

# 녹용 물추출물이 Ovalbumin으로 유도된 천식동물모델에 미치는 영향

박기범<sup>1</sup> · 변성희<sup>1,2</sup> · 양재하<sup>1,2</sup> · 서정철<sup>1,2</sup> · 변준석<sup>1</sup> · 김상찬<sup>1,2\*</sup>

1: 대구한의대학교 한의과대학, 2: 한방생명자원연구센터

## Effects of Deer Horn Extract on the Experimental Asthma Induced by Ovalbumin

Ki Bum Park<sup>1</sup>, Sung Hui Byun<sup>1,2</sup>, Chae Ha Yang<sup>1,2</sup>, Jung-Chul Seo<sup>1,2</sup>, Joon Seok Byun<sup>1</sup>, Sang Chan Kim<sup>1,2\*</sup>

1: College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, 2: Research Center for Biomedical Resources of Oriental Medicine

This study was performed to investigate the effect of oral administration of deer horn against the asthma. Deer horn improves body metabolism and strengthens overall health, especially in elderly persons and young children. Additionally, it stimulates sexual function in females and can stimulate wound healing. Asthma was induced to Balb/c mouse by i.p. injection and aerosol immunization with ovalbumin. It was observed the change of the eosinophil number in the BALF. Concentrations of IL-4, IL-5 in BALF and splenocyte were assessed by ELISA, IgG and IgE from serum were calculated by same method. The number of eosinophil in BALF was not significantly changed in deer horn group compared with control group. Concentration of IL-4 in BALF was significantly decreased in deer horn group compared with control group. Levels of IL-5 from BALF and splenocyte were significantly decreased in deer horn group compared with control group, respectively. Concentrations of IgE and IgG in serum were significantly decreased in deer horn group compared with control group, separately. We found that the effect of deer horn extract in asthma was implicated in reductions of IL-4, IL-5 released from Th2 cell, and decreases of IgG, IgE from plasma cell. These findings suggest that deer horn extract can produce anti-asthmatic effect, which may play a role in allergen-induced asthma therapy.

Key words : Deer Horn, Asthma, Interleukin, Immunoglobulin, Eosinophil

### 서 론

천식은 기도가 광범위하게 수축되어 좁아지고 기도의 수축이 수분내지 며칠 동안 지속되는 기관지폐쇄, 기관지염증을 일으키는 질환이다. 천식은 병리학적으로 기도의 eosinophilic inflammation, bronchospasm과 비특이적 항원흡입에 대한 hyperreactivity로 특징지어질 수 있다<sup>1)</sup>.

임상적으로는 기침,喘鳴, 호흡곤란등의 증후를 보이면서, 호산구(Eosinophil)를 위시한 다양한 염증세포들이 기도내로의 침윤을 나타낸다<sup>2)</sup>. 또한, 천식은 알러지성 질환으로 Th1과 Th2 cell간의 imbalance로 인하여 유발되며, 특히 Th2-type의 면역반

응이 현저하여 발생된다<sup>3)</sup>.

Interleukine(IL)-4, IL-5, IL-10등의 Th2-type cytokine들은 eosinophil과 mast cell, B cell등을 활성화시켜 천식의 진행에 연관된다<sup>4)</sup>. 역학적 연구에 의하면 미국에서 천식은 인구의 5-10%에서 발생하며<sup>5)</sup>, 천식의 발병률 및 사망률은 세계적으로 증가추세에 있음이 보고되고 있다<sup>6)</sup>. 천식은 발작성의 호흡곤란, 천명, 기침, 나음(rales)을 특징으로 하는 증후군으로<sup>7)</sup>, 원인의 대부분을 차지하는 알레르기 외에도 상기도 감염, 정서적 스트레스, 기후변화, 약물, 운동 등이 천식을 유발할 수 있다<sup>8)</sup>.

천식은 한의학적으로 哮喘證에 해당되는데<sup>9)</sup> 喉中有聲響한 것을 哮라하고 呼吸急促한 것을 喘이라하여 구분하기도 하나, 청대 이후로는 哮喘에는 喘促症이 겸하여 나타난다고 하여 哮喘證을 하나의 증후로 보고 있다<sup>9)</sup>.

현재까지 천식에 대한 한의학적 연구로 이<sup>9)</sup>가 五拗湯의 진

\* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : sckim@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2247

· 접수 : 2005/07/18 · 수정 : 2005/08/22 · 채택 : 2005/09/20

해, 항Histamin 및 기관지평활근 이완효과를, 정<sup>10,11</sup>)은 加味清上補下湯과 定喘湯을 이용하여 폐기관지와 면역기능의 변화를, 박<sup>12</sup>)은 千繻導痰湯의 항알레르기 반응과 면역기능에 대한 연구를 보고하였다.

녹용에 대한 연구는 유 등<sup>13</sup>)이 치주인대세포의 세포주기 조절에 미치는 영향, 황 등<sup>14</sup>)이 다이옥신유도 독성에 대한 방어효과, 이 등<sup>15</sup>)이 조혈작용에 대한 오 등<sup>16</sup>)이 흑색종 유발 생쥐의 종양억제와 면역기능에 미치는 영향, 윤 등<sup>17</sup>)이 항산화 효과, 김 등<sup>18</sup>)이 운동억제성 골다공증에 미치는 영향 등을 평가하였으나, 아직 전식에 대한 보고는 부족하다.

