

麥門冬이 천식유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향

정해준, 정희재, 정승기, 이형구
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Liripois Tuber contributes to the chemotaxis of eosinophils and secretion of cytokines in A549 human epithelial cells

Hae-Jun Jung, Gee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory System, Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Abstract

Background and Objective: The importance of the presence of eosinophils in the airways of patients with fetal asthma has long been recognized, but the mechanism by which these cells are recruited and retained in the lung are only now being elucidated. Eotaxin is a potent and specific eosinophil chemoattractant that is mobilized in the respiratory epithelium after allergic stimulation.

Material and Methods: We used water extracts of Liripois Tuber and pulmonary epithelial cell lines A549(human type II-like epithelial cells) and human eosinophils.

We estimated cytotoxic effects of Liripois Tuber via MTS assay, and estimated the effects of Liripois Tuber on chemokines from prestimulated A549 cells by sandwich ELISA and RT-PCR. We conducted chemotaxis assay on prestimulated eosinophils treated with Liripois Tuber.

Result: In this study we demonstrated that TNF- α , IL-4 and IL-1 β induced the accumulation of chemokines mRNA in the pulmonary epithelial cell lines A549 in dose-dependent manner. Chemokines were inhibited by Liripois Tuber in dose-dependent manner. The eosinophil migration was inhibited at high concentration of Liripois Tuber.

Conclusion: These findings indicate that the suppression of the expression of chemokines can be accomplished by Liripois Tuber treatment, raising the possibility that Liripois Tuber might be of therapeutic value in diseases such as asthma.

Key Word: Liripois Tuber, eosinophil, eotaxin, asthma

I. 緒論

최근 알레르기 면역반응을 Th1과 Th2의 균형에 의해 그 기전을 설명하고 있는데, 천식은 Th2 반응의 우세로 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13과 같은 cytokine이 분비되어 호산구의 유도과 비만세포의 활성화, B 림프구에서 IgE 생성에 관여함으로써 유발된다고 설명하고 있다^{1,2}.

천식의 특징적인 병리소견은 기관지내에 호산구의 수가 증가되어 있는 것이다. 기관지에 모여든 호산구는 활성화되어있고, 자사(apoptosis)가 억제된 상태이다. 활성화된 호산구는 많은 양의 LTC4를 유리하며 혈관과 기도평활근에 작용함으로써 알레르겐 흡입 유발 시에 조기반응과 후기반응이 일어나게 한다³.

천식치료의 주요한 목표는 기관지 과민반응, 가역적인 기도폐쇄와 기도의 개형(remodelling)과 연관된 염증 반응을 줄이거나 예방하는 것이다. Corticosteroid의 흡입치료는 기도의 국소부위 만성염증 진행을 방해하여 천식증상의 의미 있는 경감과 폐기능측정에서 상당한 개선을 보인다⁴.

최근 연구에서 Green 등⁵은 객담호산구증을 줄이는 치료 전략이 표준임상 가이드라인에 의한 치료전략보다 천식발작을 줄이는데 훨씬 효과적이라고 주장한 바 있다. 따라서 호산구의 기도 내 유입기전에 대한 연구는 천식의 병태생리를 밝히고 그에 대한 치료를 고안하는데 중요하다 하겠다. 또한 유착분자가 염증반응의 주된 매개인자라는 사실이 알려지면서 자극된 세포의 유착분자의 표현을 억제하거나 예방하는 관점으로 치료가 시도되기 시작하였고, 많은 연구가 진행 중이다⁶.

기관지천식과 유사한 韓醫學의 證候는 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 哮喘證으로 實症의 外感風寒 痰濕內盛, 虛症의 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛로 나누어 치료하고 있다^{7,8}.

麥門冬은 清心肺火止渴의 主治를 가지고⁹, 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津하는 작용으로 肺陰虛의 慢性咳嗽證 치료에 사용되는데 臨床에서는 마른기침의 만성기관지염, 만성인후염 등에서 麥門冬湯으로 응용되고 있다¹⁰.

저자는 BEAS-2B세포에 TNF- α 를 처리 후 유도된 IL-6 과 IL-16 mRNA 發顯을 살펴본 결과 麥門冬 100 μ g/ml 농도에서 각각 44 %, 27 % 의 유의한 감소효과를 확인하였다¹¹. 麥門冬의 천식치료기전에 대한 보다 자세한 연구를 위하여 喘息의 주요 발병원인으로 작용하는 호산구와 호산구의 화학주성과 밀접하게 관련 있는 eotaxin을 중심으로 실험을 진행하였고, 또한 IL-8, IL-16, intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), RANTES와 같은 chemokine들에 대해서도 mRNA 측면에서 麥門冬의 효과를 확인하여 결과를 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 麥門冬 (Liripois Tuber, *Liriope platyphylla* Wang et Tang)은 Sun Ten Phatmaceutical Co., Taiwan에서 수입한 물추출 엑기스를 사용하였다.

2) 세포주

본 실험에 사용된 A549(human type II-like epithelial cells) cell은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 세포

주었다.

2. 방법

1) 세포배양 및 세포 독성 확인

A549(human type II-like epithelial cells) cell을 본 실험에 사용하였고, 세포 배양을 위하여 사용된 배지는 10% fetal bovine serum(Hyclone, Logan, U.S.A.), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen Life Technologies, Rorkville, U.S.A.), 10 mM HEPES (JRH Biosciences, Lenexa, U.S.A.), 11mM sodium bicarbonate (JRH Bioscience)가 포함된 RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies)를 사용하였다. 먼저 麥門冬 (Sun Ten Phatmaceutical Co., Taiwan)에 대한 세포 독성을 측정하기 위해 배양한 세포를 96-well plate (Corning, U.S.A.)에 2×10^4 cells/well로 seeding한 다음 24시간 동안 배양한 후 약재를 농도별로 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001mg/ml로 배지에 희석하여 $100 \mu\text{l}$ 씩 well에 첨가한다. 24시간 동안 방치한 후 MTS solution (Promega, Madison, U.S.A.)을 $20 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 다음 O.D.=490에서 흡광도를 측정하였고, 각 실험은 triplicate로 3회에 걸쳐 확인하였다.

2) Cytokine 처리 조건에 따른 eotaxin과 RANTES의 발현양 확인

배양한 A549 cell을 5×10^5 cells/well로 12-well plate (Corning, U.S.A.)에 plating하여 24시간 배양한 후 serum free media로 교체한 다음 24시간 방치하고 TNF- α (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 50ng/ml과 IL-4(Biosource, Camarillo, U.S.A.) 50ng/ml, IL-1 β (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 10ng/ml을 최적 농도로 동시에 처리하여 24시간과 48시간 동안 배양하는 조건, eotaxin과 RANTES를 전후에 자극하는 방법, 배지를 교체 여부에 따른 차이로 조건을 실험하였다. 획득된 상등액을 취하여 Human eotaxin ELISA Set(BD Bioscience, U.S.A.)를 이용하여 sandwich ELISA를 실시하였고 RANTES의 발현 농도는 mRNA 측면에서 RT-PCR(Reverse Transcriptase PCR) 방법으로 확인하였다.

