

생쥐의 B 細胞에서 anti-CD40과 rIL-4로 유도된 사이토카인 생산과 면역글로블린 E에 대한 加味治哮喘의 효과

함철인 · 박양춘*

대전대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Kamichihyo-san on Anti-CD40 and Recombinant Interleukin-4 Induced Cytokine Production and Immunoglobulin E in Highly Purified Mouse B Cells

Chul in Ham, Yang chun Park*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Taejon University

In order to evaluate the antiallergic effects of Kamichihyosan(KCHS), studies were done. We measured the cytotoxic activity for lung fibroblast cell, cytokines transcript expression, production of IL-4, IL-10, IFN- γ , proliferation of B cell in anti-CD40mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. The results were obtained as follows: KCHS was not showed cytotoxicity in the fibroblast lung cell, KCHS increased the gene synthesis of INF- γ , TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-10(m-RNA), KCHS decreased the gene synthesis of IL-4, IL-5, TGF- β (m-RNA), KCHS decreased the appearance of IL-4, IgE significantly, KCHS increased the appearance of IL-10, IFN- γ significantly, KCHS decreased the proliferation of B cell significantly, The facts above prove that KCHS is effective against the allergy. Thus, I think that we should study on this continuously.

Key words : Kamichihyosan(加味治哮喘), IL-4, IL-10, IFN- γ , antiallergic effects

서 론

最近 20~30年間に 있어온 알레르기 疾患의 지속적인 増加는 生活環境의 變化가 發病에 重要하게 關係하는 것으로 보는데 특히 1960年代에 비해서 2000年代에 呼吸器 알레르기 疾患의 有病율이 3~5배 増加하였다¹⁾. 알러지란 人體가 외부로부터 침입한 異物質에 對항하여 나타나는 免疫反應이 자신에게 有害하게 작용하는 것을 말하는데 過敏免疫反應이라고도 한다²⁾. 過敏免疫反應은 네 종류로 나뉘는데 第一型 過敏免疫反應은 IgE 媒介 過敏免疫反應이라고도 불린다. 즉 抗原에 對한 IgE 抗體가 生産되어 이 抗體가 組織 肥滿細胞와 血液 好鹽基球에 結合되면 이들 細胞는 細胞內 顆粒들이 파괴되면서 藥理學的 活性媒介物質을 분비하고 이들 媒介物質은 血管擴張과 平滑筋 收縮 등을 일으

킨다³⁾. 加味治哮喘은 金⁴⁾의 《晴崗醫鑑》에 기재된 治哮喘에 潤肺化痰을 강화할 목적으로 百部根을 加한 處方⁵⁾으로 大田大學校 附屬韓方病院 肺系內科에서 氣管支喘息 等に 緩解劑로 用하는 處方이다.

최근 韓藥의 抗알러지 效果에 對한 實驗的 研究가 多樣하게 이루어지고 있으며⁶⁻⁹⁾, 加味治哮喘에 對한 研究로는 金¹⁰⁾이 pertussis로 유발한 알러지反應에서 補助 T 細胞의 스위칭에 미치는 影響을 報告하였다. 이에 著者는 加味治哮喘이 B 세포에서 사이토카인 生産과 IgE에 미치는 影響을 알아보고자 관련 사이토카인의 發顯, IgE 發顯, B 細胞의 細胞增殖에 미치는 效果를 測定하였던 바 有意한 結果를 얻어 報告하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물 및 약제

實驗動物은 雄性 4주령의 BALB/C 생쥐를 韓國化學研究所

* 교신저자 : 박양춘, 청주시 상당구 용담동, 대전대부속 청주한방병원
· E-mail : omdpyc@dju.ac.kr · Tel : 043-229-3705
· 접수 : 2003/09/23 · 수정 : 2003/10/30 · 채택 : 2003/11/17

에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서 2 週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였으며 處方 內容과 1貼의 用量은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Kamichihyo-san

構成藥物	生藥名	用量(g)
半夏	<i>Pinelliae Tuber</i>	6.0
陳皮	<i>Fraxini Cortex</i>	4.0
赤茯苓	<i>Hoelen</i>	4.0
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	4.0
蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	4.0
紫菀	<i>Asteris Radix</i>	4.0
貝母	<i>Fritillariae Rhizoma</i>	4.0
杏仁	<i>Ansu Semen</i>	4.0
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4.0
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	4.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	12.0
百部根	<i>Stemonae Radix</i>	4.0
Total Amount		64.0

2. 시료제조

加味治哮喘散 148g에 증류수 1300 ml을 가하여 열탕추출기(대웅, DWT-1800T)에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX로 여과한 후 減壓 蒸溜裝置 (Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland)로 濃縮하고, 이를 다시 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 얻은 완전 건조된 분말을 冷凍 (-84℃) 保管하면서 적당한 濃度로 희석하여 사용하였다.

