 동시에 *R. gnavus*의 지속적인 투여를 통해 아토피피부염 악화를 감소시킬 수 있는지 검증하고 이에 따른 기전을 규명하고자 한다.

연구재료 및 연구방법: 4주령 암컷 BALB/C 마우스에 2주 동안 항생제를 음수 처리함과 동시에 *R. gnavus* (1×10^9 CFU/200 μ l)를 실험이 끝날 때까지 매일 경구 투여하였다. 6주령이 되었을 때 마우스의 등에 털을 제거한 후 난 알부민

(ovalbumin, OVA) 항원을 피부에 적용해 항원 감작을 통한 아토피피부염 유발을 시행하였다. 아토피피부염의 증상을 확인하기 위하여 피부의 transepidermal water loss (TEWL)와 피부 발적 및 홍반 등 임상증상 점수화 (Clinical score)하였으며, 마우스의 피부 조직에서 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 통해 염증세포 침윤 정도를 확인하였다. 또한, 전신 면역 유발 정도를 확인하기 위하여 혈청 내 총 immunoglobulin (Ig) E 와 항원 특이적 IgE를 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 기법을 통해 측정하였고, 면역반응을 평가하기 위해 flow cytometry를 사용하여 피부 림프절에서 조절 T 세포 (Treg; regulatory T cell)인 CD4⁺Forkhead box P3⁺ (Foxp3)세포의 빈도를 평가하였다. 또한 피부조직에서 피부 내 염증 발생과 관련한 사이토카인인 interleukin (IL)-6 및 Treg과 관련 있는 사이토카인인 IL-10를 qPCR를 이용하여 측정하였으며, 마우스의 분변에서 Short chain fatty acids (SCFAs)를 gas chromatography/mass spectrometer (GC/MS)으로 측정하였다.

연구 결과: 항생제 처리에 의한 아토피피부염의 증상 변화를 확인한 결과, 아토피피부염 유발군에 비해 항생제 처리한 아토피피부염 유발군에서 아토피피부염의 증상 지표인 TEWL, 임상증상 점수 (clinical score)와 혈청 내 총 IgE, 혈청 내 항원 특이적 IgE가 증가하였고 피부 조직 내 염증세포의 침윤 정도가 증가하였다. 또한, 항생제 처리한 아토피피부염 유발군의 피부 림프절 내 CD4⁺Foxp3⁺세포의 분포가 유의하게 감소하였으며, 피부 조직에서 염증 사이토카인인 IL-6 발현량이 증가하였다. 마우스 분변에서 SCFAs를 측정한

결과, 아토피피부염 유발군에 비하여 항생제 처리한 아토피피부염 유발군에서 SCFAs 중 butyric acid와 propionic acid가 감소하였다. 반면, 항생제 처리한 아토피피부염 유발군에 비하여 항생제 처리와 동시에 *R. gnavus*를 투여한 아토피피부염 유발군의 아토피피부염의 증상 지표 (TEWL, clinical score, 혈청 내 총 IgE 및 항원 특이 IgE) 및 피부조직 내 염증세포의 침윤 정도가 감소함을 보였다. 또한, 항생제 처리와 동시에 *R. gnavus*를 투여한 아토피피부염 유발군의 피부 림프절에서 CD4⁺Foxp3⁺세포의 분포가 유의하게 증가하였으며, 피부 조직에서 IL-10의 발현량이 유의하게 증가하였다. 그러나 피부 조직에서 IL-6의 발현량이 감소하였으나 통계적인 유의성은 보이지 않았다. 다음으로, 마우스의 분변에서 SCFAs 확인한 결과, 항생제 처리한 아토피피부염 유발군보다 항생제 처리함과 동시에 *R. gnavus* 투여한 아토피피부염 유발군에서 butyric acid가 유의한 증가를 보였다.

결론: 항생제 처리에 의한 장내 불균형시, 아토피피부염 악화 모델에서 *R. gnavus*은 장내 SCFAs를 증가시키고 피부에서 Treg 세포의 조절을 통해 아토피피부염 증상 완화에 영향을 줄 가능성이 있다.

중심단어: 아토피피부염, *Ruminococcus gnavus*, 항생제, 조절 T 세포,

Short chain fatty acids,

목차

국문요약	I
그림목록	V
약어목록	VI
서론	1
연구재료 및 방법	4
항생제 처리와 아토피피부염 마우스 모델 제작	4
사용 균주와 균주 배양 조건	5
TEWL의 평가와 임상증상 점수화	5
피부 조직학적 검사	6
혈청 내 Ig E 수치 정량	6
RNA(Ribonucleic acid) 추출 및 real-time(RT) PCR	7
유세포 분석	7
Gas chromatography/mass spectrometer(GC/MS) 분석	8
통계 분석	9
연구결과	10
항생제에 노출된 마우스에서 <i>R. gnavus</i> 의 경구투여는 아토피피부염의 임상증상을 완화시킨다	10
항생제에 노출된 마우스에서 <i>R. gnavus</i> 의 경구 투여는 전신 면역 알레르기반응 감소 및 피부의 Treg 면역반응을 증가시킨다	12
항생제에 노출된 마우스에서 <i>R. gnavus</i> 의 경구 투여는 장내 SCFAs 를 증가시킨다	14
고찰	16
결론	21
참고문헌	22
영문요약	28

그림 목록

- Figure 1. Oral *R. gnavus* administration improve the clinical signs in antibiotic-treated atopic dermatitis mouse models·····11
- Figure 2. Oral *R. gnavus* administration regulates the systemic immune allergic response and the Th2/Treg response in antibiotic-treated atopic dermatitis mouse models··13
- Figure 3. Oral *R. gnavus* administration increases the SCFAs on feces in antibiotic-treated atopic dermatitis mouse models··········15

약어 목록

AD: Atopic dermatitis

Ruminococcus gnavus: *R. gnavus*

TEWL: Transepidermal water loss

Ig: Immunoglobulin

Th: T helper

Treg: Regulatory T cell

OVA: Ovalbumin

H&E: Hematoxylin and eosin

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

IL: Interleukin

Foxp3: Forkhead box P3

SCFAs: Short chain fatty acids

서론

아토피피부염 (Atopic dermatitis)은 피부의 소양감, 전신 홍반, 피부 건조 등 다양한 증상을 동반하는 만성 염증성 피부질환으로[1] 영·유아 시기부터 성인에까지 광범위하게 유발되며 최근 국내 한 연구에서는 영유아의 경우 아토피피부염 유병률이 약 20%까지 급격히 증가함을 확인하였다.[2] 아토피피부염은 경피 수분손실 (TEWL; transepidermal water loss) 증가에 따른 피부 장벽 장애와 혈액 내 immunoglobulin (Ig) E의 증가를 특징으로 한다.[3-5] 또한, T helper (Th) 1 세포의 활성 감소와 Th2 세포의 활성 증가로 Th2 반응을 매개한 interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인들을 과량 분비하여 면역학적 변화를 통한 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.[6, 7] 아토피피부염은 유전적 요인, 면역학적 요인 및 환경적인 요인이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 예상하지만, 아직까지 발생 기전은 명확히 밝혀지지 않고 있다.[8]