본 연구는 녹용이 천식에 미치는 효과를 알아보기 위하여, Balb/c mouse에 ovalbumin으로 알레르기성 천식을 유발한 후 BALF(기관지폐포세척액, Bronchoalveolar avage fluid)에 존재하는 eosinophil, IL-4, IL-5의 변화, 혈청 중 IgG, IgE의 변화, splenocyte의 IL-4, IL-5의 분비량을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험방법

### 1. 실험동물의 사육

실험동물은 female BALB/c mouse(오리엔트, 대구, 한국)를 사용하였으며, 천식을 유도하지 않고 PBS를 투여한 Normal군, 천식을 유도하고 PBS만을 투여한 Control군, 천식을 유도하고 녹용을 투여한 Deer horn군으로 나누어 각 군당 5마리씩 총15마리를 사용하였다. 실험동물은 5마리씩 분리하여 polycarbonate cage에 수용하고, 온도 20-25℃ 및 습도 30-35%로 조절된 항온습습 및 공기청정 시스템(동물사육시스템, 한국)에서 사육하였으며, 명암주기는 12/12시간으로 조절하였다. 사료(한란, 한국)및 음용수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다.

### 2. 한약액의 제조 및 투여

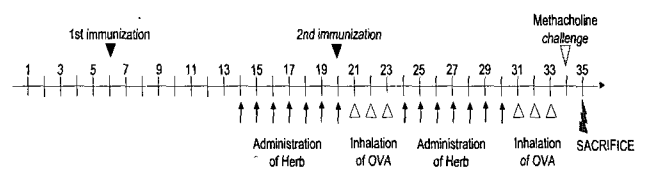
녹용 300g(영남약업사, 대구, 한국)을 정제수 2000ml로 3시간 가열 추출한 후, 추출물을 여과지로 1차 여과한 다음, 여과액을 rotary evaporator로 감압농축하여 점조성 추출물을 얻었다. 이 점조성 추출물을 다시 동결건조하여 57.87g(수율 19.29%)의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 검액의 투여는 11.0mg/20g를 1회/1일 투여량으로 하여, 철제 경구주입기(명진사, 서울, 한국)를 사용하여 경구투여하였다.

### 3. 면역반응의 유도

면역반응을 유도하기 위하여 10mg/ml(PBS)의 ovalbumin(Sigma, USA) 5 $\mu$ l와 Alum(Imject® Alum, Pierce, USA)50 $\mu$ l, PBS 50 $\mu$ l를 복강주사로 immunize하였다. 1차 면역 유도 후, 면역 boosting을 위하여 12일 후 동일한 방법으로 2차 면역을 유도하였다.

### 4. Inhalation

1.0% ovalbumin in PBS를 Nebulizer(Omron, Japan)로 분무하여 30분간 흡입시킨 후, 기도알러지를 유도하였다.



Scheme 1. Experimental Design.

### 5. 혈액의 채취

Heparinized capillary tube(Superior, Germany)를 이용하여 mouse의 눈외자를 찔러 채혈한 다음, 1.5ml tube에 넣어 8,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상등액은 실험전까지 -70℃에 보관하였다.

### 6. 실험동물의 희생 및 BALF채취

Mouse의 꼬리와 경추부분을 당겨 경추를 탈구시킨 후, BALF를 취하였다. 즉, 목부위와 흉부의 피부를 절개하고, 기관지에 24G needle(Becton Dickinson, Korea)을 삽입하고 봉합사(원산업, 한국)로 단단히 묶은 후, 1ml syringe에 EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)용액을 500 $\mu$ l를 넣은 후 기관지 내로 삽입하여 up & down하여 BALF를 얻었다. 이를 6회 반복하여 각기 다른 3개의 tube에 BALF 1ml씩 취한 후, 가장 먼저 채취한 1ml의 BALF를 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여, cytokine 측정을 위한 상등액은 -70℃에 보관하였고, pellet은 나머지 BALF와 합쳐 사용 전까지 냉동보관하였다.

### 7. Spleen의 적출 및 splenocyte채취

BALF를 채취한 뒤, mouse의 횡격막을 절개하여 spleen을 적출한 다음, 5ml의 RPMI 1640에 spleen을 넣은 다음, 이물질을 제거하고 cell strainer(10 $\mu$ m, Falcon, USA)를 사용하여 곱게 mash하였다. 이를 4,000rpm으로 3분간 원심분리한 후, 상등액을 제거한 pellet에 RBC lysis buffer 2ml를 넣고 2분간 방치 후, 8ml의 RPMI 1640을 넣은 후 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액은 제거하였다. 각 pellet에 10ml의 RPMI 1640을 넣은 후, cell counting하여 최종 5 $\times$ 10<sup>5</sup>개로 24 well plate에 분주하여 배양하였다.

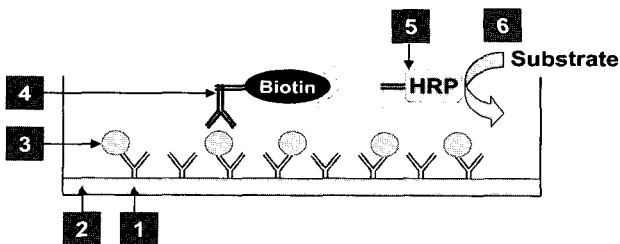
### 8. Eosinophil측정

BALF를 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액은 버리고 pellet에 RBC lysis buffer를 200 $\mu$ l넣고 vortex 후 얼음에 2분간 방치하였다. 여기에 800 $\mu$ l의 RPMI 1640을 넣은 후, 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여, 상등액은 버리고, pellet에는 1ml의 PRMI 1640을 넣어 잘 흔들어 준 후 20 $\mu$ l를 취하고, 여기에 다시 trypan blue(Sigma, USA) 60 $\mu$ l를 더하여 cell counting하였다. 최종적으로 각 실험개체당 4 $\times$ 10<sup>4</sup>개의 cell을 취하여 cytocentrifuge(Wesor, USA)에 옮겨, 550rpm으로 5분간 원심분리한 다음, Diff-Quick staining(Sysmax, Japan)으로 염색하고 fixer(Biomedica, Canada)를 10 $\mu$ l떨어 뜨린 후 eosinophil의 수를 측정하였다.

