대한한방소아과학회지 제35권 제4호(2021년 11월)
J Pediatr Korean Med. May, 2021;35(4):96-111
ISSN 2287-9463(Online), https://doi.org/10.7778/jpkm.2021.35.4.96

태독이 장내 세균총에 미치는 영향을 규명하기 위한 임신쥐의 스트레스 및 식이에 따른 신생쥐의 장내 세균총 및 IgA 농도 분석 시험

정지은[1] · 최유민[2] · 정민정[1,*]

[1]우석대학교 한의과대학 소아과학교실, [2]우석대학교 한의과대학 침구의학교실

Abstract

Study on Intestinal Flora and IgA Concentration Analysis in Newborn Mice by Stress and Diet in Pregnant Mice to Investigate the Effect of Taedok on the Intestinal Flora

Jeong Jieun[1] · Choi Yoomin[2] · Jeong Minjeong[1,*]

[1]*Department of Pediatrics, College of Korean Medicine, Woosuk University*
[2]*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Korean Medicine, Woosuk University*

Objectives

The purpose of this study is to look for pathological mechanism of disease development caused by Taedok, by studying whether stress and diet in pregnant ICR mice affect the intestinal flora and IgA (Immunoglobulin A) concentration.

Methods

The mice were divided into 4 groups (n=5 per group) based on the concept of Taedok: the control group (G1), stress group (G2), capsaicin diet group (G3), high fat diet group (G4).

We collected and analyzed intestinal flora from maternal feces and cecal flora from neonatal mice by group. Then, IgA concentration in the maternal feces and sIgA (secretory Immunoglobulin A) concentration in the cecal contents of newborn mice were analyzed.

In addition, serum corticosterone was analyzed before and after stress application.

Results

Changes in maternal intestinal flora and neonatal mice cecal flora by stress and diet were observed. There were no significant changes in the IgA concentration in maternal feces and the sIgA concentration in the cecal contents of neonatal mice.

No significant changes compared to the control group were observed between groups before and after applying stress. However, when comparing within one subject, a significant increase was confirmed after stress application in the stress group (G2).

Conclusions

Based on the results, we observed stress and diet in pregnant mice affect the intestinal flora of maternal and neonatal. We were able to interpret the pathological mechanism of Taedok based on the principle of interaction between mother and newborn intestinal flora.

Key words: Taedok, Microbiome, Stress, Capsaicin diet, High fat diet, ICR mouse

• **Received**: October 22, 2021 • **Revised**: November 15, 2021 • **Accepted**: November 19, 2021
***Corresponding Author**: Jeong Minjeong
Eoeun-ro 46, Wansan-gu, Jeonju, Jeonbuk, Republic of Korea
TEL: +82-63-220-8619 / FAX: +82-63-220-8616
E-mail: vocation0313@gmail.com

ⓒ The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the tenus of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Ⅰ. Introduction

태독 (胎毒)은 부모의 잘못된 음식 섭취, 생활습관, 정서 변화 등으로부터 비롯된 열독 (熱毒)이 태아에 전해지거나, 신생아의 입안에 있는 예악지기 (穢惡之氣)가 체내로 유입되어 발생한 것으로 濕疹, 胎熱, 癰疽, 胎黃, 瘡瘍 등의 질병을 일으킨다[1]. 태독으로 인해 가장 많이 발생하는 것은 습진 (濕疹) 등과 같은 피부 질환이다[2]. 태독 학설은 隨代 巢元方의 ≪諸病源候論≫에서 胎毒이라는 글자는 없으나, 小兒雜病諸侯病因중에 비슷한 설명으로 胎疸候, 難乳候 등을 설명하여 일찍이 거론되었으며, 唐代 孫思邈의 ≪千金要方≫, ≪巢氏病源≫ 등의 初生出腹중에 구체적인 제시가 있고, 宋代 ≪小兒衛生總微論方≫의 胎中病論에서 태독이라는 용어를 처음 사용하였다[2]. ≪及幼方≫에서 "아이의 질병이 다양하고 복잡한데 거의 절반은 태중 (胎中)에서 받은 열독 (熱毒)이다"라고 언급할 정도로[3] 한방소아과학에서 태독은 중요한 병인 중 하나이다. 따라서 임신 중 매운 것을 먹거나 화를 내거나 하지 않도록 하는 등 산모의 섭생을 중요시하였고, 태독으로 인한 질환을 예방하기 위해 하태독법을 신생아에게 시행하였다[2].

장관은 소화, 흡수 외에도 면역학적 역할을 담당하고 있으며, 이는 질병 예방에 있어서 중요하다. 특히 장내 세균총은 숙주와 상호작용하여 장점막 방어와 국소면역기전의 활성화에 중요한 역할을 한다[4]. 위장관에 정착한 장내 미생물은 숙주인 영아의 장내 면역 활성, 장 보호, 에너지대사 등에서 다양한 기능을 한다고 알려져 있고[5,6], 또한 아토피피부염 등 알레르기 질환에 관여한다고 보고된 바 있다[7].

태아의 장내는 무균상태이며, 출산 과정에서 산도를 통과하며 처음 장내 미생물에 노출되고, 이후 급격히 장내 세균총이 생성되기 시작한다. 실제로 출산 방식이 생애 초기 장내 미생물 군집의 형성과 발달에 영향을 미친다는 연구가 많은데, 자연분만아와 제왕절개아에서 장내 미생물 구성의 차이가 보고되었다[8,9]. 자연분만으로 태어난 영아의 초기 장내 미생물 구성은 모체의 질 내 미생물 구성과 유사하고, 제왕절개분만으로 태어난 영아의 장내 미생물 구성은 모체의 피부에 공생하는 미생물과 유사하다[8,9]. 즉, 자연분만아의 장내 세균총은 모체 장내 세균총의 영향을 받으므로, 임신 중 모체의 장내 세균총 구성에 영향을 미치는 산모의 식이, 스트레스 등 생활습관 관리가 중요하다고 할 수 있다.

태독은 태중에서 산모로부터 받은 것으로, 특히 습진 등 피부질환을 많이 일으키며, 하태독법을 통한 태독의 제거를 통해 질병 예방의 효과가 있다. 자연분만아의 장내 세균총은 분만 직후 모체 장내 세균총 구성과 밀접한 관련을 가지면서 생성된다. 장내세균총은 아토피 피부염 등 알레르기 질환과의 관련성이 있으며, 면역학적 역할을 담당하고 있다. 저자는 '태중, 출생 직후'라는 시기, '습진, 아토피 피부염'이라는 질환, '질병 예방과 면역'이라는 기능의 유사성, 그리고 태독의 발생을 막고 건강한 장내 세균총 형성을 위해 공통적으로 임신기간 동안 산모의 생활 관리가 중요하다는 점을 통해 태독과 장내 세균총과의 연관성에 주목하게 되었다. 이를 바탕으로, 한방소아과학의 중요 병인 (病因)인 태독 (胎毒)으로 인한 질환의 발병을 산모의 장내 세균총과 신생아의 장내 세균총의 상호작용의 원리에 입각하여 해석함으로써 태독의 병리기전을 장내 세균총 구성 변화를 통해 규명해보고자 하였다. 즉, '태독이 신생쥐의 장내 세균총 및 면역 활성에 영향을 미칠 것이다'라는 가설을 설정하고, 이를 위한 실험적 모델을 설정하여 연구를 진행하였다.

저자는 임신쥐의 스트레스 및 식이에 따른 신생쥐의 장내 세균총과 면역 활성의 변화를 알아보기 위해, 분만 시 모체 분변과 신생쥐 21일령의 맹장 내용물의 장내 세균총을 분석하고, 모체 분변 내 IgA (Immunoglobulin A) 농도, 신생쥐 맹장 내용물 내 sIgA (secretory Immunoglobulin A) 농도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. Materials and Methods

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA)을 이용하여 분변 샘플로부터 유전체 게놈을 추출하여 라이브러리를 제작하고 TapeStation DNA screentape D1000 (Agilent, Santa Clara, CA)과 Picogreen assay를 통해서 사이즈 확인 및 농도를 측정하였다.

2 mM EDTA (Sigma, Burlington, MA), 1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, Burlington, MA)을 이용하여 분변 균질액을 만들고, Mouse IgA ELISA, Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)와 Mouse Secretory Immunoglobulin A ELISA Kit (MyBioSource, Vancouver, Canada)를 각각 이용하여 분변의 IgA 및 맹장 내용물 sIgA를 분석하였다.

Corticosterone Parameter Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 임신쥐 혈청 corticosterone을 분석하였다.

(2) 기기

완성된 16s amplicon library는 MiSeq (Illumina, San Diego, CA)을 이용해서 시퀀싱 반응을 수행하였다. Sequencing이 완료된 후 MiSeq Reporter (Illumina, San Diego, CA)을 사용하여 FASTQ 파일을 생성하고, BWA를 통해 PhiX 서열을 제거하였다. 얻어진 서열은 CD-HIT-OTU를 이용하여 총 수준의 OTU를 형성하였다.