최근에는 생후 초기 특정 기간에 외부 환경인자의 노출이 면역계 이상으로 알레르기 등과 같은 질환이 발생한다는 ‘위생 가설’로 아토피피부염 발생을 설명하고 있다.[9-12] 특히, ‘위생 가설’ 개념을 넓혀 다양한 환경적 요인의 노출로서 비감염성 장내 미생물의 중요성이 대두되고 있다(미생물 가설).[13] 인체 내 장에는 가장 많은 미생물들이 군집을 형성하여 복잡한 인체 생리활동에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 인간의 소화, 영양분 흡수 뿐 아니라 외부 항원에 대한 면역관용을 통한 국소 및 전신 면역, 대사 및 숙주의 행동 발달에

결정적인 역할을 한다고 알려져 있다.[14, 15] 여러 연구에 따르면, 출생 패턴, 식습관, 항생제 사용과 같은 다양한 환경 요인의 노출이 장내 미생물의 다양성과 특정 미생물의 분포 변화를 초래하여 비만, 염증성 장 질환뿐만 아니라 아토피피부염과 같은 여러 알레르기질환 발생 위험을 높이는 것으로 보고하고 있다.[16-19] 이전 역학연구에서 자연분만에 비하여 제왕절개를 통해 태어난 소아에서 장내 미생물총의 감소와 알레르기 감작 위험도가 증가한다고 보고되었으며,[20, 21] 또 다른 역학 연구들에서 어린 시기의 항생제 복용이 많을수록 아토피피부염 발생 위험의 증가와 장내 미생물총의 다양성이 감소한다고 보고되었다.[22-24] 이는 면역 시스템이 발달하는 생후 특정 기간 동안 미생물에 대해 충분히 노출되지 않으면 면역기능의 변화로 아토피피부염 발생에 기여할 수 있다고 보여진다. 그러나 아토피피부염 발생에서 장내 미생물총과 면역체계의 직접적인 연관성에 대한 연구는 아직까지 많이 미비한 실정이고 따라서 이를 입증하기 위한 기능적, 면역학적 연구가 더 필요하다.

Ruminococcus gnavus (*R. gnavus*)는 '*Lachnospiraceae* 속'에 속하는 대표적인 장내 공생균으로, 건강한 인체의 장내에 서식하며 장내 미생물을 통해 생성한 영양분을 다른 공생균에게 공급하여 장내 미생물총의 다양성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.[25-27] 장내 *R. gnavus*의 감소는 장내 미생물총의 상호작용을 저하시켜 영양실조에 영향을 주는 것으로 보고되었고[28], *R. gnavus*가 감소하게 되면 short chain fatty acids (SCFAs) 합성에 필요한 효소의 감소로 인해 비만의 위험이 증가한다고 보고되었다.[29] 최근 한 연구를 통해 *R.*

*gnavus*의 감소가 장 내 면역 및 항상성 조절에 관여하는 미생물의 기능성 유전자를 저하시켜 영유아의 아토피피부염 발생에 영향을 미친다는 연구 결과가 보고되었다.[30] 이전 연구들로 미루어 볼 때, *R. gnavus*는 대사 및 면역반응의 조절을 통해 아토피피부염 발생에 관여할 것으로 추측되나 아직까지 아토피피부염 발생에서 *R. gnavus*의 효과에 관한 연구는 명확하게 밝혀지지 않았다.

따라서, 이 연구에서는 아토피피부염 동물 모델을 이용하여 항생제 노출에 따른 장내 미생물총의 불균형을 유도하고, *R. gnavus*의 지속적인 투여 후 아토피피부염 증상 평가와 면역학적 분석을 통해 장내 미생물에 의한 아토피피부염 발생 과정과 이에 따른 기전을 규명하고자 한다.

실험 재료 및 방법

1. 항생제 처리와 아토피피부염 마우스 모델 제작

4주령 암컷 BALB/c 마우스는 Orient Bio (Orient Bio Inc, Seongnam, Korea)에서 구입해 아산병원 및 울산대 의대 기관 동물 관리 이용 위원회 (IACUC)의 지침에 따라 처리하였다. 실험은 각 군당 5마리씩 4개군으로 나누었으며 정상군 (PBS 군), 아토피피부염 유발군 (OVA 군), 항생제 처리한 아토피피부염 유발군 (OVA+Abx 군), 항생제 처리함과 동시에 *R. gnavus* 투여한 아토피피부염 유발군 (OVA+Abx+Ru 군)으로 구분하여 실험을 수행하였다.

항생제 처리는 ampicillin(1 g/L; sigma aldrich, St Louis, MO), vancomycin hydrochloride(500 mg/L; sigma aldrich, St Louis, MO), neomycin(1 g/L; sigma aldrich, St Louis, MO), metronidazole(1 g/L; Fresenius, Germany)의 조성으로 콕테일을 만들어 2주 동안 음수 처리하였다.[31-33]

아토피피부염 마우스 모델은 난알부민 (OVA; Ovalbumin; grade V; Sigma, St Louis, MO)의 피부 감각을 통해 생성하였다.[34] 항생제 처리 이후, 6주령이 되었을 때, 마우스를 마취시키고 면도기로 등의 털을 깎은 후 접착테이프(3M micropore, 3M, Republic of Korea)를 이용해 반복적으로 붙였다가 떼어내는 과정을 통해 피부 자극을 유발시켰다. 자극을 준 마우스 등 피부에 100 μ g/100 μ l의 OVA를 1X1cm² 크기의 소독된 거즈를 이용하여 도포하고 Tegaderm®(Johnson and Johnson Medical Inc, Arlington, USA)과 접착테이프로 거즈를 고정하였다. OVA 패치는 일주일에 한번 교체하였고, 피부

감작은 1주일 동안 유지하였다. 그 후 2주의 휴지기를 가진 후 같은 방법으로 2차 피부 감작 처리를 다시 수행하였다. 최종 OVA 감작 24시간 후에 마우스를 안락사 시키고 검체를 수집하였다.

2. 사용 균주와 균주 배양 조건

Ruminococcus gnavus ATCC 29149 균주를 뮤신이 첨가된 Tryptic Soya Broth(TSB; Oxoid, UK) 배지를 이용하여 배양하였다. 1×10^8 CFU/ml로 저장해 놓은 *R. gnavus*를 25ml TSB broth에 풀어 혐기성 조건인 Anaerobic Jar(Thermo Fisher Scientific; U.S.A)로 37°C incubator에서 24시간 배양한 후, *R. gnavus*를 멸균된 phosphate-buffered saline(PBS)에 2번 세척하고 Spectrophotometer(DU530 UV/VIS, Beckman, U.S.A)에서 흡광도 (Optical Density, O.D_{600nm})을 측정하여 *R. gnavus*의 수를 확인하였다. 1×10^9 CFU/200 μ l 농도의 *R. gnavus*는 항생제 처리 시작일부터 아토피피부염 실험 종료 때까지 매일 경구 투여하였다.