9. Antibody 측정

- 1) Microtiter plate (96-well)에 ovalbumin(Sigma, USA) 5µl/ml PBSN(PBS+sodium azide 0.02%)을 well당 100µl씩 넣고 4℃에서 overnight하여 coating하고, PBSN 으로, 3차례 세척하였다.
- 2) 96-well plate에 1% BSA in PBSN을 150µl/well을 넣은 뒤, 37℃에서 1시간 배양한 후, PBSN으로, 3차례 세척하였다.
- 3) 실험방법 6에서 준비한 혈액의 상등액 sample을 dilution buffer (0.1% BSA in PBSN)로 희석한 후 37℃에서 3시간 이상 반응시킨 후, PBSN으로 3차례 세척하였다.
- 4) IgG, IgE의 antibody를 dilution buffer로 희석하여 well당 100µl를 가하고, 37℃에서 2시간 배양한 후, PBSN으로 3차례 세척하였다.
- 5) 기질인 pNPP(p-nitrophenyl-phosphate)를 carbonate buffer(pH 9.6)에 1mg/ml로 녹여 각 well당 100µl/well 가한 후, 15분(IgG), 12시간(IgE) 배양하고, spectrophotometer (Tecan, Austria)로 OD(Optical Density)값을 측정하였다. (405nm-492nm)

10. Cytokine 측정



Scheme 2. Procedure for Cytokine Measurement.

- 1) capture antibody를 plate에 coating하기 위하여, 96-well plate에 IL-4, IL-5 각각의 capture antibody(Parmigen, USA) 2µg을 1ml의 PBS에 녹여 각 well당 50µl씩 넣고, 실온에서 overnight하고, PBS로 3차례 세척하였다.
- 2) 1%의 BSA(Sigma, USA)를 각 well당 200µl씩 넣고, 37℃에서 1시간 배양하여 blocking한 후, PBS로 3차례 세척하였다.
- 3) 실험방법 7에서 준비한 BALF의 상등액 sample은 100,000배로 희석하여 각 well당 50µl씩 넣어 3시간 배양한 후, PBS tween으로 3차례 세척하였으며, 실험방법 8에서 준비한 Splenocyte는 +/-ovalbumin 1% in RPMI 1640에 72시간 배양한 배지를 각 well당 50µl씩 넣어 3시간 배양한 후, PBS tween으로 3차례 세척하였다.
- 4) IL-4, IL-5의 detection antibody(Parmigen, USA) 2µg을 1ml의 PBS에 녹여 각 well당 50µl씩 넣고, 37℃에서 1시간 배양하고, PBS tween으로 3차례 세척하였다.
- 5) Biotin에 특이성을 갖는 avidin-HRP(Pierce, USA) 10µg을 삼차증류수 10ml에 녹여 well당 100µl를 넣어서 30분 배양한 후 PBS tween으로 3회, 그리고 PBS로 3회씩 세척하였다.
- 6) 효소의 기질인 OPD peroxidase substrate(Sigma, USA) 2 different tablets을 20ml의 삼차증류수에 녹여, 각 well당 100µl씩 넣고, 15분 후 spectrophotometer (Tecan, Austria)로 OD값을 측정하였다. (405nm-492nm)

실험 성적

1. BALF에서의 eosinophil의 수적 변화에 미치는 영향

BALF에서 eosinophil의 수는 normal군에서는 13 ± 17.35개, control군에서는 162.3 ± 44.52개, deer horn군에서는 128.3 ± 39.1개로 나타났다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 증가하였다. 그리고, deer horn군은 control군에 비교하여 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의성있는 변화를 나타내지는 못하였다(Fig. 1).

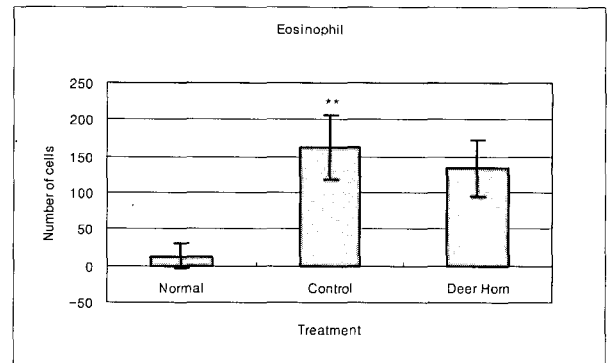


Fig. 1. Eosinophil counts in BALF of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 µg of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean ± SD of three separate experiments (n = 5 for each group) \*\*P < 0.01 compared with normal.

2. BALF에서의 Interleukin-4의 변화에 미치는 영향

BALF에서의 IL-4의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.009, control군에서는 1.080 ± 0.020, deer horn군에서는 1.020 ± 0.025이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-4의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 2).

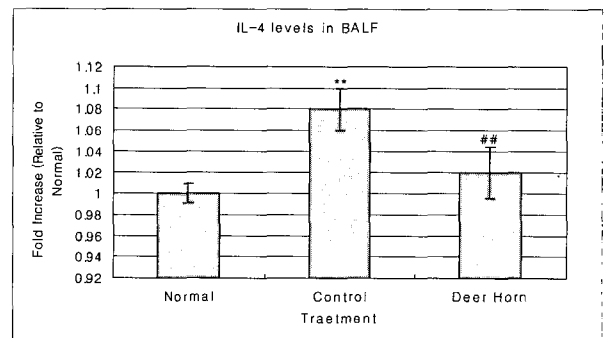


Fig. 2. Interleukin-4 concentration in BALF of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 µg of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean ± SD of three separate experiments (n = 5 for each group) \*\*, P < 0.01 compared with normal, ##, P < 0.01 compared with control.

