

# 自擬前胡湯이 천식 모델 생쥐의 BALF 내 관련 면역세포 변화에 미치는 영향

홍상철·최학주·김선빈·김동희\*

## Suppressive Effects of Jauijeonhotang(JHG) on Immune cells in BALF of OVA-sensitized Balb/c Mice

Hong Sang-Cheol, Choi Hak-Joo, Gim Seon-Bin, Kim Dong-Hee

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In order to investigate the effects of JHG on immune cells in BALF, clinically prescribed JHG was tested using OVA induced asthma animal model. The results are shown below:

1. JHG significantly reduced the total number of cells in BALF compared to that of the control at 400 mg/kg doses.
2. JHG significantly reduced the number of CD3+/CD69+ cells in BALF at 400 and 200 mg/kg doses.
3. JHG significantly reduced the number of CCR3+ cells in BALF at 400 and 200 mg/kg doses.
4. JHG significantly reduced the number of B220+/CD22+ cells in BALF at 400 and 200 mg/kg doses.
5. JHG significantly reduced the number of B220+/IgE+ cells in BALF at 400 and 200 mg/kg doses.
6. JHG significantly reduced the number of B220+/CD45+ cells in BALF at 400 and 200 mg/kg doses.

From the results above, anti-asthmatic efficacy of JHG through anti-oxidative activity as well as immune control activity has been experimentally proven. In depth study of JHG on various pathological factors and individual drug contents of JHG should follow.

Key words : Jauijeonhotang, BALF, asthma.

### I. 緒 論

천식은 기도 염증과 더불어喘鳴으로 인하여 호흡곤란이 일어나는 알러지성 질환이다<sup>1)</sup>. WHO의 보고서에 따르면 전 세계적으로 매년 300만 명 정도의 환자가 이로 인해 고통 받고 있으며, 약 25만 명이 사망하는 것으로 추정되고 있다. 그 수는 점점 증가할 것으로 예상되어 2025년에

는 1억 명 이상의 환자가 발생할 것으로 예상되고 있다<sup>2, 3)</sup>.

천식을 일으키는 요인으로는 흡연, 알레르기 유발물질 (먼지, 꽃가루 등), 찬 공기 등 다양한 환경 요인이 있으며, 유전적인 요인도 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>2-7)</sup>.

현재 천식에 사용되는 약물은 흡입기 또는 분무기 형태로 사용되는  $\beta_2$ -길항제 (살메테롤, 포모테롤, 밤부테롤) 또는 xanthine 계열의 물질이 가장 대표적이다<sup>8)</sup>. 그러나 이들은 기도의 확장

\* 대전대학교 한의과대학 병리학교실  
· 교신저자 : 김동희 · E-mail : dhkim@dju.kr

을 통해 천식 증상만 해소해 줄 뿐 근본적인 치료제가 아니며, 기도의 과민 반응성을 더 커지게 하는 부작용을 가지고 있어<sup>9)</sup>, 근치를 위한 약물 개발이 요구되고 있다.

韓醫學에서 喘息은 哮, 喘, 痰飲 등의 범주에 속한다<sup>10-17)</sup>. 喘息에 대한 主病因 病機로는 風熱, 風寒의 邪氣로 인하여 肺의 宣發, 肅降 기능이 손상되거나, 음식의 부절제로 인하여 脾의 運化 기능이 실조되어 聚濕成痰이 되는 경우, 혹은 情志失調로 肝氣逆하여 肺를 범한 경우 등의 實證性 喘息이 있다. 아울러 만성화 될수록 이들의 병리가 상호 영향을 미침으로써 치료의 난해성을 제공한다. 이와는 달리 久病體虛, 勞倦過多, 腎氣虛損 등으로 氣의 固攝作用이 상실되면 虛證性 喘息이 유발된다<sup>10-14)</sup>.

상기한 바와 같이 脾, 肺, 腎이 주 관련 장부로 인식되고 있으며, 이들의 기능 장애는 痰飲을 형성한다는 점에서 치료의 목표 臟器가 되고 있다. 이 같은 병리와 관련 장부는 서양의학과 매우 다른 독특한 유기체적 관점으로 볼 수 있다.

自擬前胡湯은 『呼吸科專病 中醫臨床診治』<sup>18)</sup>에 수록된 처방으로 祛風熱, 宣肺, 祛痰, 平喘, 清熱解毒 효능이 있는 약물로 구성되어 천식을 비롯한 다양한 實證性 呼吸器 症狀에 사용되는 처방이다. 구성 약물 중 前胡<sup>19)</sup>, 杏仁<sup>20-22)</sup>, 知母<sup>23)</sup>, 麥門冬<sup>24)</sup>, 黃芩<sup>25)</sup>, 款冬花<sup>26)</sup>, 桔梗<sup>27)</sup> 등은 이미 抗炎症, 抗喘息에 관련된 실험 연구를 통하여 유의성 있는 결과가 보고된 바가 있으나, 본 처방에 대한 실험적 연구는 보고된 바가 없다.

이에 본 실험에서는 현재 임상에서 활용되고 있는 自擬前胡湯(JHG)을 OVA 유발 천식 동물 모델에 투여하여 BALF에서 나타나는 면역세포 변화를 분석하여 객관적인 항천식 효능을 실험적으로 규명하고자 한다.