3. TEWL의 평가와 임상증상 점수화

표피 투과성 장벽 기능의 변화를 확인하기 위해서, 실험 시작 전과 각 감작 후 vapometer(SWL-3; Delfin Technologies Ltd., Kuopio, Finland)를 사용하여 TEWL을 측정하였다. 임상증상 점수화는 마우스의 피부 병변에서 0-

3 점수 시스템을 사용하여 각 감각 후 홍반, 각질, 부종에 대해 점수를 매겼다. 점수는 0 = 병변이 없음, 1 = 가벼운 병변, 2 = 중간 병변과 3 = 심각한 병변으로 평가하였다. [35]

4. 피부 조직학적 검사

마우스의 피부조직은 실험 종료 후 적출하여 10% phosphate-buffered formalin에 고정시켰다. 피부 염증 세포 침윤의 평가를 위해 paraffin sections (5 μ m 두께) 하여 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였다.

5. 혈청 내 Ig E 수치 정량

실험 종료 후 마우스의 안와에서 채취한 혈액은 혈청을 분리하여 분석에 이용되기까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 혈청 내 총 IgE 수준은 마우스 IgE enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. OVA-특이 IgE의 측정을 위해, 96well 플레이트에 OVA(100 μ g/1ml carbonate-bicarbonate buffer; Sigma Chemical Co)를 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 코팅하였다. 24시간 이후 3번의 세척 작업을 하고 well 당 100 μ l의 희석된 혈청(carbonate-bicarbonate buffer에 1/10 희석)을 분주하여 37 $^{\circ}$ C에 1시간 30분 동안 배양하였다. 배양 이후 3번의 세척 과정을 거치고, peroxidase-labelled rat anti-mouse OVA-IgE (20ng/100 μ l, Acris

Antibodies, Herford, Germany)를 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 1시간 동안 37°C 에 배양하였다. $100\mu\text{l}$ 의 TMB 용액(Sigma Chemical Co)을 첨가한 후 15분 동안 배양한 후 stop solution(Bethyl Laboratories, U.S.A)으로 반응을 중지시키고 ELISA reader(SpectraMax 19, Utah biotech Equipment, Germany)를 이용하여 흡광도 ($\text{O.D}_{450\text{ nm}}$)에서 측정하였다.

6. RNA (Ribonucleic acid) 추출 및 real-time (RT) PCR

마우스 피부에서 IL-6, IL-10의 발현을 확인하기 위해, RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 마우스 피부 조직의 RNA를 추출하고, cDNA(complementary DNA) synthesis kit(Wizbiosolutions, U.S.A)을 이용하여 RNA 농도 $2\mu\text{g}$ 으로 정량하여 cDNA 합성을 수행하였다. Real-time PCR은 ABI7900(Application Biosystems, Piscataway, NJ) 시스템에서 TaqMan 방법을 사용하여 수행되었다. 각각의 신호는 동일한 검체에서 Rn18s 수준에서 표준화하였다.

7. 유세포 분석

실험 종료 후 마우스에서 피부의 국소 림프절 (axillary and brachial lymph nodes)를 적출하여 $70\mu\text{m}$ cell strainer를 통해 세포를 분리하였다. 분리한 세포는 5×10^5 cells/test 농도로 분획하였고, FITC-labeled anti-

CD4 (0.25 μ g/test; eBioscience, San Diego, CA) 과 APC-anti-Foxp3 (1 μ g/test; eBioscience, San Diego, CA) 를 염색하였다. 염색된 세포는 FACS canto와 BD FACSDiva 8.0.1 소프트웨어 (BD Biosciences, Mountain View, CA) 을 이용하여 분석하였다.

8. Gas chromatography/mass spectrometer (GC/MS) 분석

마우스 분변은 실험 종료 직후 맹장에서 채취하였다. 분변을 455 μ l Methylene chloride (J.T.Baker, U.S.A), 25 μ l hydrogen chloride (Sigma-Aldrich, Korea South), 20 μ l 4-methyl valeric acid (Sigma-Aldrich, Korea South) (Internal standard) 를 넣어 1분 동안 섞은 후 water bath에서 1시간 동안 배양한 후 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액을 30mX 0.25mmX 0.25 μ m capillary column (VF-WAXms, CP9205, Agilent Tech, Santa Clara, USA) 이 장착된 7890A GC (Agilent Tech, Santa Clara, USA) 을 사용하여 분석하였다. 운반 기체는 헬륨을 사용하였다. 초기 온도는 80 $^{\circ}$ C/2분로 시작하여 20 $^{\circ}$ C/분에서 160 $^{\circ}$ C와 3 $^{\circ}$ C/분에서 180 $^{\circ}$ C로 점차 증가하였다. 이어서, 10 $^{\circ}$ C/분에서 230 $^{\circ}$ C까지 증가하여 5분 동안 유지하였다. 컬럼 추출물을 7000 GC/MS Triple Quad (Agilent Technologies) 의 이온 공급원이 유입되었다. 6분의 용매 지연 후에 가속 전압이 적용되었다. 특정 SCFAs에 해당하는 ion chromatogram을 표준화하였다.

9. 통계 분석

모든 데이터 분석은 GraphPad Prism 4.0(San Diego, CA)을 이용하여 기술적인 통계치를 산출하였다. One-way analysis of variance(ANOVA)와 Newman-Keuls multiple comparison test을 사용하여 유의성 및 통계적 검정을 수행하였고, *P* 값이 0.05 이하를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 실험 결과는 mean \pm standard error mean(S.E.M)으로 표시하였다.

결과

항생제에 노출된 마우스에서 *R. gnavus*의 경구 투여는 아토피피부염의

임상증상을 완화시킨다

아토피피부염 마우스 모델은 방법에서 언급한 바와 같이 피부 손상 및 반복된 OVA 감작을 사용하여 개발되었다. 마우스의 장내 미생물총의 불균형을 유도하기 위하여 OVA 감작 전 2주 동안 항생제 각테일을 음수 처리하였고, 장내 미생물총의 회복을 위하여 *R. gnavus*을 실험 전반에 걸쳐 투여하였다(그림 1a).

H&E 염색을 통한 피부조직을 확인한 결과, OVA 군에 비하여 OVA+Abx 군에서 표피의 두께 증가, 각화 발생 및 진피층까지 염증세포의 침윤 정도가 심해짐을 관찰하였다(그림 1b). 또한, 항생제에 노출된 OVA+Abx 군은 OVA 군에 비해 TEWL과 피부 임상증상 점수가 유의하게 증가되었다(그림 1c-d). 반면, 지속적으로 *R. gnavus*을 투여한 OVA+Abx+Ru 군에서는 OVA+Abx 군에 비하여 피부 조직 내 염증세포의 침윤 정도 및 TEWL과 임상증상 점수가 감소하였다(그림 b-d). 이 결과는, 항생제 처리에 의한 장내 미생물총의 불균형은 아토피피부염의 증상을 악화시킬 수 있으며 지속적인 *R. gnavus*의 투여로 증상이 완화될 수 있음을 시사한다.

