

강활추출물이 알레르기 천식 모델 생쥐에 기관지폐포세척액의 면역세포에 미치는 영향

배진현, 유지현, 길기정*

중부대학교 한약자원학과

Effects of NR on Production Levels of Cytokines and Distribution of BAL Cells in Allergic Asthma

Jin-Hyun Bae, Ji-Hyun Yoo, Gi-Jung Kil*

Dept. of Oriental Medicine Resources, Joongbu University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate therapeutic effects fo NR on allergic asthma in terms of mesurement of cytokine profiles, distribution of BAL and expression levels of asthma induced by OVA.

Methods : C57BL/6 mouse was divided into normal, NR I, control, and NRII, and Notopterygii Rhizoma Extract was orally administered to the C57BL/6 mice in the normal group and the normal mouse in NR I group while it was orally administered to the control group after inducing asthma by OVA and NR II. The study measured them by means of ELISA after dividing BALF of each group, and analyzed RT-PCR by using lung tissues.

Results : In our results, lung weight and the number of total cells in the lung and of Leukocyte and Eosinophils in BALF were significantly decreased. In addition, IL-4, IL-5, IL-13, and IgE in BALF were significantly decreased compared to the control group.

Conclusions : These results demonstrate that NR Extract be a desirable altemative therapy for allergic asthma by inhibiting the expressin of immune cells, the activation of inflammatory mediator.

Key words : Notopterygii Rhizoma, BALF, asthma, immune cell, herbal medicine

서 론

최근 알레르기 질환이 증가하여 전 인구의 20~30%가 기관지 천식, 아토피성 피부염, 화분증 등의 알레르기 질환을 앓고 있다. 이 중 기관지 천식은 기도 내로 흡입된 여러 항원에 의하여 T cell, B cell, eosinophil, neutrophil, 및 mast cell 등의 염증 세포들과 cytokine, chemokine과 같은 화학 매개체에 의해 유발되며, 기도의 과민성(기도 저항의 증가), 점액의 과분비, 호산구를 주체로 하는 만성 염증, 혈청 중 IgE의 높은 수치가 특징인 질환이다^{1,2)}.

특히 T세포 중 CD4⁺ Th2 세포들이 생성하는 cytokine

인 IL-4, IL-5, IL-13은 알레르기성 천식의 기도과민성과 호산성 염증반응에 중요한 매개역할을 수행한다³⁾.

천식을 일으키는 원인으로는 알러겐의 흡입, 호흡기 감염, 일상의 스트레스에 대한 심인성 생리반응, 공기오염, 기후, 약물, 동종 등이 있으며 천식 발작의 원인이 대부분 알레르기성으로 받아들여지고 있다⁴⁾.

현재 천식에 사용되는 약물은 만성 염증을 조절하는 흡입용 코르티코스테로이드와 천식 발작 시 응급으로 사용하는 β 2-길항제(살메테롤, 포메테롤, 밤부테롤) 또는 xanthine계열의 물질이 가장 대표적이다. 그러나 이들은 장기간 사용 할 경우, 감염에 대한 저항력이 저하되며 혈

* 교신저자 : 길기정, 충남 금산군 추부면 대학로 101 중부대학교 한약자원학과

· Tel : 041-750-6225 · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr

· 접수 : 2010년 2월 12일 · 수정 : 2010년 3월 18일 · 채택 : 2010년 3월 22일

압상승, 체중증가, 두통, 설사 등의 부작용이 나타난다. 이에 각 분야에서 약물을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다⁵⁾.

강활(*Notopterygii Rhizoma*)은 미나리과(繖形科 : Umbelliferae)에 속한 다년생 초본인 강활(*Ostericum koreanum* Maximowicz)의 뿌리로 중국에서는 미나리과(繖形科 : Umbelliferae)에 속한 중국강활(羌活)*Notopterygium incisum* Ting 혹은 관엽강활(寬葉羌活)*N. forbesii* Boissier의 뿌리 줄기 및 뿌리를 기원으로 한다.

