

천식 동물모델에서 청피의 치료 효과 - 혈관내피성장요인의 측정을 통하여

이해자*

원광대학교 한의과대학 소아과학교실

Effectiveness of Citri Reticulatae Viride Pericarpium in the Bronchial Asthma Animal Model : Assessment on the vascular endothelial growth factor (VEGF)

Hai Ja Lee*

Department of pediatrics Collage of Oriental Medicine, Wonkwang University

Purpose : We hope to evaluate the effectiveness of Citri Reticulatae Viride Pericarpium for the bronchial asthma using assesment on the vascular endothelial growth factor after Citri Reticulatae Viride Pericarpium was intravenously administered OVA-sensitized and -challenged mice. **Material and methods :** Eleven female mice, 8-10 weeks of age and free of murine specific pathogens, were used. Of the eleven mice, one mouse was not sensitized and ten mice were sensitized by intraperitoneal injection of OVA. Of the sensitized mice, three mice didn't administrate Citri Reticulatae Viride Pericarpium and seven mice administrated Citri Reticulatae Viride Pericarpium. Mice were sensitized on days 1 and 14 by intraperitoneal injection of 20 µg OVA. On days 21, 22, and 23 after the initial sensitization, the mice were challenged for 30 minutes with an aerosol of 1% OVA in saline. Citri Reticulatae Viride Pericarpium administered 200mg/kg in the tail of the mouse, one time per day, for 7 days, beginning 14 days after first sensitization. Bronchoalveolar lavage was performed 72 hours after the last challenge, and level of VEGF in the BAL fluid were measured by Western blot analysis. **Results :** Western blot analysis revealed that VEGF protein levels were increased in the all three mice which were challenge with OVA without administered Chung-pi compared the normal mouse. However, in the groups of the administered Chung-pi, the VEGF protein level markedly decreased in six of seven mice. **Conclusion :** Citri Reticulatae Viride Pericarpium might be effect the treatment of the bronchial asthma as a inhibition of the VEGF.

Key words : Citri Reticulatae Viride Pericarpium, vascular endothelial growth factor (VEGF), bronchial asthma

서 론

천식은 특이적인 알레르겐이나 비특이적인 자극에 의하여 기관지 점막부종, 점막분비증가 및 기관지 평활근의 수축이나 경련 등에 의하여 가역적이고도 반복적으로 광범위한 기도 폐쇄과 기관지 과민성 및 기도의 만성 염증을 나타내는 증후군을 말한다^{1,2)}.

靑皮는 薑香科에 속한 常綠小喬木인 귤의 未成熟果實의 果

皮를 乾燥한 것으로 疏肝破氣, 散結消痰의 효과가 있어, 胸脇胃脘疼痛, 疝氣, 食積, 乳腫, 乳核 및 久癆痞塊를 治療하는 약제로 알려져 있다^{3,4)}. 이⁵⁾는 靑皮가 기관지의 평활근에 작용하여 근이완을 시킨다고 하였고, 이⁶⁾등은 靑皮가 뇌혈류역학에 미치는 실험적 연구에 관한 보고는 있지만, 청피가 천식 치료제로써 역할에 대해서는 밝혀진 바 없다.

기관지 천식의 유발인자나 원인에 대해서는 많은 보고가 있다⁷⁻¹⁰⁾. 이⁷⁾등은 TDI로 유발한 천식 쥐모델에서 혈관내피성장요인(vascular endothelial growth factor, VEGF)이 천식에 관여한다고 말했다. VEGF는 혈관증식에 매우 중요한 역할을 하는 것은

* 교신저자 : 이해자, 전북 군산시 지곡동 29-1 원광대학교 부속 군산의료원
· E-mail : yibeads@kunmed.or.kr, · Tel : 063-472-5263
· 접수 : 2003/09/23 · 수정 : 2003/10/30 · 채택 : 2003/11/17

로 알려져 있으며, 혈관의 투과성을 증가시켜 혈장내 단백질이 혈관외로 쉽게 이동할 수 있도록 함으로써 부종과 세포의 기질의 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 특히, 천식에서 VEGF는 기도의 염증과 기도의 과민반응에 영향을 준다.

