

원 저

解表二陳湯加減方이 천식 모델 내의 Cytokine에 미치는 영향

백동진, 정희재, 이형구, 정승기
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

The Effects of *Haepyoijin-tang* on the Cytokines in Asthma Model

Dong-Jin Baek, Hee-Jae Jung, Hyung-Koo Rhee, Sung-Ki Jung

Department of Respiratory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Currently asthma is considered to be an inflammatory disease characterized by airway hyperresponsiveness and pulmonary eosinophilia, and mediated by Th lymphocytes expressing a Th 2 cytokine pattern. In many recent studies, molecular biological methods have been used to investigate the role of cytokines in pathogenesis and new therapeutic targets of asthma.

Objectives : We aimed to identify the effect of *Haepyoijin-tang* on the transcriptional activities of cytokines involved in the asthma model.

Materials and Methods : RBL-2H3 cell lines were used. Cells were stimulated with DNP-IgE or Calcium inophore+PMA for maximal gene expression. After 24 hours of *Haepyoijin-tang*-treatment, total cellular RNAs were collected using the Trizol solution method. Then the transcriptional activities of cytokines(IL-1, 4, 5, 10, 13, TNF- α) were measured by RT-PCR with electrophoresis.

Results : DNP-IgE and Calcium inophore+PMA induced IL-4/IL-5 production separately peaked at 3 hours after the stimulation, but the efficacy was better in the Calcium inophore+PMA group. In the IL-4 study, sample groups of 10%, 1%, 0.01% *Haepyoijin-tang*-treatment showed 83%, 98%, 96% of transcriptional activities compared to the control group. In the IL-5 study, sample groups of 10%, 1%, 0.1%, 0.01% *Haepyoijin-tang* showed 97%, 99%, 99%, 99% of transcriptional activities compared to the control group. In other studies any result was not obtained.

Conclusions : This study shows that *Haepyoijin-tang* has an inhibitory effect on the transcription of IL-4 and IL-5 gene expression in RBL-2H3 cell lines. Advanced studies are required to investigate the mechanisms of inhibition by herbal medicine in the asthma model. (*J Korean Oriental Med* 2000;21(3):57-67)

Key Words : *Haepyoijin-tang*, Cytokine, Asthma, IL-4, IL-5

서론

천식은 식생활의 서구화, 산업의 발달, 대기오염의

심화 및 밀폐된 공간에서의 생활과 지하생활권의 확대 등에 따른 다양하고 새로운 항원의 출현으로 인하여 점점 늘어나고 있어 발병기전, 치료 및 예방에 많은 연구가 이루어지고 있으나 아직까지는 치료에 많은 어려움이 있다.

천식은 발작성의 호흡곤란, 천명, 기침을 특징적인

· 접수 : 2000년 7월 31일 · 수정 : 9월 25일 · 채택 : 10월 11일
· 교신저자 : 백동진, 부산 수영구 광안1동 127-19 백동진한의원
(Tel. 051-751-3731)

증후군으로 하는 질병으로 한의학에서는 呼吸急促 喘鳴有聲한 증상을 나타내는 哮喘證, 哮喘證에 해당된다¹²⁾.

解表二陳湯加減方은 祛痰潤肺, 止咳平喘, 解表理氣의 효능을 가진 解表二陳湯⁹⁾에 健脾強胃하는 白朮, 止咳定喘 潤心肺하는 蘇子炒, 虛勞少氣, 一切虛損을 치하는 鹿茸¹³⁾을 加하고 麻黃을 去한 處方으로 임상에서 哮喘證, 哮喘證 치료에 응용되고 있는 처방이다.

解表二陳湯의 효능에 관한 연구로는 金⁶⁾ 등은 알레르기 喘息의 呼吸樣狀과 氣管組織에 미치는 影響을, 朴⁷⁾ 등은 解表二陳湯에 麻黃을 빼고 款冬花 白朮을 加한 加味解表二陳湯이 肺損傷에 미치는 影響에 대한 실험적 연구를 보고하였다.

천식은 즉시형 과민반응(immediate hypersensitivity)에 의해서 일어나는 질환으로⁸⁾, 최근의 연구자들은 천식을 기도염증성 질환으로 보고 있다⁹⁾.

천식의 기도염증은 활성화된 비만세포(mast cell), 호산구(eosinophil), T cell과 같은 염증세포들이 기관지점막에 침착하고 이들 세포에서 여러 종류의 chemokines와 각종 cytokines 등이 발현·분비되어 발생한다¹⁰⁾. 그 중 특히 T helper 2(Th2) 임파구에서 생성되는 Interleukin-4(IL-4)는 휴지기 상태의 B cell에서 Ia 항원을 발현시키고 Immunoglobulin E(IgE) 생산을 증가시키며¹⁰⁾, Interleukin-5(IL-5)는 IL-4의 작용을 도울 뿐 아니라 골수에서 호산구 분화를 촉진하고 기도내 호산구를 활성화시켜 천식의 유발에 매우 중요한 역할을 한다고 하였다¹¹⁾.

최근에는 천식의 발병기전과 병태생리에 대한 연구로 분자생물학적인 연구를 통하여 그 기전을 밝히려고 시도하고 있으며, Carlos 등¹²⁾은 세포의 염증반응 및 면역반응에 cytokines들의 역할과 치료약제를 투여하여 어떤 변화가 있는지를 관찰하고 있다.