發散風寒藥으로 사용되는 강활은 性은 溫, 味는 辛, 苦하고, 진정·진토·항균·항염증 작용 등이 있는 것으로 보고 되어 있다⁶⁾.

강활의 항염증 및 항알레르기 효능에 대한 연구와 LPS로 자극한 RAW264.7세포에서 강활 추출물의 염증성 세포활성 물질의 억제효과, 강활과 방풍의 항염증 상승작용에 관한 연구 등이 있으나 천식에 관한 연구는 거의 보고 되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 강활추출물이 천식억제 및 면역조절효과에 대한 영향을 규명하고자 천식을 유발시킨 생쥐의 기관지폐포세척액에서 호산구·림프구를 관찰하고, IL-3, IL-5, IL-13, IgE 등을 ELISA방법으로 측정, 비교 분석하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 강활(*Notopterygii Rhizoma* ; NR)은 경동시장에서 구입하여 중부대학교 본초학교실에서 감정한 후 정선하여 4℃에서 냉장 보관하면서 시료로 사용하였다.

2) 시약 및 기기

(1) 시약

Chicken egg albumin (Sigma, USA) Aluminum potassium sulfate (Sigma, USA), Diethyl pyrocarbonate (Sigma, USA), Isopropanol (Sigma, USA), RBC lysis solution (Sigma, USA), Ethidium bromide (Sigma, USA), Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma, USA), D-phosphate buffer saline (Sigma, USA) Chloroform (Sigma, USA), RPMI-1640 (Sigma, USA), Collagenase (Sigma, USA), Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco, USA), Fetal bovine serum (Gibco, USA), RNAzolB (Tel-Test, USA), Taq polymerase (TaKaRa, Japan), Deoxynucleotide triphosphate (TaKaRa, Japan), Moloney Murine Leukemia TaKaRa, Japan), Virus Reverse (TaKaRa, Japan), Transcriptase (TaKaRa, Japan), M-MLV RT RNase (TaKaRa, Japan), Moloney Murine Leukemia Virus Reverse (TaKaRa,

Japan), Transcriptase ; M-MLV RT RNase (TaKaRa, Japan), inhibitor (TaKaRa, Japan), Agarose (FMC, USA), IL-5 ELISA KIT (Biosource, USA), IL-4 ELISA KIT (Biosource, USA), IL-13 ELISA KIT (R&D Systems Shibayagi, Japan), IgE ELISA KIT (R&D Systems Shibayagi, Japan)에서 사용하였다.

(2) 기기

Rotary evaporator (Eyela, Japan), Spectrophotometer (Shimazu, Japan), Centrifuge (Sigma, USA), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech, Germany), Ice maker (Vision과학, Korea), Homogenizer (OMNi, USA), Plate shaker (Lab-Line, USA), Digital thickness gauge (Mitutoyo Corp, Japan), Cytological Centrifuge (Hanil, Korea), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Elisa Reader (Molecular devices, USA), Air compressor (Tamiya, Japan), 열탕 추출기(Daewoong, Korea), Pulverizer (Rong tsong, Taiwan)에서 사용하였다.

3) 실험동물 및 사육환경

본 연구에서 사용된 실험동물은 자성인 4~5주령의 C57BL/6 mouse를 대한실험센터에서 공급받아 실험 당일 까지 고품사료(항생제 무첨가, 삼양재료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃를 유지하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

강활 100 g에 증류수 1000 ml을 가하여 약탕기에 넣고 3시간여 동안 전탕하여 추출한 후 여과하고 감압증류기를 이용해서 농축한 다음 phosphate buffered saline (PBS)를 사용하여 남은 추출액이 20 ml가 되게 하여 -80℃ deep freezer에 4시간 동안 정치하고 freeze dryer로 12시간 동안 동결 건조하여 10 g을 얻어 냉장(4℃)보관하면서 본 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) Asthma mouse model

