

황금이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향

조철준, 임도희, 황지호, 양수영, 박양춘
대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Effect of Scutellaria Radix extract drug on immune cells and cytokines in BALF of OVA-induced asthmatic mice

Cheol-jun Cho, Do-hee Lim, Ji-ho Hwang, Soo-young Yang, Yang-chun Park

Division of Respiratory System, Dep. of Internal Medicine College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

objective : The purpose of this research is to examine the effects of Scutellaria Radix(SR) extract on immune cells and cytokines in ovalbumin(OVA)-induced asthmatic mice.

Methods : In vivo, C57BL/6 mice were sensitized and handicapped by OVA for 9 weeks. In this experiment, one group was not treated, and the other group was treated with SR extract for six weeks(five times per week) and analyzed by ELISA and flow cytometer.

Results : In vivo, there were significant decreases in eosinophils, IL-4, IL-13 in BALF (bronchoalveolar lavage fluid) compared with that of control group. However, IFN- γ in the SR group increased significantly compared with that of control group. Additionally, the population of CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in the SR group decreased compared with that of control group.

conclusion : The results of this study support a role for SR as an effective treatment for asthma in its experimental success in significantly decreasing inflammation and asthma reactions, and in increasing INF- γ , Which helps prevent such reactions.

Key Words: Scutellaria Radix, asthma, cytokine.

1. 緒 論

기관지천식(이하 천식)은 가역적인 기도폐쇄과 기관지 과민성, 기도의 부종, 호산구성 염증을 특징으로 하는 복합적 임상 증후군이다. 최근 여러 연구에 의하여 천식에 대한 개념이 기도평활근의 가역적 수축에 의한 질환이라는 인식에서 염증매개체, 신경계, 각종 면역세포의 복합적 상호작용에 의한 질환이라는 인식으로 변화되었다¹. 따라서 천식의 활동성 지

표인 호산구를 비롯하여 천식의 병리기전에 관여하는 여러 사이토카인과 케모카인의 변화를 조절하는 것이 천식 치료의 중요한 목표가 될 수 있다.

천식은 한의학에서 呼吸促急하며 喉中有聲響한 증상을 나타내는 哮喘證의 범주에 속하는데 寒冷, 과격한 심리적 변화, 痰火, 宿根, 感染, 음식물에 대한 과민반응, 肺腎의 기능약화 등을 원인으로 보고 있다. 治法은 實證과 虛症에 따라 구분하는데 實證은 宣肺定喘, 化痰定喘하고, 虛症은 養肺定喘, 補益心身, 納氣定喘, 瀉肺化痰, 補益腎元한다^{2,3}.

黃芩(Scutellariae Radix)은 脣形科(꿀풀과; Labiateae)에 속한 다년생 초본인 黃芩(속썩은풀; Scutellaria baicalensis GEORGI)의 뿌리를 건조한 것이다.

· 접수 : 2006. 2. 10. · 채택 : 2006. 2. 27.
· 교신저자 : 박양춘, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9
대전대학교 청주한방병원 내과
(Tel. 043-229-3704, Fax. 043-253-8757
E-mail : omdpyc@dju.ac.kr)

性味는 苦寒無毒하고 肺, 膽, 胃, 大腸經에 작용하여 瀉實火, 除濕熱 하는 效能이 있어 壯熱煩渴, 肺熱咳嗽, 濕熱瀉痢 등의 主治에 응용되고 있다⁴. 황금에 대한 기존 연구로는 변⁵의 DNA 합성 및 간세포 독성에 대한 연구, 김⁶의 유전자 표현에 대한 연구 등이 보고되고 있으며, 특히 황⁷은 Ovalbumin으로 유발시킨 천식모델을 대상으로 황금이 기관지 폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid; 이하 BALF)내 총 세포수와 호산구수를 감소시키고 혈청내 IgE와 폐조직 및 비장세포의 IL-5를 감소시킨다고 보고하였는데, BALF내에서 사이토카인 및 IgE의 변화를 관찰하지는 않았으며 폐장세포에 대한 유세포분석은 시행되지 않았다. 이에 저자는 황금이 천식의 병소인 폐장에 미치는 영향을 직접적으로 확인하고자 기관지 폐포 세척액(Bronchoalveolar lavage fluid; 이하 BALF)내의 호산구수, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , IgE의 변화와 폐조직의 유세포 분석 등을 측정할 결과 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

동물은 18~25g의 C57BL/6(한국화학연구소) 생쥐를 사료와 물을 충분히 공급하고, 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약제

실험에 사용된 황금(*Scutellariae Radix*)은 대전대학교 부속한방병원에서 구입 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 기관지 천식 생쥐 모델

500 μ g/ml의 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10%(w/v) aluminum potassium sulfate(Alum)를 PBS로 용해한 후 혼합하여 얻은 혼합물에 10N NaOH를 첨가하여 pH가 6.5가 되게 조정하고, 상온에서 1시간 동안 방치한 후 750 \times g에

서 5분 동안 원심 분리하였다. 분리한 OVA/Alum 침전물(pellet)에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 μ g OVA를 0.2ml로 조정하여 복강 내로 주사하여 전신감작을 시켰다. 이후 4주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민(500 μ g/ml) 100 μ l를 기관지로 직접 투여(I.T. : intra trachea)하였다. 5~12주간 분무기를 이용하여 2.5mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다.