3. 시약 및 기기

Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), magnesium chloride(MgCl₂)은 Sigma社(U.S.A.)제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa社 (Japan) 제품을, 역전사효소(moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega社 (Madison, U.S.A.) 제품을, RNazolB는 Tel-Test社(U.S.A.) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Logan, U.S.A.)은 Hyclone社(Logan, U.S.A. 제품, 그리고 agarose(FMC, U.S.A.)등을 사용하였고, 유세포 형광분석에 사용된 phycoerythrin (PE)-anti-rat conjugate Ig, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-IgE는 Pharmingen社(Torreyana, U.S.A)의 제품을, 3H-thymidine, Sephadex G-10은 Amersham Pharmacia社 (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

本 研究에 使用된 機器는 bright microscope(Nikon, Japan), inverted microscope(Nikon, Japen), flow cytometry(Becton

Dickinson, U.S.A) spectrophotometer(shimazue. Japan), CO₂ incubator(napco, Gernay), imager II photo-system(Bioneer, Korea), 遠心分離器(centrikon, Sigma), bio-freezer (sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice-maker(vision科學, Korea) 및 homogenizer (OMNI, U.S.A) 등의 것을 使用하였다.

4. 방법

1) 세포 배양

생쥐의 정상 lung fibroblast 세포 (mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐(lung)조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 후 conical tube(15 ml)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리하였다. Tube에 DMEM (containing collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics(penicillinm 104 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml))를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양한다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 105세포/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

2) 세포 毒性(cytotoxicity) 測定

세포독성방법은 SRB assay法¹¹⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs 세포는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 加味治哮喘散(최종 농도 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액(PBS)로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50µl를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온(room temperature)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A.)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices, USA)에서 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) B 세포分離 및 培養

BALB/C 생쥐에서 비장을 분리하여 비장세포(spleen cell)를 채취하여 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 이에 적혈구용혈액(Sigma) 2 ml를 넣고 37℃ 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10 ml의 D-PBS를 첨가하여 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다. 분리한 비장세포에 J1J, GK153, M1/70 배양상층액(1 ml/10⁸세포) 그리고 Thy-1.2 Ab 40 µl을 처리한 후 얼음에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 2회 D-PBS로 수세한 후 rabbit complement lyophilised (Serotec., U.K) 0.5 ml을 처리한 후 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 5회 complete medium으로 수세하고 Sephadex

G-10 column(Amersham Pharmacia, USA)에 통과시켜 B 세포를 분리하였다. B세포 함량을 측정하기 위하여 α -B220-FITC를 이용하여 유세포형광분석기(flow cytometry)로 분석하였다.

4) B 세포에서 사이토카인 遺傳子發見 分析

(1) B 세포에 加味治哮喘 處理

생쥐 B세포를 분리하여 24 well plate의 각 well에 1×10^6 세포씩 분주하고, 加味治哮喘 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하였고, 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb(500 ng/ml)과 rmIL-4(recombinant mouse interleukin-4, 500 U/ml, PharMingen)를 동시 배양하였다. 加味治哮喘 추출물과 anti-CD40 mAb와 rmIL-4를 동시배양하여 6시간 후 배양 상등액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

(2) B 세포의 RT-PCR

① RNA 추출

배양종료 후 상등액을 제거한 후 RNAzolB를 이용하여 생쥐 B세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. RNAzolB를 1/10 양으로 CHCl_3 (chloroform: 40 $\mu\text{l}/400 \mu\text{l}$ RNAzolB)을 넣은 후 15 초간 vortex로 혼합하고 얼음 (ice)에서 15분간 방치하였다. 고속원심분리기(4°C)로 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하고 천천히 흔들어 주었다. 그리고 고속원심분리기(4°C)로 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고, 1 ml의 80% EtOH/DEPC D.W를 넣고 살짝 vortex후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액을 다시 제거한 speed-vac으로 건조시켰다. DEPC/D.W(0.05%)로 추출한 total RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μl 의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μg 을 75°C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 μl 10 mM dNTPs mix, 1 μl random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25 μl), RNA inhibitor로서 1 μl RNase inhibitor (20 U/ μl), 1 μl 100 mM DTT, 4.5 μl 5 \times RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2)를 가한 후, 1 μl 의 M-MLV RT(200 U/ μl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-mlv RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μl 의 cDNA를 주형으로 사용하였고, 주형에 대한 primer는 β -actin, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-4(IL-4), interleukin-5(IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10(IL-10), TGF- β 1, IFN- γ , tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 증폭하기 위하여 sense primer(20 pmole/ μl)와

antisense primer (20 pmole/ μl)를 혼합하여 1 μl 를 가하고, 다시 3 μl 2.5 mM dNTPs, 3 μl 10 \times PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl_2), 그리고 0.18 μl Taq polymerase(5 U/ μl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μl 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation ; 95°C, 5분, denaturation ; 95°C, annealing ; 55°C, 1분, elongation ; 72°C, 1분을 25cycles한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μl 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다. Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