이에 저자는 천식 유발 쥐모델에 청피를 주입한 후 VEGF의 변화를 관찰함으로써 청피가 천식 치료에 관여하는 기전을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

Korean Research Institute of Chemistry Technology (Daejeon, Korea)에서 병원체에 감염되지 않고, 특이한 항원에 노출되지 않은 쥐를 구입하였고, 실험내내 laminar flow cabinet에서 사육하였다. 이 연구에서 사용된 모든 쥐는 전북대학교병원 동물사육 위원회(the Institutional Animal Care and Use Committee of the Chonbuk National University Medical School; Chonju, South Korea)에서 인정하는 기준에 따랐다. 쥐는 8-10주 된 쥐를 대상으로 하였다.

1) 동물모델

특별한 항원에 대해서 감작되지 않은 8-10주 된 쥐 11마리를 대상으로 하였다. 1마리는 천식을 유발하지 않았으며, 10마리에서는 OVA를 이용하여 천식을 유발하였다. 천식 유발은 20 µg의 OVA(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)을 aluminum hydroxide(Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA) 1 mg과 혼합하여 총 200 µl을 복강내로 주입하였다. 처음 주입한 후 14일 후에 같은 방법으로 다시 복강내로 OVA를 주입하여 감작시켰다. 처음 감작시킨 날로부터 21일째, 22일째, 23일째 되는 날 초음파 분무기(NE-U 12; Omron Corp., Tokyo, Japan)를 이용하여 1%(wt/vol) OVA aerosol을 30분씩을 분사시켜서 다시 감작시켰다. 마지막 감작을 시킨 날로부터 72시간 후에 기관지경 세척술을 시행하였다(Fig 1).

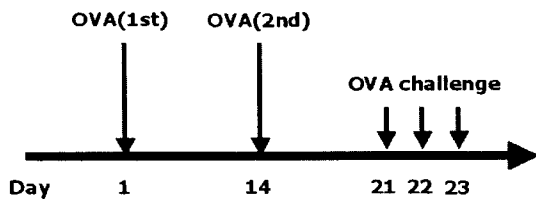


Fig 1. Schematic diagram of the experimental protocol. Mice were sensitized on days 1 and 14 by intraperitoneal injection of OVA emulsified in 1 mg aluminum hydroxide. On days 21, 22 and 23 after the initial sensitization, the mice were challenged for 30 minutes with an aerosol of 1%(wt/vol) OVA in saline using an ultrasonic nebulizer.

기관지경 세척술(bronchoalveolar lavage, BLA) 후에 쥐는 sodium pentobarbitone(pentobarbital sodium, 100mg/kg body weight)를 복강내로 과량 투여하여 희생시켰다. 개흉을 한 후 조심스럽게 기관지삽관술을 시행하여 삽관된 관내로 소관을 삽입하였다. 0.9% 생리식염수를 천천히 폐내에 주입한 후 다시 빼냈다. 세척술을 시행하여 얻은 용액은 원심분리 후 다시 사용할 때까지

-700에서 상층액을 보관하였다. 총 세포수는 hemocytometer를 이용하여 측정하였으며, BAL세포는 cytopsin (Shandon Scientific Ltd., Cheshire, United Kingdom)으로 준비한 후 Diff-Quik용액(Dade Diagnostics of Puerto Rico Inc., Aguada, Puerto Rico)으로 염색한 후 세포를 검사하였다. 두 검사자가 서로 독립적으로 현미경하에 검사하였으며, 무작위로 서로 다른 네 곳에서 400개의 세포를 측정하였다. 두 검사자간의 편차는 5%로 이내였으며, 두 검사자의 평균값을 각각의 세포수로 정하였다.

2. 靑皮의 정제 및 주입방법

靑皮 200g에 3차 증류수 1.8L를 환저플라스크에 넣고, 냉각기를 부착하여 2시간 전열기로 증탕한 후 3,000rpm에서 20분간 분리하고 진공압축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간 동안 동결 건조하여 30g의 분말시료를 얻었다. 이렇게 얻은 靑皮 분말을 증류수에 녹여 200mg/kg을 10마리 중 7마리 쥐의 꼬리에 하루에 한 번 정맥주사하였다. 두 번째 OVA를 복강내에 주입한 후 청피를 7일동안 매일 정맥 주사를 하였으며, 마지막 감작 후 72시간에 기관지 세척술을 시행하였다(Fig 2).