3. 비장세포의 Interleukin-4에 미치는 영향

Splenocyte를 배양한 배지에서의 IL-4의 함량은 normal군에

대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은  $1.000 \pm 0.005$ , control군에서는  $1.010 \pm 0.008$ , deer horn군에서는  $1.003 \pm 0.005$ 으로 모두 유의한 결과를 나타내지 않았다(Fig. 3).

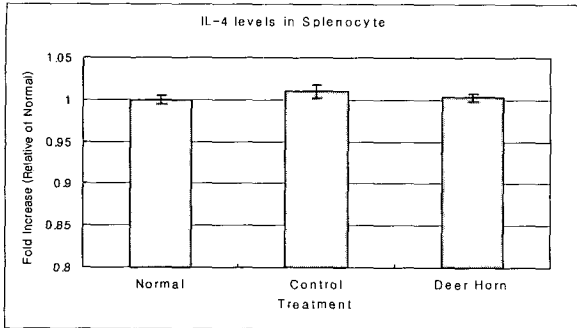


Fig. 3. Interleukin-4 concentration in culture supernatant of splenocyte each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50  $\mu$ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments (n = 5 for each group).

4. 항원자극을 동반한 비장세포의 Interleukin-4에 미치는 영향

OVA를 처치한 splenocyte의 배양액 중 IL-4의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은  $1.000 \pm 0.027$ , control군에서는  $1.036 \pm 0.026$ , deer horn군에서는  $1.023 \pm 0.018$ 로 모두 유의한 결과를 나타내지 않았다(Fig. 4).

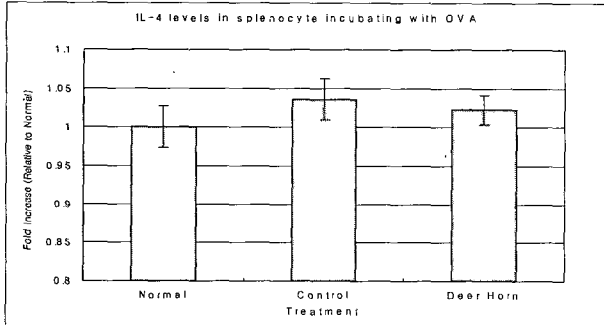


Fig. 4. Interleukin-4 concentration in culture supernatant of splenocyte with OVA each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50  $\mu$ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments (n = 5 for each group).

5. BALF에서의 Interleukin-5의 변화에 미치는 영향

BALF에서의 IL-5의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은  $1.000 \pm 0.025$ , control군에서는  $1.116 \pm 0.050$ , deer horn군에서는  $1.015 \pm 0.037$ 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-5의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 5).

control군에서는  $1.049 \pm 0.025$ , deer horn군에서는  $1.005 \pm 0.016$ 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-5의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 6).

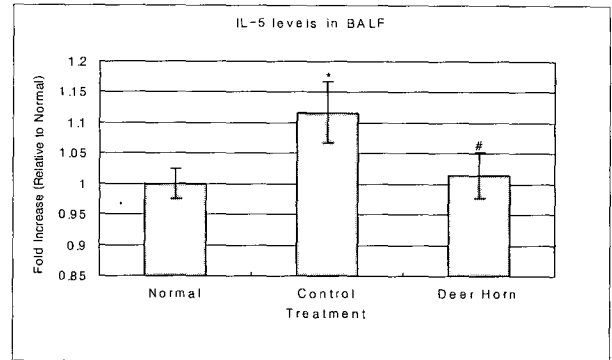


Fig. 5. Interleukin-5 concentration in BALF of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50  $\mu$ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments (n = 5 for each group) \*: P < 0.05 compared with normal, #: P < 0.05 compared with control.

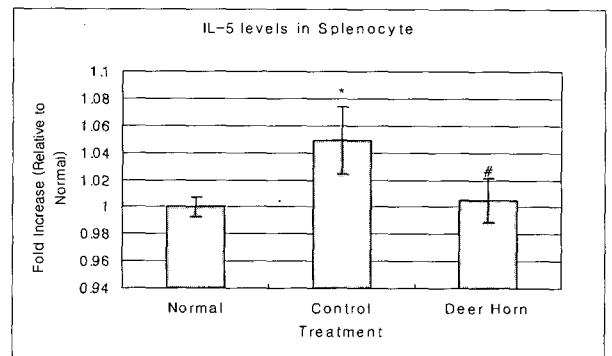


Fig. 6. Interleukin-5 concentration in culture supernatant of splenocyte each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50  $\mu$ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments (n = 5 for each group) \*: P < 0.05 compared with normal, #: P < 0.05 compared with control.

7. 항원자극을 동반한 비장세포의 Interleukin-5에 미치는 영향

OVA를 처치한 splenocyte의 배양액중 IL-5의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은  $1.000 \pm 0.005$ , control군에서는  $0.999 \pm 0.005$ , deer horn군에서는  $1.000 \pm 0.006$ 로 모두 유의한 결과를 나타내지 않았다(Fig. 7).

8. 혈청 Immunoglobulin G의 변화에 미치는 영향

혈청 중 Ig G의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은  $1.000 \pm 0.002$ , control군에서는  $1.267 \pm 0.0313$ , deer horn군에서는  $1.137 \pm 0.010$ 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 Ig G의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 Ig G의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 8).

6. 비장세포의 Interleukin-5에 미치는 영향

Splenocyte를 배양한 배지에서의 IL-5의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은  $1.000 \pm 0.007$ ,

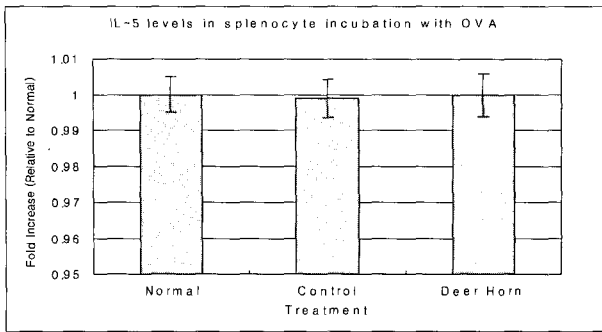


Fig. 7. Interleukin-5 concentration in culture supernatant of splenocyte with OVA each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50  $\mu$ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments (n = 5 for each group).