Table 2. Oligonucleotide sequences of primers Used for Quantitative RT-PCR

Gene	Primer	Sequence
β -actin	Sense	5'-TGGAACTCCTGATCCATGAAC-3'
	Antisense	5'-TAAACCGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
IL-1 β	Sense	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
	Antisense	5'-AGCCCATGAGTTCATTCAC-3'
IL-4	Sense	5'-ATGAACCTCTCTCCACAAGCGC-3'
	Antisense	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
IL-5	Sense	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAT-3'
	Antisense	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'
IL-6	Sense	5'-CCGTCGATAGTGGCATCCATGAAAC-3'
	Antisense	5'-GGACCAATACCTGCTATAGGG-3'
IL-10	Sense	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAT-3'
	Antisense	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'
TNF- α	Sense	5'-AACACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
	Antisense	5'-TAAGTCAGTTTAAATGCTTAGGG-3'
TGF- β	Sense	5'-ACACAGTACAGTACAGTA-3'
	Antisense	5'-CCGTAGATACGTTAAAC-3'
IFN- γ	Sense	5'-AAGGAGGTGTCAGAACACTGT-3'
	Antisense	5'-TAGCATGGGGGTGTTGTCITT-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program(AAB, USA)을 이용하여 최고값(height)으로 측정하였다.

5) IL-4, IL-10, IFN- γ 및 IgE 생산량 측정

생쥐 B 세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에 2×10^5 세포씩 분주하고, 加味治哮喘 抽出物(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하였고, 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb (500 ng/ml)와 rmIL-4(500 U/ml)를 10일과 48시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 IFN- γ , IL-4, IL-10 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA, Endogen, U.S.A.)를 48시간, 그리고 IgE ELISA kit(PharMingen, U.S.A.)으로 분비량은 10일 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체 (antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 B 세포 배양상등액(culture supernatant)을 100 μl 씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl 를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl 씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μl 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) B세포의 細胞增殖에 대한 影響

생쥐 B세포의 증식을 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2×10^5 세포씩 분주하고, 加味治哮喘 抽出物(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$,

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하였다. 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb(500 ng/ml)와 rIL-4(500 U/ml)를 72 시간 동안 동시 배양 하였다. 동시배양 40시간 배양 후 50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 [methyl-3H] Thymidine(Amersham, U.S.A.)을 첨가한 후 최종 48시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기를 사용하여 유리섬유여지(Glass microfiber filter, Whatman) 위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

성적

1. 폐섬유세포에서 세포독성에 미치는 영향

폐섬유세포에서 세포독성에 미치는 영향을 살펴본 결과 실험군에서 對照群에 비해 濃度依存的 減少가 있으나 有意性있는 세포독성은 보이지 않았다(Table 3).

Table 3. Cytotoxicity Effects of KCHS on Mouse Lung Fibroblast Cell(mLFC)

	Dose($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Viability(% of control)
Control	0	100.0 \pm 2.7 ^{a)}
	1	99.9 \pm 5.3
	10	98.4 \pm 4.8
KCHS	50	98.5 \pm 3.6
	100	97.9 \pm 2.9
	200	94.6 \pm 6.7

a) : Means \pm standard error, Control : non-treated group. KCHS : pretreated group with various concentration KCHS extract.

2. 생쥐 B 세포에서 사이토카인 遺傳子發顯 分析

1) B 세포에서 IL-1 β 遺傳子發顯

正常群에서는 Ht 값이 64, 對照群의 Ht 값은 93, 實驗群에서는 96, 84, 75로 나타났다(Table 4, Fig. 1).

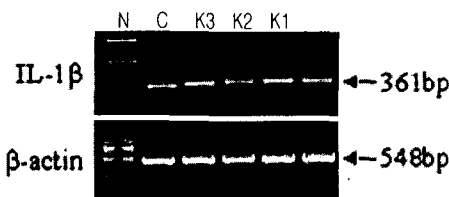


Fig. 1. Effects of KCHS on IL-1 β transcript expression in anti-CD40 plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. N : Non-treated group. C : Anti-CD40 + rIL-4 treated group. K3 : Anti-CD40 + rIL-4 + KCHS(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)treated group. K2 : Anti-CD40 + rIL-4 + KCHS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)treated group. K1 : Anti-CD40 + rIL-4 + KCHS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)treated group.