3) Sandwich ELISA

96-well plate (Costar, USA)에 $100 \mu\text{l}$ /well anti-human eotaxin(BD Bioscience, USA)을 coating하여 4°C에서 O/N 배양하고 0.05% PBS-tween 20으로 3회 세척한 후 $200 \mu\text{l}$ Pharmingen's Assay Diluent (BD Bioscience, USA)로 실온에서 1시간 동안 blocking시켰다. 3회 세척 후 Pharmingen Assay Diluent에 희석한 표준시료를 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 실온에서 2시간 동안 배양한 다음 3회 세척 후 $100 \mu\text{l}$ anti-eotaxin detection antibody와 Avidin-horseradish peroxidase conjugate를 가하여 1시간 동안 실온에 방치하였고, 7회 세척한 후 $100 \mu\text{l}$ Tetramethylbenzidine과 Hydrogen peroxide (Pharmingen's TMB Substrate Reagent set, BD Bioscience, USA)를 첨가하여 30분간 실온에 반응시킨 다음 2N H₂SO₄ 50 μl 를 첨가하여 반응을 정지시키고 30분 이내에 O.D.= 450, 570에서 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4) Eotaxin Assay

배양한 A549 cell을 5×10^5 cells/well로 12-well plate (Corning, U.S.A.)에 plating하여 24시간 배양한 후 serum free media로 교체한 다음 24시간 방치하고 eotaxin을 stimulation시키는 cytokine인 TNF- α (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 100ng/ml과 IL-4(Biosource, Camarillo, U.S.A.) 100ng/ml을 3시간 동안 처리하였다. 또한 RANTES를 유도하는 IL-1 β (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 10ng/ml과 TNF- α (Biosource) 100ng/ml을 첨가하여 24시간 동안 배양한 다음 麥門冬을 100, 10, 1, 0.1, 0.01 μg /ml의 농도로 희석하여 48시간 동안 처리한 후 상등

액을 취하여 human eotaxin ELISA Kit를 이용하여 sandwich ELISA를 실시하였고 cell pellet 으로 RT-PCR을 실시하였다.

5) RT-PCR을 이용한 chemokine 발현량 측정

(1) Total RNA의 분리

각 12-well로부터 획득한 cell pellet 에 Trisol Reagent (Invitrogen Life Technologies)을 300 μ l씩 첨가하여 lysis 시킨 후 200 μ l씩 가하여 vortex한 다음 실온에서 5분간 방치한 다음 100 μ l chloroform을 첨가하여 15초간 흔들어준 후 상온에서 3분간 방치한 다음 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 취해서 옮긴 후 250 μ l Isopropanol을 첨가한 다음 10분간 실온에 방치했다가 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 획득한 후 75% 에탄올을 500 μ l 가하여 세척해 준 다음 상온에서 dry시킨 후 20 μ l DEPC-DW에 녹여 1: 50으로 희석한 다음 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정하였다.

(2) 1st strand cDNA의 합성

분리한 total RNA를 이용하여 first strand complementary DNA(cDNA)를 합성하였는데 3 μ g의 RNA에 500 μ g/ μ l Oligo dT primer (Invitrogen Life Technologies, USA) 1 μ l를 첨가한 후 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었고 5X synthesis buffer 5 μ l, 10mM dNTPs 1 μ l, 40U/ μ l RNase inhibitor 0.5 μ l를 섞어 최종 부피를 25 μ l로 맞추어 25 $^{\circ}$ C 2분간 반응시켰다. 이 반응액에 200U/ μ l M-MLV reverse transcriptase 1 μ l를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시키고 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 enzyme을 불활성화 한 다음 획득한 cDNA를 RT-PCR에 사용하였다.

(3) Reverse transcriptase PCR analysis

Total RNA로부터 합성한 cDNA는 reverse transcriptase PCR과 real time PCR에 모두 사용하였는데 2 μ l의 cDNA, 0.2 μ m primer 2 μ l, 10 μ l premix taq polymerase (Takara, Japan)를 혼합하여 최종 부피 20 μ l로 맞추는 다음 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturaion 하고, 95 $^{\circ}$ C에서 45초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension하여 35회 반복하여 유전자를 증폭하였다. Control로 GAPDH의 발현량을 이용하여 표준화하였고 RANTES, IL-16에 대한 발현량을 일차적으로 확인하였으면 PCR에 사용한 specific primer는 Table 1에 기록하였다.

(4) cDNA를 이용한 real-time PCR반응

RT-PCR시 GeneAmp 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems)를 사용하여 합성한 각 sample의 template을 1:10으로 희석하여 그중 2 μ l를 취하여 0.2 μ m primer 2 μ l와 12.5 μ l SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK)를 최종 부피를 25 μ l 양으로 혼합한 다음 real time PCR을 실시하였다. 먼저 cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100으로 serial dilution한 후 농도당 3개씩 PCR하여 평균값을 사용하였고, 각 반응액의 증폭이 threshold에 도달한 Cycle number(Ct)를 기준으로 standard curve를 그려서 정량 하였고 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 표준화하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95 $^{\circ}$ C사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하였고 PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturaion 하고, 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 40회 반복하였고 이때 사용된 primer는 RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16으로 각 primer의 sequence는 다음과 같다.

Table 1. Sequences of primer used for real-time PCR

Gene	Oligonucleotide sequences
GAPDH	FW 5'-TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC-3'
	RV 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA-3'
RANTES	FW 5'-CTG CCT CCC CAT ATT CCT CGG-3'
	RV 5'-GAG TTG ATG TAC TCC CGA ACC C-3'
ICAM-1	FW 5'-TGA GGA GAG ATC ACC ATG GAGC-3'
	RV 5'-GCC AGG GAA CAG ACC ACG GT-3'
VCAM-1	FW 5'-GAG AAC CCA GAT AGA CAG CCC-3'
	RV 5'-TTC ACG AGG CCA CCA CTC ATC-3'
IL-8	FW 5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG-3'
	RV 5'-TGT GTT GGC GCA GTG TGG TC-3'
IL-16	FW 5'-CTC GCT CAA CCT TTC AGA GCT-3'
	RV 5'-GAC ATG GAT GCC GTC TAA TTG C-3'

6) 사람 혈액으로부터 호산구의 분리

(1) 사람 혈액으로부터 lymphocyte의 분리

EDTA가 첨가되어 있는 tube에 사람 혈액을 섞어 채취한 혈액이 응고되지 않도록 한 다음 0.9% NaCl을 동량으로 첨가하여 혈액을 희석해 주었다. 혈액과 lymphoprep을 2:1의 비율로 혈액 위에 lymphoprep을 섞이지 않도록 조심스럽게 첨가한 후 800g에서 20분간, 실온에서 원심분리 한 다음 sample과 medium의 중간층인 mononuclear cell을 분리해 냈다. 0.9% NaCl로 희석하여 250g에서 10분간 실온에서 원심분리 한 후 세포 수 측정을 실시하여 정확한 세포수를 계산한 다음 eosinophil isolation buffer로 세척하였다.

(2) Lymphocyte로부터 호산구의 분리

5x10⁷ cell에 50 μ l의 MACS CD3 immunomagnetic beads(Miltenyi Biotec, Germany)를 혼합하여 6 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양한 후 SuperMACS separation system을 이용하여 magnetic 부분에 분리관을 설치하고 세포와 bead 혼합을 통과시켜 bead와 결합한 세포를 positive selection한 다음 CD16 immunomagnetic bead를 다시 혼합하여 10 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 SuperMACS separation system을 이용하여 magnetic 부분에 분리관을 설치하고 세포와 bead 혼합을 통과시켜 bead와 결합하지 않은 호산구만을 획득하는 negative selection을 통해 호산구를 분리하였다. 분리한 세포는 Diff-Quik (Sysmex Corporation, Japan) staining 방법을 통해 분리된 세포 수와 purity를 확인하였다.

(3) 호산구의 Diff-Quik염색

분리한 호산구 5 μ l를 microscope slides에 떨어뜨린 다음 또 다른 슬라이드를 이용하여 넓게 폼다. 실온에서 약 15분 정도 건조시킨 슬라이드를 고정액에 10초간 담가 고정시키고 Solution 1에 20초 동안 담가 고정된 슬라이드를 염색시킨 다음 Solution 2에 20초 동안 담가 착색시킨 슬라이드를 증류수로 닦아 내고 실온에서 건조시켰고 건조된 슬라이드는 mounting를 거쳐 커버슬라이드를 덮어 현미경으로 관찰하였다.