이에 저자는 천식치료에 임상적인 효과가 인정되는 解表二陳湯加減方이 염증성 반응과 알레르기 반응에 관여하는 cytokines의 전사의 변화를 관찰하기 위하여 RBL-2H3 세포주(Rat basophil leukemia cell line)를 이용하여 Interleukin-1(IL-1), IL-4, IL-5, Interleukin-10(IL-10), Interleukin-13(IL-13) 및 tumor

necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokines의 발현을 억제하는 효과를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 세포주

본 실험에 사용된 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입한 흰쥐의 혈액에서 기원한 RBL-2H3 cell line(Rat basophil leukemia cell line)이다.

2) 배지

세포 배양을 위하여 RPMI 1640(Roswell Park Memorial Institute 1640, Gibco BRL, Co., U.S.A.) 배지에 2mM L-glutamine, 1.5g/L sodium bicarbonate, 0.1mM non-essential amino acid, 1.0mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum(FBS)를 첨가하여 사용하였다

3) 약제

경희의료원 한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였으며, 解表二陳湯加減方 1첩의 내용과 용량은 Table 1과 같다.

4) 검액의 조제

解表二陳湯加減方 1첩 분량을 5000ml round flask에 넣고 3000ml의 정제수를 가하여 냉각기를 부착하고 3시간 가열 전탕한 다음 여과지로 여과한 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하여 40℃ 감압건조기에서 완전 건조하여 解表二陳湯加減方 엑기스를 얻는다. 엑기스 0.1g에 증류수 10ml를 넣고 완전히 녹여 1% 엑기스 Stock 용액을 만든 후 0.45 μ m syringe filter(Millex-GS, Millipore, Co. U.S.A.)로 여과하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

100mm culture dish에 RBL-2H3 세포주를 Seeding한 후 5%의 humidified CO₂ 조건이 유지되는 incubator를 이용하여 37℃에서 배양하면서 1주일에 2회 배양 배지를 교체하여 주었다. 사용된 배양 배지는

Table 1. Composition of *Haepyojijin-tang* derivatives

Herbs	Scientific Name	Dose(g)
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	8.0
陳皮	<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i>	8.0
赤茯苓	<i>Hoelen</i>	8.0
炙甘草	<i>Glycyrrhizae Radix(broiled)</i>	8.0
蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	8.0
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	8.0
蘇子炒	<i>Perillae Semen(roasted)</i>	8.0
杏仁炒	<i>Ansu Semen(roasted)</i>	8.0
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	6.0
紫菀	<i>Asteris Radix</i>	6.0
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	6.0
貝母	<i>Fritillariae Roylei Bulbus</i>	6.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	6.0
鹿茸	<i>Cervi Cornu Parvum</i>	4.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4.0
Total amount		102.0

RPMI 1640 배지에 2mM L-glutamine, 1.5g/L sodium bicarbonate, 0.1mM non-essential amino acid, 1.0mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum를 첨가하여 사용하였다.

2) 검액 처리

배양된 세포를 모두 수확하고 20 μ 씩 취한 다음 0.4% trypan blue 20 μ 와 섞어 hemocytometer에 넣고 현미경을 이용하여 cell counting을 하였다.

세포수를 1.6×10^6 개로 하여 다시 100mm culture dish에 seeding하여 부착시켜 여러 cytokines의 전사를 통한 발현도를 극대화시키기 위하여 대표적으로 알려진 IL-4, IL-5의 inducer인 DNP-IgE(75 ng/ml)와 A23187 Calcium Inophore(1 μ M)+ phenyl mercuric acetate(PMA, 50 nM)를 각각 phosphate buffered saline(PBS, buffer control)과 함께 투여하였다.

24시간이 경과한 후 검액의 최종 농도를 10%, 1%, 0.1%, 0.01% 되도록 처리한 후 5%의 humidified CO₂ 조건이 유지되는 incubator를 이용하여 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

3) RNA 추출

검액 처리 24시간 후 Trizol solution method를 이용하여 배양 세포주들로부터 전체 세포(total cellular) RNA를 추출한다. 먼저 원심분리를 통하여 수확한

세포들에 1ml의 Trizol solution (Gibco, BRL, Co. U.S.A.)을 처리하여 18-21G syringe로 균질화시킨 다음 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm으로 원심분리하여 상층액을 수거한 후 5분 정도 상온에 두었다가 200 μ phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)을 섞은 다음 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다.

맑은 상층액을 수거한 후 동량의 isorophanol alcohol을 혼합한 뒤 -20 $^{\circ}$ C에서 30분간 보관하여 RNA pellet을 침강시켰다. 침강된 RNA는 100 μ 의 DEPC water에 녹인 후 spectrophotometer (Hewlett Packard, Co. U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

분리 방법은 Fig. 1과 같다.

4) cDNA 합성

cDNA의 합성은 First single-stranded cDNA synthesis kit(AMV) (Boehringer -Mannheim, Co. Germany)를 이용하였다. 1 μ g의 RNA를 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리하여 denaturation시킨다. 1 μ 10 \times buffer, 25mM MgCl₂ 2 μ , 1 μ deoxynucleotide mix, 1 μ oligo(dt)15primer, 0.5 μ RNase inhibitor, 0.4 μ Avian myeloblastosis virus(AMV, reverse transcriptase), 3.1 μ DEPC water를 혼합한 반응용액과 denaturation 시킨 RNA를 섞어 25 $^{\circ}$ C에서 10분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 99 $^{\circ}$ C에서 5분, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하여 cDNA를 합성하

였다.