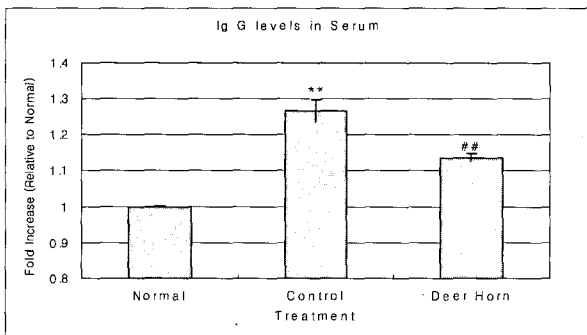


Fig. 8. Immunoglobulin G concentration in serum of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50  $\mu$ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments (n = 5 for each group) \*\*: P < 0.01 compared with normal, ##: P < 0.01 compared with control.

9. 혈청 Immunoglobulin E의 변화에 미치는 영향

혈청 중 Ig E의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000  $\pm$  0.207, control군에서는 8.244  $\pm$  0.777, deer horn군에서는 6.150  $\pm$  1.087이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 Ig E의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 Ig E의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 9).

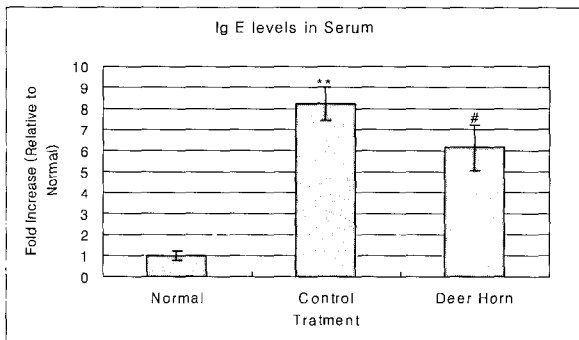


Fig. 9. Immunoglobulin E concentration in serum of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50  $\mu$ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three separate experiments (n = 5 for each group) \*\*: P < 0.01 compared with normal, #: P < 0.05 compared with control.

고 찰

氣管支 喘息은 기관지의 반응성 증가를 특징으로 하며 여러 가지 자극에 의해 기도의 점막에 염증반응을 일으키고 기관지 평활근을 수축시켜 기도폐색을 일으키게 되는데, 이러한 기도의 폐색은 자연적으로 또는 치료의 결과에 따라 회복되는 가역적인 특성을 갖고 있다<sup>19)</sup>.

喘息을 일으키는 원인으로는 알러젠의 흡입, 호흡기감염, 일상의 스트레스에 대한 심인성 생리반응, 공기오염, 기후, 약물, 운동 등이 있으며, 이 중 喘息發作의 원인이 대부분 알러르기(allergy)성으로 받아들여지고 있다, 특징적인 증상으로는 발작성의 호기성호흡곤란, 천명, 과호흡, 기침, 나음(rales)을 들 수 있다<sup>6)</sup>.

韓醫學에서 喘息은 哮喘證에 該當되는데<sup>20)</sup>, 哮喘證의 辨證은 우선 實證을 가려, 實證은 주로 風寒, 痰濁 등의 病邪로 因하며 治療는 祛邪에 중점을 두고, 虛證은 주로 肺虛, 腎虧 등으로 因하므로 治療는 扶正에 중점을 두고 있다<sup>21)</sup>.

본 연구에서는 허증성 병변에 적용되는 녹용이 천식에 미치는 효과를 알아보고자, Balb/c mouse에 ovalbumin으로 알러르기성 천식을 유발한 후 BALF 에 존재하는 eosinophil, IL-4, IL-5, 혈청 중 IgG, IgE, splenocyte의 IL-4, IL-5의 량을 관찰하였다.

많은 염증질환은 호산구증다증(eosinophilia)와 관련성이 많다. 예를 들면, 천식, 알러지성비염, 아토피성 피부질환 그리고, 염증성장질환 등이다<sup>22)</sup>. 호산구는 천식 기도내에서 흔히 관찰되며, 호산구성 기도 염증은 천식의 가장 특징적인 소견중의 하나로서 호산구의 기도내 유입기전에 대한 연구는 천식의 병리상태를 밝히고 그에 대한 치료를 고안하는데 중요하다고 할 수 있다<sup>23)</sup>.

호산구(eosinophil)은 1846년 Wharton Jones에 의해 발견되었고, 이후 Paul Ehrlich에 의해 산성염료인 eosin에 의해 염색된다고 하여 호산구라고 명명하였다<sup>24)</sup>. 호산구가 활성화되면 호산구 표면의 인지질(phospholipid)로부터 phospholipase A2에 의해 lyso-PAF가 생성되고 acetyltransferase에 의해 활성화되어 PAF(platelet activating factor)가 생성된다. 또한 아라키돈산으로부터 cyclooxygenase에 의해 prostaglandine F2 $\alpha$ 와 lipoxygenase에 의해 호중구에서는 LTB4가 주로 생성되는데 반해 호산구로부터는 LTC4 및 LTD4와 15-HETE등이 생성되는데, 이들은 강력하게 기관지를 수축시키고, 혈관투과성을 증가시킬 뿐 아니라 이들 자체가 호산구에 대한 화학주성능 및 활성능이 있으므로 말초혈액으로부터 호산구를 기도내로 유입시키고 활성화시켜 알러르기 염증반응을 지속시킨다. 또한 호산구를 비롯한 염증성 세포들과 호산구의 활성화시 분비되는 불활인 양이온단백(cationic protein)들이 기도 상피세포 손상에 관여한다<sup>25)</sup>. 임상적으로도 급성천식환아의 조직검사에서 기도주위에 호산구의 침윤을 특징적으로 관찰할 수 있다<sup>26)</sup>.