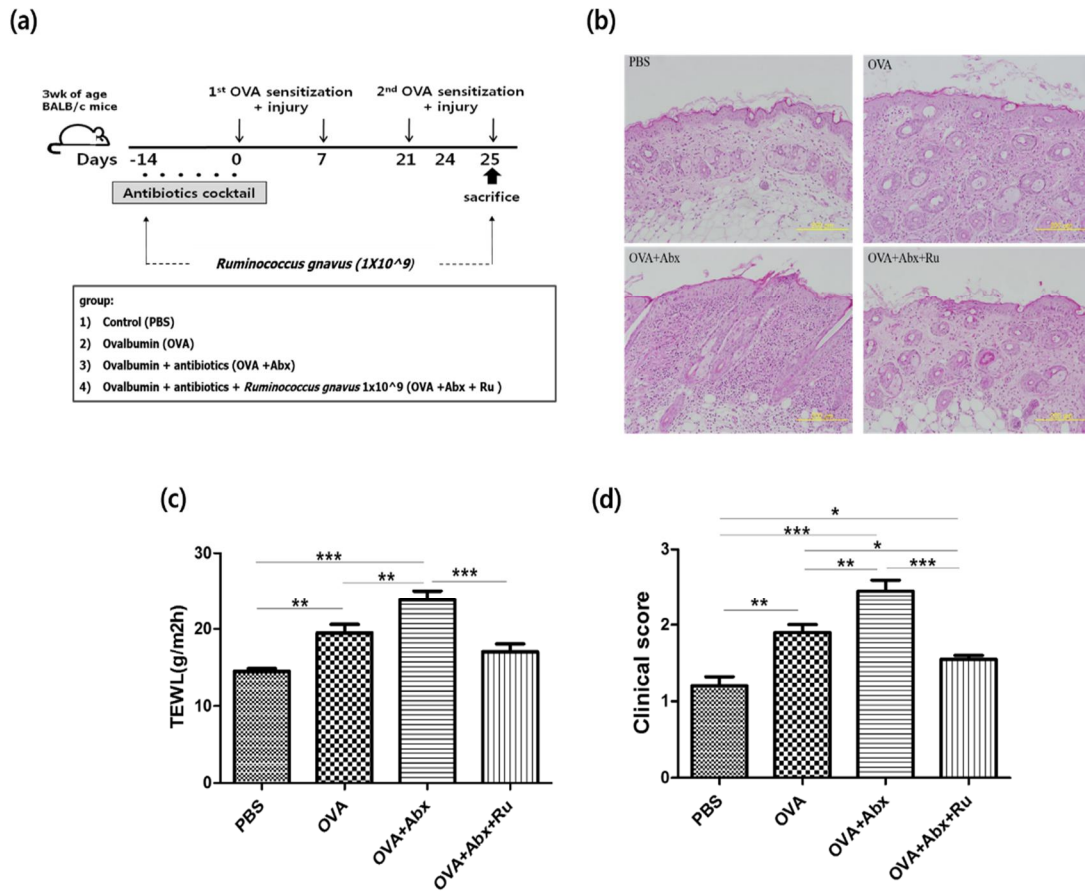


Fig 1. Oral *R. gnnavus* administration improve the clinical signs in antibiotic-treated atopic dermatitis mouse models. (a) Experimental design, (b) Histological analysis using H&E-stained skin tissue, (c) Clinical score and (d) TEWL measurements.

Statistical significance was determined by ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Abx, antibiotics; Ru, *R. gnnavus*

항생제에 노출된 마우스에서 *R. gnavus*의 경구 투여는 전신 면역 알레르기반응 감소 및 피부의 Treg 면역반응을 증가시킨다

전신 면역반응 유발 정도를 확인하기 위하여 혈청 내 총 IgE와 항원 특이 IgE를 측정된 결과, OVA+Abx 군이 OVA 군에 비해 혈청 내 총 IgE와 OVA 특이 IgE가 증가하는 경향을 보인 반면, OVA+Abx+Ru 군에서 혈청 내 총 IgE 및 OVA 특이 IgE가 감소되었다(그림 2a-b). 다음으로 국소 림프절에서 CD4+FOXP3+ 세포의 분포와 피부 조직에서 Treg 연관 사이토카인인 IL-10 및 Th2 연관 사이토카인인 IL-6의 발현량을 측정하였다. OVA+Abx 군에 비하여 OVA+Abx+Ru 군에서 CD4⁺Foxp3⁺ 세포 분포 및 피부 조직에서 IL-10의 발현이 증가되었다(그림 2c-d). 피부조직의 Th2 연관 사이토카인(IL-6)의 발현을 살펴본 결과, OVA+Abx 군에서 IL-6의 발현량이 증가하였으며 OVA+Abx+Ru 군에서 감소하였다(그림 2e). 이 결과는, 지속적인 *R. gnavus*의 투여는 아토피피부염 마우스 모델에서 전신 면역 알레르기반응 감소 및 Treg 조절에 관여할 수 있음을 시사한다.