7) 호산구 chemotaxis assay

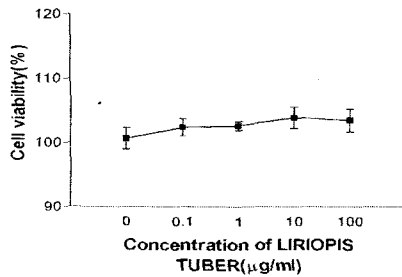
A549 cell을 cytokine assay에서와 같은 방법으로 IL-4와 TNF- α 를 첨가하여 eotaxin을 자극한 후 麥門冬 100, 1, 0.01 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 다음 상등액을 취하여 48-well multiwell chemotaxis chamber (NeuroProbe Inc, USA)의 아래 well에 28 μ l 씩 채웠다. 그 위에 pore size 5 μ m의 polycarbonate filter (NeuroProbe)를 덮고 윗 well에 분리한 human eosinophil을 1x10⁵/ml로 56 μ l씩 넣은 chamber를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 90분간 배양하였다. Top well에서 호산구를 제거한 후 여과막을 Diff-Quik 염색하여 chemotaxis activity에 의해 여과막으로 이동한 호산구의 수를 400배 현미경으로 계산하였다.

III. 結 果

1. 세포 독성 확인

麥門冬의 세포 독성을 알아보기 위해 농도별로 처리한 결과 농도에 따른 세포 생존율에 큰 차이가 없는 것으로 보아 A549 cell에 대해 독성은 갖지 않는 것으로 나타났고 본 실험에서 세포 생존율 10%이내의 오차는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보았다(Fig 1).

Fig. 1. Identification of A549 cell cytotoxicity for Liriopsis Tuber. Each concentration was assayed in triplication and were measured at 490nm using fluorescence microplate reader.



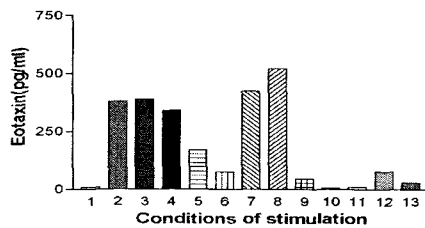
2. Cytokine 처리 조건에 따른 eotaxin 발현양에 대한 sandwich ELISA 결과

Eotaxin은 TNF- α (Biosource, Camarillo, U.S.A.)와 IL-4(Biosource, Camarillo, U.S.A.)에 의해 주로 유도되고 RANTES는 TNF- α (Biosource)와 IL-1 β (Biosource, Camarillo, U.S.A.)을 주로 실험에 사용하고 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 실험에서는 이런 자료를 바탕으로 호산구와 RANTES를 동시에 잘 발현시키는 농도의 조건을 검색한 결과 eotaxin과 RANTES에 대한 cytokine을 동시에 처리하는 것보다 eotaxin을 유도한 다음 RANTES에 대한 cytokine을 처리하는 것이 더 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 또한 각 cytokine에 대한 적절한 농도로는 eotaxin에 대해서는 TNF- α (Biosource) 25ng/ml과 IL-4(Biosource)50ng/ml, RANTES에 대해 TNF- α (Biosource) 25ng/ml과 IL-1 β (Biosource) 10ng/ml 이라는 것을 확인 하였다.

Fig. 2. Concentration of eotaxin in the supernatant stimulated by TNF- α , IL-4 and IL-1 β stimuli.

- 1: only A549 cell,
- 2: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml ; 48hrs
- 3: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml and IL-1 10ng/ml ; 24hrs
- 4: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml and IL-1 10ng/ml ; 48hrs
- 5: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml, after 24hrs Media Change plus IL-1 10ng/ml
- 6: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml, after 24hrs Media Change plus IL-1 10ng/ml and TNF- α 25ng/ml
- 7: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml, after 24hrs plus IL-1 10ng/ml
- 8: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml, after 24hrs plus IL-1 10ng/ml and TNF- α 25ng/ml
- 9: IL-1 10ng/ml and TNF- α 25ng/ml ; 48hrs
- 10: IL-1 10ng/ml and TNF- α 25ng/ml, after 24hrs Media Change plus IL-4 50ng/ml
- 11: IL-1 10ng/ml and TNF- α 25ng/ml, after 24hrs Media Change plus IL-4 50ng/ml and TNF- α 25ng/ml
- 12: IL-1 10ng/ml and TNF- α 25ng/ml, after 24hrs plus IL-4 50ng/ml
- 13: IL-1 10ng/ml and TNF- α 25ng/ml, after 24hrs plus IL-4 50ng/ml and TNF- α 25ng/ml



3. Cytokine 처리 조건에 따른 RANTES 발현양에 대한 reverse transcriptase PCR 결과

본 실험에서 eotaxin에 초점을 맞추고 있기 때문에 각 조건에 대한 결과 중 일차적으로 eotaxin의 발현양이 많은 조건중에서 RANTES가 가장 잘 발현되는 조건을 확인하고자 하였다. Standard로 사용한 GAPDH는 control과 모든 조건이 대부분 비슷한 농도로 발현되는 것을 확인하였고 반면 RANTES는 control에서는 발현되지 않으나 조건에 따라 차이를 보였으며 IL-16의 경우 control을 제외한 모든 조건이 비슷한 수준으로 발현되었기 때문에 그중 eotaxin이 가장 잘 발현되는 7 lane의 조건에서 다른 chemokine도 일정량 발현이 되는 것을 확인하여 실험을 진행하였다

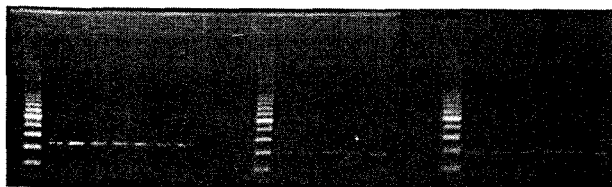
Fig. 3. Reverse transcriptase PCR analysis of RANTES and IL-16 mRNA induced in A549 cells.

Representative electrophoresis showing the induction of expression of (a) GAPDH (b) RANTES (c) IL-16 mRNA stimulated by TNF- α , IL-4 and IL-1 β combination.

M: 1kb marker,

- 1: only A549 cell,
- 2: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml ; 48hrs treatment
- 3: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml and IL-1 10ng/ml ; 24hrs treatment
- 4: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml and IL-1 10ng/ml ; 48hrs treatment
- 5: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml after 24hrs plus media change and IL-1 10ng/ml
- 6: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml after 24hrs plus IL-1 10ng/ml
- 7: TNF- α 25ng/ml and IL-4 50ng/ml after 24hrs plus IL-1 10ng/ml and TNF- α 25ng/ml

(a) GAPDH (b) RANTES (c) IL-16



M 1 2 3 4 5 6 7

4. Eotaxin assay 결과

A549 cell을 Th2 계통의 IL-4, TNF- α , IL-1 β cytokine으로 자극한 후 麥門冬으로 0.01-100 μ g까지 농도별로 처리한 결과 10 μ g/ml에서 50% 감소하였고 100 μ g/ml에서는 70%이상의 현저한 감소를 나타냈다. 세포 독성 실험에서 麥門冬이 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 확인했기 때문에 eotaxin에 대한 저해효과가 있는 것으로 판단할 수 있었다(Fig 4).