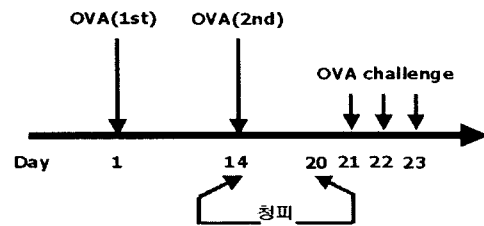


Fig 2. Chung-pi was administered intravenous one time per day to each treated animal from 14 days to 20 days.

3. BAL fluid에서 VEGF의 측정:

VEGF의 범위는 manufacturer's protocol(R&D system, Minneapolis, MN)에 따라 효소 면역분석(enzyme immunoassays)에 의해 정량화 하였다. 보통 쥐에서 검출할 수 있는 VEGF의 범위는 3pg/ml이하이다. VEGF의 범위는 Western blot analysis의 방법을 이용하여 측정하였다. BAL 용액은 OVA로 천식 유발된 쥐의 기관지에서 0.8ml생리식염수와 함께 얻은 후 1분 동안 4000x g로 원심 분리시켰다. 이렇게 해서 얻어진 상층액은 Bradford reagent(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 정량화 하였으며, 3µg의 BAL 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 놓은 후 120 V로 90분간 electrophoresis시켰다.

4. 통계학적인 비교

통계학적인 비교는 one-way ANOVA를 이용하였으며, 대조군과 실험군 사이의 비교는 Student's t test를 이용하였다.

결 과

1. BAL 용액내의 세포변화:

정상 쥐(n=1)의 BAL 용액과 비교시 천식 유발 쥐모델에서

는 BAL용액내에 있는 총 세포의 수는 10마리 모두 72시간에 상당히 증가하였다(Fig 3). 각각의 세포를 비교시 림프구, 호산구, 그리고 포식세포의 수가 증가하였다. 청피를 투여한 쥐(n=7)의 BAL 용액의 경우 청피를 투여하지 않은 쥐모델(n=3)과 비교시 각각의 세포수(림프구, 호산구, 포식세포)의 수는 감소하였으나 통계적으로 유의하게 감소하지 않았다(> 0.05).

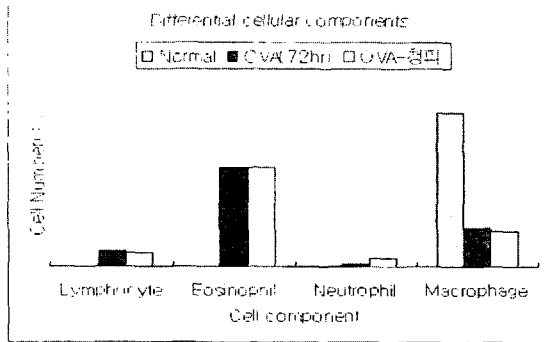


Fig 3. Effect of Chung-pi on total and differential cellular components of BAL fluids in the OVA-sensitized and -challenged mice. Sampling was performed at 72 h after treatment with Chung-pi. The numbers of each cellular component were counted. Bars represent the mean \pm SD from two independent experiments.

2. BAL 용액내의 VEGF의 변화:

Western blot analysis상 정상 쥐모델(n=1)과 비교시 천식 유발 쥐 모델에서(n=10) BAL 용액내에 있는 VEGF의 범위는 매우 증가하였다. 하지만, 청피를 주입한 경우 7마리 중 6마리에서 VEGF의 범위가 청피를 주입하지 않은 모델과 비교시 매우 감소하였다(Fig 4).

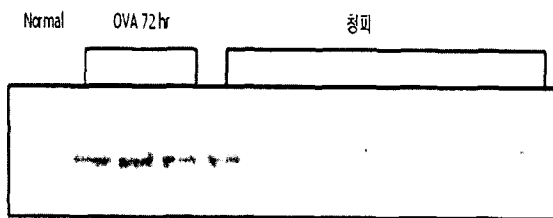


Fig 4. Effect of Chung-pi on VEGF secretion in BAL fluids of OVA-sensitized and -challenged mice using Western blot analysis. Data represent the mean \pm SD from two independent experiments.

고찰

이 연구에서 천식 유발 쥐모델을 통해서 청피가 VEGF의 분비를 억제시켜서 천식 치료에 효과가 있음을 처음으로 밝혔으며, 천식 치료제로서 청피의 역할은 VEGF의 분비를 억제시켜서 기도의 부종을 감소시킴으로써 기관지 내경을 확장시켜 증상을 호전시킴을 알 수 있었다.