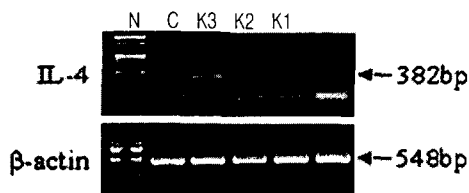


Fig. 2. Effects of KCHS on IL-4 transcript expression in anti-CD40 plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. 단, N, C, K3, K2, K1는 Fig. 1과 상동

2) B 세포에서 IL-4 遺傳子發顯

正常群에서는 Ht 값이 14, 對照群의 Ht 값은 38, 實驗群에서는 14, 13, 42로 나타났다(Table 4, Fig. 2).

3) B 세포에서 IL-5 遺傳子發顯

正常群에서는 Ht 값이 27, 對照群의 Ht 값은 53, 實驗群에서는 25, 50, 40으로 나타났다(Table 4, Fig. 3).

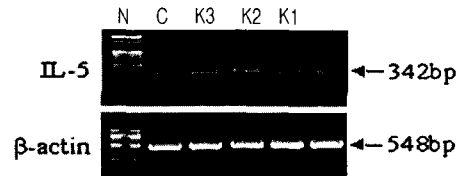


Fig. 3. Effects of KCHS on IL-5 transcript expression in anti-CD40 plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells. 단, N, C, K3, K2, K1는 Fig. 1과 상동

4) B 세포에서 TNF- α 遺傳子發顯

正常群에서는 Ht 값이 149, 對照群의 Ht 값은 122, 實驗群에서는 155, 163, 165로 나타났다(Table 3, Fig. 4).



Fig. 4. Effects of KCHS on TNF- α transcript expression in anti-CD40 plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. 단, N, C, K3, K2, K1는 Fig. 1과 상동

5) B 세포에서 IL-6 遺傳子發顯

正常群에서는 Ht 값이 22, 對照群의 Ht 값은 41, 實驗群에서는 115, 56, 79로 나타났다(Table 3, Fig. 5).

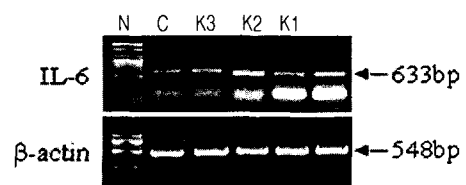


Fig. 5. Effects of KCHS extract on IL-6 transcript expression in anti-CD40mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. 단, N, C, K3, K2, K1는 Fig. 1과 상동

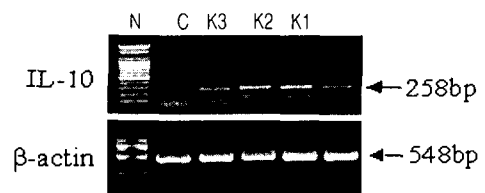


Fig. 6. Effects of KCHS on IL-10 transcript expression in anti-CD40 plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. 단, N, C, K3, K2, K1는 Fig. 1과 상동

6) B 細胞에서 IL-10 遺傳子 發顯

正常群에서는 Ht 값이 27, 對照群의 Ht 값은 35, 實驗群에서는 57, 71, 41로 나타났다(Table 4, Fig. 6).

7) B 細胞에서 TGF-β 遺傳子 發顯

正常群에서는 Ht 값이 215, 對照群의 Ht 값은 234, 實驗群에서는 220, 215, 200으로 나타났다(Table 4, Fig. 7).

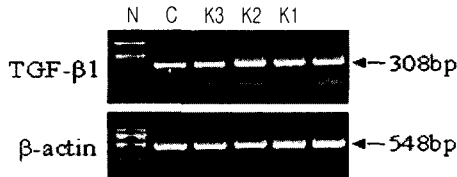


Fig. 7. Effects of KCHS on TGF-β transcript expression in anti-CD40 plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. 단, N, C, K3, K2, K1는 Fig. 1과 상동

8) B 細胞에서 IFN-γ 遺傳子 發顯

正常群에서는 Ht 값이 21, 對照群의 Ht 값은 15, 實驗群에서는 104, 98, 22로 나타났다(Table 4, Fig. 8).