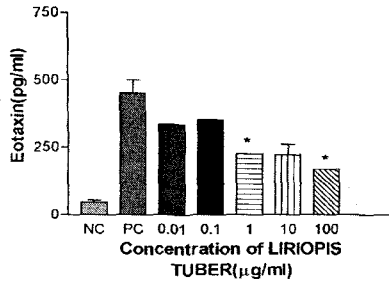


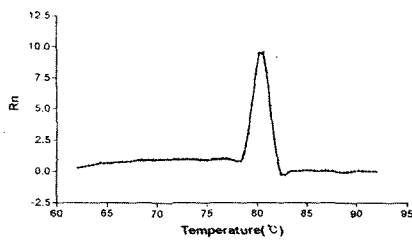
Fig. 4. Eotaxin inhibition assay of Liriopsis Tuber from stimulated A549 cell. NC: negative control (only A549 cell) PC: positive control, stimulation Eotaxin release into the medium was measured by an ELISA. The asteris denotes a significant difference ($P < 0.05$)

5. RT-PCR을 이용한 chemokine 발현량 결과

1) GAPDH

각각의 유전자 발현량을 normalization 하기 위하여 control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 5와 같다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R2는 0.9986으로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of GAPDH



B. Standard curve of GAPDH

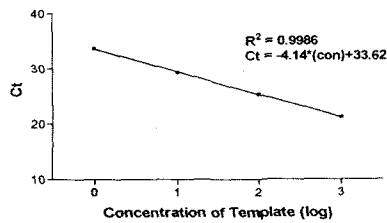


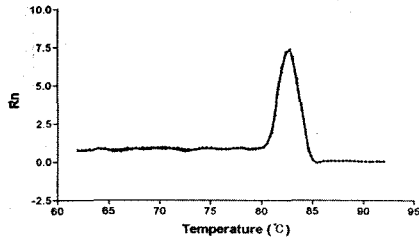
Fig. 5. Dissociation and standard curve of GAPDH as internal control

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 78 to 83 $^{\circ}$ C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer. B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

2) RANTES

RANTES 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 6 와 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고, 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9964으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of RANTES



B. Standard curve of RANTES

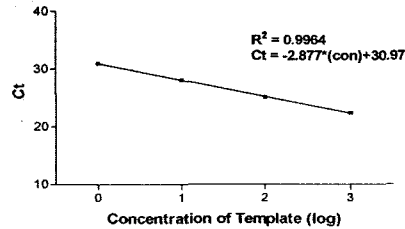


Fig. 6. Dissociation and standard curve of RANTES

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 80 to 85°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer.

B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 RANTES 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눴으로써 normalization 하였다 (Fig. 7).

麥門冬을 0.01, 1, 100µg/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 RANTES에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 0.01µg/ml에서 5%, 1µg/ml에서 10% 감소 하였고 100µg/ml 농도에서는 14%가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

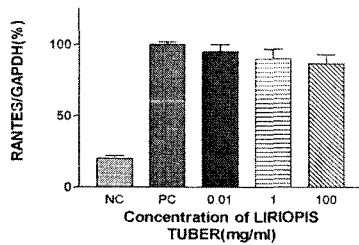


Fig. 7. Expression level of RANTES

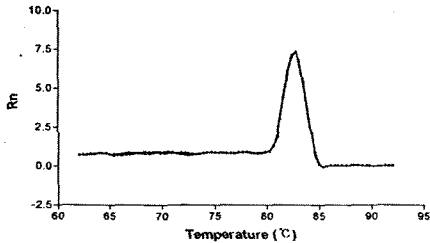
NC: negative control (only A549 cell)

PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)

3) ICAM-1

ICAM-1 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 8 와 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9930으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of ICAM-1



B. Standard curve of ICAM-1

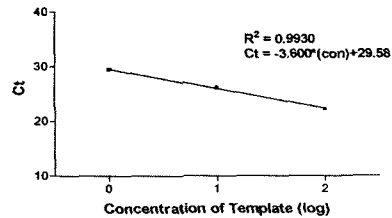


Fig. 8. Dissociation and standard curve of ICAM-1

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 80 to 85°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer.

B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

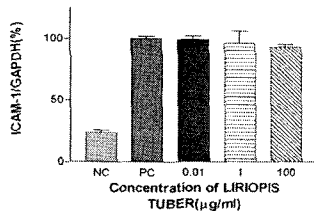
Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 ICAM-1 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization 하였다 (Fig. 9).

麥門冬을 0.01, 1, 100µg/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 ICAM-1에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1µg/ml에서 6%, 100µg/ml 농도에서 7%가 감소하였다.

Fig. 9. Expression level of ICAM-1

NC: negative control (only A549 cell)

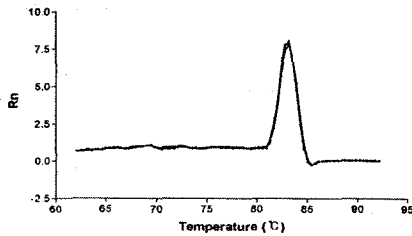
PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)



4) VCAM-1

VCAM-1 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 10 과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고, 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9960으로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of VCAM-1



B. Standard curve of VCAM-1

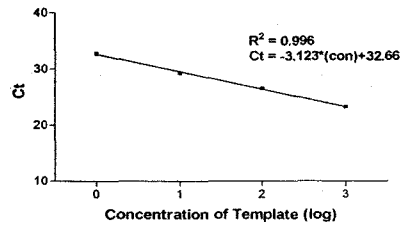


Fig. 10. Dissociation and standard curve of VCAM-1

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 81 to 85°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer.

B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

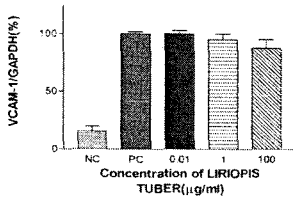
Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 VCAM-1 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization 하였다 (Fig.11).

麥門冬을 0.01, 1, 100µg/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 VCAM에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1µg/ml에서 5%, 100µg/ml 농도에서 12.5%가 감소하였다.

Fig. 11. Expression level of VCAM-1

NC: negative control (only A549 cell)

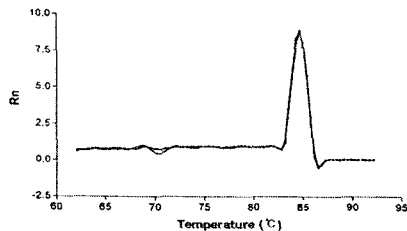
PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)



5) IL-8

IL-8 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 12 와 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9929로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of IL-8



B. Standard curve of IL-8

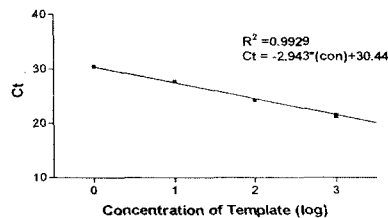


Fig. 12. Dissociation and standard curve of IL-8

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 83 to 86.5°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer.

B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

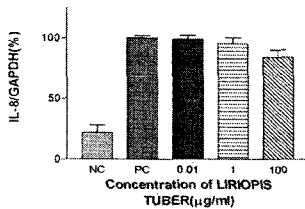
Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 IL-8 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나뉘므로써 normalization 하였다 (Fig. 13).

麥門冬을 0.01, 1, 100µg/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 VCAM에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1µg/ml 농도에서는 5%의 감소를 보였고 100µg/ml의 농도에서는 16%의 저해 효과를 보였다.

Fig. 13. Expression level of IL-8

NC: negative control (only A549 cell)

PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)



6) IL-16

IL-16 유전자에 대한 real time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 14와 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었고 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9934로 나타났기 때문에 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of IL-16

B. Standard curve of IL-16

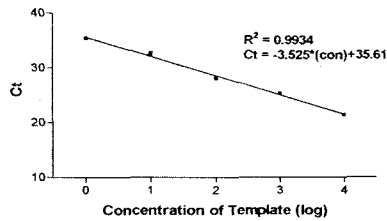
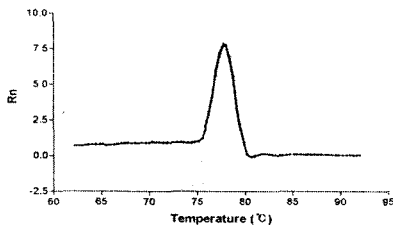


Fig. 14. Dissociation and standard curve of IL-16

A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 75 to 80°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer.