2) 黃芩 추출물 경구 투여

OVA/Alum로 전신감작 시킨 후 5주째부터 黃芩 추출물(220mg/kg)을 일주일에 3회 경구로 8주간 투여하였다. 대조군은 동량의 증류수를 경구로 8주간 투여하였다.

3) 기관지 폐포 세척액 (BALF)으로부터 세포의 분리

투약 8주후 기관지천식 생쥐의 눈에서 혈액을 분리한 후 목부분을 해부하여 주사기를 기관지(trachea)에 삽입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 10% FBS/DMEM 배양액 1ml를 3회 순환시켜 기관지폐포세척액을 얻었다. 기관지폐포세척액에 ACK 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다.

4) 호산구 분리 및 측정

BALF부터 세포를 분리한 후 cytopsin(한일과학)에서 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 slide를 건조하였다. 건조된 슬라이드는 Diff-Quick 용액(Baxter Healthcare, Miami, FL)을 이용하여 염색하였다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 염색특징 등으로 면역세포의 type을 결정하였으며, 광학현미경(Nikon, japan) \times 400에서 관찰하여 infiltration된 호산구의 수를 측정하였다.

5) ELISA Analysis

생쥐에서 분리한 폐포 세척액과 혈청에서 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , IgE의 양을 측정하기 위하여 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)를 실시하였다.

6) 형광 유세포 분석

폐와 폐포 세척액으로부터 분리한 세포로부터 여러 가지 세포 표면 분자들에 대한 항체를 이용한 염

색을 하기 위하여 $2\sim5\times 10^5$ 세포로 조정하여 염색 완충용액(1% 우 태아 혈청, 0.01% NaN_3 가 포함된 인산염 완충용액, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 이후

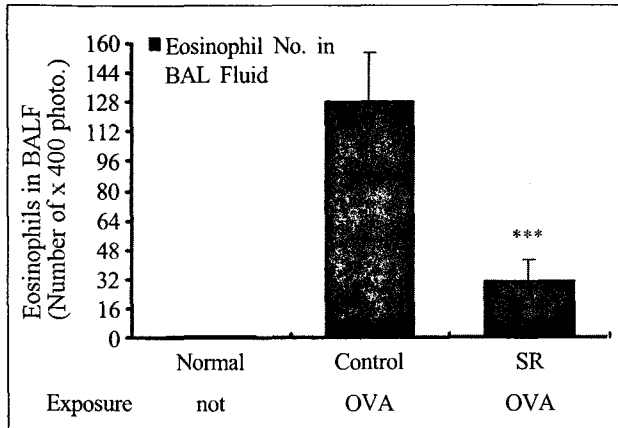


Fig. 1. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on eosinophil in murine OVA-induced asthma of BAL fluid.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, BALF was obtained from each group of mice and the number of eosinophils was calculated.

Normal : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

The results are expressed the mean±S.E(N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test(***) $p<0.001$).

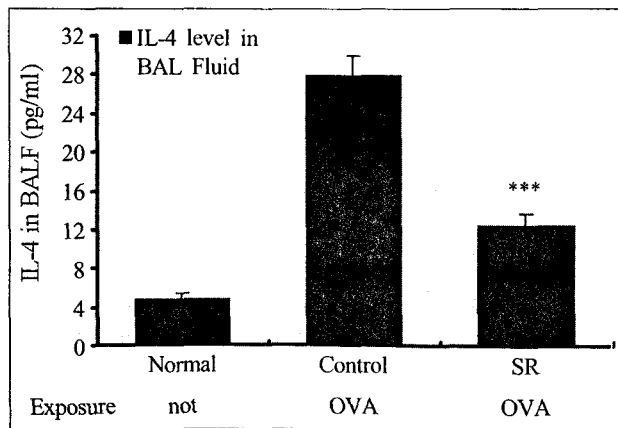


Fig. 2. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on IL-4 level in murine OVA-induced asthma of serum.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, BALF was obtained from each group of mice and the IL-4 level was calculated.

Normal : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (***) $p<0.001$).

FITC(fluorescein isothiocyanate) 또는 PE (phycoerythrin) 형광 물질이 결합된 CD3, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220, CD11b, Gr-1 등의 항체를 시료에 가하여 4℃에서 40분간 반응시키고, 염색 완충 용액으로 2회 세척한 후 세포 표면 분자들의 발현을 유세포 형광분석기(FACS, Becton Dickinson, U.S.A.)로 분석하였다.