천식은 가역적 기도폐쇄, 기도염증 반응, 기도과민반응을 특징으로 하는 질환이다. 기관지 평활근의 수축으로 기관지 내강이

좁아지는 데다, 점막의 부종과 진하고 끈끈한 점액이 과잉 분비되어 호흡곤란등의 기관지 폐색의 증세를 일으킨다²⁾. 한의학에서 喘息은 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 증상을 주 증상으로 하는 哮喘證에 해당하며¹¹⁾, 哮喘의 원인은 痰結喉間, 與氣相擊이라 하여¹²⁾ 담음을 제거하는 치료방법을 주로 사용하고 있다. 哮喘證의 치료에 있어서 한의학에서는 급성 발작기에 기관지 평활근 수축에 현저한 이완효과를 나타내어 기관지 수축으로 인한 기관지 천식 및 호천성 기관지염에 유효한 처방으로 알려진 이진탕가감방을 응용하고 있다¹³⁾. 이진탕을 구성하는 약제중 거담의 작용으로 사용되는 진피는 꿀의 성숙 과피이고, 청피는 꿀의 미성숙 과피로 건위의 효능은 청피와 진피가 유사하지만, 청피는 행기시키는 작용이 보다 강하여 실증에 응용되고 있다.³⁾

靑皮는 辛味하여 散하고, 味苦하여 降하며, 性溫으로 血脈을 소통시키기 때문에 疏肝破氣, 消積和滯하는 작용이 있어 대부분 氣滯로 인한 증상에 사용되거나 임상상 活血之劑와 배합하여 기체혈어나 혈어협통등에 응용되고 있다. 최근 각종 氣滯로 인해 氣滯則血滯가 發生되거나, 正氣가 損傷되어 氣虛則血虛가 誘發된 허혈성 뇌질환등에서 청피에 관한 연구가 진행중이다⁶⁾.

천식에 기관지 미세혈관순환이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁵⁾. 기관지 염증이 있을 때, 미세혈관에서 단백질이 기관지로 빠져나오고, 이로 인해 기관지 벽의 부종과 혈관의 확장이 유발되며, 결국은 기도 직경을 좁히게 된다. 천식환자의 경우 정상인보다 기관 점막에 부종과 혈관이 확장되어 있으며, 이런 현상은 VEGF와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

이미 알려진 바와 같이 VEGF는 내피세포성장을 유발하는 강력한 인자 중에 하나이다. VEGF는 호산구 이외에 상피세포, 비만세포, 근육세포에서 분비한다. 이 단백질은 혈관형성에 중요한 역할을 하며, 혈관의 투과성을 증가시키고, 이로 인해 혈장내 단백질을 혈관의 공간으로 빠져나가게 함으로써 기관지 부종을 일으킨다. Asai 등⁹⁾은 VEGF의 양이 정상인보다는 천식환자의 가래에서 증가하였고, 천식환자에서 기도 혈관 투과성과 관련이 있다고 했고, 이 등¹⁰⁾은 TDI로 천식 유발 쥐 모델에서 VEGF가 천식 유발에 중요한 역할을 하며, VEGF의 분비를 억제시키는 방법이 천식 치료에 좋은 치료 방법이 될 것이라고 말했다. 이 연구는 OVA를 이용하여 쥐에서 천식을 유발하였으며, 다른 연구 결과와 마찬가지로 정상 쥐에 비해서 VEGF의 양이 월등히 증가되어 천식 유발에 VEGF가 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

스테로이드가 부종과 혈관의 과투과성으로 인한 염증을 억제시키는 약제로 잘 알려져 있으며, 기관지 천식같은 호흡기계 염증을 치료하는데 사용되어 왔다. 이 약제는 기관지나 폐포에 있는 상피세포에서 VEGF의 분비를 억제시키는 것으로 알려져 있다. 이⁷⁾ 등은 VEGF억제제를 투여시 호산구가 현저하게 감소되었다고 보고했다. 그러나 저자들의 경우 청피를 투여한 그룹과 하지 않은 그룹에서 천식을 유발하는 세포들 수에 차이를 보이지 않았다. 따라서 靑皮는 호산구보다는 기관지 상피세포에 작용하여 VEGF의 분비를 억제함을 예측할 수 있다.^{8-10,14-17)}