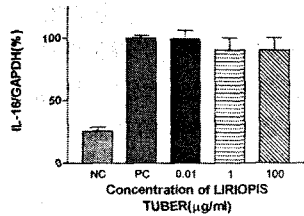
B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

Standard curve를 이용하여 얻은 각 sample의 IL-16 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나뉘므로써 normalization 하였다 (Fig. 15).

麥門冬을 0.01, 1, 100µg/ml의 세가지 농도로 처리하여 cytokine에 의해 chemokine 자극이 유도된 A549 cell에서 IL-16에 대한 mRNA에 수준에서 발현량이 control에 비해 얼마나 감소되었는지 확인한 결과 1µg/ml 농도에서는 9.8%의 감소를 보였고 100µg/ml의 농도에서는 10.4%의 저해 효과를 보였다.

Fig. 15. Expression level of IL-16

NC: negative control (only A549 cell)
 PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)



6. 사람의 혈액으로부터 호산구의 분리결과

사람의 혈액으로부터 lymphoprep을 이용하여 2×10⁸개의 lymphocyte를 분리하였고 이를 CD 3와 CD 16 immunomagnetic bead로 selection하여 1×10⁵개의 호산구를 획득하였다. 이 세포는 Diff-Quick staining 방법으로 염색하여 hemocytometer로 숫자를 확인하였고 purity는 97.2±0.34% 이었으며 trypanblue 염색을 하여 관찰한 결과 생존율은 98.7%였다.

7. 호산구 chemotaxis assay 결과

분리한 호산구를 chemotaxis chamber에 넣고 세포 이동성을 확인한 바 chemoattractant에 의해 호산구가 세포막 상의 구멍(화살표)으로 이동하게 되고 이를 Diff-Quick 염색하여 현미경으로 관찰한 결과 진한 점으로 보이는 것이 막을 통과한 세포이고 희미한 점들은 통과하지 못하고 반대쪽에 비특이적으로 붙어있는 세포를 보여준다.麥門冬 농도가 0.01µg/ml과 1µg/ml에서는 control에 비해 차이가 없었고 100µg/ml에서만 호산구의 이동성이 193±15개로 유의성(p<0.05)있게 저해되는 것을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. Cell Counting of Migrated Eosinophils from A549 Cell Monolayers in Response to TNF-α, IL-4 by Liriois Tuber

	Migrated Eosinophils per High-Power Field				
	NC	PC	Liriois Tuber (0.01µg/ml)	Liriois Tuber (1µg/ml)	Liriois Tuber (100µg/ml)
TNF-α+IL4	90±37	296±19	283±44	256±34	193±15 *

Data are presented as mean ± SEM of cells/high-power field.

NC: negative control (only A549 cell)

PC: positive control (cytokine stimulated A549 cell)

*: P<0.05 compared with the PC.

IV. 考 察

최근 알레르기 면역반응을 Th1과 Th2의 균형에 의해 그 기전을 설명하고 있는데, 천식은 Th2 반응의 우세로 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13과 같은 cytokine이 분비되어 호산구의 유도과 비만세포의 활성화, B 림프구에서 IgE 생성에 관여함으로써 유발된다고 설명하고 있다^{1,2}. 천식은 기도의 염증변화를 일으키는데 여러 가지 세포들이 작

용하고 있지만 그 중에서 호산구가 중요한 역할을 하고 있다. 호산구에서 분비되는 물질에는 MBP(major basic protein), ECP(eosinophilic cationic protein), EDN(eosinophil-derived neurotoxin), 그리고 EPO(eosinophil peroxidase) 등이 있다. MBP는 기생충, 암세포 그리고 다른 포유동물의 세포에 독으로 작용하고, 천식환자 기도의 상피세포, 점막 및 점막하에 많이 분포되어 있고, 천식환자의 객담과 기관지폐포 세척액에서 검출되며, 작용은 기도의 상피세포 파괴, 혈소판의 활성화, 혈액응고와 보체경로의 억제, 그리고 비만세포와 호염기세포에서 히스타민의 유리 등이 있다. ECP는 림프구 증식을 억제하고, 쥐에서는 비만세포를 활성화시킨다. EPO는 기생충, 세균, 종양세포 그리고 숙주세포 등에 독으로 작용하고, 혈소판을 활성화시키고 비만세포를 탈과립시키고 기도수축과 과민반응을 일으킨다. 그리고 M2 수용체를 억제하고 호산구 탈과립작용도 있다. 활성화된 호산구는 지질대사물질을 새로 형성하고 합성하고 대표적 물질로 LTC4와 PAF(plate activating factor)가 있으며, LTC4는 강력한 기도수축작용이 있으며 혈관투과력을 가지고 있다. PAF는 혈소판과 중성구를 활성화시키고 기도를 수축시키고 기도과민성을 증가시킨다²³.

염증세포가 혈액내에서 혈관내피세포를 지나 조직내로 이동하는 과정은 크게 3단계 즉 접근, 유착, 경내피이동로 나눌 수 있으며 여러 유착물질이 관여한다. 첫째, 접근단계는 염증세포와 혈관내피세포가 가역적으로 붙었다 떨어졌다 하는 단계로 염증세포가 혈관내피세포의 selectin 계열과 결합한다. 둘째, 유착단계는 염증세포가 활성화되면서 integrin 계열 유착물질을 표현하여 혈관내피세포의 immunoglobulin 계열 유착물질(ICAM-1, VCAM-1)과 강하게 결합한다. 마지막으로 경내피이동단계는 염증세포가 혈관내피세포 사이의 기저막을 지나 조직내로 이동하는 단계로 PECAM-1이 주로 관여한다²².

호산구가 알레르기 반응을 일어나는 곳으로 선택적으로 모여드는 현상은 호산구의 화학주성(chemotaxis) 및 혈관내피세포와 세포외기질(extracellular matrix)에 호산구가 선택적으로 유착됨으로써 일어난다. 사이토카인이 호산구의 증식과 분화에 중요한 역할을 하며 또 화학주성에도 관여한다³.

호산구의 이동을 유발하는 물질로 C5a와 PAF가 있으며, IL-2, IL-3, IL-5, GM-CSF, lymphocyte chemoattractant factor, RANTES 와 eotaxin을 포함하며, ICAM-1, VCAM-1과의 결합으로 혈관내피세포와 부착하게 된다²⁴.

IL-3, IL-5, GM-CSF는 호산구 생존을 연장시키며 IL-5는 호산구의 자사(apoptosis)를 억제한다. 그러므로 사이토카인은 골수에서 호산구생산을 촉진하고 호산구의 혈관내피세포 유착을 유도하고 화학주성을 촉진하고 세포활성화를 전처치하며, 조직내에서 생존을 연장시킴으로써 알레르기 염증을 유발한다³.

그러나 IL-5, VLA-4, PSGL-1 그리고 CC chemokine receptor-3에 대한 길항제와 IL-4와 IL-13는 천식에서 호산구의 결집을 방해한다²⁵.

천식치료의 주요한 목표는 기관지 과민반응, 가역적인 기도폐쇄와 기도의 remodelling과 연관된 염증반응을 줄이거나 예방하는 것이다. Corticosteroid의 흡입치료는 기도의 국소부위 만성염증 진행을 방해하여 천식증상의 의미있는 경감과 폐기능측정에서 상당한 개선을 보인다⁴.