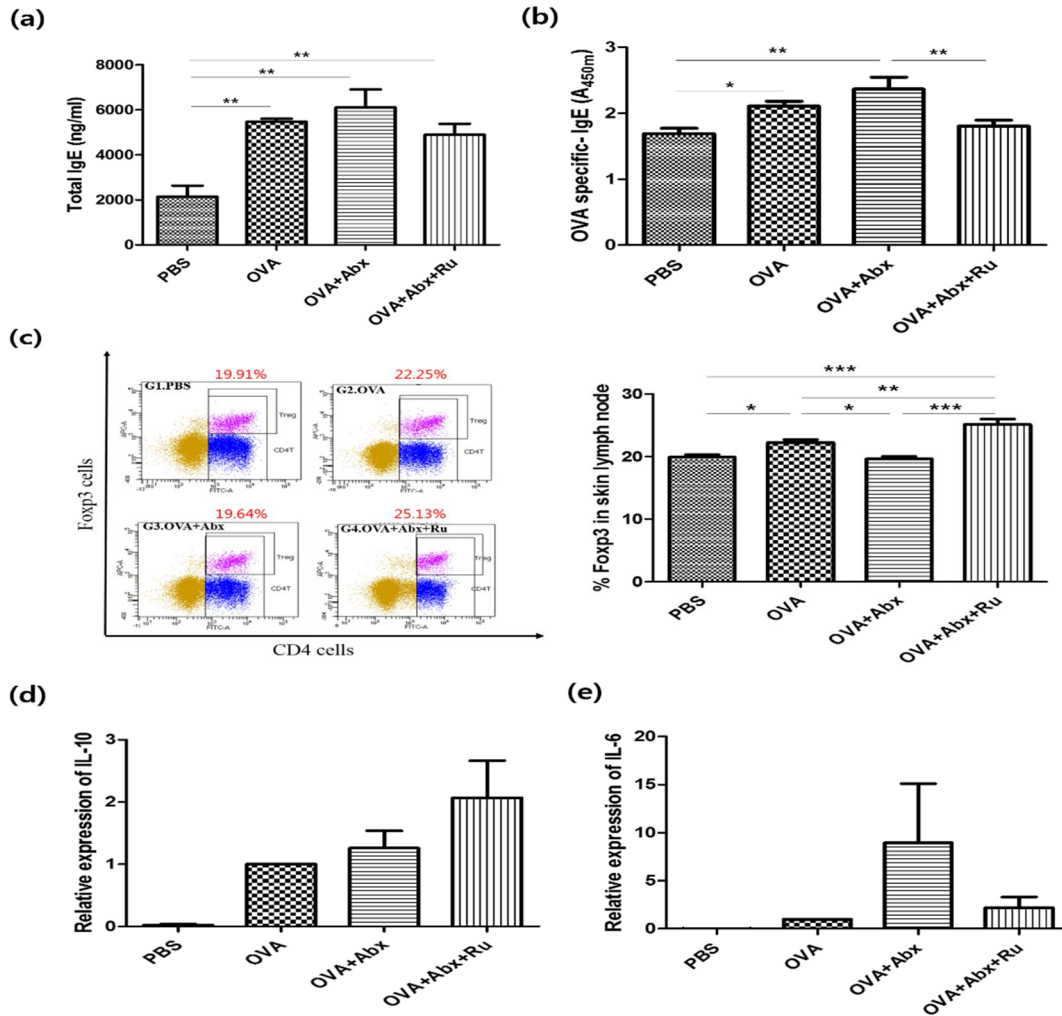


Fig 2. Oral *R. gnavus* administration regulates the systemic immune allergic response and the Th2/Treg response in antibiotic-treated atopic dermatitis mouse models. Concentration of (a) total IgE and (b) OVA-specific IgE levels in the serum as determined by ELISA. (c) Population of CD4⁺Foxp3⁺ cells in the skin draining lymph nodes of treated AD mice as determined by flow cytometric analysis. Measurement of (d) IL-10, (e) IL-6 skin mRNA expression in AD mice by real-time PCR. Statistical significance was determined by ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. (P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001). ND, non-detection; Abx, antibiotics; Ru, *R. gnavus***

항생제에 노출된 마우스에서 *R. gnavus* 의 경구 투여는 장내 SCFAs 를

증가시킨다.

항생제 노출과 지속적인 *R. gnavus* 투여가 장내 대사산물인 SCFAs 에 영향을 미치는지를 조사하기 위해, 아토피피부염 마우스 모델의 분변에서 GC/MS 를 이용하여 SCFAs 의 수치를 측정하였다. OVA 군에 비해 OVA+Abx 군에서 butyric acid 와 propionic acid 가 감소되었다(그림 3b-c). 반면, OVA+Abx+Ru 군에서는 OVA+Abx 군에 비해 전체적인 SCFAs 수치가 증가하였고, 특히 butyric acid 가 유의하게 증가되었다. 이 결과는, 지속적인 *R. gnavus* 의 투여는 아토피피부염 마우스 모델에서 장내 미생물의 대사산물인 SCFAs 조절에 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

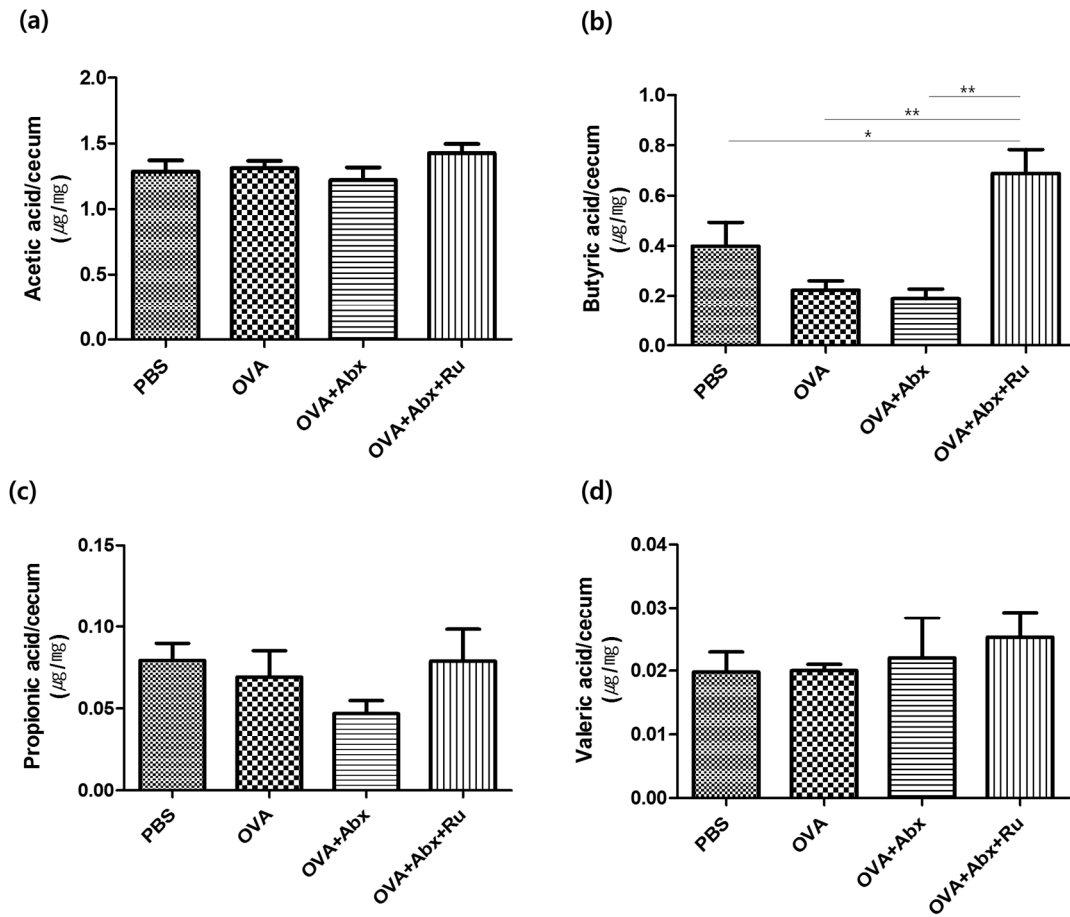


Fig 3. Oral *R. gnavus* administration increases the SCFAs from feces in antibiotic-treated atopic dermatitis mouse models. (a-d) SCFAs were measured by gas chromatography/mass spectrometry (GC / MS) in AD mice.

Statistical significance was determined by ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$). Abx, antibiotics; Ru, *R. gnavus*

고찰

본 연구에서는 아토피피부염 마우스 모델에서 항생제 노출에 의해 아토피피부염의 표현형 (TEWL, 임상 점수, 피부 내 염증세포의 침윤 및 혈청 IgE 농도)과 피부 염증성 사이토카인인 IL-6의 발현량이 증가하는 반면, 지속적인 *R. gnavus*의 투여로 이러한 지표들이 완화되는 것을 확인하였다. 또한, 항생제의 노출은 피부에서 Treg 세포의 분포와 Treg 연관 사이토카인인 IL-10의 발현을 감소시키는 반면 *R. gnavus*의 투여를 통해 Treg 세포 분포와 IL-10의 발현량이 증가하였다. 특히, 항생제 노출에 의해 감소된 SCFAs의 butyrate와 propionate는 지속적인 *R. gnavus*의 투여에 의해 증가되었다. 따라서, 본 연구 결과는 *R. gnavus*에 의한 SCFAs의 변화가 피부의 Treg 반응을 조절하여 아토피피부염의 증상 및 염증반응에 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사한다.