7) 통계처리

실험 결과의 통계처리는 unpaired Student's t-test를 사용하여 통계 처리하였으며 P<0.05, P<0.01 또는 P<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 成 積

1. 기관지폐포세척액(BALF)내 호산구수에 미치는 영향

호산구 분비를 측정된 결과, 정상군은 1±0.58, 대조군은 127.7±26.8, SR 투여군은 30.3±12.3으로 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 감소하였다(Fig. 1).

2. 기관지폐포세척액(BALF)내 사이토카인 분비에 미치는 영향

1) IL-4 분비에 미치는 영향

IL-4 분비를 측정된 결과, 정상군은 4.7±0.6(pg/ml), 대조군은 27.9±2.1(pg/ml), SR 투여군은 12.3±1.4(pg/ml)으로 유의성 있게(p<0.001) 감소하였다(Fig. 2).

2) IL-5 분비에 미치는 영향

IL-5 분비를 측정된 결과, 정상군은 0±0(pg/ml), 대조군은 8.7±1.1(pg/ml), SR 투여군은 4.3±0.7(pg/ml)으로 감소하였으나 유의성은 관찰하지 못하였다(Fig. 3).

3) IL-13 분비에 미치는 효과

IL-13 분비를 측정된 결과, 정상군은 4.3±0.9(pg/ml), 대조군은 76.4±13(pg/ml), SR 투여군은 38.6±4.2(pg/ml)으로 유의성 있게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 4).

4) IFN-γ의 분비에 미치는 영향

IFN-γ 분비를 측정된 결과, 정상군은 2.4±0.5(pg/ml), 대조군은 5.7±0.9(pg/ml), SR 투여군은 11.6±2.3(pg/ml)으로 유의성 있게(P<0.05) 감소하였다(Fig. 5).

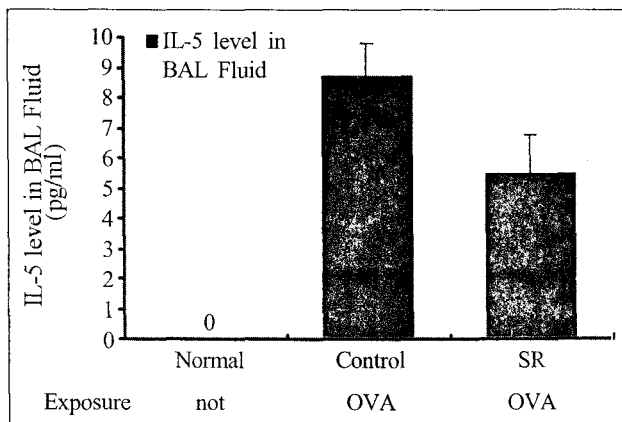


Fig. 3. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on IL-5 level in murine OVA-induced asthma of serum.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, BALF was obtained from each group of mice and the IL-5 level was calculated.

Normal : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test

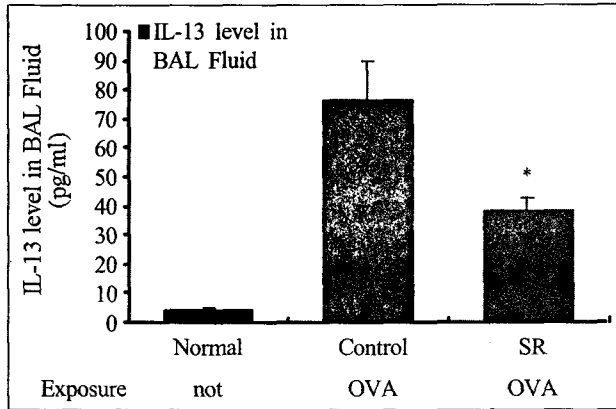


Fig. 4. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on IL-13 level in murine OVA-induced asthma of BAL fluid.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, BALF was obtained from each group of mice and the IL-13 level was calculated.

Normal : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05).

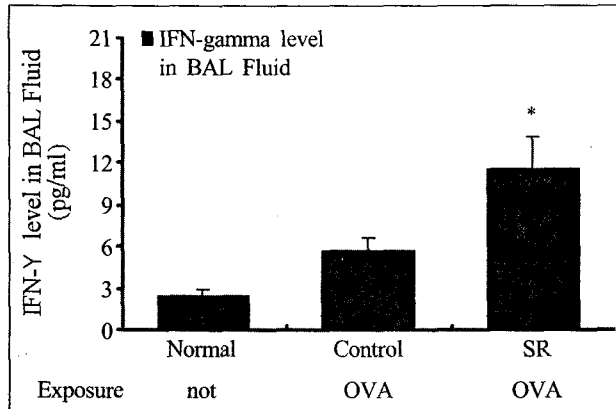


Fig. 5. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on IFN- γ level in murine OVA-induced asthma of BAL fluid.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, BALF was obtained from each group of mice and the IFN- γ level was calculated.

Normal : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05).