천식치료에 사용되는 부신피질 스테로이드제의 작용기전에는 T 림프구, 호산구, 비만세포 등 알레르기성 염증세포에 작용하여 사이토카인이나 화학매체의 유리를 억제하고, 염증세포의 기도 내 침윤을 감소시키며, 호산구등 염증세포의 생존기간을 줄이는 기전이 있다³.

최근연구에서 Green 등⁵은 객담호산구증을 줄이는 치료 전략이 표준임상 가이드라인에 의한 치료전략 보다 천식발작을 줄이는데 훨씬 효과적이라고 주장한 바 있다. 따라서 호산구의 기도 내 유입기전에 대한 연구는 천식의 병태생리를 밝히고 그에 대한 치료를 고안하는데 중요하다 하겠다. 또한 유착분자가 염증반응의 주된 매개인자라는 사실이 알려지면서 자극된 세포의 유착분자의 표현을 억제하거나 예방하는 관점으로 치료가 시도되기 시작하였고, 많은 연구가 진행 중이다⁶.

Eotaxin, MCP-3, MIP-1a 그리고 RANTES가 알레르기 반응시 생성 분비되어 호산구의 유인에 결정적 역할을

수행하고 이 중에서 eotaxin은 호산구에 선택적으로 작용하여 호산구 염증의 병리에 결정적 역할을 한다. CCR-3는 호산구의 주된 수용체이기 때문에 호산구 염증의 치료제 개발에 있어 주된 목표중 하나임이 분명하다. 호산구에 미치는 chemokine의 효과를 선택적으로 차단함으로써 천식을 제어하는 새로운 시대가 곧 도래 할 것으로 기대된다²⁶.

麥門冬은 性味가 甘微苦하고 微寒한 약물이며²⁷, 潤燥生津 化痰止咳의 효능이 있다. 解熱, 消炎, 鎮咳, 祛痰, 利尿, 強心 등의 약리작용을 가지고 있으며, 肺陰虛의 慢性咳嗽證에 사용되는데 臨床에서는 마른기침의 만성기관지염, 만성인후염 등에서 麥門冬湯으로 응용되고 있으며, 汗出過多, 頻脈, 低血壓, 虛脫症의 증상에는 生脈散으로 응용되고 있다¹⁰.

麥門冬과 관련된 研究가 많이 진행되었으며¹¹⁻¹⁶, 알레르기 및 천식과 관련된 麥門冬湯에 관련된 동물실험으로는 류¹⁷가 麥門冬湯이 천식의 호흡양상과 기관조직에 대한 유의한 효능을, 김¹⁸은 흰쥐의 BALF내 면역세포와 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 효능을 발표하였고, 麥門冬 단미에 대한 실험은 정²¹이 IL-6, IL-16 그리고 GM-CSF의 유전자 발현에 대한 효능을, 이¹⁹는 IL-4, IL-5 그리고 IL-6의 발현에 대한 효능을 박²⁰은 麥門冬 약침의 항알레르기 및 면역에 관한 효능을 발표하였다. 麥門冬과 관련된 이러한 연구는 천식 등 호흡기 질환에 미치는 영향을 실험동물을 이용하여 염증반응이나 면역기능을 통하여 관찰하거나, cytokine들의 변화양상을 분자생물학적인 기법으로 확인하려는 연구들이었다.

이에 저자는 천식의 치료에 사용되는 麥門冬의 치료효과를 알아보기 위하여 천식의 주요 발병원인으로 작용하는 eosinophil과 eosinophil의 화학주성과 밀접하게 관련 있는 eotaxin을 중심으로 실험을 진행하였고, 또한 IL-8, IL-16, intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), RANTES와 같은 chemokine들에 대해서도 mRNA 측면에서 麥門冬의 효과를 확인하여 결과를 보고하는 바이다.

우선 麥門冬의 세포 독성에 관한 실험에서 농도별에 따른 세포 생존율에 큰 차이가 없는 것으로 보아 A549 cell에 대해 독성은 갖지 않는 것으로 나타났고, 본 실험에서의 세포 생존율 10% 이내 오차는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Eotaxin의 발현량에 대한 실험에서 A549 cell을 Th2 계통의 IL-4, TNF- α , IL-1 β cytokine으로 자극한 후 麥門冬 0.01-100 μ g의 농도별로 처리한 결과 10 μ g/ml에서 50% 감소하였고 100 μ g/ml에서는 70% 이상의 현저한 감소가 나타났다.

Eotaxin의 호산구에 대한 선택적 활성의 분자적 근거는 eotaxin 수용체인 CCR-3를 호산구가 발현하는데 있는 데²⁸, eotaxin은 염증부위에 호산구 유인시 핵심적 역할을 할 뿐만 아니라 호산구의 염증유발 기능을 활성화시킴으로써 조직 손상에도 기여하고, 또한 호산구 표면에 높은 농도로 발현되어 있는 CCR-3수용체에 eotaxin이 특이적으로 결합한다²⁹. TNF- α 와 IL-4는 기관지상피세포의 eotaxin생성을 조절하는데 eotaxin mRNA의 발현을 증진시키는 역할을 한다³⁰. 또한 인간 기관지상피세포에서도 CCR-3의 발현이 보고되어, 기관지상피세포도 알레르기 천식의 병리에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다³¹.

송³²은 혈장 eotaxin과 천식증상의 연관성을 관찰한 결과 천식의 급성악화환자는 안정상태의 천식환자에서 보다 혈장 eotaxin이 높았고, 기관지확장제에 반응을 잘하는 환자보다는 반응하지 않았던 환자에서, 그리고 퇴원하였던 환자보다 천식악화로 입원하였던 환자에서 혈청 eotaxin 이 높은 것을 확인하였고, 또한 eotaxin이 천식의 급성악화와 관련이 있으며, 폐기능 저하 및 천식의 중증도와 관련이 있는 것으로 생각하였다.

이처럼 임상적으로 폐기능 저하와 천식의 중증도와 관련이 있는 eotaxin의 발현을 麥門冬이 억제한다는 결과는 현재 천식에 사용되는 麥門冬의 치료기전을 밝히는데 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

RANTES의 발현량에 대한 실험을 살펴보면 cytokine에 의해 자극이 유도된 A549 cell에 麥門冬 0.01, 1, 100 μ g/m의 각 농도별로 처리한 후 RANTES의 mRNA 발현량이 control에 비해 0.01 μ g/ml에서 5%, 1 μ g/ml에서 10%, 100 μ g/ml에서는 14%가 감소된 것을 확인하였다.

RANTES는 주로 활성화 된 T 임파구와 일부 혈소판에서 분비되어, 기억형 CD4 T 임파구와 호산구에 화학주성을 가지고 있으며 호산구 및 호염기성구의 활성화에 관여하고 기관지 천식의 병인에 중요한 역할을 하고 있다³³.

RANTES와 관련된 임상연구에서 특이항원 기관지유발검사 전 혈청내 RANTES농도는 천식반응환자군이 정상 대조군보다 유의한 증가를 보였으나, 특이항원 유발검사후 천식환자군에서 유발전과 비교하여 유의있는 변화가 관찰 되지 않았고, 이는 기관지천식 환자의 병인에 RANTES농도의 증가가 중요한 역할을 하며, 특히 천식의 만성 염증성 변화에 깊이 관여한다고 보고 하였다³⁴.

한약과 관련된 RANTES에 대한 실험을 살펴보면 calcium ionophore로 처리된 사람의 비만세포주(HMC- ℓ)에서 地黃平喘湯³⁵과 白蓮治哮喘湯³⁶은 농도의존적으로 RANTES mRNA 발현을 억제하였다.

麥門冬의 RANTES의 발현량에 대한 실험결과는 억제 효과가 미미하여 주치료 기전으로 생각할 수는 없지만 한약의 다양한 함유성분에 의한 치료기전의 하나로 추측할 수 있다.