5) RT-PCR 분석에 의한 유전자 발현 분석

RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)에 사용한 primer들은 Table 2에 정리하였다.

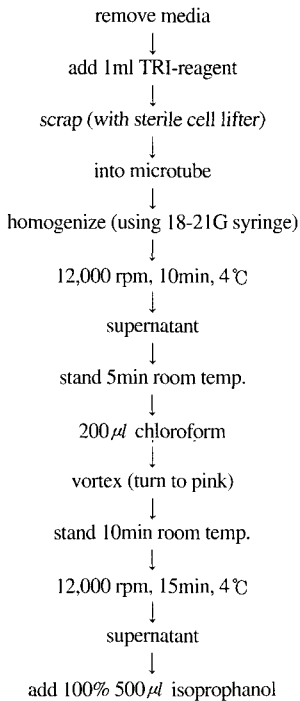


Fig. 1. Schematic procedure of RNA isolation.

합성한 cDNA 1µl를 template로 사용하여 반응용액(2µl 10× buffer, 200mM dNTP, 0.5-1 unit taq polymerase, 10pmol osteocalcin primer)에 혼합하였다. Cycle 즉, 각 cytokine의 PCR condition은 Table 3에 정리하였으며, 정량을 위한 internal control gene으로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 이용하였다.

정확한 정량적 분석을 위하여 primer에 ³²P-adCTP 0.1 µCi (Amersham, Co. U.S.A.)로 labelling하여 PCR을 실시한 후 X-ray film을 통하여 감광하여 그 정량을 확인하였다. Detection은 phosphoimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 이용하였다.

6) RT-PCR products의 전기영동

10µl의 RT-PCR product는 6% TBE gel (Novex, San Diego, CA, U.S.A.)을 이용하여 loading하였다. 전기영동은 100V에서 40분 동안 수행하였으며 1× TAE buffer를 사용하였다. 분리된 RT-PCR product를 육안으로 확인하기 위하여 gel을 500ml의 ethidium bromide(Et-Br) 용액으로 20분간 염색한 후 ultraviolet transilluminator를 통하여 관찰한 후 polaroid film을 이용하여 사진으로 제작한 후 scanning하였다.

Table 2. Sequence of Primers Used for Quantitative RT-PCR

Primer	Sequence
Interleukin-1	5' -AGA TGA AGT GCT CCT TCC AG-3' 3' -CAA CAC GCA GGA CAG GTA CAG-5'
Interleukin-4	5' -ACC TTG CTG TCA CCC TGT TC-3' 3' -TTG TGA GCG TGG ACT CAT TC-5'
Interleukin-5	5' -CTC TGT TGA CGA GCA ATG AG-3' 3' -TAA CCA ACT GGG ACG ATA TG-5'
Interleukin-10	5' -ATG CCC CAA GCT GAG AAC CAA CCA AGA CCC A-3' 3' -TCT CAA GGG GCT GGG TCA GCT ATC CCA-5'
Interleukin-13	5' -AGG ATG ACA AAC TCT GGA G-3' 3' -CTC AAG GTC ACA GTG AAG G-5'
Tumor necrosis factor-α	5' -CTT GTG GCA GGG GCC ACC ACG CTC-3' 3' -CTC AGC GCT GAG TTG GTC CCC CTT CTC-5'
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	5' -TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC-3' 3' -CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-5'

Table 3. PCR Conditions for Each Gene Expression

Cytokine	Base pair	Temp.	Time	Cycles
Interleukin-1	358bp	94℃	1min	1
		95℃	1min	
		52℃	1min	35
		72℃	1min	
		72℃	7min	1
Interleukin-4	357bp	94℃	1min	1
		95℃	30sec	
		55℃	30sec	30
Interleukin-5	424bp	72℃	30sec	
		72℃	7min	1
Interleukin-10	351bp	94℃	1min	1
		94℃	30sec	
		65℃	30sec	29
		72℃	30sec	
		72℃	7min	1
Interleukin-13	358bp	94℃	1min	1
		95℃	1min	
		58℃	1min	35
		72℃	1min	
		72℃	7min	1
Tumor necrosis factor- α	322bp	95℃	3min	1
		95℃	45sec	
		62℃	45sec	33
		72℃	45sec	
		72℃	7min	1
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	300bp	94℃	1min	1
		95℃	30sec	
		55℃	30sec	30
		72℃	30sec	
		72℃	7min	1

성적

1. Calcium Inophore+PMA와 DNP-IgE 효과에 따른 IL-4 및 IL-5의 시간대별 발현 증가도

여러 cytokines의 전사를 통한 발현도를 극대화시키기 위하여 대표적으로 알려진 IL-4, IL-5의 inducer인 DNP-IgE(75 ng/ml)와 Calcium inophore(1 μ M)+PMA(50 nM)를 각각 PBS(control)와 함께 투여하였다.