장내 미생물군집은 장 점막 면역계에 존재하는 활성화된 면역세포들에 의해 생리적 염증반응을 유지하고 SCFAs와 항 염증성 면역물질들을 생산하여 인체 내 항상성 유지에 도움을 준다고 알려져 있다. [36-38] 이전의 여러 연구들에 따르면 장내 미생물군집의 불균형이 초래되면 면역반응에 영향을 주어 아토피피부염의 발달에 기여한다고 보고되었다.[39-41] 한 연구에서는 IgE가 높은 아토피피부염 환자의 장내 미생물군집의 다양성이 감소되어 있었고,[42] 다른 한 연구에서는 무균 마우스 모델에서 혈청 IgE 농도가 증가한다고 보고되었다.[43] 또한, 최근 한 연구에서 항생제에 노출된 아토피피부염

모델에서 항생제를 투여하지 않은 군에 비하여 높은 IgE 농도 및 아토피피부염 증상의 악화를 보여주었다.[33] 본 연구 결과에서도 항생제를 처리한 마우스에서 아토피피부염의 표현형인 TEWL, 임상 점수 및 피부의 염증세포의 침윤이 증가하였고 혈액 내 IgE 농도가 유의하게 증가되었다. 이는 장내 미생물의 존재 및 군집의 다양성의 변화가 추후 아토피피부염 발생에 연관이 있음을 시사하는 결과이다.

본 연구에서 장내 미생물인 *R. gnavus*의 경구 투여가 항생제에 노출된 마우스에서 아토피피부염의 표현형(TEWL, 임상 점수, 염증세포의 침윤 정도 및 혈액 IgE 농도)의 감소와 피부 면역반응(Treg 세포 분포와 IL-10 발현 증가 및 IL-6의 감소)을 조절할 수 있음을 확인하였다. 최근에는 장내 미생물의 불균형을 프로바이오틱스와 같은 유익한 세균의 증가를 통해 장내 세균 구성을 바꾸고 면역기능을 조절하여 아토피피부염을 예방 또는 치료하려는 연구들이 보고되고 있다.[44, 45] 특히 Treg의 분화가 장내 미생물총과 관련이 깊다는 연구 결과들이 나오면서 장내 미생물총의 면역기능은 Treg 유도를 통한 면역억제 반응에 중점을 두고 있다.[46] Treg은 항원에 반응하는 Th2 세포, 비만세포 및 호산구의 활성화를 억제하고 B 세포의 활성 억제를 촉진시켜 IgE 생산을 감소시키는 역할을 한다.[47] 또한, IL-10과 TGF- β 와 같은 면역 억제 사이토카인을 분비하여 염증반응의 감소 및 항원에 대한 면역 관용을 유도하여 아토피피부염과 같은 알레르기질환의 발생을 억제시키는 것으로 알려져 있다.[48] 한 연구에서 장내 미생물인 *Bacteroides fragilis*가 Treg 분화를 통해 장

점막 내 관용을 유도한다고 보고하였으며[49], Nc/Nga 아토피피부염 마우스 모델을 이용한 연구에서는 *Lactobacillus rhamnosus*를 투여한 아토피피부염 마우스에서 혈액 내 IgE와 Th2 사이토카인 감소 등을 통한 전반적인 아토피피부염 증상이 호전되었고 IL-10이 증가됨을 확인하였다.[50, 51] 또 아토피피부염 마우스 모델에 *Lactobacillus sakei* WIKIM30를 투여하였을 때 장내 미생물총의 조성 중 특히, *Ruminococcus*의 증가와 함께 Treg의 생성 유도를 통한 IL-10 발현의 증가가 전반적인 Th2 면역반응을 억제하여 아토피피부염의 증상을 완화시킨다고 보고하였다.[52] 최근 항생제를 투여한 아토피피부염 마우스에서 정상 마우스 분변의 투여를 통해 Treg 반응의 증가와 Th2/ILC3의 면역반응 감소로 인해 아토피피부염이 개선될 수 있음을 확인하였다.[33] 이런 결과들을 미루어, 장내 미생물인 *R. gnavus*는 피부 내 Treg의 분화를 촉진시켜 Th2 관련 사이토카인의 발생과 염증반응의 억제로 인해 아토피피부염의 증상을 완화시키는 것으로 생각된다.

SCFAs는 장내 미생물에 의해 생성되는 주요 대사산물로서 장 상피세포가 침입하는 균에 대한 면역반응을 이용하여 숙주의 항상성을 조절하고 염증으로부터 숙주를 보호하는 등 여러 측면에서 중요한 역할을 한다.[38, 53] 정상 수준의 SCFAs는 건강한 면역 환경을 조성하는 데 도움이 되지만 SCFAs의 부족은 Th2-매개 면역 환경을 촉진시켜 나중에 알레르기질환 발생의 원인이 된다고 알려졌다.[54] SCFAs는 다른 장기와 국소 부위에 도달하기 위하여 혈액 순환에 흡수되는 대사산물을 통해 순환계로 들어가 혈액, 지방조직,

간, 말초 조직 등에서 면역 시스템 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다.[55, 56] 특히, SCFAs의 대사산물인 acetate, butyrate 및 propionate는 지질대사, 염증반응, 산화스트레스 등의 조절에 관여하는 G protein-coupled receptor(GPCR)의 활성화를 통해 Treg의 분화를 촉진하고 Treg 관련 면역반응의 조절을 통해 알레르기질환에 영향을 준다고 보고되었다.[55, 57, 58] 또한, butyrate는 수지상 세포 및 T 세포를 활성화시켜 결과에 Treg 세포의 축적을 촉진한다고 보고되었다.[38] 최근 항생제 복용 후 장내 미생물총의 불균형이 SCFAs 생성을 감소시키고 전반적인 대사물질을 변경한다고 알려지면서 SCFAs 생산에 있어 장내 미생물 구성의 필수 역할이 강조되고 있다.[59, 60] 장내 미생물인 *R. gnavus*는 intramolecular trans-sialidase(IT-sialidase)와 관련 있는 대사 경로를 통해 뮤신을 분해할 때 다당류와 펙틴을 발효시켜 SCFAs인 acetate, butyrate 및 propionate를 생산하는 것으로 알려져 있다.[61, 62] 본 연구 결과, 항생제를 처리한 마우스에서 분변 내 butyrate와 propionate가 감소하였고, *R. gnavus* 투여 군에서는 전반적인 SCFAs 증가와 함께 특히 butyrate가 유의하게 증가하였다. 최근 한 연구에서도 항생제를 투여한 아토피피부염 마우스에서 전반적인 SCFAs이 감소되었고, 정상 마우스 분변의 투여를 통해 butyrate와 propionate가 크게 증가하는 것을 보여주었다.[33] 이 결과는 *R. gnavus*의 투여가 acetate, butyrate, propionate의 생산량 증가에 영향을 줄 수 있다고 생각될 수 있으며, 특히 *R. gnavus*에 의한 장내 미생물의 구성 변화에 따라 생성된 SCFAs(특히, butyrate)가 혈류를 통한

순환에 의해 먼 조직에서도 Treg 연관 면역반응의 자극을 유발할 수 있음을 시사한다.