5) IgE 분비에 미치는 효과

혈청내의 IgE 분비를 측정 한 결과, 정상군은 0 ± 0 (ng/ml), 대조군은 14.3 ± 2.1 (ng/ml), SR 투여군은 9.8 ± 2 (ng/ml)로 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6)

3. 폐세포에 대한 형광 유세포 분석에 미치는 영향

1) CD3e/CCR3⁺에 미치는 영향

폐세포에서 CD3e/CCR3⁺ 세포의 비율이 정상군에서는 19.9% 대조군에서는 34.8%, SR 투여군에

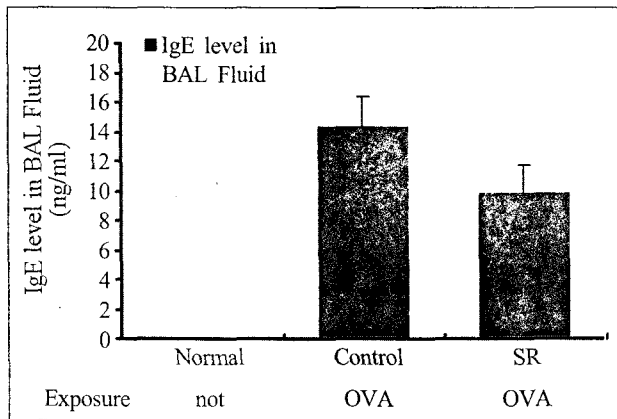


Fig. 6. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on IgE level in murine OVA-induced asthma of BAL fluid.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, BALF was obtained from each group of mice and the IgE-level was calculated.

Normal : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test

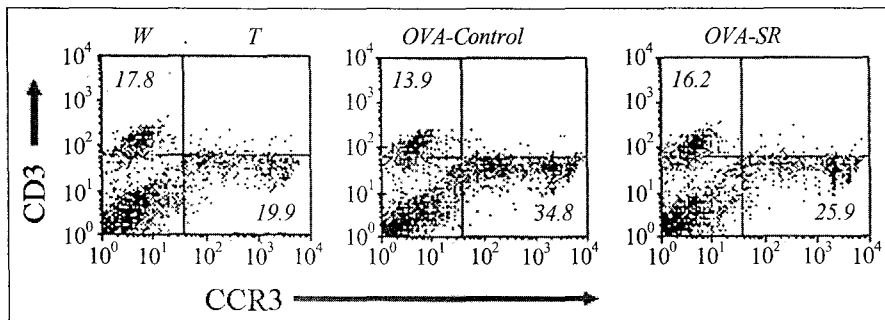


Fig. 7. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on CD3e⁺/CCR3⁺(%) in murine OVA-induced asthma lung cells.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks (3times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

WT : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

서는 25.9%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다 (Fig. 7).

2) CD69⁺/CD3e⁺에 미치는 영향

CD69⁺/CD3e⁺ 세포의 비율이 정상군에서는 4.4%, 대조군에서는 16.3%, SR 투여군에서는 8.6%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 8).

3) IgE⁺/B220⁺에 미치는 영향

IgE⁺/B220⁺ 세포의 비율이 정상군에서는 1.2%, 대조군에서는 15.7%, SR 투여군에서는 8.6%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 9).

4) CD11b+/Gr-1+에 미치는 영향

Gr-1+ 세포의 비율이 정상군에서는 2.6%, 대조

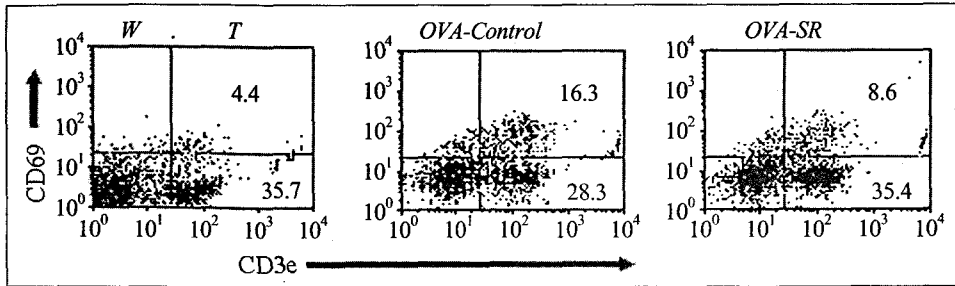


Fig. 8. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on CD69⁺/CD3e⁺(%) in murine OVA-induced asthma lung cells.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. Two experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks (3times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

WT: normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

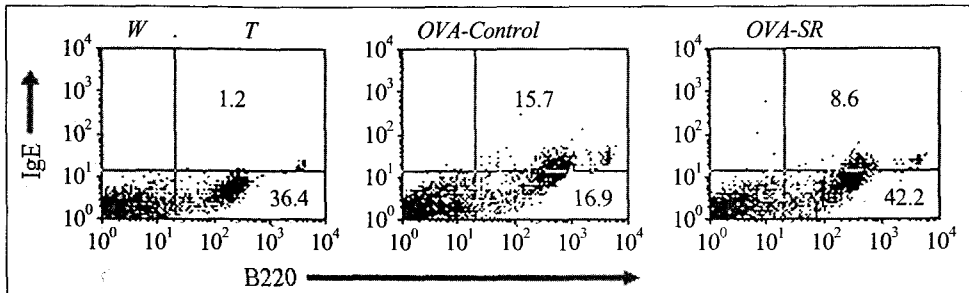


Fig. 9. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on IgE⁺/B220⁺(%) in murine OVA-induced asthma lung cells.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks (3times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