2) 동물

임신 ICR mouse (암컷, 임신 4일차, 29마리) ㈜오리엔트바이오 동물을 구입하였다. 온도 20~25 ℃, 명암주기 (조명시간) 12시간/일 (오전 7시부터 오후 7시), 조도 150~300 Lux 환경을 조성하여 7일간 시험을 실시하는 동물실 내에서 순화시켰다. 7일간의 검역·순화 기간을 거치며 건강 및 실험의 실시에 적합성 여부를 확인하여 건강한 임신쥐를 선별하였다. 순화 기간 중에는 입수 시에 동물의 꼬리에 적색 유성펜을 이용하여 개체표시 (tail marking)를 하고, 사육 상자에는 검역·순화 기간 중 임시 개체식별카드 (시험명, 개체번호, 입고 시기)를 부착하였다. 신생쥐도 임신쥐와 같은 환경에서 관리되었으며 21일간 모유수유 하였다.

사료는 자유 급이 방법으로 공급하였고 음수는 상수 도수를 필터 유수 살균기로 여과 후 자외선을 조사하고, 폴리카보네이트 재질의 음수병 (250 mL)을 이용하여 자유 섭취시켰다.

본 시험은 동물보호법에 근거한 ㈜케이피씨의 동물실험윤리위원회에 의해 승인을 받았다 (승인번호: P194030).

2. 방법

1) 체중 측정 및 일반증상 관찰

모든 모체에 대해서 주 1회 (군 분리 시, 분리 후 9, 15, 22, 29일째) 체중을 측정하였으며, 모든 모체, 신생쥐에 대하여 투여 및 관찰 기간 동안 사망 여부 등에 대하여 1일 1회 이상 관찰하였다.

2) 군 분리

임신 4일차 암컷 29마리를 입수하여 7일간 검역·순화 기간을 거치며 건강한 임신쥐를 선별하였다. 검역·순화 기간 중 이상 반응이 관찰된 임신쥐는 없어 모든 개체가 배정되었다. 임신 11일차에 군 분리를 위해 체중을 측정하고 체중 측정 결과를 통해 각 그룹당 체중의 평균이 유사하도록 G1 (대조군), G2 (스트레스 부여군), G3 (캡사이신 사료 급여군), G4 (고지방 사료 급여군)로 군 분리를 실시하였다 (Table 1). 각 군당 G1 9마리, G2 7마리, G3 7마리, G4 6마리가 배정되었다. 군 분리 완료 후 임신쥐의 꼬리에 검정색 유성펜을 이용하여 개체표시를 하고 각각의 사육 상자에 개체 식별 카드 (시험번호, 시험군, 개체번호, 성별, 시험 기간 등 기재)를 부착하였다. 군당 6마리 이상으로 유지 후 최종 분석은 군당 1번 개체부터 순서대로 5마리를 이용하여 진행하였다.

Table 1. Group Composition

	Give stress	Diet	Number
G1 (Control)	X	General diet	5
G2 (Stress)	O	General diet	5
G3 (Capsaicin diet)	X	Capsaicin diet	5
G4 (High fat diet)	X	High fat diet	5

임신쥐 G1군에서 출생한 신생쥐는 G1군, G2군에서 출생한 신생쥐는 G2군, G3군에서 출생한 신생쥐는 G3군, G4군에서 출생한 신생쥐는 G4군으로 배정하였다. 신생쥐는 각 군당 G1 87마리, G2 74마리, G3 86마리, G4 87마리가 배정되었다.

3) 사료 공급 및 스트레스 부여

G1 (대조군), G2 (스트레스 부여군)에는 고형 사료 (Harlan Laboratories, 2018S)를 공급하였다. G3 (캡사이신 사료 급여군)에는 Capsaicin (0.03%) (Cayman CHEMICAL) 함유 설치류 사료를 공급하였다. 캡사이신 함유 설치류 사료는 일반 설치류 사료와 Capsaicin을 배합하여 조제하였다. G4 (고지방 사료 급여군)에는 고지방 사료 (Research diets, D12492, Fat 60%)를 공급하였다. 캡사이신 및 고지방 사료는 임신 11일차부터 시험종료 시까지 자유 급이 방법으로 공급하였다.

G2 (스트레스 부여군)에는 밝은 조명 (약 6500 LUX)하 보정틀에 45분간 속박을 하루 6회 반복하여 임신 11일차부터 17일차까지 스트레스를 부여하였다.

4) 부검

출생 후 21일차에 신생쥐에서 부검을 진행하여 맹장 내용물을 획득하였다.

5) 분변 및 장 내용물 세균총 분석

(1) DNA (Deoxyribonucleic acid) Isolation

분만 당일 분변 및 21일령 신생쥐 맹장 내용물 샘플로부터 PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA)를 이용하여 유전체 게놈을 추출하였다.

(2) DNA PCR

추출된 DNA를 주형 (template)으로 사용하여 16s rDNA의 V3-4구역을 두 차례 증폭하여 Miseq 시퀀싱을 위한 라이브러리를 완성하였다. 사용된 primer들의 염기서열은 다음과 같다 (Table 2). 2차 증폭을 위해서 Nextera Index PCR primer를 사용하였다. 제작된 라이브러리는 TapeStation DNA screentape D1000 (Agilent, Santa Clara, CA)과 Picogreen assay를 통해서 사이즈 확인 및 농도를 측정하였다.

(3) Sequencing

완성된 16s amplicon library는 MiSeq (Illumina, San Diego, CA)을 이용해서 300 cycle*2 조건으로 시퀀싱 반응을 수행하였다. OTU analysis에서 MiSeq raw data는 sequencing이 완료된 후 MiSeq Reporter (Illumina, San Diego, CA)을 사용하여 FASTQ 파일을 생성하고, BWA를 통해 PhiX 서열을 제거하였다.

각 샘플별로 구분된 paired-end data는 FLASH (1.2.11)를 사용하여 120-160 bp가 겹치면서 길이가 440-460 bp인 고품질의 서열만을 추려내도록 하였다. 얻어진 서열은 CD-HIT-OTU를 이용하여 sequencing error로 간주되는 낮은 품질의 서열, ambiguous 서열, chimera 서열 등을 제거한 후, 97% 이상의 서열 유사성을 갖는 서열끼리 clustering하여 총 수준의 OTU를 형성하였다. 각 OTU의 대표서열은 Reference DB (NCBI 16S rRNA database)에 BLASTN (v2.4.0)을 수행하여, 유사성이 가장 높은 subject의 organism 정보로 taxonomic assignment를 수행하였다. 이때 DB에 매치되는 best hit의 query coverage가 85% 미만이고, 매치된 영역의 Identity가 85% 미만이면, taxonomy를 정의하지 않도록 하였다.

6) 분변 IgA 및 맹장 내용물 sIgA 분석

분만 시 모체 분변의 IgA 농도와 21일령 신생쥐 맹장 내용물의 sIgA 농도는 획득한 분변 100-150 mg을 칭량하고 2 mM EDTA (Sigma, Burlington, MA)와 1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, Burlington, MA)이 포함된 PBS (phosphate buffer saline)를 분변 200 mg 당 1 ml 씩 넣은 후 homogenizationg 하였다.

분변 균질액을 17,000 xg 로 10분 동안 원심 분리하고 상층액을 모아 Mouse IgA ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX)와 Mouse Secretory Immunoglobulin A ELISA Kit (MyBioSource, Vancouver, Canada)를 각각 이용하여 하나의 well에서 분석하였다.

Table 2. Primer Sequence for PCR Analysis

	Primer	Sequences
1st amplification	341 Forward	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC A-3'
	805 Reverse	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3'
2nd amplification	Forward	5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC AC -[i5]- TCG TCG GCA GCG TC-3'
	Reverse	5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT -[i7]- GTC TCG TGG GCT CGG-3'

7) 임신쥐 혈청 corticosterone 분석

스트레스 부여군 (G2)의 경우 임신 11일차 첫 스트레스 부여 직전과 임신 17일차 마지막 스트레스 부여 후 즉시 채혈하여 혈청을 획득하였으며, 대조군 (G1), 캡사이신 사료 급여군 (G3) 및 고지방 사료 급여군 (G4)에서도 동일한 시점에서 혈청을 획득하여 Corticosterone Parameter Assay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 하나의 well에서 분석하였다.

3. 통계처리

실험에서 얻어진 모든 실험 결과는 mean ± standard deviation (SD)로 표시하고 SPSS (version 20, IBM SPSS Statistics, USA)를 사용하여 검정하였다. 모든 자료들에 대해 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하였으며, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 실험군을 알아내기 위하여 Tukey's test를 실시하였고, 이분산인 경우는 Dunnett T3 test로 사후검정을 실시하였다. 또한 개체 내 혈중 corticosterone의 스트레스 전후 농도 비교는 paired t-test를 이용하여 분석하였다 (유의수준: 양측 5% 및 1%).