실험 1주째 500 µg/ml의 난알부민(ovalbumin : OVA)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750×g에서 5분 동안 원심분리하였다. 이 침전물(pellet)에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 µg OVA을 0.2 ml를 복강 내로 주사하여 전신감작을 시키고, 이후 3주째에는 생쥐를 마취한 후 OVA (500 µg/ml) 100 µl를 기도 투여(IT : intra trachea)하였다. 4~8주째까지는 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml OVA/PBS 40 µl를 8~12주째까지는 5 µg/ml의 OVA/ PBS 40 µl를 air compressor를 이용하여 20분간 주 3회 노출시켰다. 이때

정상군은 PBS 만을 주사, 흡입시켰다.

3) 약물 투여

OVA/alum로 전신 감작 시킨 4~12주째까지 매일 1회 200 mg/kg 농도로 oral zonde needle를 사용하여 경구투여 하였다.

실험은 7마리를 한 군으로 하여 정상군(normal group : 천식을 유발하지 않고 증류수만 투여한 군), 대조군(control group : 천식을 유발시키고 증류수 투여한 군), 실험군 I (NR I : 천식을 유발하지 않고 강황투여군), 실험군 II (NR II : 천식을 유발시키고 강황투여군)으로 나누었다.

4) 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage

fluid: BALF)분리

실험 마지막 날, 생쥐를 희생시킨 후 표피를 열고, DMEM 배양액 1 ml를 넣은 주사기를 기관지에 삽입하고 끈으로 묶어 고정된 후 3회 순환시켜 분리한 후 RBC lysis (Sigma, USA)용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포 수를 측정하였다. 나머지 폐포세척액은 냉장하였다가 cytokine과 면역글로블린 측정에 사용하였다.

5) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

생쥐에서 분리한 폐포세척액에서 각 cytokine량을 측정하기 위해 IL-4, IL-5, IL-13, IgE을 ELISA Kit를 사용하여 측정하였다. 각각의 cytokine 및 면역글로블린에 대한 항체를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 100 µl씩 분주하여 4°C에서 overnight 하였다. 각 well을 4번 완충용액으로 세척한 다음 1시간 동안 실온에서 assay buffer 100 µl씩 분주하여 반응 시킨 후 4번 완충용액으로 세척하였다. 그 후 폐포세척액을 100 µl씩 분주하여 2시간 반응 시킨 후 4번 완충용액으로 세척한 다음 여기에 straptavidin-HRP를 100 µl 가하고 분주하여 30분 반응시킨 후 4번 완충용액으로 세척하였다 TMB기질을 50 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 µl씩 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR)

(1) Total RNA의 추출

각 실험군의 생쥐에서 떼어낸 폐 조직을 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNAzol^B (Tel-Test, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 용해시켜 정량하고, RNA를 확인하기 위하여 RNA 4 µg을 EtBr이 들어있는 formaldehyde buffer와 섞어 70°C에서

10 분간 denaturation 시킨 후, formaldehyde를 넣은 1.5 % agarose gel에 loading dye와 함께 loading 하여 그 양을 확인하였다.

확인한 RNA는 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)에 사용하였다.

(2) cDNA 합성

역전사 반응은 준비된 total RNA 3 µg에 해당하는 양을 75°C에서 10분 동안 denaturation시키고, 이 denaturated total RNA 3 µg에 2.5 µl의 10 mM dNTPs, 1 µl의 random sequence hexanucleotides (25 pM/25 µl), RNA inhibitor로서 1uL의 RNAsin (20 U/µl), 1 µl의 100 mM DTT 및 4 µl의 5×RT buffer (250 mM Tris-Cl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 혼합한 후, 1 µl의 M-MLV RT(200 U/µl)를 첨가한 뒤 DEPC 처리된 증류수를 더하여 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 원심분리하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 10분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화시키고 즉시 얼음으로 옮겼다. 합성이 완료된 first-strand cDNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 사용하였다.