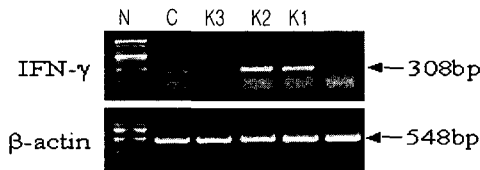


Fig. 8. Effects of KCHS on IFN-γ transcript expression in anti-CD40 plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. 단, N, C, K3, K2, K1는 Fig. 1과 상동

Table 4. Effects of KCHS Extract on Cytokines Transcript Expression in Anti-CD40mAb plus rIL-4 stimulated Murine Splenic B Cells

Cytokine m-RNA expression(Ht)	Group				
	Normal	Control	KCHS(μg/ml)		
IL-1β	64	93	96	84	75
IL-4	14	38	14	13	42
IL-5	27	53	25	50	40
TNF-α	149	122	155	163	165
IL-6	22	41	115	56	79
IL-10	27	35	57	71	41
TGF-β	215	234	220	215	200
IFN-γ	21	15	104	98	22

Table 5. Effects of KCHS Extract on IL-4 Production in anti-CD40mAb plus rIL-4 Stimulated Murine Splenic B Cells

Group	KCHS (μg/ml)	IL-4 production (pg/ml)
Normal	0	65.5±8.4 ^{a)}
Control	0	236.1±15.1
KCHS	100	132.7±9.5 ^{***}

a) : Means ± standard error. Normal : Non-treated group. Control : Anti-CD40 + rIL-4 treated group. KCHS : Anti-CD40 + rIL-4 + KCHS(100μg/ml) treated group. * : P-value : Statistically significant value compared with control data(*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001).

3. IL-4 生成에 미치는 影響

正常群에서는 65.5±8.4 pg/ml, 對照群은 236.1±15.1 pg/ml, 實驗群에서는 132.7±9.5 pg/ml로 나타나 有意性 있는 抑制效果가 나타났다(Table 5).

4. IL-10 生成에 미치는 影響

正常群에서는 52±7.6 pg/ml, 對照群은 187±17.7 pg/ml, 實驗群에서는 284±17.9 pg/ml로 나타나 有意性 있는 增加가 나타났다(Table 6).

Table 6. Effects of KCHS Extract on IL-10 Production in anti-CD40mAb plus rIL-4 Stimulated Murine Splenic B Cells

Group	KCHS (μg/ml)	IL-10 production (pg/ml)
Normal	0	52±7.6 ^{a)}
Control	0	187±17.7
KCHS	100	284±17.9 ^{**}

a), Normal, Control, KCHS는 Table 4와 상동

5. IFN-γ 生成에 미치는 影響

正常群에서는 5.4±0.4 pg/ml, 對照群은 12.5±0.9 pg/ml, 實驗群에서는 21.5±3.8 pg/ml로 나타나 有意性 있는 增加가 나타났다(Table 7).

Table 7. Effects of KCHS Extract on IFN-γ Production in anti-CD40mAb plus rIL-4 Stimulated Murine Splenic B Cells

Group	KCHS (μg/ml)	IFN-γ production (pg/ml)
Normal	0	5.4±0.4 ^{a)}
Control	0	12.5±0.9
KCHS	100	21.58±3.8 [*]

a), Normal, Control, KCHS는 Table 4와 상동

6. IgE 生成에 미치는 影響

正常群에서는 15.9±2.6 pg/ml, 對照群은 86.1±8.1 pg/ml, 實驗群에서는 42.7±9.7 pg/ml로 나타나 有意性 있는 減少가 나타났다(Table 8).

Table 8. Inhibitory Effect of KCHS Extract on IgE Production in Anti-CD40mAb plus rIL-4 Stimulated Murine Splenic B Cells

Group	KCHS (μg/ml)	IgE production (ng/ml)
Normal	0	15.9±2.6 ^{a)}
Control	0	86.1±8.1
KCHS	100	42.7±9.7 ^{***}

a), Normal, Control, KCHS는 Table 4와 상동

Table 9. Inhibitory Effect of KCHS Extract on B Cell Proliferation by Anti-CD40mAb plus rIL-4 Stimulated Murine Splenic B Cells.

Group	KCHS (μg/ml)	B cells production (cpm)
Normal	0	1267±146 ^{a)}
Control	0	31228±2455
KCHS	100	27809±2361 [*]

a), Normal, Control, KCHS는 Table 4와 상동

7. B 세포의 증식에 미치는 영향

정상群에서는 1267±146 cpm, 對照群은 31228±2455 cpm, 實驗群에서는 27809±2361 cpm으로 나타나 有意性 있는 減少가 나타났다(Table 9).

고찰

加味治哮喘은 金⁴⁾의 《晴崗醫鑑》에 기재된 治哮喘에 潤肺化痰을 강화할 목적으로 百部根을 가한 處方⁵⁾으로 大田大學校附屬韓方病院 肺系內科에서 氣管支喘息 등에 緩解劑로 다용하는 處方이다. 그 構成藥物에서 半夏, 桔梗, 貝母, 杏仁, 百部根, 紫菀, 桑白皮는 化痰止咳平喘하고, 麻黃, 蘇葉, 生薑은 發散風寒하고, 陳皮, 枳殼은 理氣化痰하고, 茯苓은 利水滲濕하고 甘草는 調和諸藥하며 潤肺한다¹²⁾.