즉, 호산구는 천식의 후기반응시 기도 내로 유입되어 세포막으로부터 PAF, PGF2 $\alpha$ , LTC4, LTD4 등을 생성하여 이들에 의해 강력하게 기관지를 수축시키고, 혈관투과성을 증가시켜 피하조직부종등을 유발시켜 이에 의해 이차적인 기도수축을 유발시키며, 또한 이들의 화학주성능에 의해 호산구 자신과 다른 염증

반응세포를 유입시켜 천식반응을 지속시키면서, MBP, ECP 등의 세포독성단백을 분비시켜 기도점막을 손상시키고 점막박탈층을 초래함으로써 기도과민성을 증가시킨다<sup>24,27</sup>.

본 실험에서의 BALF에서 eosinophil의 수는, control군에서 normal군에 비교하여 유의성 있게 증가하였다. Deer horn군은 control군에 비교하여 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의성 있는 변화를 나타내지는 못 하였다.

한편, 천식에서 기도내의 dendritic cell(수지상세포)은 naive T cell을 Th2 cell로 generation에 하는데에 중추적인 역할을 한다<sup>28</sup>. Dendritic cell은 가장 강력한 항원제시세포(antigen presenting cell)로서 1차적인 세포성 면역반응을 유발할 수 있는 유일한 세포이며 골수에서 기원해서 미성숙한 형태로 혈류를 거쳐 체내 모든 기관에 이동해 간다<sup>29</sup>. 수지상세포는 각 조직에서 주변의 항원(antigen)을 채집해서 림프기관으로 가서 T 림프구에 항원을 제시하는 역할을 한다<sup>28,30,31</sup>. 분화된 Th2 cell는 항원제시세포와 만나 알레르겐의 peptide를 공여받게 되면 IL-4, IL-5, IL-13 등의 cytokine을 분비하여 알레르기 염증을 발생시키는데 있어 중심적인 역할을 담당한다<sup>32</sup>.

IL-5의 분비는 allergic asthma를 유발하는 allergen이 폐로 흡입되면, mast cell과 Th2 cell이 기관지에서 활성화되게 되고, 항원에 의하여 활성화된 Th2 cell은 IL-4, IL-5 그리고 IL-13을 분비하게 되고, mast cell은 TNF- $\alpha$ 를 분비한다. IL-4와, IL-13, TNF- $\alpha$ 는 기도내에 있는 epithelial cell, smooth muscle cell, fibroblast를 자극하여 eotaxin의 분비를 상승적으로 촉진시킨다. eotaxin과 IL-5는 폐조직에서 혈관으로 흡수되어 체내를 순환하면서, 골수에서 eosinophil의 성장 및 분화를 활성화하여, 다시 병소인 폐, 기관지에 eosinophil을 증가시켜 기도의 염증 및 천식을 유발한다<sup>33-35,36</sup>.

최근의 연구에 의하면, 이러한 IL-5를 억제시켜 천식 및 다른 hypereosinophilic disorders를 치료할 수 있는 가능성을 시사하고 있다<sup>27,37-40</sup>. 실제로 Garrete등<sup>39</sup>은 anti-interleukin-5인 mepolizumab을 인체에 투여하면 eosinophil의 활성화를 유의하게 줄일 수 있음을 보고하였다.

또 IL-4는 IgE항체의 생성 및 미감작 CD4<sup>+</sup> Th cell을 Th2 cell로 발생시키는 주요자극제이다<sup>41</sup>. T 림프구에서 유래된 다른 종류의 cytokine들은 각각 특정 Ig동형으로의 전환을 유도한다. 이 중 IL-4는 시험된 종(species)에서는 모두 IgE에 대한 중요한 전환인자이다. 즉 IL-4는 B cell을 plasma cell로의 발달을 이끌어 IgE, IgG 등의 생성을 유발시킨다<sup>34</sup>. 이렇게 생성된 IgE는 mast cell에 작용하여 granule방출을 유도함으로써 과민반응을 일으킨다<sup>41-43</sup>.

본 실험에서는 BALF와 splenocyte에서 IL-4, IL-5의 량을 측정하였다. 먼저 BALF에서는 BALF에서의 IL-4의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-4의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성있게 감소시켰다.

실험동물의 spleen에서 얻은 splenocyte를 배양(-/+OVA)한 배지에서의 IL-4의 함량은 실험군 전체에서 유의한 변화를 나타

내지 못하였다.

IL-5는 BALF에서 control군이 normal군에 비교하여 유의성 있게 IL-5의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성있게 감소시켰다.

또한, splenocyte를 배양한 배지에서의 IL-5의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-5의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성있게 감소시켰다.

그러나, OVA를 처치한 splenocyte의 배양액중 IL-5의 함량은 IL-4와 마찬가지로 유의한 결과를 나타내지 않았다.

Ig E는 plasma cell에서 분비되는 것으로, Ig E는 조직내에서 Fc $\epsilon$ R I 이라 불리는 고친화성 표면수용체를 매개로 mast cell에 강하게 결합한다. 항원이 Ig E에 결합하면 이들 수용체들이 교차결합(cross-links)하게 되고, 이는 mast cell의 granule로부터 화학적 매개 물질들의 분비를 유발하게 되어 제1형 과민반응의 발생에 이르게 된다. 또 basophils(호염구) 및 activated eosinophil(활성화된 호산구)에도 Fc $\epsilon$ R I가 발현되는데, Ig E는 여기에도 결합하여 제1형 과민반응을 일으키는데 관여할 수 있다<sup>44</sup>. 화학적 매개물질들은 주로, histamine과 chymase, tryptase, serine esterase 등의 효소로 이러한 물질들은 조직의 기질단백질을 파괴하고, 조직의 파괴를 유도한다<sup>44</sup>. 또한 Ig E는 hay fever, asthma, hives(발진), anaphylatic shock 등의 증후와 관계되는 즉각적인 과민반응을 매개한다고 알려져 있다<sup>45,46</sup>.