그러나, 본 연구는 몇 가지 한계점을 가지고 있다. 첫 번째, *R. gnavus*가 직접적으로 SCFAs의 생성에 관여하는지 확인하지 않았으며, 또한 장내에 증가된 SCFAs가 어떻게 피부의 Treg 세포 반응을 촉진하는지에 대해 직접적인 조사를 하지 않았다. 그러므로 생물학적 관계를 검증하고 확인하기 위해서는 좀 더 구체적인 추가 연구가 여전히 필요할 것으로 사료된다. 두 번째, 본 연구는 항생제 투여를 통한 장내 불균형을 유도함과 동시에 *R. gnavus* 투여를 통한 아토피피부염에서의 완화 효과를 확인하였다. 그러나 프로바이오틱스로서 *R. gnavus*의 직접적인 단독 효과를 확인하기 위해서는 항생제 처리한 이후에 *R. gnavus*의 투여를 통한 추가 연구가 더 필요할 것으로 보이며, 또한 *R. gnavus*의 완화 효과를 명확히 확인하기 위해서는 기존에 입증된 프로바이오틱스 균주를 대조군으로 이용한 비교 연구가 여전히 이루어져야 할 것이다. 그러나 이러한 한계점에도 불구하고 본 연구는 아토피피부염 환자에서 감소되어 있는 *R. gnavus*를 이용하여 장내 미생물의 불균형 시 *R. gnavus*가 아토피피부염 임상 증상에 완화를 확인함으로써 이를 통해 추후 인체 장내미생물을 활용한 아토피피부염의 치료법 개발에 새로운 가능성을 보여준 연구 결과로 생각된다.

결론

항생제 처리에 의한 장내 불균형 시, *R. gnavus*는 장내 SCFAs를 증가시키고 피부에서 Treg 세포의 조절을 통해 아토피피부염 증상 완화에 영향을 줄 가능성이 있다.

참고문헌

1. Leung, D.Y. and T. Bieber, *Atopic dermatitis*. Lancet, 2003. **361**(9352): p. 151-60.
2. Lee, J.Y., et al., *Exposure to gene-environment interactions before 1 year of age may favor the development of atopic dermatitis*. Int Arch Allergy Immunol, 2012. **157**(4): p. 363-71.
3. Abramovits, W., *Atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 2005. **53**(1 Suppl 1): p. S86-93.
4. Oshio, T., et al., *Dermatophagoides farinae extract induces severe atopic dermatitis in NC/Nga mice, which is effectively suppressed by the administration of tacrolimus ointment*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(4): p. 403-11.
5. Nedoszytko, B., et al., *Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis*. Postepy Dermatol Alergol, 2014. **31**(2): p. 84-91.
6. Brandt, E.B. and U. Sivaprasad, *Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis*. J Clin Cell Immunol, 2011. **2**(3).
7. Grewe, M., et al., *A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis*. Immunol Today, 1998. **19**(8): p. 359-61.
8. Faergemann, J., *Atopic dermatitis and fungi*. Clinical microbiology reviews, 2002. **15**(4): p. 545-563.
9. Zutavern, A., et al., *Pre-natal and post-natal exposure to respiratory infection and atopic diseases development: a historical cohort study*. Respir Res, 2006. **7**: p. 81.
10. Gibbs, S., et al., *Atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: a case-control study*. Int J Epidemiol, 2004. **33**(1): p. 199-207.
11. Dom, S., et al., *Pre- and post-natal exposure to antibiotics and the development of eczema, recurrent wheezing and atopic sensitization in children up to the age of 4 years*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(9): p. 1378-87.
12. Azad, M.B., et al., *Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity*. Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian

- Society of Allergy and Clinical Immunology, 2013. **9**(1): p. 15-15.
13. Stiemsma, L.T., et al., *The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies*. *ImmunoTargets and therapy*, 2015. **4**: p. 143-157.
 14. Chu, D.M. and K.M. Aagaard, *Microbiome: Eating for trillions*. *Nature*, 2016. **532**(7599): p. 316-7.
 15. Holscher, H.D., *Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota*. *Gut Microbes*, 2017. **8**(2): p. 172-184.
 16. Apostolou, E., et al., *Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence in situ hybridization*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001. **30**(3): p. 217-21.
 17. Chen, C.C., et al., *Alterations in the gut microbiotas of children with food sensitization in early life*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2016. **27**(3): p. 254-62.
 18. Cavaglieri, C.R., et al., *Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes*. *Life Sci*, 2003. **73**(13): p. 1683-90.
 19. Lee, S.Y., *Can the Use of Antibiotics Alter the Susceptibility to Allergic Diseases?* *Allergy Asthma Immunol Res*, 2018. **10**(5): p. 425-427.
 20. Bager, P., J. Wohlfahrt, and T. Westergaard, *Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses*. *Clin Exp Allergy*, 2008. **38**(4): p. 634-42.
 21. Murgas Torrazza, R. and J. Neu, *The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate*. *J Perinatol*, 2011. **31 Suppl 1**: p. S29-34.
 22. Lee, S.Y., et al., *Additive effect between IL-13 polymorphism and cesarean section delivery/prenatal antibiotics use on atopic dermatitis: a birth cohort study (COCOA)*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e96603.
 23. Notay, M., et al., *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for the Treatment and Prevention of Adult Dermatological Diseases*. *Am J Clin Dermatol*, 2017. **18**(6): p. 721-732.
 24. Timm, S., et al., *Prenatal antibiotics and atopic dermatitis among 18-month-old children in the Danish National Birth Cohort*. *Clin Exp Allergy*, 2017. **47**(7): p. 929-

936.

25. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
26. Kraal, L., et al., *The prevalence of species and strains in the human microbiome: a resource for experimental efforts*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97279.
27. Crost, E.H., et al., *Utilisation of mucin glycans by the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus* is strain-dependent*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76341.
28. Blanton, L.V., et al., *Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children*. Science, 2016. **351**(6275).
29. Truax, A.D., et al., *The Inhibitory Innate Immune Sensor NLRP12 Maintains a Threshold against Obesity by Regulating Gut Microbiota Homeostasis*. Cell Host Microbe, 2018. **24**(3): p. 364-378.e6.
30. Lee, M.J., et al., *Perturbations of gut microbiome genes in infants with atopic dermatitis according to feeding type*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(4): p. 1310-1319.
31. Heimesaat, M.M., et al., *Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii**. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8785-95.
32. Kennedy, E.A., K.Y. King, and M.T. Baldrige, *Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 1534.
33. Kim, H.-J., S.-H. Lee, and S.-J. Hong, *Antibiotics-Induced Dysbiosis of Intestinal Microbiota Aggravates Atopic Dermatitis in Mice by Altered Short-Chain Fatty Acids*. Allergy Asthma Immunol Res, 2020. **12**(1): p. 137-148.
34. Fyhrquist, N., et al., *Foxp3+ cells control Th2 responses in a murine model of atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2012. **132**(6): p. 1672-80.
35. Kim, H.J., et al., *A novel mouse model of atopic dermatitis with epicutaneous allergen sensitization and the effect of *Lactobacillus rhamnosus**. Exp Dermatol, 2012. **21**(9): p. 672-5.
36. Bergman, E.N., *Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal*