알레르기 천식을 비롯한 아토피 질환의 발생에서 IgE 항체는 중요한 역할을 하는데 IgE 항체의 생성 정도를 결정하는데는 항원의 성상과 항원에의 반복 노출 외에 개체에 따른 유전적 요소, T 림프구, 사이토카인, FcεRⅡ/CD23 및 IgE 항체에 대한 자가항체 등이 관여한다고 알려져 있다¹⁾. 이러한 IgE를 發顯시키는 B 림프구의 分化는 세 가지 종류의 신호에 의한다. 첫째로 B 세포의 抗原 受容體를 통하여 이루어지는데 抗原 特異的 反應을 결정하는데 中樞的인 역할을 한다. 둘째는 Th2 세포에서 유래된 IL-4, IL-13 같은 cytokine에 의하여 제공된다. 셋째는 B 세포와 T 세포의 interaction에 의하여 제공된다¹³⁾. 이때 B 세포와 Th 세포의 접촉은 B 세포에 대한 增殖 信號를 전달하는데 이때 결정적인 역할을 수행하는 受容體-ligand 짝은 B 세포 表面에는 CD40 이고 활성화된 Th 세포에서는 CD40-ligand이다^{14~16)}.

Th 림프구는 cytokine을 分泌하여 氣道の 炎症反應을 調節하는 중요한 役割을 하고 있다. Th 림프구는 싸이토카인의 分泌 樣相에 따라 Th1, Th2 림프구로 나뉘어 지는데 이중 Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 등을 生産하며 卽時型過敏反應, 氣管支喘息과 같은 알러지성 疾患, 寄生蟲感染에 대한 防禦作用에 관여한다¹⁷⁾. Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 拮抗作用을 나타내어 機能이 抑制되는 現象이 觀察되며 알러지성 氣管支喘息 患者의 기관지 肺胞洗滌液에서는 Th2 림프구의 功能이 活性化됨이 觀察되고 있다¹⁸⁾.

IL-1β는 免疫 및 炎症의 媒介物로서 急性期에 反應하여 免疫反應을 增幅시키는 機能을 하는데^{19,20)} B 前球細胞의 成熟과 抗原 刺戟을 받은 B 세포 增殖을 誘導한다³⁾.

IL-4는 여러 종류의 세포에 다양한 기능을 나타내는 분자량 20kD의 cytokine으로 초기에는 休息 B 세포를 증식시키는 작용으로 알려져 B 세포 成長因子로 불렸다. 주로 Th2 세포에서 생성되나 활성화된 肥滿細胞도 생성한다. IL-4는 B 세포의 細胞期에 따라 그 기능이 달라서 休息 B 세포에 대하여는 活性因子로 작용하여 細胞의 크기가 커지며 細胞表面 MHC 第二抗原과 FcR 發顯을 촉진하며 활성화된 B 세포에서는 成長因子로 작용하여 DNA 합성을 항진시키고 增殖期의 B 세포에서는 分化因子로 작용하여 IgG1과 IgE 분비를 항진시키는 반면에 IgG2a, IgG2b 그

리고 IgM 분비를 抑制한다. 또한 IL-4는 T 림프구와 肥滿細胞의 증식을 촉진하며 大食細胞의 食作用을 항진시킨다. IgE는 第一型過敏免疫反應을 일으키는 중요한 인자이므로 IL-4 생산의 항진은 알러지 반응에서 중요한 역할을 하게된다^{13,21)}.

IL-5는 活性化된 T 세포가 生成하지만 活性化된 B 세포의 增殖을 가져오는 作用과 B 세포가 IgM과 IgG를 生成케 하며 또한 IgA 生成을 亢進한다. 또 B 세포에 IL-2 受容體를 表出시키는 作用도 있고 B 세포가 IL-2의 作用을 입어 增殖 分化하는 것을 補助한다. IL-5는 抗原과 反應한 前殺害 T 세포에 IL-2 受容體를 表出시켜 IL-2의 作用으로 殺害 T 세포로 分化하는 것을 補助하는 일도 한다. 과립구 집락 자극인자(GM-CSF)와 공동으로 未熟好酸球를 增殖시켜 好酸球로 分化시킨다. 또한 好酸球를 活性化하는 役割을 한다^{22,23)}.