3회의 독립적인 실험 결과 각각의 inducer로 처리한 군에서 대조군에 비하여 3시간을 기점으로 IL-4, IL-5의 합성도의 극대치를 기록하였으며, IL-5에서는

DNP-IgE 처리군이 Inophore+PMA 처리군보다 3시간에 더 높은 활성도를 보여주었으나, 시간별에 따른 추이를 보면 활성도의 증가 정도는 Inophore+PMA 처리군이 월등하게 앞서 작용하였다(Table 4, Fig. 2, 3).

2. 解表二陳湯加減方の 농도에 따른 IL-4 전사도의 추이

解表二陳湯加減方이 IL-4 전사도에 대한 효과를 알아보기 위하여 대조군과 10%, 1%, 0.1%, 0.01%의 농도별 검액 투여군으로 나누어 24시간동안 calcium inophore+ PMA induction을 시킨 후 다시 24시간 검액 처리 후 IL-4의 primer로 PCR을 실시하였다. PCR

Table 4. The Cpm Value of the Response of IL-4 and IL-5 Gene Expression after Treatment of Calcium Inophore+PMA or DNP-IgE

Expression	Control	I+P ^{b)}	D-I ^{c)}	I+P	D-I	I+P	D-I	
		1hr		2hr		3hr		
IL-4	(cpm ^{a)})	62 ± 2.3	443 ± 1.9	385 ± 2.2	494 ± 2.3	468 ± 4.8	556 ± 3.7	495 ± 1.3
	(%)	11	80	69	89	84	100	89
IL-5	(cpm)	71 ± 2.4	200 ± 3.8	120 ± 2.3	285 ± 2.5	208 ± 1.2	325 ± 0.9	410 ± 5.0
	(%)	17	49	29	70	51	79	100

a) : Radioactive counting value (count per min)
Control : No treatment group

b) : Calcium inophore+PMA treated group

c) : DNP-IgE treated group

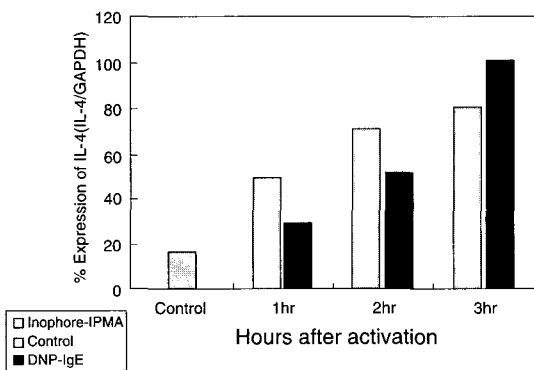


Fig. 2. The response of IL-4 gene expression after treatment of Calcium inophore+PMA or DNP-IgE.

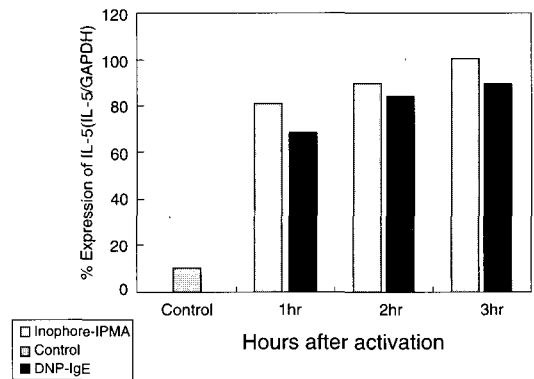


Fig. 3. The response of IL-5 gene expression after treatment of Calcium inophore+PMA or DNP-IgE.

product를 6% TBE gel로 전기영동을 하여 phosphoimager로 정량 분석하였으며, 모든 분석은 house keeping gene인 GAPDH의 양과 비교하여 측정하였다.

3회의 독립적인 실험 결과 10% 투여군에서는 83%, 1% 투여군에서는 98%, 0.01% 투여군에서는 96%로 전사 억제 효과를 나타내었으며 0.1% 투여군에서는 큰 차이가 나타나지 않았다(Table 5, Fig. 4).

3. 解表二陳湯加減方の 농도에 따른 IL-5 전사도의 추이

解表二陳湯加減方の IL-5 전사도에 대한 효과를 알아보기 위하여 대조군과 10%, 1%, 0.1%, 0.01%의 농도별 검액 투여군으로 나누어 24시간 동안 Calcium inophore +PMA induction을 시킨 후 다시 24

시간 검액 처리 후 IL-5의 primer로 PCR을 실시하였다. PCR product를 6% TBE gel로 전기영동을 하여 phosphoimager로 정량 분석하였으며 모든 분석은 house keeping gene인 GAPDH의 양과 비교하여 측정하였다.

3회의 독립적인 실험 결과 10% 투여군에서 97%, 1% 이하 농도 투여군에서는 99%로 경미한 전사 억제 효과를 나타내었다(Table 4, Fig. 5).