ICAM-1의 발현량에 대한 실험을 살펴보면 cytokine에 의해 자극이 유도된 A549 cell에 麥門冬 0.01, 1, 100 μ g/ml의 각 농도별로 처리한 후 ICAM-1의 mRNA 발현량이 control에 비해 1 μ g/ml에서 6%, 100 μ g/ml에서 7%가 감소 된 것을 확인하였다.

VCAM-1의 발현량에 대한 실험을 살펴보면 cytokine에 의해 자극이 유도된 A549 cell에 麥門冬 0.01, 1, 100 μ g/ml의 각 농도별로 처리한 후 VCAM-1의 mRNA 발현량이 control에 비해 1 μ g/ml에서 5%, 100 μ g/ml에서 12.5%가 감소 된 것을 확인하였다.

ICAM-1은 섬유아세포, 각질형성세포 및 혈관내피세포 표면에 발현되는 분자량 90-114kDad 의 유발성 표면 단백질이고, VCAM-1은 주로 혈관내피세포에서 발현되며, 대식세포, 수지상세포, 골수기질세포, 기도상피세포에서도 발현되며, 림프구와 호산구, 단구의 유착을 위한 배위자로 작용 한다³.

염증성 매개체로서 내피세포를 활성화시키면 시간에 따라서 다양한 유착분자의 표현이 증가한다. ICAM-1과 VCAM-1의 유도는 새로운 단백질합성을 필요로 하며 시작이 늦고 비교적 장시간 유지되기 때문에 만성염증 침윤에 역할을 하는 것으로 생각 된다³⁷.

기관지천식환자에서 특이 항원 유발 8시간후 혈청 ICAM-1, E-selectin 및 VCAM-1의 농도는 유발 전에 비하여 유의하게 증가하였는데 아토피성 기관지 천식 환자에서 혈청내 sICAM-1, sE-selectin 및 sVCAM-1 농도증가는 세포표면의 ICAM-1, E-selectin 및 VCAM-1의 표현증가를 반영하고, 아토피성 기관지 천식의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 사료되며, 이들은 기관지 천식환자의 염증반응의 지표로서 사용 될 수 있을 것으로 보았다³⁸.

호산구의 화학주성과 관련하여 eotaxin에 의한 호산구의 상피조직이동에는 MAC/ICAM-1과 VLA-4/VCAM-1의 상호작용이 중요하다고 하였다³⁹.

호산구의 이동과 관련된 ICAM-1과 VCAM-1에 대한 麥門冬의 발현억제 효과는 미미하게 나타나 치료효과 기전에 대한 기대치에는 미치지 못하는 것으로 판단되었으나, 麥門冬은 유착분자중 ICAM-1보다 VCAM-1에 더욱 연관성을 나타내었다.

IL-8의 발현량에 대한 실험을 살펴보면 cytokine에 의해 자극이 유도된 A549 cell에 麥門冬 0.01, 1, 100 μ g/ml의 각 농도별로 처리한 후 IL-8의 mRNA 발현량이 control에 비해 1 μ g/ml 에서 5%, 100 μ g/ml에서 16%가 감소 된 것을 확인하였다.

IL-8은 CXC chemokine로 분류되어 주로 호중구에 작용하지만 호산구에는 특정한 상황에서 선택적으로 작용한다^{26,40}. 그러나 CXC chemokine인 IL-8은 호산구의 알러지 염증부위 유입에 별다른 관여를 하지 않는다는 보고도 있다⁴¹.

생체 밖에서 IL-5가 호산구를 자극하면 IL-8에 반응할 수 있게 되고⁴², 이때 IL-8은 IL-5로 전 처리된 호산구에 칼슘의 세포내 증가, actin의 중합화, 화학주성을 나타내기 때문에 역시 이러한 cytokine이 병존하는 알레르기 염증 증이 존재하는 질병상태에서 호산구에 작용할 수 있음을 시사 한다⁴³.

IL-8과 관련된 실험을 살펴보면 TNF- α 로 처리된 BEAS-2B 기관지상피세포를 이용하여 小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘 100 μ g/ml 농도에서 IL-8 mRNA 발현량이 각각 47%, 43%의 유의성 있는 억제를 확인하였고⁴⁴, 瀉白散과 瀉白散加沙蔘 100 μ g/ml 농도에서 IL-8 mRNA 발현량이 각각 57%, 53%의 유의성 있는 억제를 확인하였다⁴⁵. 또한 calcium ionophore로 처리된 사람의 비만세포주(HMC- ℓ)을 이용한 실험에서 地黃平喘湯³⁵ 100 μ g/ml이 IL-8 mRNA 발현이 강하게 억제되었고, 白蓮治哮喘³⁶은 농도의존적으로 IL-8 mRNA 발현을 억제하였다.

IL-16의 발현량에 대한 실험을 살펴보면 cytokine에 의해 자극이 유도된 A549 cell에 麥門冬 0.01, 1, 100 μ g/ml의 각 농도별로 처리한 후 IL-16의 mRNA 발현량이 control에 1 μ g/ml 에서 9.8%, 100 μ g/ml에서 10.4%가 감소된 것을 확인하였다.

IL-16은 CD4+에 대한 강력한 화학주성(chemoattractant) cytokine으로 분류되며⁴⁶, histamine과 IL-1 β 및 TNF- α 등의 자극을 통하여 기관지 상피세포에서 발현되고, 기도 내 염증유발 세포의 축적에 중요한 역할을 담당하나, glucocorticoid 계열인 dexametason에 의해 IL-16의 발현이 억제되고 이어서 기도염증이 감소하게 되는 것을 볼 수 있다⁴⁷. 그 외 IL-16과 eotaxin의 차단으로 70%의 호산구 화학주성 억제효능을 보였고, anti-RANTES 항체는 단지 30%의 호산구 화학주성을 억제 효능을 보였다⁴⁸.

IL-8과 IL-16의 발현량에 대한 麥門冬 100 μ g/ml의 억제효과는 각각 16%, 10.4%로 나타나 麥門冬의 천식치료 기전중 하나로 볼 수 있을 것으로 생각된다.

호산구 chemotaxis 관련 실험에서 麥門冬 100 μ g/ml은 통과된 호산구의 수가 대조군의 296 \pm 19보다 훨씬 줄어든 193 \pm 15로 나타나 유의성(p<0.05) 있는 억제 효과가 나타났다.

따라서 麥門冬은 호산구의 이동을 저해하며 특히 eotaxin의 발현을 억제하므로 천식의 치료기전에 작용하는 것으로 생각된다.

IV. 結 論

A549 human lung epithelial cell에서 麥門冬이 eotaxin, RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16과 같은 chemokine과 호산구에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 麥門冬에 대한 세포 독성 실험, sandwich ELISA, RT-PCR을 이용한 chemokine 저해 효과 검증, 사람 혈액으로부터 직접 호산구를 분리하여 chemoattractant에 대한 in vitro 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 麥門冬을 농도별로 처리하여 MTS assay를 실시한 결과 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.
2. Chemokine의 발현을 유도한 다음 ELISA를 실시한 결과 eotaxin의 생산량이 麥門冬의 농도에 의존적으로 저해되는 것을 확인하였다.
3. RANTES, ICAM-1, VCAM-1, IL-8, IL-16이 麥門冬 100 μ g/ml에서 각각 14%, 7%, 12.5%, 16% 10%의 발현량을 저해하는 효과가 있는 것을 확인하였다.
4. 사람의 혈액으로부터 호산구를 분리한 결과 1 \times 10⁵개의 호산구를 획득하였고 purity는 97.2 \pm 0.34%이었으며 trypanblue 염색을 하여 관찰한 결과 생존율은 98.7%였다.
5. 분리한 호산구를 이용하여 chemotaxis assay를 실시한 결과 1 μ g/ml에서는 유의한 감소는 없었지만 100 μ g/ml에서는 유의성있는 감소를 나타내어 고농도에서는 麥門冬이 chemoattractant에 대한 저해 효과가 있는 것을 확인하였다.