Ⅲ. Results

1. 체중 및 일반증상 관찰

시험 기간 동안 모든 군에서 주 1회 체중을 측정하였으며, 모든 군에서 대조군 대비 유의적인 차이는 확인되지 않았다 (Table 3, Figure 2). 모든 모체, 신생쥐에 대해 1일 1회 이상 사망 여부 등에 대하여 관찰한 결과 각 실험군에서 주요한 이상 반응은 관찰되지 않았다.

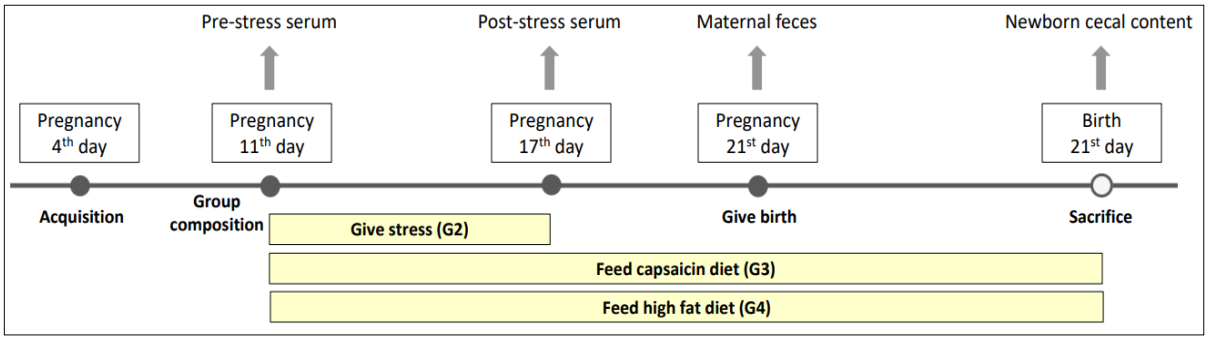

Figure 1. Protocol of applying stress, capsaicin diet, and high fat diet

Table 3. Group Mean Bodyweight

Group	Result	Days (g)				
		0	9	15	22	29
G1 (Control)	Mean	40.07	60.44	51.11	50.40	46.15
	SD	2.75	9.78	3.27	1.66	2.70
	N	5	5	5	5	5
G2 (Stress)	Mean	39.90	46.42	47.74	49.42	43.02
	SD	2.38	10.11	1.56	2.47	3.01
	N	5	5	5	5	5
G3 (Capsaicin diet)	Mean	40.35	52.86	50.94	51.59	44.34
	SD	1.61	11.53	3.31	3.95	3.23
	N	5	5	5	5	5
G4 (High fat diet)	Mean	39.42	53.16	46.62	47.93	44.55
	SD	1.46	15.48	2.46	2.87	2.82
	N	5	5	5	5	5

SD (Standard deviation), N (Number)

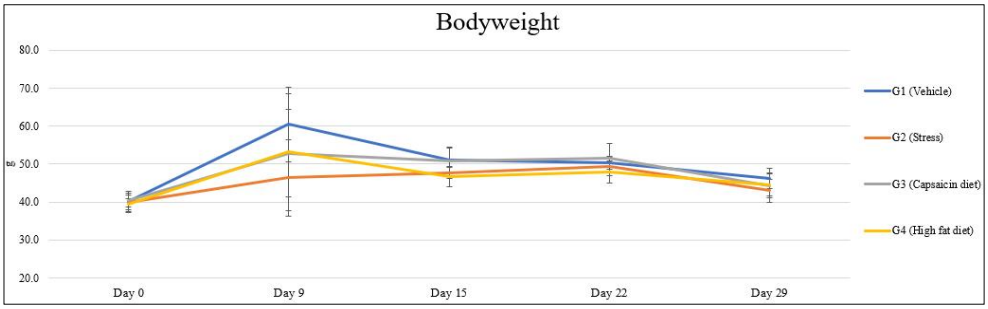

Figure 2. Effect of stress, capsaicin diet and high fat diet on body weight in pregnant ICR mice. Data are expressed as mean ± SD (Standard deviation)

2. 분변 및 장 내용물 세균총 분석

1) 모체 분변의 장내 세균총 분석

모체 분변 내 세균총 분석 시 측정된 abundance ratio 수치를 phylum, class, order, family 및 genus 수준까지 군별로 비교하였다. phylum 수준에서 9개, class 수준에서 16개, order 수준에서 19개, family 수준에서 41개, genus 수준에서 116개의 세균을 분석하였다 (Figure 3-7).

그 결과 family 수준에서 대조군 (G1) 대비 고지방 사료 급여군 (G4)의 *Christensenellaceae*에서 유의적인 감소가 확인되었고 ($p<0.01$), 스트레스 부여군 (G2)의 *Gracilibacteraceae*에서 유의적인 증가가 확인되었다 ($p<0.05$). 또한 genus 수준에서 대조군 (G1) 대비 고지방 사료 급여군 (G4)의 *Christensenella*에서 유의적인 감소가 확인되었고 ($p<0.01$), 스트레스 부여군 (G2)의 *Gracilibacter*에서 유의적인 증가가 확인되었다 ($p<0.05$) (Figure 3-7).

2) 신생쥐 맹장 내용물의 장내 세균총 분석

신생쥐 맹장 내용물의 세균총 분석 시 측정된 abundance ratio 수치를 phylum, class, order, family 및 genus 수준까지 군별로 비교하였다. phylum 수준에서 19개, class 수준에서 16개, order 수준에서 19개, family 수준에서 41개, genus 수준에서 116개의 세균을 분석하였다 (Figure 3-7). 그 결과 대조군 (G1) 대비 캡사이신 사료 급여군 (G3)의 phylum 수준에서 *bacteroidetes*에서 유의적인 감소가 확인되었고 ($p<0.01$), class 수준에서 *bacteroidia*에서 유의적인 감소가 확인되었고 ($p<0.01$), order 수준에서 *bacteroidales*에서 유의적인 감소가 확인되었다 ($p<0.01$). Family 수준에서 대조군 (G1) 대비 고지방 사료 급여군 (G4)의 *Rikenellaceae*와 *Clostridiales* 및 *Hungateiclostridiaceae*에서 유의적인 증가가 확인되었으며 ($p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.05$), *Clostridiaceae*에서 유의적인 감소가 확인되었다 ($p<0.01$). Genus 수준에서 대조군 (G1) 대비 캡사이신 사료 급여군 (G3)의 Phocea에서 유의적

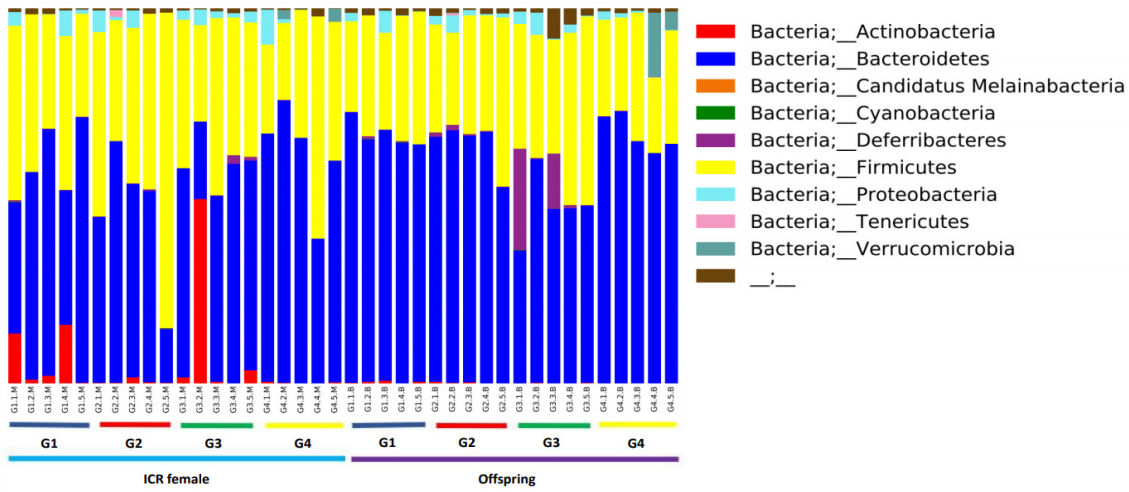

Figure 3. Taxonomic classification of gut microbiome at phylum level

인 증가가 확인되었고 ($p<0.05$), 고지방 사료 급여군 (G4)의 *Alistipes, Harryflintia, Pseudoflavonifractor* 및 *Ruminiclostridium* 에서 유의적인 증가가 확인되었다 ($p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.05$) (Figure 3-7).