IL-6는 活性化된 T 세포에서 生成되며 B 세포가 抗體 生産細胞로 分化하는 最終段階를 誘導하는 物質로서 알려져 있다. 抗原과 反應한 T 세포에도 作用하며 IL-2 受容體를 表出시켜 IL-2를 生成시켜서 增殖을 招來하기도 하고 殺害 T 세포의 發顯도 補助한다²⁴⁾.

IL-10은 B 세포의 증식에는 제한적으로 작용하지만 B 세포가 plasma 세포로 분화된 다음에 고도로 면역글로블린의 생산을 가져온다²⁴⁾. 또한 Th1의 IL-2와 IFN-γ 분비를 抑制한다³⁾.

TNF-α는 단핵식세포 자극으로 IL-1, IL-6, IL-8 생산을 항진하고, T 세포 活性化와 B 세포 抗體 生産 亢進 補助因子로 작용하고 TGF-β는 IL-1, IL-6, TNF의 생성과 作用을 抑制하고 대부분의 細胞의 증식을 抑制하고 炎症反應을 抑制한다³⁾.

IFN-γ는 細胞媒介 Th1 免疫反應의 유도에서 결정적 媒介因子로 작용하고 B 세포의 분화와 증식을 抑制하는데 Th1과 Th2 분화의 주요 調節因子이다. 따라서 IL-4 작용과 拮抗作用을 보여 IL-4에 의한 IgE 생성을 抑制한다^{3,25)}.

이에 著者는 加味治哮喘이 알레르기 면역반응에 미치는 效能을 實驗的으로 糾明하기 위해 anti-CD40, rIL-4의 刺戟에 의한 關聯 cytokine인 IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF-α, TGF-β, IFN-γ의 轉寫能에 미치는 影響, IL-4, IL-10, IFN-γ의 生産에 미치는 影響, IgE의 發顯에 미치는 影響, B 세포 增殖에 對한 抑制效果 등을 測定하였다. 먼저 肺纖維芽細胞에서 細胞毒性에 미치는 影響을 살펴본 결과 實驗群에서 對照群에 비해 濃度依存的 減少가 있으나 有意性 있는 細胞毒性은 보이지 않았다(Table 3, Fig. 1). B 세포의 核으로부터 細胞質로 나오는 斜程上에서 發現되어진 遺傳子合性을 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應으로 살펴볼 때, B 세포에 Anti-CD40과 rIL-4를 處理한 對照群의 Ht 값은 IFN-γ와 TNF-α는 減少하였고 나머지 사이토카인은 增加하였다. 加味治哮喘을 處理한 實驗群에서는 Ht 값이 IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10은 增加하였고, IL-4, IL-5, TGF-β는 減少하였다. 對照群의 Ht 값이 正常群에 비하여 減少 후 增加한 것은 IFN-γ와 TNF-α였으며, 增加 후 減少한 것은 IL-4, IL-5, TGF-β이었다(Fig. 2~9, Table 4). 이것은 pertussis로 유발한 알러지 반응에서 加味治哮喘이 IFN-γ는 增加시켰으나 IL-4를 減少시키지는 않았다는 김¹⁰⁾의 결과와 차이가 있는데 이는 자극 항원이 다른 in vivo 실험과

의 차이에 기인하는 것으로 생각되며 향후 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

IL-4, IL-10, IFN- γ 의 생산량의 측정에서 加味治哮喘이 각각有意性있게 IL-4의 생성을 抑制하였고, IL-10의 생성을 增加시켰고, IFN- γ 의 생성을 增加시켰다(Table 5~7). Th1 세포의 IFN- γ 를 抑制하는 IL-10의 遺傳子 發顯과 生成량이 增加되었으나 동시에 IL-4가 減少하고 IFN- γ 가 增加됨으로써 Th1과 Th2의 교차조절에 있어서 Th1으로 조절되는 것으로 여겨진다. B 세포로부터 세포 밖으로 生産되어 나오는 IgE의 生産량의 측정에서 IgE의 생성을 有意性있게 抑制하였으며(Table 8), B 세포의 세포 증식 측정에서 B 세포의 증식을 有意性있게 抑制하였다(Table 9).

이와 같이 加味治哮喘이 알러지作用에 미치는 影響은 IL-4, IL-5, TGF- β 의 發顯을 抑制하고 IFN- γ 의 發顯을 增加시켜 B 세포의 增殖을 抑制하고 IgE의 合成을 阻害함으로써 抗알러지 效果를 갖는 것으로 思料된다.