(3) cDNA의 PCR 증폭

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(MWG, Germany)을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 1 uL의 first-strand cDNA를 주형으로 사용하였다. 주형에 대한 β-actin, TNF-α, IL-1β, IL-5, IL-4 IL-13에 대한 sense primer (20 pM/µl)와 antisense primer (20 pM/µl)를 혼합하여 1 µl를 가하고, 다시 3 µl 2.5 mM dNTPs, 3 µl 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 및 0.18 µl Taq polymerase (5 U/µl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 µl 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation; 95°C, 5분, denaturation; 74°C, 5분, annealing; 55°C, 1분, elongation; 72°C, 1분을 25 cycle한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조건

Table 1. Oligonucleotide Primer

Gene	Sequece
β-actin	5'-TGGAATCCTGATCCATGAAC-3'
	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAGTCCG-3'
IL-4	5'-AGCCATATCCACGGATGCGAC-3'
	5'-GCATGGTGGCTCAGTACTACG-3'
IL-5	5'-GTCCTTCAGGAATCTGTTC-3'
	5'-GGTCATGTACTTTCATGAG-3'
IL-13	5'-GCCGGGATGGGCATTCCACGTGTG-3'
	5'-GGACGCCAAGGTCAAGAACAGTTG-3'
IL-1β	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
	5'-AGCCCATGAGTTCATTTCAC-3'
TNF-α	5'-AGCGGCTGACTGTCAGATTGTTAG-3'
	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 50 V 조건에서 30 분간 전기영동하여 분석하였다.

Oligonucleotide의 염기배열은 Table 1과 같다.

6) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과를 Student's *t*-test (JAVA, Bonferroni Ver 1.1)로 분석하여 *p*값을 구하였다. 각 실험 군을 대조군 및 정상군과 비교하여 *p* < 0.05일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. Lung weight

천식이 유발되면 기관지 및 기관의 염증으로 인해 각종 면역세포 증가와 다소 유관하여 폐의 무게가 증가하는 것으로 알려져 있는데⁶⁾, 본 실험 결과 OVA로 천식을 유도한 control군에 비하여 NR II군의 lung weight가 유의하게 감소하였다(Table 2).

각 군 간의 평균체중은 특별한 차이를 보이지 않았다(data not down).

기도 안은 점액물질로 인하여 기도 폐쇄를 보이고, 기도벽은 호산구, 림프구 등의 염증세포가 침착되어 붓게 되므로 무게가 증가하는데, control군에 비하여 NR II군에서는 lung weight가 유의하게 감소한 것으로 보아 강활추출물이 천식억제에 효과가 있을 것으로 사료된다.

Table 2. Effect of NR Extract on Lung Weight in Mice with OVA-induced Asthmatic Mouse Lung Weight

Group	Lung weight (g)
Normal	0.27±0.01
NR I	0.27±0.03
Control	0.51±0.14**
NR II	0.32±0.02*

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week) for asthma sensitization and challenge. The mice in the prophylaxis / treatment group were treated with NR extract for the later 8 weeks (3 times / week). At the end of the total experimental Procedure, the mice lungs were taken out and weighed. Values represent the means \pm SEM of 7 mice.

Normal : normal C57BL/6 mice.

NR I : normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract.

Control : OVA-induced asthma model mice.

NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract.

* : *p* < 0.05, ** : *p* < 0.01 compared to control group.

2. Cell count

1) Total cells in Lung

천식이 유발되면 폐 내 호산구, 림프구, 대식세포, 비만세포 등 천식의 만성 염증성 병리를 일으키는 세포의

증가로 기도 침착과 기관지의 부종 및 점액분비 과다로 인해 폐의 총 세포 수가 증가하는 것으로 알려져 있는데⁶⁾, 본 실험 결과 Table 3에서와 같이 OVA로 천식을 유도한 대조군에 비하여 NR II군이 폐의 총 세포 수가 유의하게 감소하였다.

천식이 유발된 대조군에 비하여 NR II군에서는 총 세포 수가 유의하게 감소한 것으로 보아 강활추출물이 천식 억제에 효과가 있을 것으로 사료된다.