본 실험에서의 혈청 중 Ig E의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성있게 Ig E의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control군에 비교하여 Ig E의 수준을 유의성있게 감소시켰다. 일반적으로 Th2 cell에서 분비된 IL-4, IL-13은 B cell을 plasma cell로 발달시키고, 활성화된 plasma cell은 IgE 및 IgG를 분비하게 되는데, 본 실험에서는 녹용이 IL-4와 IgE를 유의성있게 줄여 B cell의 활성을 억제시키는 것으로 나타났다.

병원체들이 상피장벽을 통과하여 국소감염을 일으키면 숙주는 자신의 방어체계를 병원체가 성장하는 부위로 이동시킨다. 이들 중의 한 기전은 mast cell에 의해 이루어진다. mast cell은 국소혈관들의 투과성을 급속히 높이는 작용을 하는 histamine을 포함하는 혼합된 화학매개물질들이 있는 독특한 세포질과립들을 갖는 큰 세포이다. mast cell의 Fc $\epsilon$ R I, Fc $\gamma$ R III receptor는 IgE와 IgG에 각각 결합하여 지질 염증매개 물질(lipid inflammatory mediator) 및 granule을 분비하게 된다<sup>47</sup>.

IgG는 serum에서 가장 풍부한 Immunoglobulin으로 잘 알려져 있다. 이러한 IgG의 역할은 먼저, IgE가 기관지 mast cell에 부착하여 degranulation을 유발할 때, mast cell의 sensitization과 activation을 일으켜서 IgE와 같이 mast cell에 작용한다. 또, IgE가 결합된 mouse에게는 IgE대신 IgG를 생산하여 airway hyperresponsiveness를 일으킨다. 그리고, IgG는 eosinophil의 Fc $\gamma$ R II에 부착하여 eosinophil의 degranulation을 유발하기도 한다<sup>48,49</sup>. 실제로, 천식에 이완된 어린이에게서는 그렇지 않은 어린이들에 비하여 IgG와 IgE의 level이 유의하게 상승되어 있음이<sup>50</sup> 보고되고 있다.

본 실험에서의 혈청 중 IgG의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성있게 IgG의 수준을 증가시켰으며, deer horn군은 control에 비교하여 IgG의 수준을 유의성있게 감소시켰다.

## 결론

녹용이 천식에 미치는 효과를 알아보기 위하여, Balb/c mouse에 ovalbumin으로 알레르기성 천식을 유발한 후 BALF에 존재하는 eosinophil, IL-4, IL-5, 혈청 중 IgG, IgE, splenocyte의 IL-4, IL-5의 량을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

BALF에서 eosinophil의 수는 deer horn군에서 control군에 비교하여 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의성있는 변화를 나타내지는 못하였다. BALF에서 IL-4는 deer horn군은 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성있게 감소시켰다. 그러나, splenocyte를 배양(-/+OVA)한 배지에서의 IL-4의 함량은 실험군 전체에서 유의한 변화를 나타내지 못하였다. BALF 및 splenocyte에서 IL-5는 deer horn군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성있게 감소시켰다. 그러나, OVA를 처치한 splenocyte의 배양액 중 IL-5의 함량은 IL-4와 마찬가지로 유의한 결과를 나타내지 못하였다. 혈청 중 IgE, IgG의 함량은 deer horn군은 control군에 비교하여 IgE, IgG의 수준을 유의성있게 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때 녹용은 Th2 cell이 매개되는 천식에 유효하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역협력연구센터 지원사업 (Grant number; R12-2003-002-03002-0)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. National Asthma Education and Prevention Program. Expert panel report 2: guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda, MD: National Institutes of Health; Publication No. 97 - 4051, 1997.
2. 공중보건편집위원회. 예방의학과 공중보건, 계축문화사, 서울, pp 129-145, 1992.
3. Chiang, D.J., Ye, Y.L., Chen, W.L., Lee, Y.L., Hsu, N.Y., Chiang, B.L. Ribavirin or CpG DNA sequence-modulated dendritic cells decrease the IgE level and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 168(5):575-580, 2003.
4. Corrigan, C.J., Haczku, A., Gemou-Engesaeth, V., Doi, S., Kikuchi, Y., Takatsu, K., Durham, S.R., Kay, A.B. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin 5. *Am Rev Respir Dis.* 147:540-547, 1993.

5. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 9. 서울 : 民瑞出版社. pp 187-202, 426, 460-461, 468, 1999.
6. 전국의과대학교수역. 오늘의 진단 및 치료. 1. 서울:한우리. pp 287-297, 1999.
7. 原安徽中醫學院編. 中醫臨床手冊. 1. 서울:成輔社. pp 115-116, 1983.
8. 上海中醫學院編. 中醫內科學. 1. 香港:商務印書館香港分館. pp 17-23, 1975.
9. 李珩九. 五拗湯이 咳嗽 喘息에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1982.
10. 鄭昇杞. 定喘湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 경희대학교 대학원. 1985.
11. 鄭昇杞. 加味清上補下湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 대한한의학회지. 12(1):118-138, 1991.
12. 朴光恩. 千禧導痰湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 경희대학교 대학원. 1993.
13. 유승한, 최희인, 김현아, 김운상, 신형식, 유형근. 녹용이 치주인대세포의 세포주기조절에 미치는 영향. 동의생리병리학회지, 17(1):157-164, 2003.
14. 황석연, 양진배, 장철수, 이영찬, 이형철. 다이옥신유도 독성에 대한 녹용 추출물의 방어효과. 동의생리병리학회지. 16(4):674-679, 2002.
15. 이민형, 서영배. 녹용의 조혈작용에 대한 실험적 연구. 본초학회지. 16(1):91-109, 2001.
16. 오하석, 김장현. 부위별 녹용이 흑색종 유발 생쥐의 종양억제와 면역기능에 미치는 영향. 소아과학회지. 14(1):39-77, 2000.
17. 윤철호, 정지천, 신억섭. Bromobenzene으로 유발된 신장 기능 저하에 미치는 녹용 약침의 항산화 효과. 한방내과학회지. 20(2):287-302, 1999.
18. 김근모, 박순달. 녹용 및 육미지황탕가녹용이 백서의 운동억제성 골다공증에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 4(1):23-47, 1994.
19. 의학교육연수원. 가정의학. 5. 서울:서울대학교출판부. pp 286-288, 1998.
20. 馬康慈. 中醫師臨床手冊. 1. 臺北:衆文圖書公司. pp 235-240, 1976.
21. 具本泓, 朴鎬湜, 尹泰汝, 金東圭, 崔洽求. 東醫內科學. 3. 서울:書苑堂. pp 41-47, 1992.
22. Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* 59(8):793-805. 2004.
23. 김창근, 유진호, 고영률, Hirohito Kita. 기도내 호산구성 염증에서 IL-5와 Eotaxin의 역할. 천식 및 알레르기학회지, 24(1):127-136, 2004.
24. 김미경. Biology of eosinophil, 대한천식및 알레르기학회 추계학술대회 초록집, pp 409-417, 1997.
25. 박해심. 기관지천식에서의 eosinophil cationic protein과 tryptase. 알레르기, 15(4):596-597, 1995.
26. 김지혜, 오재원, 이하백. 급성 천식 환아에서의 혈청

- eosinophil cationic protein치의 변화에 대한 연구. *알레르기*, 16(2):219-229, 1996.
27. Garlisi, C.G., Kung, T.T., Wang, P., Minnicozzi, M., Umland, S.P., Chapman, R.W., Stelts, D., Crawley, Y., Falcone, A., Myers, J.G., Jones, H., Billah, M.M., Kreutner, W., Egan, R.W. Effects of chronic anti-interleukin-5 monoclonal antibody treatment in a murine model of pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20(2):248-255, 1999.
  28. van Rijt, L.S., Vos, N., Willart, M., Kleinjan, A., Coyle, A.J., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 114(1):166-173, 2004.
  29. Steinman, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol* 9:271, 1991.
  30. Hart, D.M. Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90: 3245, 1997.
  31. Banchereau, J., Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245, 1998.
  32. 조상현, 장윤석. CpG-ODNs를 이용한 천식의 새로운 면역조절요법. *천식 및 알레르기*. 22(1):43-53, 2002.
  33. Sara, M., Rankin, Dolores, M. Conroy and Timothy J. Williams. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Molecular Medicine Today*. 6(1):20-27, 2000.
  34. 최인선. 동물 천식모형에서 선택적 면역 조절 요법. *천식 및 알레르기*. 22(4):663-668, 2002.
  35. Lampinen, M., Carlson, M., Håkansson, L.D., Venge, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 59(8):793-805, 2004.
  36. Walker, C., Virchow, J.C. Jr, Bruijnzeel, P.L., Blaser, K. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J. Immunol*. 146(6):1829-1835, 1991.
  37. Bochner, B.S., Busse, W.W. Advances in mechanisms of allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 113(5):868-875, 2004.
  38. M.J. Koury, J.H. Newman and J.J. Murray, Reversal of hypereosinophilic syndrome and lymphomatoid papulosis with mepolizumab and imatinib. *Am J Med* 11:587-589, 2003.
  39. J.K., Garrett, S.C., Jameson, B., Thomson, M.H., Collins, L.E., Wagoner, D.K., Freese et al., Anti-interleukin-5 (mepolizumab) therapy for hypereosinophilic syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 113(1):115-119, 2004.
  40. Koury, M.J., Newman, J.H., Murray, J.J. Reversal of hypereosinophilic syndrome and lymphomatoid papulosis with mepolizumab and imatinib. *Am J Med*. 115(7):587-589, 2003.
  41. 강재성 외. 세포분자면역학(4판). 법문사. 서울. pp 198, 258, 2002.
  42. Paul, M., O'Byrne, Mark, D. Inman and Ellinor Adelroth: Reassessing the Th2 cytokine basis of asthma. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 25(5):244-248, 2004.
  43. Douglas, S. Robinson: New Therapies for Asthma: Where Next? *Pediatric Pulmonology*. 36:369-375, 2003.
  44. Charles, A., Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik. *Immuobiology*. Gerald. New York. pp 473, 481. 2001.
  45. S.I. Mayr, R.I. Zuberi, F.-T. Liu. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 36:821-827, 2003.
  46. Douglas, S. Robinson. T-cell cytokines: what we have learned from human studies. *PAEDIATRIC RESPIRATORY REVIEWS*. 5(Suppl A):S53-58, 2004.
  47. Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik. *Immuobiology*. Gerald. New York. pp 374, 473, 481, 2001.
  48. G.J., Gleich, H. Kita: Bronchial asthma: Lessons from murine models. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 94: 2101-2102, 1997.
  49. ROB C. AALBERSE: Specific IgE and IgG Responses in Atopic versus Nonatopic Subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 162:S124-127, 2000.
  50. Rizzo, M.C., A.K., Arruda, M.D., Chapman, E. Fernandez-Caldas, D. Baggio, T. A. E. Platts-Mills and C. K. Naspitz. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. *Ann. Allergy*. 71:152-158, 1993.