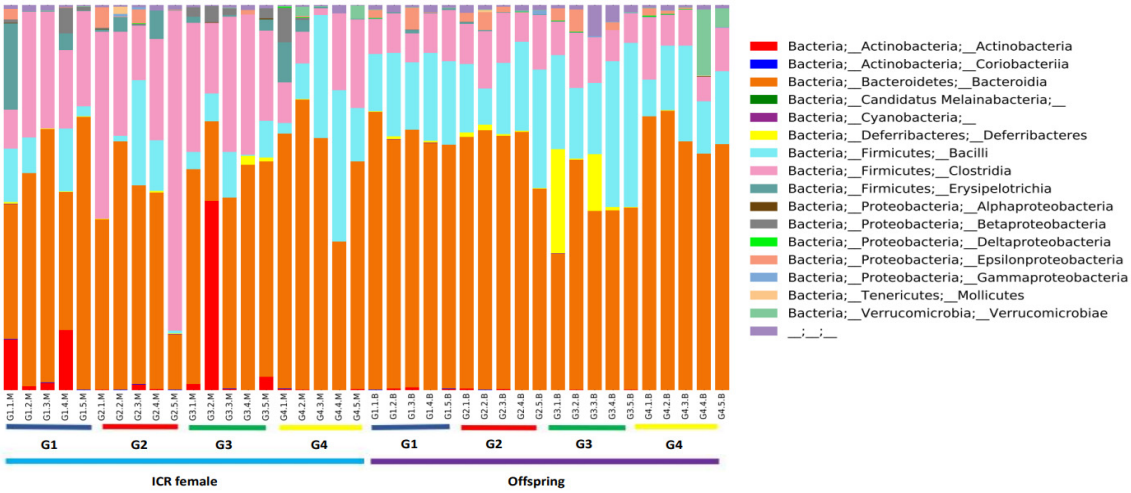

Figure 4. Taxonomic classification of gut microbiome at class level

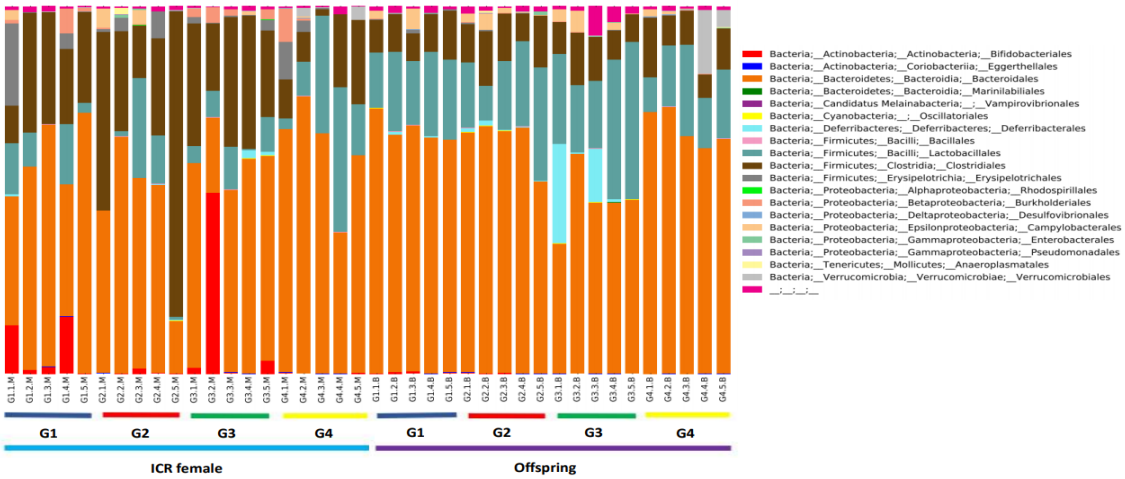

Figure 5. Taxonomic classification of gut microbiome at order level

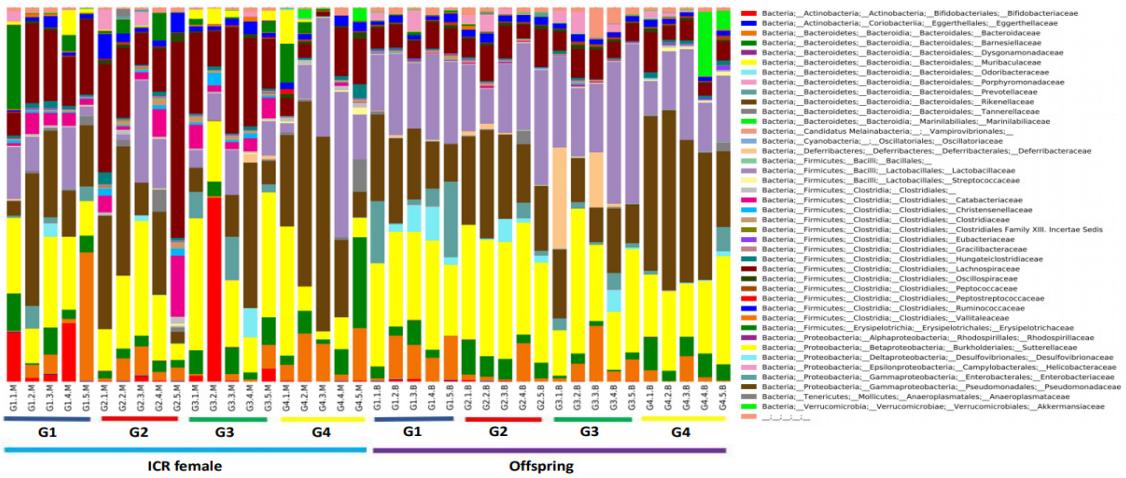

Figure 6. Taxonomic classification of gut microbiome at family level

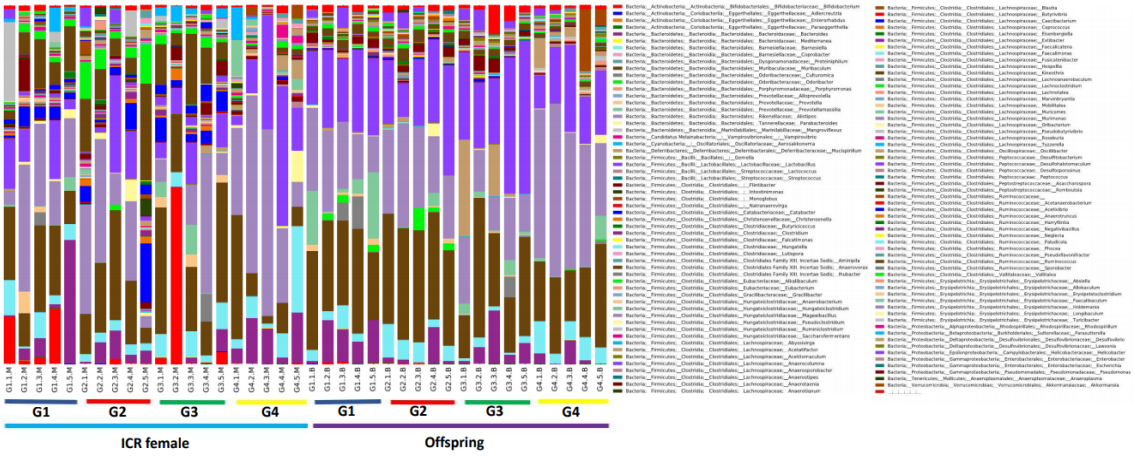

Figure 7. Taxonomic classification of gut microbiome at genus level

3. 분변 IgA 및 맹장 내용물 sIgA 분석

분만 시 모체 분변의 IgA 농도를 측정한 결과 대조군 대비 유의적인 농도 변화는 관찰되지 않았다 (Table 4, Figure 8).

21일령 신생쥐 맹장 내용물의 sIgA 농도를 측정한 결과 대조군 대비 유의적인 농도 변화는 관찰되지 않았다 (Table 4, Figure 9).

Table 4. Group Mean IgA or sIgA Level

Group	Result	IgA level in female ICR mice (ng/mg feces)	sIgA level in offspring (pg/mg feces)
G1 (Control)	Mean	6555.94	270.11
	SD	3192.85	132.02
	N	5	5
G2 (Stress)	Mean	6934.50	179.43
	SD	2478.72	102.41
	N	5	5
G3 (Capsaicin diet)	Mean	5538.97	227.80
	SD	3321.92	175.97
	N	5	5
G4 (High fat diet)	Mean	6338.67	338.98
	SD	1922.81	236.07
	N	5	5

IgA (Immunoglobulin A), sIgA (secretory Immunoglobulin A), SD (Standard deviation), N (Number)

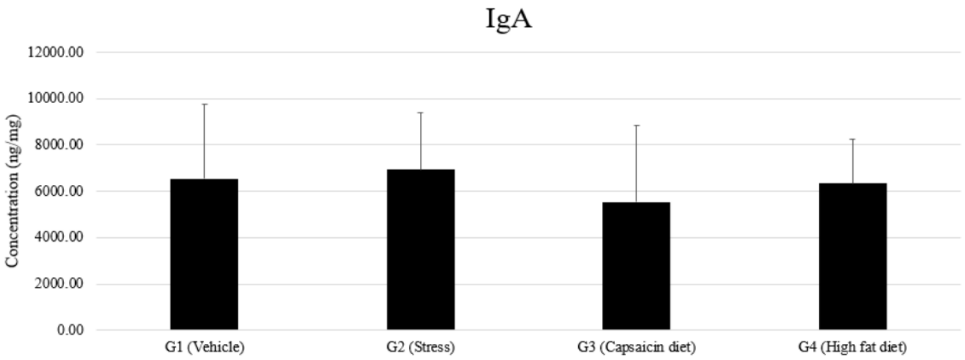

Figure 8. IgA (Immunoglobulin A) level in feces of female ICR mice. Data are expressed as mean ± SD (Standard deviation).