2) Total Leukocyte in BALF

BALF 내 total leukocyte 수는 폐 내 총 세포 수의 경우와 마찬가지로⁶⁾, 이는 폐 자체의 염증과 관련하여 감염에 저항하기 위해 BALF 내 total leukocyte 수가 증가했음을 의미한다. 본 실험 결과 OVA로 천식을 유도한 대조군에 비하여 NR II군의 폐 세척액 내의 총 leukocyte 수가 유의하게 감소하였다(Table 3).

천식이 유발된 대조군에 비하여 NR II군에서는 leukocyte의 수가 유의하게 감소한 것으로 보아 강활추출물이 천식을 억제시키는 것으로 생각되었다.

3) Eosinophils in BALF

모든 천식 환자에서 중증도와 관계없이 기도 점막에 eosinophil을 포함한 염증반응이 관찰되고, CD4⁺ 세포의 분획 증가 등이 나타나고, eosinophil의 생성, 성장과 성숙, 그리고 동원을 자극하는 중요한 사이토카인으로는 IL-3, IL-5 등이 알려져 있다⁴⁾.

Table 3에서와 같이 OVA로 천식을 유도한 control군에 비하여 NR II군의 폐 세척액 내의 eosinophils 수가 유의하게 감소하였다(Table 3).

Table 3. The Number of Total Cells in OVA-induced Asthmatic Mouse Lung Tissue, Leukocyte in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF), and Eosinophil in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF)

Group	Lung absolute number ($\times 10^6$)	BALF absolute number	
		Leukocyte ($\times 10^5$)	Eosinophils (cm^2)
Normal	6.90±3.23	7.10±2.68	9.60±5.73
NR I	5.70±2.36	4.80±1.89	11.20±6.46
Control	59.20±8.17***	55.8±6.57***	133.00±22.43***
NR II	15.30±5.3**	17.4±4.52**	37.20±10.69***

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week) for asthma sensitization and challenge. The mice in the prophylaxis/treatment group were treated with NR extract for the later 8weeks (3 times /week). At the end of the total experimental procedure, the mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. The total number of lung cells was calculated. Values represent the means \pm SEM of 7 mice.

Normal : normal C57BL/6 mice.

NR I : normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract.

Control : OVA-induced asthma model mice.

NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract.

** : *p* < 0.01, *** : *p* < 0.001 compared to control group.

따라서 control군에서 eosinophils 수가 증가한 것으로 보아 천식 유발 된 것을 확인할 수 있고, NR II군에서는 eosinophils 수가 감소한 것으로 보아 강황추출물이 천식을 억제하는 데 영향을 끼치는 것으로 판단된다(Table 3).

3. BALF 내 IL-4, IL-5, IL-13 ELISA 분석

IL-4는 Tcell, NKcell, mast cell, 호염기구, 호산구에서 분비되는 cytokine으로 알레르기에 매우 본질적인 역할을 하고, IL-4는 주로 Th2세포에서 생성되어 B세포의 분화와 증식을 촉진하여, B세포 활성화와 IgE항체 생성을 위해 IgE 유전자의 전사를 유도하는 것으로 보고되어 있다⁹⁾.

본 실험에서 BALF에서 IL-4의 level을 측정된 결과, OVA로 천식 유도한 대조군에 비하여 NR II군에서는 IL-4가 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

따라서 BALF에서 OVA로 천식을 유도한 대조군에 비하여 NR II군의 IL-4의 수치가 감소한 것으로 보아 강황추출물이 면역조절에 영향을 끼친다고 판단된다.

IL-5는 Th2세포 및 활성화와 비만세포에 의해 생산되며 호산구의 성장과 분화를 자극하고 성숙한 호산구를 활성화 시키고 세포내의 과립 분비를 유도하는 것으로 알려져 있는데⁸⁾, 본 실험에서 BALF에서 IL-5의 level을 측정된 결과, OVA로 천식 유도한 control군에 비하여 NR II군에서 IL-5가 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

이러한 기능을 지닌 IL-5가 BALF에서 OVA로 천식을 유발시킨 군에 비하여 NR II의 IL-5 수치가 감소한 것으로 보아 강황추출물이 면역조절에 영향을 끼친다고 판단된다.