WT : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

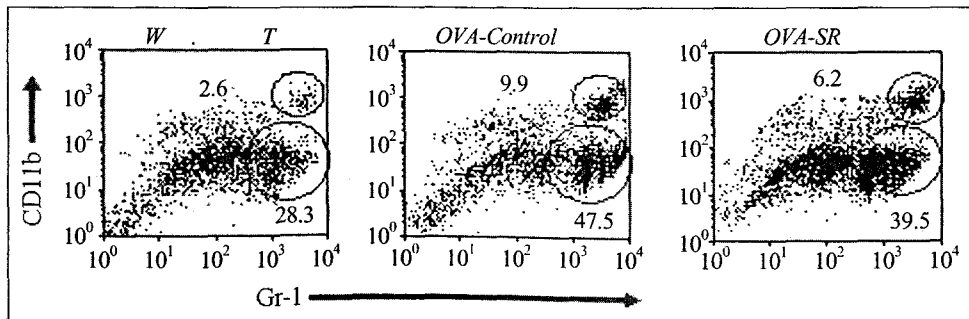


Fig. 10. Effect of *Scutellaria Radix*(SR) extract drug on CD11b⁺/Gr-1⁺(%) in murine OVA-induced asthma lung cells.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. Two experimental group was treated with SR extract(220mg/kg) for the later 8 weeks (3times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

WT : normal C57BL/6 mice.

OVA-control : OVA inhalation(control).

OVA-SR : OVA inhalation and SR treatment(220mg/kg).

군에서는 9.9%, SR 투여군에서는 6.2%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10).

IV. 考 察

기관지천식(이하 천식)은 기도내에 가역적인 기도 폐색, 협착에 의해 호흡곤란, 기침, 천명 등이 반복적으로 발생하는 질환으로, 호산구, 비만세포, T세포 등 염증세포가 활성화되어 침착되어 있는 특이적 소견을 나타낸다⁸.

천식은 기도 자극성 화학물질의 증가로 발병되는 가장 대표적인 호흡기 질환으로 인식되며, 이는 여러 유인에 의하여 기관지 평활근의 비후와 기관지 점막과 점막하의 부종이 유발되어 기도가 광범위하게 수축되어 좁아지고, 이에 따른 기도저항이 증가되어 호흡이 곤란해지면서 호기성 호흡곤란 양상을 띠게되는 가역적인 기관지의 과민 반응이라 할 수 있다^{4,9}.

호산구는 항원항체 복합물을 탐식하는 등 알레르기에 관여한다. 알레르기 질환, 기생충질환, 자가 면역질환 등에서 증가하는데, 그 중 천식은 대표적인 질환으로서 발병전에 중요한 역할을 한다. 천식환자의 기관지에는 호산구가 많이 발견되며, 호산구는 혈소판활성인자를 만들어 염증을 장기화시키며, 염증모개물질을 생산하여 기관지수축을 일으키고 혈관투과도를 증가시켜 부종을 일으킨다. 공기를 통해 전달되는 알레르기 항원 및 자극물질은 쉽게 기도에도달하며, 이곳에는 정상적으로 비만세포가 존재하며 국소적으로 IgE 항체가 형성되므로 호산구의 침윤을 더 조장시키게 된다. 이와 같이 호산구는 즉시형 과민반응 질환에 중요한 역할을 하므로 그 수의 증감을 추적하여 알레르기 반응의 좋고 나쁨을 판단할 수 있다¹⁰.

기관지천식의 병인에 중요하게 관여하는 세포 중 Th1 림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN- γ 를 생산하며, 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스에 대한 방어 작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여하고, Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며, 즉시형 과민반응, 천식과 같은 알레르기성 질환, 기생충감염

에 대한 방어 작용에 관여한다. Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 길항작용을 나타내어, Th1 림프구의 기능이 증가되면 Th2 림프구의 기능이 억제되는 현상이 관찰되며, 알레르기성 기관지천식환자의 기관지 폐포 세척액에서는 Th2 림프구의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다¹¹. 즉 항원에 의한 IgE 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2 림프구는 naive CD4+ T세포가 IL-4의 영향으로 항원과 반응시 분화되고, 이때 IgE 생성을 방해하는 IFN- γ 를 분비하는 Th1 림프구는 그 발달이 저해된다¹².