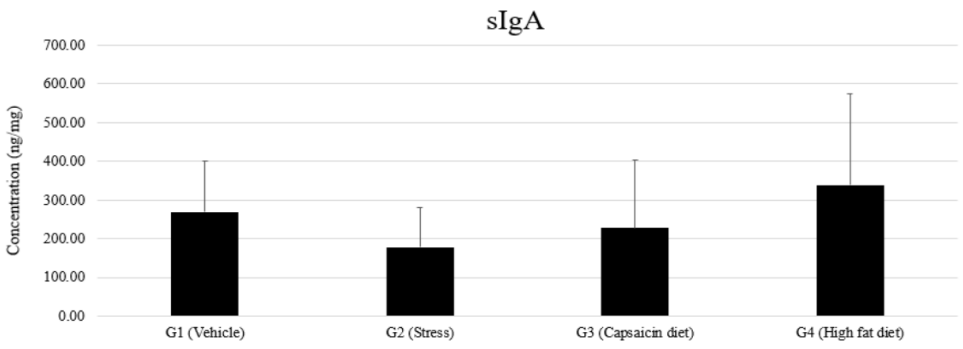

Figure 9. sIgA (secretory Immunoglobulin A) level in cecal contents of offsprings. Data are expressed as mean ± SD (Standard deviation)

4. 임신쥐 혈청 corticosterone 분석

임신쥐에서 첫 스트레스 부여 직전과 임신 17일차 마지막 스트레스 부여 후 즉시 채혈한 혈청에서 corticosterone을 분석하였다. 군간 결과 비교 시에 스트레스 부여 전 및 부여 후 결과에서 대조군 대비 유의적인 농도 변화는 관찰되지 않았다.

한 개체 내에서 스트레스 부여 전후 비교 시에는 대조군 (G1)과 캡사이신 사료 급여군 (G3) 및 고지방 사료 급여군 (G4)의 경우 유의적인 차이는 없었고, 스트레스 부여군 (G2)의 경우 스트레스 부여 후 유의적인 수치 상승이 확인되었다 ($p<0.05$) (Table 5, Figure 10).

Table 5. Group Mean Corticosterone Level

Group	Result	Pre-stress (ng/mL)	Post-stress (ng/mL)
G1 (Control)	Mean	171.48	1053.96
	SD	214.77	1034.64
	N	5	5
G2 (Stress)	Mean	522.51	2193.89*
	SD	354.87	1149.23
	N	5	5
G3 (Capsaicin diet)	Mean	512.35	1537.45
	SD	290.37	1204.75
	N	5	5
G4 (High fat diet)	Mean	211.41	234.33
	SD	325.12	208.36
	N	5	5

Significant difference between pre stress and post stress by paired t-test: * $p<0.05$.
SD (Standard deviation), N (Number)

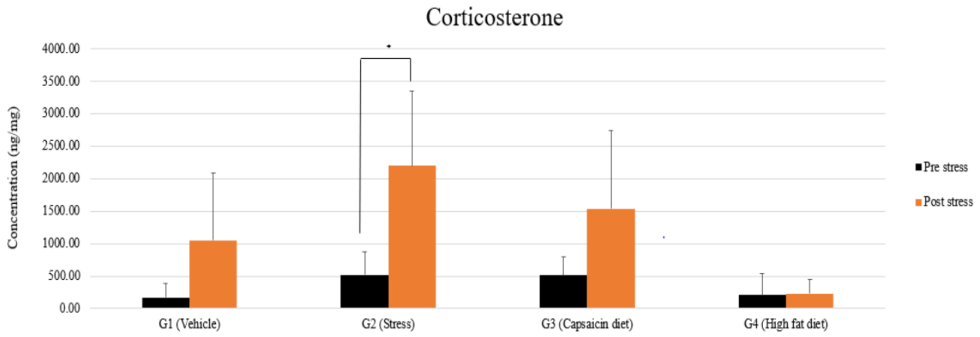

Figure 10. Serum corticosterone level of pre and post stress in female ICR mice. Data are expressed as mean ± SD (Standard deviation). Significant difference between pre stress and post stress by paired t-test: * p<0.05.

Ⅳ. Discussion

태독 (胎毒)은 《及幼方》에서 소아 질병 발생 원인의 절반이라는 언급이 있을 정도로 중요한 병인 중 하나이다[3]. 태독 (胎毒)은 출생 후부터 발생되는 각종 질환인 태질 (胎疾)을 일으키는데, 태질 (胎疾)은 부모로부터 전수 (傳授)되는 질환으로, 잘못된 양태 (養胎)로 태독 (胎毒)이 태아에 영향을 끼치거나 분만 시에 예악지기 (穢惡之氣)를 흡입하여 발생하는 질환으로 출생 시 이미 인지되거나 생후 1개월 이내에 주로 발병하며, 늦어도 생후 1년 이내에 발현되는 질환이다. 태질 (胎疾)의 종류는 다양한데 가장 많이 나타나는 것은 습진 (濕疹) 등과 같은 피부질환이며, 아구창 (鵝口瘡), 구창 (口瘡) 등 구강질환 (口腔疾患), 제부질환 (臍部疾患), 그 외에 태겁 (胎怯), 태경 (胎驚), 태한 (胎寒), 태간 (胎癎) 등 신경계 질환, 태황 (胎黃), 태풍 (胎風), 태적 (胎赤) 등 전신적인 질환 등이 있다[2]. 따라서, 태독으로 인한 질환을 예방하기 위해 임신 중 섭생을 중요시하였고, 출생 직후에 하태독법 (下胎毒法)을 시행하였다[2].

장관은 음식을 소화시켜 영양분을 흡수하는 역할 외에도, 면역학적 역할을 담당하고 있으며, 이는 질병 예방에 있어서 중요하다. 특히 장내 세균총은 장관에 정착, 증식하여 세균간 상호작용에 의해 유해 미생물 증식을 억제하고 정상적인 세균총의 균형을 유지하며[10-12] 숙주와 상호작용하여 장점막 방어와 국소면역기전의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[4].

최근 장내 세균총과 아토피 피부염 등 알레르기 질환과의 관련 연구가 많이 보고되고 있다. 아토피 피부염 환자에서 정상 대조군 대비 유의하게 증가, 감소 되어있는 장내 세균총[13,14], 생후 초기 장내 세균총의 구성과 아토피 피부염 발생과의 연관성[15-18], 식품 알레르기의 발현에 영향을 미치는 장내 세균총[19] 등 연구 결과들을 볼 때, 장내 세균총의 면역학적 역할과 아토피 피부염의 발생을 관련지어 생각해 볼 수 있다.

태아의 장내는 무균상태로, 모체 밖으로 나오는 순간 산도와 회음부에 있는 여러 다양한 세균에 노출되면서 태아의 장내에 세균이 처음으로 획득된다. 자연분만으로 태어난 영아의 초기 장내 미생물 구성은 어머니의 질에 위치한 장내 미생물 구성과 유사하다[8,9]. 제왕절개분만으로 태어난 영아의 장내 미생물 구성은 어머니의 피부에 공생하는 미생물과 유사하며 장내 미생물의 다양성이 상대적으로 낮다[8,9]. 이는 제왕절개분만으로 태어난 소아에서 알레르기성 비염, 천식, 비만, 당뇨 등 면역성, 대사성 질환의 발병률이 자연분만으로 태어난 소아에 비해 상대적으로 높다는 연구 결과와 같은 맥락이라고 할 수 있다[6,8,9,20,21].

즉, 자연분만아의 장내 세균총은 모체의 장내 세균총에 영향을 받는다. 따라서 임신 중 모체의 장내 세균총 구성에 영향을 미치는 식이, 스트레스 등 생활습관 관리가 중요하다고 할 수 있다.