지금까지 천식에 사용되어온 해표이진탕등 처방에 관한 연구는 이루어지고 있었지만¹⁸⁾ 단일약제로써 靑皮의 작용기전에

대해서 알려진 바가 거의 없었다. 또 다른 청피의 실험적 연구에서 청피가 기관지평활근에 acetylcholine의 중간유효량(ED50)으로 수축을 유발시킨후, 청피를 투여한바 청피의 농도가 증가함에 따라 유의한 기관지평활근의 이완효과가 나타난 보고가 있지만, 그 기전에 대해서는 밝혀지지 않고 있다.⁹⁾

이 실험을 통해서 청피의 천식 치료 효과는 VEGF의 분비를 억제시키는 것과 관련이 있음을 알게되었고, 靑皮가 미세 기관지 혈액의 흐름을 도와주는 것으로 사료된다.

이 연구는 청피를 구강으로 투여하지 않고, 정맥투여를 했다. 따라서, 200mg/kg의 용량이 VEGF의 분비를 효과적으로 억제하였지만 구강투여를 한다면 용량을 더욱 증가시켜야 할 것으로 생각되며, 기존 한약의 흡수방법이 구강투여인 점등을 미루어 효과적인 구강투여 용량에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 향후 단일 약제로써 청피에 대한 독성검사가 추가로 필요할 것으로 생각된다.

결 론

Western blot analysis상 정상 쥐모델과 비교시 OVA로 감작 후 청피를 투여하지 않은 쥐모델 모두에서 기관지 세척액 내에 혈관내피성장요인이 증가하였다. 그러나 청피를 투여한 경우 7 마리 중 6마리에서 대조군에 비해서 혈관내피성장요인이 현저하게 감소하였다. 청피는 혈관내피성장요인의 작용을 억제시킴으로써 천식 치료에 효과가 있음을 알 수 있다.

감사의 글

이 연구는 2002년도 원광대학교 교비지원에 의하여 연구됨

참고문헌

- 대한 천식 및 알레르기 학회, 천식과 알레르기 질환, pp244-254, 군자출판사, 서울, 2002.
- 한용철, 임상호흡기학, P208-210, 일조각, 서울, 1998
- 신민교, 臨床本草學, p213-214, 南山堂, 서울, 1984
- 김택제, 이재성, 이경미 : 진피와 청피중 Flavonoid Glycosides의 분리와 정량, J. of korean society of Analytical Science, 4(2):191-195, 1991.
- 이윤석: 각종 평활근에 미치는 청피의 효과, 원광대학교 대학원, 1998.
- 정현우, 오찬호, 은재순: 청피가 뇌혈류 역학에 미치는 실험적 연구, 대한동의 병리학회 16(1), pp104-110, 2002.
- Lee YC, Kwak YG, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. J Immunol. 1;168:3595-600, 2002.
- Asai K, Kanazawa H, Kamoi H, Shiraishi S, Hirata K, Yoshikawa J. Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. Clin Exp Allergy. 33:595-599, 2003.
- Kanazawa H, Asai K, Hirata K, Yoshikawa J. Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Med. 1;114:354-358, 2003.
- Boulay ME, Boulet LP. Airway response to low-dose allergen exposure in allergic nonasthmatic and asthmatic subjects: eosinophils, fibronectin, and vascular endothelial growth factor. Chest. 123:430, 2003
- 李珩九, 鄭昇紀, 東醫肺系內科學, 187-195, 民瑞出版社, 서울, 1991.
- 허준, 동의보감, p480-481, 남산당, 서울, 1981.
- 김승주, 정연재, 정승기, 이형구, 해표이진탕이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향, 대한한방내과학회지, 19(2), p59-73, 1999.
- Demoly P, Maly FE, Mautino G, Grad S, Gougat C, Sahla H, Godard P, Bousquet J. VEGF levels in asthmatic airways do not correlate with plasma extravasation. Clin Exp Allergy. 29:1390-1394. 1999.
- Asai K, Kanazawa H, Otani K, Shiraishi S, Hirata K, Yoshikawa J. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin levels in induced sputum from asthmatic subjects. J Allergy Clin Immunol. 110:571-575, 2002.
- Lee YC, Lee HK. Vascular endothelial growth factor in patients with acute asthma. J Allergy Clin Immunol. 107:1106, 2001.
- Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. J Allergy Clin Immunol. 107:1034-1038, 2001.
- 백동진, 정희재, 이형구, 정승기 : 해표이진탕가감방이 천식 모델내의 cytokine에 미치는 영향, 대한한의학회지, 21(3), pp57-67, 2000.