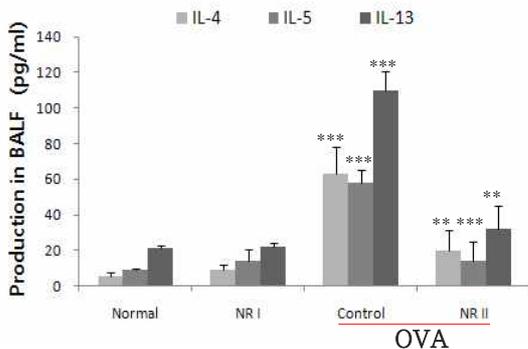


Fig. 1. The level of IL-4, IL-5, and IL-13 in broncho alveolar lavage fluid (BALF)

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3times a week) for asthma sensitization and challenge. At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice. The concentration of IL-4 in mice BALF was measured using ELISA.

Values represent the means \pm SEM of 7 mice.

Normal : normal C57BL/6 mice.

NR I : normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract.

control : OVA-induced asthma model mice.

NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract.

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compared to control group.

IL-13은 주로 Th2세포의 생산되며, IL-4와 기능적으로 유사하여 Th2세포의 생성 및 IgE의 생산을 촉진하는 것으로 보고되어 있으며⁷⁾, 이것은 기도에서의 점액 분비를 유도하며 기도저항의 증가에 있어서 매우 중요한 역할을 한다.

BALF에서 IL-13의 level를 측정된 결과, OVA로 천식을 유도한 control군에 비하여 NR II군에서는 IL-13이 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

따라서 BALF에서 OVA로 천식을 유발시킨 군에 비하여 NR II의 IL-13의 수치가 감소한 것으로 보아 강황추출물이 면역조절에 영향을 끼친다고 판단된다.

4. BALF 내 IgE level

IgE는 체액에 존재하는 면역 단백질의 일종으로 주로 IL-4, IL-13, IFN- γ 에 의해 조절되고 체내에 침투한 항원이 비만세포나 호염기구의 세포표면에 강력히 결합하여 히스타민, 뉴코트리엔과 세로토닌 등의 물질을 분비하며⁷⁾, 이 물질들은 혈관의 투과성을 증진하고 모세혈관을 확장시키며 적혈구의 화학주성을 촉진하여 알레르기성 조직반응이 일어나게 된다.

BALF에서 IgE의 level을 측정된 결과, OVA로 천식을 유발한 control군에 비하여 NR II군에서 IgE가 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

따라서 BALF에서 OVA로 천식을 유발군에 비하여 NRII군에서 IgE 수치가 감소한 것을 보아 강황추출물이 면역조절에 영향을 끼친다고 판단된다.

1) RT-PCR

천식 유발과 관련된 여러 cytokine 들의 mRNA 발현

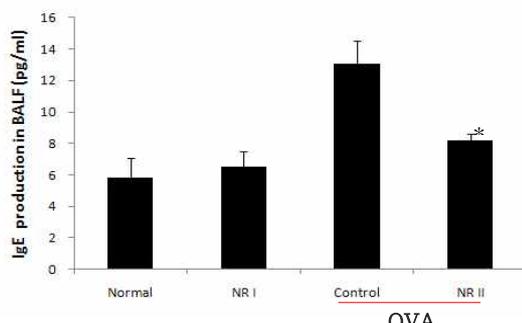


Fig. 2. The level of IgE in broncho alveolar lavage fluid (BALF)

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3times a week) for asthma sensitization and challenge. At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice. The concentration of IL-4 in mice BALF was measured using ELISA.

Values represent the means \pm SEM of 7 mice.

Normal : normal C57BL/6 mice.

NR I : normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract.

control : OVA-induced asthma model mice.

NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared to control group.