4. 解表二陳湯加減方の 농도에 따른 IL-1, IL-10, IL-13 및 TNF-α 전사도의 추이

解表二陳湯加減方の 전사도에 대한 효과를 알아보기 위하여 대조군과 10%, 1%, 0.1%, 0.01%의 농도별 검액 투여군으로 나누어 24시간 동안 calcium inophore+PMA induction을 시킨 후 다시 24시간 검액

Table 5. The Effect of *Haepyoijin-tang* against the IL-4 Gene Expression

Expression		Control		Sample			
		before activation	after activation	10%	1%	0.1%	0.01%
IL-4	(cpm ^{a)})	65± 2.7	523± 26.7	442± 15.0	520± 22.6	530± 21.0	510± 22.0
	(%)	12	99	83	98	100	96
GAPDH	(cpm)	560± 14.7	560± 29.9	566± 22.4	558± 19.0	560± 21.1	560± 18.0

a) : Radioactive counting value (count per min)
 Control : Calcium inophore+PMA treated group
 Sample : *Haepyoijin-tang* treatment group after Calcium inophore+ PMA activation

Table 6. The Effect of *Haepyoijin-tang* against the IL-5 Gene Expression

Expression		Control		Sample			
		before activation	after activation	10%	1%	0.1%	0.01%
IL-5	(cpm ^{a)})	32± 2.1	385± 23.5	372± 12.0	380± 18.3	383± 23.0	380± 18.0
	(%)	8	100	97	99	99	99
GAPDH	(cpm)	980± 18.3	980± 23.1	980± 20.7	972± 23.0	983± 21.7	980± 22.0

a) : Radioactive counting value (count per min)
 Control : Calcium inophore+PMA treated group
 Sample : *Haepyoijin-tang* treatment group after Calcium inophore+ PMA activation

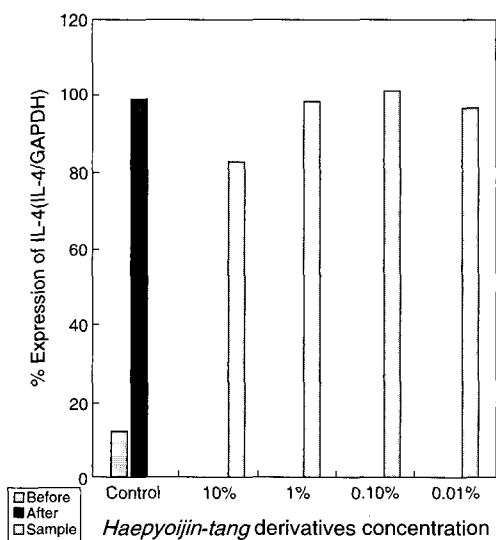


Fig. 4. The effect of *Haepyoijin-tang* against the IL-4 gene expression.

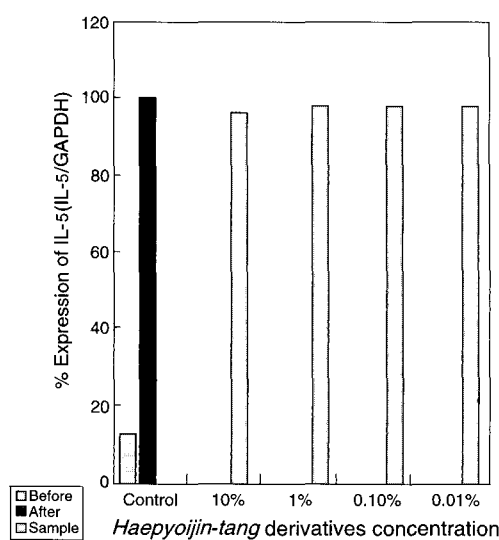


Fig. 5. The effect of *Haepyoijin-tang* derivatives against the IL-5 gene expression.

처리 후 IL-1, IL-10, IL-13 및 TNF- α 의 primer로 PCR을 실시하였다. PCR product를 6% TBE gel로 전기영동을 하여 phosphorimager로 정량 분석하였으며 모든 분석은 house keeping gene인 GAPDH의 양과 비교하여 측정하였다.

3회의 독립적인 실험 결과 모든 농도의 解表二陳湯加減方 투여군에서 대조군에 비하여 전사도의 변화가 관찰되지 않았다.

고찰

천식은 만성호흡기질환의 일종으로 반복적인 호흡기의 감염이나 특정 항원에 대한 노출로 인하여 발생하는 가역적, 발작적 기도폐색을 동반하는 병증이며, 특징적으로는 기관지 수축에 의한 경련(paroxysm) 및 기관지 폐색(obstruction)과 호흡곤란(dyspnea)을 악화시키는 두터운 점막층을 생산한다⁹⁾. 천식의 3가지 주증상은 간헐적(가역적) 호흡기도 폐색, 호산구에 의한 만성 기관지 염증 및 기관지 수축물질에 의한 기관지 평활근의 과반응(수축)이다⁹⁾.

천식은 즉시형 과민반응(immediate hypersensitivity)으로 기관지점막에는 호산구와 T helper 2(Th2) 임파구 아형의 CD4+ T 임파구의 숫자가 증가된 것을 볼 수 있다^{8,9)}. 천식발작은 항원이 immunoglobulin E(IgE)에 결합된 결과로 비만세포 활성화에 의하여 시작된다. 비만세포에서 유래된 cytokines은 호산구, 호중구 및 Th2 임파구의 증가를 유도하며 비만세포, 호염기구 및 호산구 모두는 기도평활근을 수축시키는 매개물질을 생산한다⁹⁾. 그 중 가장 중요한 기관지 수축 매개물질들은 Leukotriene C4(LTC4)와 이들의 분해산물인 Leukotriene D4(LTD4)와 Leukotriene E4(LTE4) 및 platelet-activating factor(PAF)이다⁹⁾.