태독은 태중에서 산모로부터 받은 것으로 각종 질환, 특히 습진 등 피부질환을 일으키며, 하태독법을 통한 태독의 제거를 통해 질병 예방을 기대할 수 있다. 자연분만아의 장내 세균총은 분만 직후 모체 장내 세균총 구성과 밀접한 관련을 가지면서 생성된다. 장내 세균총은 아토피 피부염 등 알레르기 질환과의 관련성이 있으며, 면역학적 역할을 담당하고 있다. 저자는 '태중, 출생 직후'라는 시기, '습진, 아토피 피부염'이라는 질환, '질병 예방과 면역'이라는 기능의 유사성, 그리고 태독의 발생을 막고 건강한 장내 세균총 형성을 위해 공통적으로 임신기간 동안 산모의 생활 관리가 중요하다는 점을 통해 태독과 장내 세균총과의 연관성에 주목하게 되었다. 이를 바탕으로, 한방소아과학의 중요 병인 (病因)인 태독 (胎毒)으로 인한 질환의 발병을 산모의 장내 세균총과 신생아의 장내 세균총의 상호작용의 원리에 입각하여 해석함으로써 태독의 병리기전을 장내 세균총 구성 변화를 통해 규명해보고자 하였다. 즉, '태독이 신생쥐의 장내 세균총 및 면역 활성에 영향을 미칠 것이다'라는 가설을 설정하고, 이를 위한 실험적 모델을 설정하여 연구를 진행하였다.

산모가 신열비감 (辛熱肥甘)한 음식을 섭취하여 그 열독 (熱毒)이 태아 (胎兒)에 전해지거나, 산모의 우사울노 (憂思鬱怒)로 오지 (五志)가 화 (火)로 화 (化)하여 태아 (胎兒)에 영향을 끼쳐 태열이 발생한다는 태독의 개념2)에 입각하여, G1 (대조군), G2 (스트레스 부여군), G3 (캡사이신 사료 급여군), G4 (고지방 사료 급여군) 4개의 군을 설정하였다. 각 군별 모체 분변과 신생쥐 맹장 내용물 세균총을 분석하고, 분만 시 모체 분변 내 IgA 농도와 21일령 신생쥐 맹장 내용물 내 sIgA 농도를 측정하여 분석함으로써 태독이 장내 세균총과 면역 활성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

분만 시 모체 분변과 신생쥐 21일령 맹장 내용물의 세균총을 비교한 결과는 다음과 같았다. 모체 분변의

세균총 분석 결과 대조군 (G1) 대비 고지방 사료 급여군 (G4)의 family 수준에서 *Christensenellaceae*, genus 수준에서 *Christensenella*에서 유의적인 감소를 나타내었다.

*Christensenellaceae*는 체지방이 증가할수록 장내 함량이 낮으며[22], 중성지방, 총콜레스테롤, LDL (low density lipoprotein)과 음의 상관관계[23-27], HDL (high density lipoprotein)과 양의 상관관계를 보인다는 연구 결과[23]가 보고된 바 있다. 한 연구에서는 *Christensenellaceae*가 체질량지수가 낮은 사람에서 증가하는 것 뿐만 아니라, 마우스에 이식했을 때 체중 증가를 감소시키는 결과가 관찰되었다[28]. 본 시험 결과에서도 고지방 식이를 급이한 군에서 그 함량이 유의적으로 낮게 확인되어 기 보고된 결과와 유사한 경향이 확인되었다. 또한 *Christensenellaceae*는 과민성 대장 증후군이 있는 군에 비해 건강한 대조군에서 상대적으로 높게 나타난다고 알려져 있다[29-32]. 이로써 임신 중 고지방 식이가 모체의 장내 세균총의 유의한 변화를 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

스트레스 부여군 (G2)의 family 수준에서 *Gracilibacteraceae*, genus 수준에서 *Gracilibacter*에서 유의적인 증가가 확인되었으나, *Gracilibacteraceae, Gracilibacter*의 역할과 기능 등에 대한 기존 연구가 없어 해석의 어려움이 있었다.

캡사이신 사료 급여군 (G3) 모체의 장내 세균총 분석 결과에서는 대조군 대비 유의성 있는 변화를 발견하지 못하였다.

신생쥐의 맹장 내용물 세균총 분석 결과에서는 대조군 (G1) 대비 캡사이신 사료 급여군 (G3)의 phylum 수준에서 *Bacteroidetes,* class 수준에서 *Bacteroidia,* order 수준에서 *Bacteroidales*에서 유의적인 감소가 확인되었다. 기존 연구에서 알레르기가 없는 영아에 비해 아토피 피부염이 발생하는 영아는 생후 1개월에 *Bacteroidetes*를 포함한 장내 미생물총의 다양성 감소가 관찰되어 생후 초기 장내 세균총의 다양성 감소가 아토피 피부염의 발생과 관련 있는 것으로 볼 수 있었다[18]. 이는 본 실험의 가설과 부합되는 결과로, 임신 중 辛熱한 음식의 섭취가 출생한 자녀의 장내 세균총에 영향을 미쳐 아토피 피부염의 발생에 영향을 미친다고 설명할 수 있으며, 산모의 태독이 자녀에게 전달되어 태열을 발생시킨다는 한의학적 이론을 장내 세균총을 이용하여 증명한 것이다.

또한 *Bacteroidetes*는 과민성 장 증후군 환자의 분변 미생물총에서 대조군 대비 감소하였고[33], 염증성 장 질환 환자와 대조군의 gastrointestinal tissue sample (n=190)을 분석한 결과 염증성 장 질환에서 감소하는[34] 결과가 기존 연구에서 관찰되었다. 이는 辛熱한 음식으로 유발된 태독이 태아에 전달되었을 때 면역 활성에 영향을 미쳐 관련 질환에 이환될 가능성이 높아진다고 설명할 수 있다. 염증성 장 질환군 (n=12)과 대조군 (n=5)의 생검 조직 미생물총을 분석하여 비교한 연구에서는 염증성 장 질환에서 *Bacteroidetes*의 증가가 관찰되었으나[35] 적은 수에서 이루어진 연구로 개인에 따라 큰 차이가 있었으며, 염증성 장 질환군 조직의 염증이 있는 부위와 없는 부위 사이에서 *Bacteroidetes*의 유의한 차이가 발견되지 않았고, 대조군에 무증상이지만 대장암 가족력이 있거나 폴립의 감시를 위해 대장내시경 검사를 받고 있는 경우도 포함되었다는 점에서 중점을 두고 해석하기에는 무리가 있었다.

최근 연구들에서 자폐 스펙트럼 장애군과 대조군 어린이의 분변 세균총을 분석하여 비교한 결과 군간 차이가 있었으며 자폐 스펙트럼 장애군에서 *Bacteroidetes*가 유의하게 감소한 것이 관찰되었고[36], 남아에서 유아기 후기에 장내 미생물 군집에서 *Bacteroidetes*의 우세는 신경 발달 향상, 인지와 언어 발달과 관련이 있었다[37]. 이를 통해 태독이 태겁 (胎怯), 태경 (胎驚), 태한 (胎寒), 태간 (胎癎) 등 신경계 질환을 발생시킨다는 한의학적 이론과 장내 세균총의 연관성을 엿볼 수 있었다.

Family 수준에서 고지방 사료 급여군 (G4)의 *Rikenellaceae*와 *Clostridiales* 및 *Hungateiclostridiaceae*에서 유의적인 증가, *Clostridiaceae*에서 유의적인 감소가 확인되었다. *Rikenellaceae*는 기존 다른 연구에서, 고지방 사료를 급이한 마우스에서 장내 증가가 보고된 바 있으며[38], 2형 당뇨의 발병과 관련이 있음이 보고된 바 있다[39]. 뿐만 아니라 자가면역 질환인 SLE (systemic lupus erythematosus)와의 관련성도 보고된 바 있다. 마우스에서 루푸스가 발병하기 전 단계에서 발병 단계로 진행됨에 따라 *Rikenellaceae*이 증가하는 등 장내 미생물총의 구성이 변화하였으며[40], 루푸스에 취약한 마우스 모델에서 *Rikenellaceae*의 증가는 더 심각한 SLE 유사 질환과 관련 있는 것으로 밝혀졌다[41]. 이러한 연구 결과 역시 본 실험의 가설과 부합되는 결과로, 임신 중 肥甘한 음식의 섭취가 출생한 자녀의 장내 세균총에 영향을 미쳐 각종 질환의 발병 가능성을 높일 수 있다는 점을 시사해 준다. *Clostridiales, Hungateiclostridiaceae, Clostridiaceae*는 기존 연구가 거의 없어서 해석할 수 없었다.