黃芩(Scutellariae Radix)은 唇形科(꿀풀과; Labiatae)에 속한 다년생 초본인 黃芩(속썩은풀; Scutellaria baicalensis GEORGI)의 뿌리를 건조한 것이다. 性味는 苦寒無毒하고 肺, 膽, 胃, 大腸經에 작용하여 瀉實火, 除濕熱 하는 효능이 있어 壯熱煩渴, 肺熱咳嗽, 濕熱瀉痢 등의 主治에 응용되고 있다. 따라서 邪熱이 肺를 犯하여 나타나는 身熱咳嗽, 痰黃粘稠 등의 證에 사용할 수 있다⁴. 황금에 대한 기존 연구로는 변⁵의 DNA 합성 및 간세포 독성에 대한 연구, 김⁶의 유전자 표현에 대한 연구 등이 보고되고 있으며, 특히 황⁷은 Ovalbumin으로 유발시킨 천식모델을 대상으로 黃芩이 기관지 폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid; 이하 BALF)내 호산구수를 감소시키고 혈청내 IgE와 폐조직 및 비장세포의 IL-5를 감소시킨다고 보고하였으나, 사이토카인 중 비장세포의 세포활성물질인 IL-5에서의 유의성으로 국한되어 있고, 폐장세포에 대한 유세포분석의 실험연구가 보고되지는 않았다.

따라서 본 저자는 清熱燥濕, 瀉火解毒의 효능으로 咳嗽, 喘息疾患에 효과가 있을 것으로 사료되는 黃芩이 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 천식을 유발시킨 생쥐의 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid; 이하 BALF)내의 호산구수, IL-4, IL-13, IFN- γ 를 측정하고 폐세포의 유세포 분석을 통하여 유의한 결과를 얻게 되었다.

먼저 BALF내 호산구수의 변화에서 대조군은 정상군에 비해 분비량이 증가하였던 반면, 대조군에 비하여 黃芩 투여군에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1). 이는 황금을 대상으로 BALF내 호산구 수를

측정한 황⁷의 동일한 실험과 일치하는 결과이다. 천식환자의 기관지에는 호산구가 많이 발견되며, 호산구는 혈소판활성인자를 만들어 염증을 장기화시키며, 염증모개물질을 생산하여 기관지수축을 일으키고 혈관투과도를 증가시켜 부종을 일으킨다. 이것은 즉각형 과민반응 질환에 중요한 역할을 하므로¹⁰, 황芻으로 인해서 호산구수가 감소되었다는 것은 황芻이 알레르기 천식 질환에 기도내로 유입되는 염증세포들의 활성을 억제할 가능성이 있다고 생각된다.

다음으로 ELISA 분석결과를 살펴보면, BALF내 IL-4는 대조군에서 정상군에 비해 분비량이 증가하였고 황금 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2). IL-4는 Th2 림프구에서 생성되어 B 림프구를 활성화시켜 IgE의 생산을 증가시킨다고 보고되었으며¹³, 생체 내 실험에서 항IL-4 항체나 IFN- γ 에 의해 IL-4 의존성 IgE 생성이 차단된다고 하였는데¹⁴, 황芻이 BALF에서 IL-4의 발현을 감소시킴으로써 알레르기 반응에 효과를 나타낸다고 여겨진다.

BALF내 IL-5는 대조군에서 정상군에 비해 분비량이 증가하였고 황芻 투여군에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 관찰하지 못하였다(Fig. 3). IL-5는 Th2 림프구에서 생성되어 호산구증가증을 초래하는 주요한 사이토카인이다. IL-5는 또한 성숙한 호산구를 활성화시키고, 그들의 수명을 연장하며, 염증부위에서 축적에 기여한다¹⁵. 따라서 황芻 투여군의 다소의 IL-5 감소는 기도 내 호산구를 감소시킴과 더불어 천식의 염증반응을 감소시키는 효과를 나타낸다고 할 수 있겠으나 유의성은 없었다.

BALF내 IL-13은 대조군에서 정상군에 비하여 분비량이 증가하였고 황芻 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4). IL-13은 Th2 림프구에 의해 주로 생산되는 사이토카인으로, IL-4와 25%의 구조적 동질성이 있으며, 주된 기능은 B세포의 증식, 세포표면의 integrin, MHC class II 항원 및 CD23의 증가, IL-6의 분비증가, 항체의 class switching으로 IgE와 IgG4의 생산 작용이 있다. 또한 IL-13은 혈관내피세포의 VCAM-1 발현을 선택

적으로 유도시킬 수 있다¹⁶⁻⁸. 따라서 황芻 투여군에서 IL-13의 감소는 염증 및 알레르기 천식 반응의 감소를 의미한다고 할 수 있다.

BALF내 IFN- γ 은 대조군에서 정상군에 비해 약간의 분비량이 증가하였고 황芻 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5). IFN- γ 는 Th1 림프구에서 생성되어 항바이러스 작용을 가지고 있을 뿐 아니라 class II MHC 생산물을 증가시키고 CD23의 표현을 감소시킨다¹⁹. 또한 IL-4의 작용을 길항하여 IgE 생성을 억제하는 것으로도 알려져 있다²⁰. 따라서 황芻 투여군에서의 IFN- γ 의 증가는 IgE 생성 억제로 알레르기 반응에 효과를 나타내는 것을 의미한다고 할 수 있다.