결론

加味治哮喘의 效能을 糾明하기 위하여 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ 의 轉寫能에 미치는 影響, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 生産에 미치는 影響, IgE의 發顯에 미치는 影響, B 세포增殖에 對한 抑制效果 등을 測定하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

加味治哮喘은 肺纖維芽細胞에서 細胞毒性에 미치는 影響을 살펴본 결과 濃度依存的 減少가 있으나 有意性있는 細胞毒性은 보이지 않았고, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ 遺傳子合成을 增加시켰으며, IL-4, IL-5, TGF- β 遺傳子合成을 減少시켰다. 그리고 加味治哮喘은 IL-4, IgE의 生成량을 有意性있게 減少시켰시켰고, IL-6, IFN- γ 의 生成량을 有意性있게 增加시켰으며, B 세포의 細胞增殖을 有意性있게 減少시켰다.

以上的 結果로 보아 加味治哮喘은 IL-4, IL-5, TGF- β 의 發顯을 抑制하고 IFN- γ 의 發顯을 增加시켜 B 세포의 增殖을 抑制하고 IgE의 合成을 阻害함으로써 抗알러지 效果를 갖는 것으로 思料된다.

참고문헌

- 대한 천식 및 알레르기학회: 천식과 알레르기질환, 서울, 군자출판사, p.99, 2002.
- 鄭奎萬: 알레르기과 韓方, 서울, 圖書出版第一路, pp.15-26, 60-61, 1990.
- 이세종: 면역학, 서울, 고려의학, pp.154-156, 260-265, 1994.
- 金永勳: 晴崗醫鑑, 서울, 杏林書院, p.130, 1990
- 대전대학교부속한방병원: 한방병원처방집, 대전, 한국출판사, p.129, 1997.
- 고재찬, 김준명, 송재진, 박양춘, 김병탁: 紫蛤散의 抗알러지 效果에 대한 實驗的 研究, 대한한방내과학회지, 22(3): 405-414, 2001.
- 장승규, 박양춘, 김병탁, 김동희: 止哮喘이 알러지反應과 肺損傷에 미치는 影響, 동의생리병리학회지, 15(2):286-295, 2001.
- 권강주, 박양춘, 김병탁, 김동희: 寧哮喘이 알러지反應과 肺損傷에 미치는 影響, 동의생리병리학회지, 15(1):150-159, 2001.
- 송상진, 박양춘, 김병탁: 加味射干麻黃湯의 항알러지 效果에 대한 實驗的 研究, 동의생리병리학회지, 15(6):905-909, 2001.
- 김준명, 박양춘, 김병탁, 김성훈: 加味治哮喘의 알러지 cytokine조절작용에 대한 研究, 동의생리병리학회지, 14(2): 80-90, 2000.
- Papazissi, K, Geromichalos, D, Dimitriadis, K., Kortssaris, H: Optimization of the sulforhodamine B(SRB) colorimetric assay., immunological method. 208:151-158, 1997.
- 全國韓醫科大學本草學教授 공편: 本草學, 서울, 永林社, p.123, 126, 137, 303, 348, 352, 448, 460, 464, 479, 480, 481, 484, 541, 1991.
- Jelinek DF: Regulation of B lymphocyte differentiation. Ann Allergy Asthma Immunol. 84(4):375-387, 2000.
- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S: The CD40 antigen and its ligand. Annu Rev Immunol. 12:881-922, 1994.
- Kehry MR, Hodgkin PD: B-cell activation by helper T-cell membranes. Crit Rev Immunol. 14(3-4):221-238, 1994.
- Roitt I, Brostoff J, Male D: Immunology(14th edi.), London, Mosby, p.144, 1998.
- 정승원, 이미애, 하대유: 사이토카인이 Th1細胞의 Mitogens에 대한 增殖反應에 미치는 影響, Korean J. Immunol. 19:73-81, 1997.
- Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M: cytokines and asthma, J. of investigational allergology and clinical immunology, 7(5):270-273, 1997.
- Palmi M, Meini A: Role of the nitric oxide/cyclic GMP/Ca²⁺ signaling pathway in the pyrogenic effect of interleukin-1beta. Mol Neurobiol. 25(2):133-147, 2002.
- Watkins LR, Hansen MK, Nguyen KT, Lee JE, Maier SF: Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta: molecular biology for non-molecular biologists. Life Sci. 65(5):449-481, 1999.
- Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik A, Paul WE: B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. J Immunol. 15;136(12):4538-4541, 1986.
- 서울대학교의과대학: 면역학, 서울, 서울대출판부, pp.123-141, 1987.
- Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW: Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. Respir Res. 2(2):71-79, 2001.

24. Briere F, Bridon JM, Servet C, Rousset F, Zurawski G, Banchereau J: IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. *Nouv Rev Fr Hematol.* 35(3):233-235, 1993.
25. O'Neil D, Swanton C, Jones A, Medd PG, Rayment N, Chain B: IFN-gamma down-regulates MHC expression and antigen processing in a human B cell line. *J Immunol.* 162(2):791-798, 1999.