Genus 수준에서 캡사이신 사료 급여군 (G3)의 *Phocea*에서 유의적인 증가가, 고지방 사료 급여군 (G4)의

Pseudoflavonifractor, Alistipes, Harryflintia 및 *Ruminiclostridium*에서 유의적인 증가가 확인되었다. 기존 연구에서, 고지방 식이로 2형 당뇨를 유발시킨 ZDF (Zucker diabetic fatty rat) 모델 쥐와 일반 식이를 먹인 ZDF 쥐 (대조군)의 분변 세균총을 분석한 결과 당뇨 유발 ZDF에서 *Phocea, Pseudoflavonifractor*가 유의하게 증가 되어있음이 보고된 바 있다[42]. 이를 통해 *Phocea, Pseudoflavonifractor*가 당뇨와 관련이 있는 세균이며, 본 실험에서 신생쥐의 장내 세균총이 당뇨과 관련이 높은 장내 세균총 구성으로 변화한 것을 확인할 수 있었다.

*Alistipes*도 기존 연구에서 2형 당뇨의 발병과 관련이 있음이 보고된 바 있다[39]. 과민성 장 증후군 소아에서 복통 빈도의 증가가 *Alistipes*의 증가와 상관관계가 있다는 기존 연구 결과도 있었다[43]. 또한 고지방 식이로 비만이 유도된 마우스에서 IgA 수준이 감소하고 장내 세균총 구성의 변화가 초래되어 장내 염증이 증가, 인슐린 저항성을 높인다는 기존 연구에서, 고지방 식이로 IgA가 결핍된 마우스에서 *Alistipes*의 증가가 관찰되었다[44]. 본 실험에서도 고지방 사료 급여군 (G4)에서 *Alistipes*의 증가가 관찰되어 유사한 경향이 확인되었으며, 이는 肥甘한 음식으로 발생한 태독이 자녀의 면역에 변화를 일으켜 여러 질환에 이환될 가능성이 높아짐을 시사한다. *Harryflintia* 및 *Ruminiclostridium*는 기존 연구가 거의 없어서 해석할 수 없었다.

스트레스 부여군 (G2) 모체에서 출생한 신생쥐의 맹장 내용물 세균총 분석 결과에서는 대조군 대비 유의성 있는 변화를 발견하지 못하였다.

결론적으로, 본 연구 결과는 임신 중 辛熱肥甘한 음식의 섭취가 출생한 자녀의 장내 세균총에 영향을 미쳐 각종 질환의 발병 가능성을 높일 수 있다는 점을 시사해 준다.

저자는 한의학의 태독 이론을 실험하기 위해 임신쥐에 다양한 중재를 적용하였고, 그 결과 태독에 의한 모체의 장내 세균총 및 신생쥐의 맹장 내 세균총의 변화를 확인하였다, 그리고 태독과 아토피 피부염, 과민성 장 증후군, 염증성 장 질환, SLE, 당뇨 등 질환과의 관련성을 살펴볼 수 있었다.

하지만 유의적으로 증가, 감소한 세균을 확인하였음에도 불구하고, 이에 대한 기존 연구가 충분하지 않아 해석에 어려움이 있어 아쉬움이 남는다.

태독이 신생쥐의 면역 활성에 영향을 미칠 것이라는 가설을 바탕으로 스트레스 부여, 캡사이신, 고지방 사료 급이시 장관 면역 활성의 변화를 관찰하기 위해 분만 시 모체 분변 내 IgA 농도와 21일령 신생쥐 맹장 내용물 내 sIgA를 측정하였다. IgA는 IgG, IgM과는 달리 출생 시에는 거의 없다가 생후 13일경에 혈중에 처음으로 나타나고, 점차 증가하여 7~8세 경에 성인치에 도달하며, 위장관, 호흡기, 비뇨 생식기의 분비물과 같은 체외 분비물 내의 주된 면역글로불린으로 장관 면역에 관여한다[45]. 따라서 면역 활성을 확인하기 위한 지표로 본 실험에서 측정하였다. 실험 결과 대조군 대비 유의적인 농도 변화는 관찰되지 않았다. 이는 본 연구의 한계로, 실험 설계의 수정 및 보완을 통한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

임신쥐에서 스트레스 부여 전과 마지막 스트레스 부여 후 혈중 corticosterone 농도 측정 결과 스트레스 부여 전 및 부여 후 결과에서 모든 군에서 대조군 대비 유의적인 농도 변화는 관찰되지 않았다. 한 개체 내에서 스트레스 부여 전후 비교 시에는 스트레스 부여군 (G2)에서만 스트레스 부여 후 유의적인 수치 상승이 확인되었다. ICR mouse에서 혈중 corticosterone은 임신 일자 별 농도의 변화가 크고 또한 개체 간 차이도 상당히 크다는 보고가 있는데[46], 본 실험에서도 임의적인 스트레스 부여 여부와 상관없이, 출산이라는 특수한 상황에서 모든 군에서 스트레스가 발생하였고, 혈중 corticosterone이 임신 후반부로 갈수록 올라가는 경향이 관찰되어, 군별 유의한 차이가 발생하지 않은 것으로 판단된다. 즉, 개체 간 큰 variation, 군당 적은 n수 등 복합적인 원인이 작용하여 군간 유의적인 차이가 관찰되지 않은 것으로 생각된다. 한 개체 내 corticosterone 농도 변화가 스트레스 부여군 (G2)에서만 유의한 증가가 관찰된 것은 스트레스 부여군 (G2)에서는 다른 군 대비 보다 강한 스트레스 부여에 따라 스트레스 호르몬이 더 상승한 것으로 판단된다.

즉, 본 실험에서 혈중 corticosterone 농도의 군별 유의성을 확인하지 못하였고, 이는 모체 장내 세균총 분석에서 스트레스 부여군 (G2)에서 유의성 있는 변화를 나타내지 못한 것에 대한 하나의 이유로 설명될 수 있을 것이다. 임신쥐에 매우 강한 스트레스를 부여하는 것은 동물의 윤리적 사용에 대한 문제와 임신 상황에서 스트레스로 인한 폐사 가능성에 대한 우려로 어려움이 있어, 본 실험에서 적당한 강도의 스트레스 부여 설정에 어려움이 있었다. 향후 실험 설계의 수정 및 보완을 통한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구는 태독 학설을 산모와 신생아의 장내 세균총의 상호 작용의 원리에 입각하여 현대의학적으로 해

석하기 위한 최초 연구로 그 의미가 크다고 할 수 있다. 다만, 본 연구의 한계로, 실험 개체 수가 적었으며 태독의 기전 규명을 위한 선행 동물 실험의 부재로 실험 설계가 다소 미흡한 부분이 있다. 뿐만 아니라 유의한 결과가 나온 세균총도 기존 연구가 부족해 해석의 어려움이 있었다.

향후 보다 많은 개체 수를 대상으로 한 연구를 진행하고, 장내 세균총 관련 연구가 많아진다면 태독과 장내 세균총과의 관련성을 증명하고, 주요 병인으로써 태독을 현대과학적으로 규명하여 한방 병리학의 발전에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. Conclusion

한방소아과학에서 중요한 병인 중 하나인 태독을 증명하고자 태독과 장내 세균총과의 연관성을 규명하고자 하였다. 임신한 ICR mouse에 태독 학설에 입각하여 스트레스 및 식이 (캡사이신 함유 사료, 고지방 사료)를 부여한 후, 임신쥐와 신생쥐의 장내 세균총 및 면역 활성 변화를 평가하기 위해 분만 시 모체 분변과 신생쥐 21일령 맹장 내용물에 대한 세균총을 분석하고, 모체 분변 내 IgA 농도, 신생쥐 맹장 내용물 내 sIgA 농도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시험 기간 동안 측정한 체중 변화에서 대조군(G1) 대비 유의적인 차이는 확인되지 않았다.

2. 캡사이신 함유 사료 및 고지방 사료 급이 시 모체의 장내 세균총 및 신생쥐의 맹장 내 세균총의 변화를 확인하였다.

3. 모체 분변 내 IgA 농도, 신생쥐 맹장 내용물 내 sIgA 농도를 측정한 결과 대조군 대비 유의적인 농도 변화는 관찰되지 않았다.

4. 임신쥐에서 스트레스 부여 전후 혈중 corticosterone 농도를 측정한 결과 대조군 대비 유의적인 농도 변화는 관찰되지 않았다.

Ⅵ. Acknowledgement

이 논문은 2017년도 정부 (미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2017R1C1B2011669).

Ⅶ. Reference

1. Kang MS, Chang GT, Kim JH. A study on fetal toxicosis removal therapy. J Pediatr Korean Med. 2003;17(1):29-51.
2. Kim KB, Kim DG, Kim YH, Kim JH, Min SY, Park EJ, Baek JH, Sun HK, Yu SA, Lee SY, Lee JY, Chang GT, Jeong MJ, Chai JW, Cheon JH, Han YJ, Han JK. Hanbangsoacheongsonyeonuihak (sang). 2nd ed. Seoul: Eui Sung Dang Publishing Co. 2015:210-2.
3. Jo JJ. Gupyubang. 1st ed. Seoul: Yeokang Publishing Co. 1993:44.
4. Walker WA. Mechanisms of action of probiotics. Clin Infect Dis. 2008;46(2):S87-91.
5. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. Nature. 2012;488(7410):178-84.
6. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol. 2015;21(29):8787-803.
7. Kalliomäki M, Isolauri E. Role of intestinal flora in the development of allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2003;3(1):15-20.
8. Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. Allergol Int. 2017;66(4):515-22.
9. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh

J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(1):4578-85.