BALF내 IgE는 대조군에서 정상군에 비해 분비량이 증가하였고 황芻 투여군에서 대조군에 비하여 다소 분비량이 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 6). IgE는 아토피 환자의 I형 면역반응에 의한 기관지 천식의 유발에 있어서 중요한 역할을 하며, 원인 항원과 결합하여 감작된 비만 세포를 활성화시킴으로써 증상을 초래한다. 혈청 IgE 농도는 아토피환자에서 증가되어 있으며 활동성의 증가와 말초혈액 내 농도사이에는 연관성이 없다고 하지만, 기관지세척액 내에는 기관지과민성의 감소와 함께 특이 IgE 항체의 감소현상을 보고하였다²¹.

따라서 황芻 투여군에서 다소의 IgE의 감소는 기도 내 면역반응의 증가 및 알레르기 염증반응의 감소를 나타낸다고 할 수 있겠으나 유의수준은 관찰하지 못하였다.

위와 같은 BALF에서의 사이토카인이 변화를 황⁷이 혈청과 폐조직 및 비장세포에서 관찰한 사이토카인의 변화와 비교하면 약간의 차이가 있다. 황⁷의 실험에서는 황芻이 혈청에서 IgE를 감소시키고 폐조직과 비장세포에서는 IL-4에는 영향이 없었으나 IL-5를 감소시킨다고 하였는데 본 실험에서는 BALF내 IL-4를 감소시키고 IFN- γ 는 증가시켰으나 IL-5와 IgE의 감소에는 유의성이 없었다. 이러한 결과에 의하면 황芻은 전신적으로는 IgE와 IL-5를 감소시키고 국소적으로는 IL-4의 감소와 IFN- γ 의 증가로 알

레르기 반응을 억제하는 작용을 나타낸다고 생각할 수 있다. 특히 천식과 관련하여 병소에서 알레르기 반응의 주요기전인 Th 림프구의 Th1 림프구로의 스위칭에 주도적으로 관여하는 IL-4와 IFN- γ 에 유의성 있는 변화를 가져오는 것은 매우 의미 있는 결과라고 할 수 있다.

천식을 유발시킨 생쥐에게 黃芩(220mg/kg)을 경구 투여 한 후 폐장세포를 유세포 분석하여 CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺의 비율에 미치는 영향을 측정 한 결과 모두 실험군에서 대조군에 비하여 낮은 비율로 기록되었다(Fig. 7-10).

CD3은 T세포의 결정표지자로서 T세포의 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포안으로 전달하는 역할을 하며²², CCR은 주로 호산구에서 발하는 케모카인 수용체로 호산구가 혈관 내피세포와 결합한 후 조직 내로 침투하도록 한다²³. 따라서 실험군에서 CD3e⁺/CCR3⁺의 비율이 감소한 것은 黃芩이 호산구의 기도내 활성화를 억제하는 효능이 있다고 생각된다.

CD69는 활성화된 B세포, T세포, 비만세포에 분포하는 것으로, 림프구의 신호전달에 관여하는데²², CD69⁺/CD3e⁺의 비율이 실험군에서 감소한 것은 면역반응을 억제하는 효능이 있다는 것을 알 수 있다.

CD23은 단핵구, 수상돌기세포, 호산구, 혈소판에 발현하는 단백질로서 대식세포와 호산구에 의한 세포독성을 매개하여 활성화는 IgE를 분비하여 호산구를 자극하고, B220은 쥐의 B세포 표면에 있는 표지자로 B세포의 면역증가를 의미한다^{24,5}. 따라서 실험군에서 CD23⁺/B220⁺의 비율이 감소함으로써 黃芩이 B세포의 성장과 IgE의 분비를 조절하는 작용이 있다고 생각된다.

Gr-1은 과립구의 표지자이고 CD11는 순환 호산구의 표면에 발현하여 내피에 발현되어 있는 ICAM-1 (intercellular adhesion molecules 1)과 유착하고, 이후 화학주성인자 등에 의해 경내피 이동이 일어나 결체조직 즉 표적장기로 유입된다²⁶. 따라서 폐세포에서 CD11b⁺/Gr-1⁺ 비율의 감소는 黃芩이 호산구의 내피세포유착을 통한 경내피이동을 억제하여 천식을

감소시키는 효능이 있는 것으로 사료된다.

이상을 종합하여 보면 黃芩은 면역반응에 영향을 미치고, 기도내로 유입되는 염증세포들의 활성을 억제하여, 천식치료에 많은 활용이 가능할 것으로 생각되며, 알레르기 질환에도 응용해 볼 수 있으리라 여겨진다.