참고문헌

1. Asky JA, Brody AR. Interleukins involved in the pathogenesis of chronic airway inflammation. *Resp Immunol*. 1997;148(1):39-47.
2. Palma Carlos AG, Palma Carlos ML, Conceição SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 1997;7(5):270-273.
3. 대한 천식 및 알레르기 학회. 천식과 알레르기. 서울;군자출판사;2002, p.237-256, p.279-285.
4. Darryl Adamko, Solomon Olawole Odemuyiwa, Redwan Moqbel. The eosinophil as a therapeutic target in asthma: beginning of the end, or end of the beginning?. *Current Opinion in Pharmacology*. 3:227-232, 2003.
5. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1715-21.
6. 이양근. 알레르기 질환에서의 유착분자. 대한천식 및 알레르기학회 춘계학술대회초록집. 1995:105-110.
7. 전국한의학대학폐계내과교실편저. 東醫肺系內科學. 서울:도서출판국진; 2004, p.192-199, 329-331.
8. 정희재, 정승기, 이형구 편저. 臨床肺系內科學. 서울:한문화사;2003, p.138-140.
9. 李龍城. 經藥分類典. 서울:도서출판 정담;2002, p.12.
10. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희. 韓藥臨床應用. 서울:전통의학연구소;1993, p.371-372..
11. 최석봉, 정승기, 이형구. 맥문동탕 및 가미맥문동탕의 효능에 관한 실험적 연구. 경희한의대는 문집. 1989;12:245-261.
12. 이상석, 정승기, 이형구. 맥문동탕이 SO₂에 의한 흰쥐의 호흡기 손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1994;15(2):173-83.
13. 김현영, 한상환. 맥문동탕이 백서의 기관지 평활근에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1995;15(2) :240-8.
14. 이선화, 박동일. 맥문동탕의 흡연에 대한 효과. 본초학회지. 1996;11(2):161-73.
15. 이해민, 신민규, 김완희. 백서의 O₃ 중독 폐손상에 관한 오미자 맥문동의 영향. 대한동의생리학회지. 1989;3(2):3-10.
16. 서창훈, 박동일. 가미맥문동탕이 알레르기 천식의 호흡양상 및 기관조직의 호산구 침윤에 미치는 영향. 동의한의연(동의대학교 한의학연구소). 2000;4:19-31.
17. 류옥상, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동탕이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. 제5회 한중 학술대회발표 논문집. 1999;3-13.
18. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동탕과 정화담강기탕이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(1):37-49.
19. 이동생, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동과 오미자가 Asthma model내의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 경희의학. 2000;16(2):69-80.
20. 박영환, 박희수. 기관지 천식 생쥐 모형에서 맥문동 약침이 항알레르기 및 면역반응에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2001;4(1):65-81.
21. 정해준, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동청폐음과 맥문동이 인간기관지 상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(1):11-23.
22. 고영률. 천식의 병태생리. 소아알레르기 및 호흡기. 2000;10(4):255-262.
23. 이양근. 호산구와 천식. 결핵 및 호흡기질환. 1999;46(1):5-16.
24. John JR. Update on cells and cytokines-Interleukin 4 and its receptor. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99;1-5.

25. Wardlaw AJ., Eosinophil trafficking in asthma. *Clin Med.* 2001;1(3):214-8.
26. 정일엽, 박춘식. 호산구와 관련된 chemokine에 대한 새로운 조명. 천식 및 알레르기. 2001;21(2):161-172.
27. 전국한의학대학교 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울:도서출판 영림사, 2004; p.647.
28. Dunzendorfer S., Kaneider NC., Kaser A., Woell E., Frade JM., Mellado M., Martinez-Alonso C., Wiedermann CJ. Functional expression of chemokine receptor 2 by normal human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(4):581-7.
29. Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, Kay AB. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):6321-9.
30. Atasoy U, Curry SL, Lopez de Silanes I, Shyu AB, Casolaro V, Gorospe M, Stellato .Regulation of eotaxin gene expression by TNF-alpha and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Immunol.* 2003 Oct 15;171(8):4369-78.
31. Stellato C., Brummet ME., Plitt JR., Shahabuddin S., Barody FM., Liu MC., Ponath PD., Beck LA. Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J Immunol.* 2001;166(3):1457-61.
32. 송소향, 이소영, 김치홍, 문화식, 송정섭, 박성학. 혈장 eotaxin과 천식의 급성악화 및 중증도와의 연관성. 결핵 및 호흡기질환. 2001;51(1):35-43.
33. Alam R., Stafford S., Forsythe P., Harrison R., Faubion D., Lett-Brown MA., Grant JA. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol.* 1993;150(8 Pt 1):3442-8.
34. 이양근 김재현 이용철 기관지천식환자에서 기관지특이항원 유발검사후 RANTES농도의 변화, 결핵 및 호흡기질환, 1996;43(2):182-189.
35. 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 사람 비만細胞柱에서의 케모카인에 對한 地黃平喘湯의 效果. 대한한방내과학회지. 2002;23(3):375-385.
36. 이형철. 사람 Mast cell에서의 케모카인에 대한 白蓮治哮喘의 效果, 경희대학교 대학원. 2002.
37. Argenbright LW, Barton RW. Interactions of leukocyte integrins with intercellular adhesion molecule 1 in the production of inflammatory vascular injury in vivo. The Shwartzman reaction revisited. *J Clin Invest.* 1992 Jan;89(1):259-72.
38. 이영승. 기관지 천식환자에서 soluble ICAM-1, E-selectin 및 vCAM-1 농도변화. 전북대학교 대학원. 1997.
39. Jia GQ., Gonzalo JA., Hidalgo A., Wagner D., Cybulsky M., Gutierrez-Ramos JC. Selective eosinophil transendothelial migration triggered by eotaxin via modulation of Mac-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 interactions. *Int Immunol.* 1999;11(1):1-10.
40. Sehmi R., Cromwell O., Wardlaw AJ., Moqbel R., Kay AB. Interleukin-8 is a chemo-attractant for eosinophils purified from subjects with a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin Exp Allergy.* 1993;23(12):1027-36.
41. Petering H., Gotze O., Kimmig D., Smolarski R., Kapp A., Elsner J. The biologic role of interleukin-8: functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. *Blood.* 1999;93(2):694-702.
42. Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, Ponath PD, Mackay CR. Chemokine receptor usage by human

- eosinophils: The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest.* 1997 Jan 15;99(2):178-84.
43. Schweizer RC, Welmers BA, Raaijmakers JA, Zanen P, Lammers JW, Koenderman L. RANTES- and interleukin-8-induced responses in normal human eosinophils: effects of priming with interleukin-5. *Blood.* 1994 Jun 15;83(12):3697-704.
44. 정진용, 정희재, 정승기, 이형구.小青龍湯과小青龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 人間氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는影響. 대한한의학회지. 2003;24(1):74-83.
45. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구.瀉白散과瀉白散加沙蔘이 人間氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF 發顯에 미치는影響. 대한한방내과학회지. 2002;23(1):15-24.
46. Cruikshank WW, DM Center, N Nisar, M Wu, B Natke, AC Theodore, H Kornfeld. 1994. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:5109-5113.
47. Arima M, Plitt J, Stellato C, Bickel C, Motojima S, Makino S, Fukuda T, Schleimer R. Expression of interleukin-16 by human epithelial cells. Inhibition by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Dec;21(6):684-92.
48. Cheng G., Ueda T., Eda F., Arima M., Yoshida N., Fukuda T. A549 cells can express interleukin-16 and stimulate eosinophil chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(2):212-8.