10. Simon GL, Gorbach SL. The human intestinal microflora. Dig Dis Sci. 1986;31(9):147-62.
11. Rook GAW, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. Gut. 2005;54(3):317-20.
12. Karlsson H, Hessle C, Rudin A. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. Infect Immun. 2002;70(12):6688-96.
13. Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamatsu H, Ikenaga T, Tajiri Y, Kumemura M. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(3):587-91.
14. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol 2001;108(4):516-20.
15. Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(1):129-34.
16. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, Adams H, van Ree R, Stobberingh EE. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the koala birth cohort study. Gut. 2007;56(5):661-8.
17. Ismail IH, Oppedisano F, Joseph SJ, Boyle RJ, Licciardi PV, Robins-Browne RM, Tang MLK. 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):674-81.
18. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. J Allergy Clin Immunol. 2012;129(2):434-40.
19. Kim MH, Suh DI, Lee SY, Kim YK, Cho YJ, Cho SH. Microbiome research in food allergy and atopic dermatitis. Allergy Asthma Respir Dis. 2016;4(6):389-98.
20. Mueller NT, Whyatt R, Hoepner L, Oberfield S, Dominguez-Bello MG, Widen EM, Hassoun A, Perera F, Rundle A. Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. Int J Obes. 2015;39(4):665-70.
21. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre MJ, Parslow RC, Pozzilli P, Brigis G, Stoyanov D, Urbonaite B, Sipetić S, Schober E, Ionescu-Tirgoviste C, Devoti G, de Beaufort CE, Buschard K, Patterson CC. Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. Diabetologia. 2008;51(5):726-35.
22. Waters JL, Ley RE.. The human gut bacteria *Christensenellaceae* are widespread, heritable, and associated with health. BMC Biol. 2019;17(1):83.
23. Fu J, Bonder MJ, Cenit MC, Tigchelaar EF, Maatman A, Dekens JAM, Brandsma E, Marczynska J, Imhann F, Weersma RK, Franke L, Poon TW, Xavier RJ, Gevers D, Hofker MH, Wijmenga C, Zhernakova A, The gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids. Circ Res. 2015;117(9):817-24.
24. Lim MY, You HJ, Yoon HS, Kwon B, Lee JY, Lee S, Song YM, Lee K, Sung J, Ko GP. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. Gut. 2017;66(6):1031-8.
25. Hibberd AA, Yde CC, Ziegle ML, Honoré AH, Saarinen MT, Lahtinen S, Stahl B, Jensen HM, Stenman LK. Probiotic or synbiotic alters the gut microbiota and metabolism in a randomised controlled trial of weight management in overweight adults. Benef Microbes. 2019;10(2):121–35.
26. He Y, Wu W, Wu S, Zheng HM, Li P, Sheng HF, Chen MX, Chen ZH, Ji GY, Zheng ZDX, Mujagond P, Chen XJ, Rong ZH, Chen P, Lyu LY, Wang X, Xu JB, Wu CB, Yu N, Xu YJ, Yin J, Raes J, Ma WJ, Zhou HW. Linking gut microbiota, metabolic syndrome and economic status based on a population-level analysis. Microbiome. 2018;6(1):172.
27. López-Contreras BE, Morán-Ramos S, Villarruel-Vázquez R, Macías-Kauffer L, Villamil-Ramírez H, León-Mimila P, Vega-Badillo J, Sánchez-Muñoz F, Llanos-Moreno LD, Canizalez-Román A, Del Río-Navarro B, Ibarra-González I, Vela-Amieva M, Villarreal-Molina T,

Ochoa-Leyva A, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S. Composition of gut microbiota in obese and normal-weight Mexican school-age children and its association with metabolic traits. Pediatr Obes. 2018;13(6):381-8.

28. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT, Spector TD, Clark AG, Ley RE. Human genetics shape the gut microbiome. Cell. 2014;159(4): 789-99.
29. Jalanka-Tuovinen J, Salojärvi J, Salonen A, Immonen O, Garsed K, Kelly FM, Zaitoun A, Palva A, Spiller RC, de Vos WM. Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. Gut. 2014;63 (11):1737-45.
30. Palma GD, Lynch MDJ, Lu J, Dang VT, Deng Y, Jury J, Umeh G, Miranda PM, Pastor MP, Sidani S, Pinto-Sanchez MI, Philip V, McLean PG, Hagelsieb MG, Surette MG, Bergonzelli GE, Verdu EF, Britz-McKibbin P, Neufeld JD, Collins SM, Bercik P. Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. Sci Transl Med. 2017;9(379):6397.
31. Pozuelo M, Panda S, Santiago A, Mendez S, Accarino A, Santos J, Guarner F, Azpiroz F, Manichanh C. Reduction of butyrate- and methane-producing micro-organisms in patients with irritable bowel syndrome. Sci Rep. 2015;5(1):12693.
32. Hollister EB, Cain KC, Shulman RJ, Jarrett ME, Burr RL, Ko C, Zia J, Han CJ, Heitkemper MM. Relationships of microbiome markers with extraintestinal, psychological distress and gastrointestinal symptoms, and quality of life in women with irritable bowel syndrome. J Clin Gastroenterol. 2020;54(2):175-83.
33. Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EMM, Simrén M. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. Gut. 2012;61(7):997-1006.
34. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(34):13780-5.
35. Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, Brostoff J, Parkhill J, Dougan G, Petrovska L. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. BMC Microbiol. 2011;11(1):7.
36. Ha S. Oh D, Lee S, Park J, Ahn J, Choi S, Cheon KA. Altered gut microbiota in korean children with autism spectrum disorders. Nutrients. 2021;13(10):3300.
37. Tamana SK, Tun HM, Konya T, Chari RS, Field CJ, Guttman DS, Becker AB, Moraes TJ, Turvey SE, Subbarao P, Sears MR, Pei J, Scott JA, Mandhane PJ, Kozyrskyj AL. *Bacteroides*-dominant gut microbiome of late infancy is associated with enhanced neurodevelopment. Gut Microbes. 2021;13(1):e1930875.
38. Daniel H, Gholami AM, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, Mondot S, Lepage P, Rothballer M, Walker A, Böhm C, Wenning M, Wagner M, Blaut M, Schmitt-Kopplin P, Kuster B, Haller D, Clavel T. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. ISME J. 2014;8(2):295-308.
39. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature. 2012;490(7418):55-60.
40. Luo XM, Edwards MR, Mu Q, Yu Y, Vieson MD, Reilly CM, Ahmed SA, Bankole AA, McBain AJ. Gut microbiota in human systemic lupus erythematosus and a mouse model of lupus. Appl Environ Microbiol. 2018;84(4):e2288-17.
41. Johnson BM, Gaudreau MC, Al-Gadban MM, Gudi R, Vasu C. 2015. Impact of dietary deviation on disease progression and gut microbiome com- position in lupus-prone SNF1 mice. Clin Exp Immunol. 2015;181(2):

323-37.

42. Wang Y, Ouyang M, Gao X, Wang S, Fu C, Zeng J, He X. *Phocea, Pseudoflavonifractor* and *Lactobacillus* intestinalis: Three Potential Biomarkers of Gut Microbiota That Affect Progression and Complications of Obesity-Induced Type 2 Diabetes Mellitus. Diabetes Metab Syndr Obes Targ Ther. 2020;13:835-50.
43. Saulnier DM, Riehle K, Mistretta TA, Diaz MA, Mandal D, Raza S, Weidler EM, Qin X, Coarfa C, Milosavljevic A, Petrosino JF, Highlander S, Gibbs R, Lynch SV, Shulman RJ, Versalovic J. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology. 2011;141(5):1782-91.
44. Luck H, Khan S, Kim JH, Copeland JK, Revelo XS, Tsai S, Chakraborty M, Cheng K, Chan YT, Nøhr MK, Clemente-Casares X, Perry MC, Ghazarian M, Lei H, Lin YH, Coburn B, Okrainec A, Jackson T, Poutanen S, Gaisano H, Allard JP, Guttman DS, Conner ME, Winer S, Winer DA. Gut-associated IgA+ immune cells regulate obesity-related insulin resistance. Nat Commun. 2019;10(1);1-17.
45. Hong CE. Textbook of pediatrics, 12th ed. Seoul: Miraen. 2020:221-2.
46. Montano MM, Wang MH, Even MD, vom Saal FS. Serum corticosterone in fetal mice: sex differences, circadian changes, and effect of maternal stress. Physiol Behav. 1991;50(2):323-9.