을 관찰한 결과, OVA로 천식을 유발한 control군에 비하여 NR II군에서의 TNF- α , IL-5, IL-4, IL-13 등의 mRNA 발현이 감소한 것을 보아 강활추출물이 면역조절에 영향을 끼친다고 판단된다(Fig. 3).

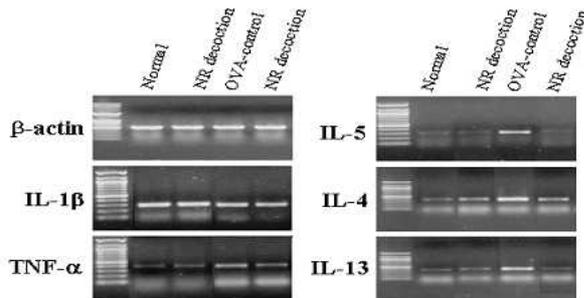


Fig. 3. mRNA expression of β -actin, TNF- α , IL-1 β , IL-5, IL-4 and IL-13 in the lung

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week). The mice in the prophylaxis/treatment group were treated with NR extract for the later 8 weeks (3 times/week). At the end of the experiment, the mice were sacrificed and mRNA expression of cytokines in lung was observed by RT-PCR.

Normal : normal C57BL/6 mice.

NR I : normal C57BL/6 mice and oral administration of NR extract.

Control : OVA-induced asthma model mice.

NR II : OVA inhalation and oral administration of NR extract.

결론

강활 추출물을 OVA로 유발한 천식 동물모델에 투여하여 기관지폐포세척액의 면역세포에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. OVA 유발한 천식모델에서 강활추출물을 투여한 결과, lung weight의 무게와 lung 내의 total cells 수, BALF 내의 leukocyte와 eosinophils의 수가 유의하게 감소하였다.
2. IL-4, IL-5, IL-13, IgE는 BALF에서 control군에 비하여 강활추출물을 투여군에서 유의하게 감소하였다.
3. 강활추출물에 의해 control군에 비해 TNF- α , IL-5, IL-4 및 IL-13 등의 mRNA 발현이 감소하였다.

이상의 결과로 보아 강활추출물이 면역조절작용을 통한 천식의 억제하는 효과가 있을 것으로 생각되며, 향후

다양한 병리적 인자 및 약물에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Busse WWW, Lemanske RF Jr. Asthma. N Engl J. Med. 2001 ; 44(5) : 350-62.
2. Toshio Hirano. Cytokine molecular biology. World Science. 2002.
3. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. N. Engl. J. Med. 1992 ; 326(5) : 298-304.
4. Song HC, Kim SH. Effect *Sitochicheu-tang* and *Boikjeungcheu-tang* on immune cell in BALF and lung tissue in a rat asthma model. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2005 ; 19(1) : 106-13.
5. 홍상철, 최학주, 김선빈, 김동희. 자의전호탕(自擬前胡湯)이 천식 모델 생쥐의 BALF 내 관련 면역세포 변화에 미치는 영향. 대전대학교 한의학논문집. 2008 ; 17(2) ; 137.
6. Oriental medical university herbal medicine the National History Compilation Committee. Clinical Traditional Herbalogy. Seoul : Younglimsa. 2006.
7. Lee MH, Seo YB, Roh SS, Comparative study ofeffect in immunecure against asthma of astragali radix by culturing year. Kor J Herbology. 2008 ; 23(2) : 111-21.
8. Lee BR, Hong KE, Jang SG. The experimental study on the immuno-regulatory effect of *Notopterygii Rhizoma* herbal-acupuncture at Pyeus (BL13) on OVA-induced asthma in mice. Kor J Meridian & Acupoint. 2005 ; 22(2) : 107-25.
9. Corrarino J. New guidelines for diagnosis and management of asthma. MCN Am J Matern Child Nurs. 2008 ; 33(2) : 136.
10. Grunig G, Warnock M, Wakil AE. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. Science. 1998 ; 282 : 2261-3.