천식의 1차 병소는 CD4+ T 임파구, 호염기구 및 호산구가 축적된 기관지점막으로 후기단계 반응의 한 예이다. 비만세포로부터 분비되는 tumor necrosis factor(TNF), IL-4 및 다른 cytokines은 혈관내피세포에 작용하는 혈관확장물질과 부착분자, 그리고 백혈구의 삼출(diapedesis)을 용이하게 하는 chemokines

을 생산케 하여 염증(inflammation)을 항진시킨다⁹⁾.

천식의 병인에 관여하는 세포는 호산구, 비만세포, 기도 상피세포 등 여러 가지가 있지만 이 중 Th 임파구는 cytokines을 분비하여 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다. Th 임파구는 cytokines의 분비양상에 따라 Th1, Th2 임파구로 나뉘어진다. Th1 임파구는 주로 IL-2, IL-12, interferon - γ (IFN- γ)를 생산하며 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity), 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주 반응에 관여한다. Th2 임파구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 즉 천식과 같은 알레르기 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용 등에 관여한다. 따라서 알레르기 천식 환자의 기관지폐포세척액에서는 Th2 임파구의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다¹³⁾.

기관지천식은 한의학에서 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 증상을 주증상으로 하는 哮喘證에 해당된다¹⁴⁾. 哮喘證 치료에 있어서 張¹⁵⁾은 증상이 未發時와 既發時로 나누고 陰陽을 분별하여 補한다 하였으며, 樓¹⁵⁾는 中外皆寒과 寒包熱로 나누고, 葉¹⁶⁾은 虛證과 實證으로 분류하고 虛證은 腎虛氣逆한 탓으로 難治이며 實證은 外邪壅塞한 것으로 易治라 하였다.

解表二陳湯은 二陳湯(半夏 橘皮 赤茯苓 炙甘草)에 蘇葉 麻黃 杏仁炒 桑白皮 紫菀 貝母 桔梗 生薑을 加味한 處方으로 祛痰潤肺, 止嗽平喘, 解表理氣의 效能이 있어⁹⁾, 哮喘證의 治療, 특히 急性發作期나 實證에 많이 응용되고 있다.

이에 저자는 解表二陳湯의 처방에 麻黃을 去하고, 健脾強胃 止瀉除濕 痰無不利하는 白朮, 歐痰降氣 止咳定喘 潤心肺하는 蘇子炒, 益氣強志 泄精漏血 却老生齒하며 虛勞少氣 一切虛損을 治하는 鹿茸¹⁵⁾을 加味하여, 虛實錯雜의 병리를 바탕으로 扶正祛邪의 治法 중 扶正에 입각하여 鹿茸 등을 加하여 解表二陳湯加減方을 구성하였다.

解表二陳湯에 대한 연구 보고로는 실험적인 연구로 解表二陳湯에 麻黃을 去하고 款冬花, 白朮을 加하여 加味解表二陳湯이라 하여 朴¹⁷⁾등은 폐손상에 미치는 효과로 鎮痛, 鎮痙 效果를 보고하였으며, 金¹⁸⁾등은

解表二陳湯이 알레르기 천식에 있어 이상호흡수의 감소와 호산구수의 감소에 유의한 효과가 있음을 연구보고 보고하였다.

최근 천식의 발생 기전과 그 치료 과정에 대한 연구로 분자생물학적 실험 기법을 도입하였고, 이러한 연구방법은 염증 반응이나 면역 반응에 공통으로 관여하는 여러 cytokines, chemokines의 증감을 관찰함으로써 세포 단계에서의 조직 손상 및 치유 복원 과정을 이해하고 설명하고 있다²⁾.

많은 연구에서 이러한 세포 단계의 반응에 어떤 cytokines나 chemokines이 관여하고 있는지를 계속적으로 보고하고 있으며, 각종 치료 제제를 투여함으로써 그러한 기전에 변화를 초래하는 기전들을 구체적으로 제시하고 있다. 한방 제제의 효과에 대한 이러한 분자생물학적 방법을 통한 구체적인 검증이 점차 이루어지고 있으나 아직까지 解表二陳湯加減方에 대한 연구 보고는 없었다.

이에 저자는 천식 치료에 임상적 효과가 인정된 解表二陳湯加減方的 염증 및 알레르기 반응에 대한 구체적인 기전을 관찰하기 위하여 호흡상피 조직세포에서 추출한 RNA를 이용한 RT-PCR analysis를 통하여 IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α 등의 cytokines에 대한 전사(transcription) 효과를 방해하거나 감소시키는 효능(효능)을 알아보았다.

여러가지 cytokines에 전사 합성에 대한 영향력을 조사하기 위하여 몇 가지 알려진 cytokine 활성 물질을 세포에 투여하여 시간마다 얼마나 cytokine 활성도가 극대화 되는지를 관찰하였다. 대표적으로 알려진 IL-4, IL-5의 inducer인 DNP-IgE(75 ng/ml)와 A23187 Calcium inophore(1 μ M)+PMA(50 nM)을 이용하였는데, 각각의 inducer는 3시간을 기점으로 그 합성도의 극대치를 기록하였으며, IL-5에서는 Inophore+PMA보다 DNP-IgE가 3시간 이후 보다 높은 활성도를 보여 주었으나 시간별에 따른 추이를 보면 활성도의 증가 정도는 Inophore+PMA가 월등하게 앞서 작용하였다. IL-4, IL-5 두가지 모두 3시간 이후에는 거의 100% 전후에 전사능을 보여주었다 (Table 4, Fig. 2, 3).