V. 結 論

黃芩의 알레르기 천식모델 생쥐에서 천식 및 면역에 미치는 효과를 알아보기 위한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BALF 내에서 호산구의 생성을 측정 한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.001) 있게 감소하였다.
2. BALF 내에서 IL-4의 생성을 측정 한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.001) 있게 감소하였다.
3. BALF 내에서 IL-5의 생성을 측정 한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.
4. BALF 내에서 IL-13의 생성을 측정 한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.05)있게 감소하였다.
5. BALF 내에서 IFN- γ 의 생성을 측정 한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.05)있게 증가시켰다.
6. BALF 내에서 IgE의 생성을 측정 한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.
7. 천식을 유발시킨 생쥐에게 黃芩을 투여하여 폐세포의 CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ 비율을 측정 한 결과 모든 항목에서 대조군에 비하여 감소하였다.

參考文獻

1. Busse WW, Horwitz RJ, Reed CE. Asthma In:

- Middleton E, Jr, Ellis EF, Yunginger JW, Reed CE, Adkinson NF, Jr, Busse WW. Allergy principles & practice, 5th ed: St. Louis, Mosby; 1988, p.838-58.
2. 전국한의과대학 폐계내과학 교실편저. 동의폐계내과학, 서울: 한문회사; 2002, p.192-7, 320-31.
 3. 허준. 동의보감. 서울: 남산당; 1989, p145, 560.
 4. 전국한의과대학 본초학교수편. 본초학. 서울: 영림사; 1994, p.178-9.
 5. 변부형, 서부일. 황금 약침의 DNA 합성 및 간세포 독성에 대한 분자 생물학적 실험 연구. 대한본초학회지 2004;19(1):35-40.
 6. 김성배, 정승현, 신길조, 이원철. 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 황금이 유전자 표현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2004;25(4-2):324-36.
 7. 황대룡. Ovalbumin으로 유발시킨 천식에 대한 황금의 물 추출물의 효과. 대한본초학회지 2004;19(4):117-25.
 8. National Institutes of Health. Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention, NIH Publication 2002. No. 02-3659.
 9. 한용철. 임상호흡기학, 서울: 일조각; 1998, p. 208-10.
 10. 전국의과대학교수편저. 오늘의 진단 및 치료, 서울: 한우리; 1999, p.259-60.
 11. 정승원, 이미애, 하대유. 사이토카인이 TH1세포의 Mitogens에 대한 증식반응에 미치는 영향. *Korean J Immunol.* 1997;9:73-81.
 12. Hultner L, Kolsch S, Stassen M, Kaspers U, Kremer JP, Mailhammer R, Moeller J, Broszeit H, Schmitt E. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J Immunol.* 2000;164(11):5556-63.
 13. Snapper CM, Paul WE. BSF-1/IL-4 prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1987;139:10-7.
 14. Pene J, Chretien I, Rousset F. Modulation of IL-4 induced human IgE production in vitro by IFN-r and IL-5. The role of soluble CD23(sCD23). *J Cell Biochem.* 1989;39:253-64.
 15. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils and disease. *Blood.* 1992; 79:3101-9.
 16. 송소향, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학. 호산구의 혈관내피세포 접착에 대한 IL-13의 영향. 천식 및 알레르기 1999;19(1):31-41.
 17. Sironi M, Sciacca FL, Matteucci C, Conni M, Vecchi A, Bernasconi S, Minty A, Caput D, Ferrara P, Colotta F, et al. Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13. selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production. *Blood.* 1994;15;84(6):1913-21.
 18. 이광훈. 알레르기 염증반응에서 유착분자. 대한천식 및 알레르기학회지. 천식과 알레르기 질환. 서울: 군자출판사; 2002, p.59-60.
 19. Mocman TR, Cherwinski H, Bond MW, Gieldlin M, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted production. *J Immunol.* 1986;136:2348.
 20. Erb KJ, Le Gros G. The role of Th2 type CD4+ T cells and Th2 type CD8+ T cell in asthma. *Immunol Cell Biol.* 1996;74(2):206.
 21. 김상훈, 고행기, 강운정, 성운업, 박인원, 최병휘. 기관지천식 환자에서 Disodium Cromoglycate 흡입치료 후의 말초혈액 호산구수와 IgE 치의 변화. 알레르기. 1995;15(2):230-4.
 22. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology.* 1993;80(2):281-6.
 23. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and

- their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000;95(10):3032-43.
24. 조상현. IgE 항체 생성과 조절. *알레르기*. 1993; 13:460-4.
25. Nakamura T, Kloetzer WS, Brams P, Hariharan K, Chamat S, Cao Xet la. In vitro IgE inhibition in B cells by anti-CD23 monoclonal antibodies is functionally dependant on the immunoglobulin Fc domain. *Int J Immunopharmacol*. 2000; 22(2):131-41.
26. Spoelstra FM, Hovenga H, Noordhoek JA, Postma DS, Kauffman HF. Changes in CD11b and L-selection expression on eosinophils are mediated by human lung fibroblastas in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(3):769-77.