- tract in various species. Physiol Rev, 1990. 70(2): p. 567-90.*
37. Le Poul, E., et al., *Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. J Biol Chem, 2003. 278(28): p. 25481-9.*
 38. Smith, P.M., et al., *The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. Science (New York, N.Y.), 2013. 341(6145): p. 569-573.*
 39. Honda, K. and D.R. Littman, *The microbiome in infectious disease and inflammation. Annu Rev Immunol, 2012. 30: p. 759-95.*
 40. Penders, J., et al., *Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. Gut, 2007. 56(5): p. 661-7.*
 41. Ismail, I.H., et al., *Reduced gut microbial diversity in early life is associated with later development of eczema but not atopy in high-risk infants. Pediatr Allergy Immunol, 2012. 23(7): p. 674-81.*
 42. Abrahamsson, T.R., et al., *Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. J Allergy Clin Immunol, 2012. 129(2): p. 434-40, 440.e1-2.*
 43. Cahenzli, J., et al., *Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. Cell host & microbe, 2013. 14(5): p. 559-570.*
 44. Holowacz, S., et al., *Lactobacillus salivarius LA307 and Lactobacillus rhamnosus LA305 attenuate skin inflammation in mice. Benef Microbes, 2018. 9(2): p. 299-309.*
 45. Tanaka, A., et al., *Oral supplementation with Lactobacillus rhamnosus CGMCC 1.3724 prevents development of atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice possibly by modulating local production of IFN-gamma. Exp Dermatol, 2009. 18(12): p. 1022-7.*
 46. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. J Allergy Clin Immunol, 2009. 123(4): p. 735-46; quiz 747-8.*
 47. Saito, M., et al., *Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. J Exp Med,*

2011. **208**(2): p. 235-49.
48. Palomares, O., et al., *Role of Treg in immune regulation of allergic diseases*. Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1232-40.
49. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.
50. Kim, H.J., et al., *Effects of Lactobacillus rhamnosus on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Tregs*. Clin Immunol, 2014. **153**(1): p. 178-86.
51. Sawada, J., et al., *Ingestion of heat-treated Lactobacillus rhamnosus GG prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(2): p. 296-303.
52. Kwon, M.S., et al., *Lactobacillus sakei WIKIM30 Ameliorates Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions by Inducing Regulatory T Cells and Altering Gut Microbiota Structure in Mice*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1905.
53. Peterson, C.T., et al., *Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota*. Clinical and experimental immunology, 2015. **179**(3): p. 363-377.
54. Cait, A., et al., *Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids*. Mucosal Immunol, 2018. **11**(3): p. 785-795.
55. Sun, M., et al., *Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases*. Journal of gastroenterology, 2017. **52**(1): p. 1-8.
56. Canfora, E.E., J.W. Jocken, and E.E. Blaak, *Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(10): p. 577-91.
57. Christensen, G.J. and H. Bruggemann, *Bacterial skin commensals and their role as host guardians*. Benef Microbes, 2014. **5**(2): p. 201-15.
58. Schwarz, A., A. Bruhs, and T. Schwarz, *The Short-Chain Fatty Acid Sodium Butyrate Functions as a Regulator of the Skin Immune System*. J Invest Dermatol, 2017. **137**(4): p. 855-864.
59. Holota, Y., et al., *The long-term consequences of antibiotic therapy: Role of colonic*

- short-chain fatty acids (SCFA) system and intestinal barrier integrity.* PloS one, 2019. **14**(8): p. e0220642-e0220642.
60. Song, H., et al., *Faecalibacterium prausnitzii* subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. **137**(3): p. 852-60.
 61. Crost, E.H., et al., *Mechanistic Insights Into the Cross-Feeding of Ruminococcus gnavus and Ruminococcus bromii on Host and Dietary Carbohydrates.* *Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 2558.
 62. Crost, E.H., et al., *The mucin-degradation strategy of Ruminococcus gnavus: The importance of intramolecular trans-sialidases.* *Gut Microbes*, 2016. **7**(4): p. 302-312.

English Abstract

Background: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease characterized by pruritic skin lesions, dysregulated immune responses and epidermal barrier dysfunction. Recently, several studies have suggested that dysbiosis of the gut microbiota by exposure of various environmental factors such as mode of birth, infant nutrition and antibiotic use in early life has been strongly associated with development of AD. *Ruminococcus gnavus* (*R. gnavus*) as a prominent member of the gut microbiota of the healthy human gut play a key role in the adaptation of gut microbiota to the mucosal environment. A previous study reported that AD patients show a decreased gut microbiota composition and a reduced abundance of *R. gnavus* compared with normal control subjects. This study point towards an important role of *R. gnavus* in modulating gut microbiome at development of AD. However, the mechanism is not clear how *R. gnavus* might contribute to this process.

Objective: This study aimed to investigate the influence of oral administration of *R. gnavus* on the dysbiosis of gut microbiota by antibiotics treatment in an ovalbumin (OVA)-induced AD mice model.

Methods: 4-week-old female BALB/C mice were treated with antibiotic cocktails in drinking water for 2 weeks and *R. gnavus* (1×10^9 CFU/200 μ l) was orally administered throughout the study. At 6 weeks of age, the mice were epicutaneously sensitized by applying OVA to the shaved dorsal skin. To assess AD symptoms, we measured transepidermal water loss (TEWL) and scored erythema, scaling, and excoriation in dorsum lesions. Total immunoglobulin (Ig)

E and OVA specific IgE in serum and histopathological changes in skin were analyzed. To evaluate the immune response, the levels of Th2-related interleukin (IL) -6 and Treg-related cytokine IL-10 were detected using real-time PCR. In addition, the frequency of CD4⁺Forkhead box P3⁺ (Foxp3) producing cells in skin draining lymph nodes was assessed using flow cytometry. Short chain fatty acids (SCFAs) in feces were measured using gas chromatography/mass spectrometer.

Results: In comparison with the values observed for the AD mice which received antibiotics, the AD phenotypes (e.g, TEWL, clinical score, total serum IgE level, OVA specific IgE level and skin inflammation on histopathology) and skin mRNA expression level of Th2-related cytokines IL-6 were significantly decreased by the oral administration of *R. gnavus* with antibiotics. In addition, the population of CD4⁺Foxp3⁺ cells in skin draining lymph nodes and the expression of IL-10 in the skin tissue were increase in AD mice treated *R. gnavus* with antibiotics than AD mice treated antibiotics only. *R. gnavus* treatment also significantly increased the production of butyric acid in feces compared to the antibiotics-treated AD mice.

Conclusion: Our results suggest that oral administration of *R. gnavus* on dysbiosis of gut microbiota in the mice may alleviate the AD symptoms through modulating the immune responses mediated by increased intestinal SCFAs production and population of skin Treg cell in the AD mice model.

Key words: Atopic dermatitis, *Ruminococcus gnavus*, Antibiotics, Regulatory T cell,

Short chain fatty acid