解表二陳湯加減方은 IL-4의 전사도에 있어 대조군에 비하여 10% 농도에서는 83%, 1% 농도에서는 98%, 0.01% 농도에서는 96%로 약간의 전사 억제 효과를 나타내었으며 0.1% 농도에서는 큰 차이가 나타나지 않았다(Table V, Fig. 4). IL-5의 전사도에 있어 대조군에 비하여 10% 농도에서 97%, 1% 이하 농도에서는 99%로 경미한 전사 억제 효과를 나타내었다 (Table 4, Fig. 5).

그러나 IL-1, IL-10, IL-13, TNF- α 의 전사억제능에 대한 결과는 대조군과 크게 차이점이 없음을 볼 수 있는데, 이는 解表二陳湯加減方的 cytokine 전사억제능이 IL-1, IL-10, IL-13, TNF- α 에서는 없는 것으로 생각된다. 그러므로 解表二陳湯加減方은 IL-4와 IL-5에 직접적으로 연관하여 이에 관계되는 천식 발현과정을 억제시킴으로써 천식 억제에 대하여 효능이 있다고 볼 수 있다.

Interleukin은 만성적인 기도 염증에 의한 pathogenesis에 연관되어지고 있다. 특히 IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13의 발현은 사람에서 천식을 일으키는 주요 원인으로 연구되어지고 있다^{8,17)}.

IL-4는 천식에 매우 중심적인 중요한 역할을 하는데 IgE 합성에 의한 B cell의 Isotype switching이 이루어져 Th2의 proliferation을 촉진시켜 주고 IFN- γ 를 Th1 cell에 의해 만들어 주고 있다¹⁸⁾. 이러한 천식에서 IL-4의 중요성은 IL-4 knockout mice에서 allergic inflammation이 생기는 과정을 실험상 증명하여 알게 되었다. IL-4 knockout mice에서는 호산구 유도가 없었으며 이것은 대조군과 현격한 차이점으로 보여졌다.

위의 사실들로 미루어 보아 IL-4는 실제로 임상환자 치료에 있어서 천식 치료 목표가 될 수 있고 실제로 천식의 치료에 획기적인 결과를 낼 수 있는 잠재력을 가졌다고 할 수 있다. 그러므로 본 실험에서 보여준 IL-4의 전사에 대한 결과는 한의학 처방의 당체가 이러한 복잡한 대사관계를 면역학적 그리고 분자 수준에서 특히, IL-4의 전사를 막아줌으로써 실제 임상에서 천식 환자의 치유에 중요한 의미를 찾을 수가 있다.

IL-5는 많은 연구에서 보고되었듯이 공기 전염으

로 인한 천식 환자에게 비정상적으로 많은 양이 검출되었고 이러한 이유로 결국 생리적 독성작용으로 천식이 더욱 심해진다는 보고가 있다. GM-CSF, IL-3, IL-5가 작용하여 호산구 생성, 성장 및 활성화에 영향을 미친다는 결과가 보고된 바 있다. IL-5는 세포 운동에 의한 f-Met-Leu-Phe와 같은 주화성 작용에 대한 상응작용으로 호산구가 작용하게 하여 준다는 사실도 알려졌다. 또한 실험용 쥐에서는 IL-5는 B cell에 영향을 준다는 것이 밝혀지기도 했다. 결국 IL-5는 호산구의 분화와 생성을 유도하는데 중추적 역할을 하는 것이 In vivo 에서 연구 결과로 보고되어지고 있다¹⁷⁾.

이러한 결과들로 미루어 볼 때 본 실험에서 보여준 것과 같이 IL-5의 전사 활성을 解表二陳湯加減方の 당제가 억제하는 억제능의 관찰은 고무적인 것이라 할 수 있겠다. 그러나 解表二陳湯加減方の 당제와 다른 가능한 당제에 대한 실험과 구체적인 억제능과의 관계는 더 연구해야 할 대상으로 생각된다.

염증유발 cytokines는 IL-1, IL-6, TNF- α 의 3가지로 보통 분류되어 왔는데, TNF- α 역시 비강점막의 비만세포에서 발견되었다. 이 cytokine은 비만세포의 비조정에 의해 발견되며 비강에 항원 침범후 2분 전후로 비강 세척액에서 발견되어지는 것을 알 수 있었다. TNF- α 는 기관지 근섬유아세포에 의한 GM-CSF 생성을 자극함이 밝혀졌다¹⁸⁾.

IL-10은 여러 세포들에서 만들어지는데 Th1, Th2, 비만세포 그리고 수지상 세포에서도 관찰되어진다. IL-10의 대사 경로를 연구하다 보면 이 factor를 이용하여 천식의 알레르기 질환 치료에 관련된다고 생각이 들며, 특히 IL-10이 TNF- α 와 IL-12의 생성을 suppression하며 Th2 cell에 우선적으로 작용하는 특이성을 가지고 있는 점으로 볼 때 이러한 대사관계가 입증된 바가 있다^{11,20)}.

IL-13은 in vitro 연구 결과에 의하면 IL-4와 유사한 효과를 보여주는데 예를 들어 B cell의 자극과 immunoglobulin의 생성을 IgE와 함께 유도해 내는 것과 monocyte transformation을 dendritic cell에서 이루어내는 점 등이다²¹⁾.

이와같이 IL-1, IL-10, IL-13 및 TNF- α 등은 천식 발병과 연관되어 있는 cytokines이지만 解表二陳湯加減方を 이용한 본 실험에서는 이러한 cytokines의 전사에는 큰 영향이 없는 것으로 밝혀졌다. 解表二陳湯加減方이 천식에 미치는 영향은 IL-4와 IL-5의 전사능을 억제하여 IgE의 합성을 저해하고, 후기반응에 큰 영향을 미치는 호산구의 활성화 저해를 통하여 치료효과를 나타내는 것으로 생각된다.

천식 치료에 임상적으로 유용한 한의학 처방에 대한 RT-PCR 분석을 이용한 cytokines 및 chemokines의 작용 변화에 미치는 영향을 실험적으로 규명함으로써 기존의 한의학 이론에 근거한 치료방법에 대한 객관적인 검증을 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 아울러 이 연구에 도입된 분자생물학적 실험을 통하여 규명된 유전자(gene)단계에서의 cytokines와 chemokines의 작용 기전을 근거로 하여 동물실험 및 임상에 사용될 수 있는 천식 치료의 한방제제 개발에 보다 객관적이고 구체적인 학문적 기초를 제공할 수 있으리라 기대된다. 이 연구에 사용되어진 RBL-2H3 세포주 외에 호흡기 상피세포주 및 기관지 평활근세포주, 혈관내피세포주 등을 이용한 실험을 통하여 보다 특이적인 천식 모델 분석이 계속되어야 할 것이며 또한 유효성이 인정되는 항목에 대하여 향후 보다 구체적이고 심도있는 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

결론

解表二陳湯加減方 水煎 액기스를 RPMI 1640의 배지내에서 10%, 1%, 0.1%, 0.01% 농도별로 점적하여 RBL-2H3 세포주를 이용한 천식 모델 丙의 cytokine의 발현에 미치는 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DNP-IgE 및 Calcium inophore+PMA 처리 3시간에 IL-4 및 IL-5의 발현이 극대화되었다.
2. IL-4의 전사도는 대조군에 比하여 10% 검액에서는 83%, 1% 검액에서는 98%, 0.01% 검액에서

는 96%로 억제 효과를 나타내었고, 0.1% 검액에서는 차이가 없었다.

3. IL-5의 전사도는 대조군에 比하여 10% 검액에서 97%, 1%, 0.1%, 0.001% 검액에서는 99%로 경미한 전사 억제 효과를 나타내었다.
4. 모든 농도의 검액에서 IL-1, IL-10, IL-13 및 TNF- α 에 대한 전사도에는 변화가 없었다.

참고문헌

1. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울:民瑞出版社. 1991;187-195.
2. 丁奎萬. 알레르기과 韓方. 서울:第一路. 1990;15-17, 183-192.
3. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1983;480-481.
4. 李龍城. 經藥分類典. 서울:壽文社. 1979;14,15,29,38, 40,41,44,47,48,52,57.
5. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院. 1981;56-59,66,67,194, 203,281,329,333-335,338-339,342-344,348,352,488-489.
6. 金承洙, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 解表二陳湯이 알레르기 喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響. 大韓韓方內科學會誌 1999;19(2);59-73.
7. 朴東一, 鄭昇杞, 李珩九. 加味解表二陳湯이 肺損傷에 미치는 影響에 對한 實驗的 考察. 大韓韓醫學會誌 1985;8(1);20-29.
8. Umetsu DT, Dekruyff RH. Th1 and Th2 CD4 cells in the pathogenesis of allergic diseases. Exp. Biol. Med. 1997;215;11-20.
9. 김광혁 외 25人. 세포·분자 면역학. 서울:정문각. 1998;297-370.
10. 강세용, 심재정, 조재연 외 13명. 천식 환자에서 증상의 정도에 따른 IL-4유전자 다형에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 1998;46(3);529-535.
11. 이숙영, 윤형규, 신 윤 외 9명. 기관지 천식에서 기관지폐포세척액내 IL-10과 기도염증정도의 연관성. 결핵 및 호흡기질환 1999;46(1);44-52.
12. Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. J. of investigational allergology and clinical immunology 1997;7(5);270-273.
13. 권오정, 김호중, 김정희 외 10명. 결핵균 독성 여부에 따른 기도 상피세포의 Chemokine 발현에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 1997;44(4).
14. 張介賓. 景岳全書. 서울:大星文化社. 上冊 1988;405, 574.
15. 樓 英. 醫學綱目. 台南:北一出版社. 1973;35-37.
16. 葉天士. 臨證指南醫案. 서울:翰成社. 1982;299-300.
17. Sewell WA, Mu H. Dissociation of production of IL-4 and IL-5. Immunol. Cell Biol. 1996;74;274-7.
18. Liu X, Xing Z. A study on IL-4 and IFN- γ regulation IgE synthesis in bronchial asthma patients. Chinese medical journal 1997;110(10);760-763.
19. 천선희. 폐결핵 환자의 폐포 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-8의 분비에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환 1998;45(5);942-952.
20. Lefort J et al. Systemic administration of endotoxin induces bronchopulmonary hyperactivity dissociated from TNF- α formation and neutrophil sequestration into the murine lungs. J. Immunol. 1998;161;474-80.
21. Grunewald SM et al. An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse, inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. J. of immunology 1998;160(8);4004-4009.