## II. 實 驗

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 自擬前胡湯 (Jaiijeonhotang

이하 JHG로 표기)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다.

Table 1. The Prescription of JHG

韓藥名	生藥名	用量(g)
前胡	Peucedani Radix	12
杏仁	Armeniaca Semen	9
桑葉	Mori Folium	12
知母	Anemarrhenae Rhizoma	10
麥門冬	Liriopsis Tuber	9
黃芩	Scutellariae Radix	9
款冬花	Farfarae Flos	15
金銀花	Lonicerae Flos	15
枇杷葉	Eriobotryae Folium	12
桔梗	Platycodon Radix	9
甘草	Glycyrrhizae Radix	6
砂仁	Amomi Semen	8
山查肉	Crataegi Fructus	8
總量		134

#### 2) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 18~25 g의 웅성인 C57BL/6 생쥐를 코아텍 (수원, Korea)으로부터 공급받아, 실험 당일까지 고형 사료 [조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상 (삼양사 Co., Korea)]와 물을 충분히 공급하였다. 실온은 22 ± 2℃, 상대 습도 50 ± 10%, 조명 시간은 12시간 (07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하였으며 안정된 환경에서의 실험을 위하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 DNase type I, aluminum potassium sulfate (Alum), chicken egg ovalbumin (OVA., Grade IV), cyclosporine A, methacholine, collagenase, RBC lysis solution, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, RPMI-1640 (Sigma Co., USA), fetal bovine serum (Hyclone Co., US

A), anti-CD3e-PE, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD69-FITC, anti-CD45-FITC, anti-CD22-FITC, propidium iodide (PI), RNase (Pharmingen Co., USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기기는 열탕추출기 (대웅 Co., Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), chemical balance (Cas Co., Korea), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), micro-pipet (Gilson Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), Biosystem XA (Buxco research system, NC, USA), centrifuge (Hanil Co., Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), thermocycler system (MWG Biotech Co., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), chemical balance (Thatorius Co., Korea), homogenizer (OMNI Co., USA), plate shaker (Lab-Line Co., USA), flow cytometry (Becton Dickinson Co., USA) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

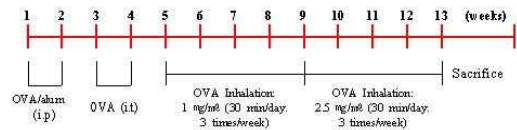
### 1) 추출물 분리

JHG 2첩 분량을 각각 증류수 1, 500 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하였다. 추출액을 흡입 여과한 후 감압 증류장치로 농축하고, 다시 동결 건조기를 이용하여 17.5 g의 분말을 얻었다. 완전 건조한 JHG를 냉동 (-80℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 2) 기관지 천식 생쥐 모델

500 µg/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum

potassium sulfate (Alum; Sigma. Co., USA)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 x g 에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심 분리한 OVA/ Alum 침전물에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후, 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 실험 시작 1, 2주에 복강 주사 (i.p)하여 전신 감작시켰다. 이 후 3, 4주에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 µg/ml) 100 µl를 기도 투여 (i.t)하였다. 5주부터 8주까지는 분무기를 이용하여 1 mg/ml을, 9주째부터 12주째까지는 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도 내로 흡입시켰다 (Scheme 1).



Scheme 1. Asthma OVA-induced mouse model

### 3) 약물 투여

OVA/Alum으로 전신 감작 시킨 후 5주째부터 JHG (400, 200 mg/kg)을 일주일에 6회 경구 투여 하였다. 동시에 양성 대조군은 cyclosporine A (CsA) 20 mg/kg을 복강 주사 (i, p)하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구 투여하였다.

### 4) 폐와 기관지 폐포세척액 (BAL fluid)으로부터 세포의 분리

6주 후 기관지천식 생쥐의 눈에서 혈액을 분리한 후 목 부분을 해부하였다. 폐포 세척액으로부터 세포를 분리하기 위해 10% FBS/DMEM 배양액 1 µg/ml을 넣은 주사기를 기관지 (trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 3회 순환시켜 분리하고 ACK 용액을 37℃에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 이를 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총세포수를 측정하였다.

5) 유세포 분석

분리한 BALF 세포를 5x10<sup>5</sup> 세포수로 조정 한 후 4℃에서 면역 형광염색(immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3e-PE, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC anti-CCR3-P E, anti-CD69-FITC, anti-CD45-FIT, anti-CD 22-FITC를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3+/CD69+, CCR3+, B220+/CD22 +, B220+/IgE+, B220+/CD45+ 세포수를 백 분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

6) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과를 ANOVA (JAVA, Bonferroni Ver 1.1)로 분석하여 p값을 구하였다. 각 대조군을 정상군과 비교하고, 실험군을 대 조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것 으로 판정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. BALF 내 총 세포수에 미치는 영향

정상군은 0.82 ± 0.26 (x10<sup>5</sup>), 대조군은 6.15 ± 0.27 (x10<sup>5</sup>)로 나타나 정상군에 비하여 대조 군에서 유의성 있게 (+++: P<0.001) 증가하였다. CsA 투여군은 3.09 ± 0.18 (x10<sup>5</sup>)로 나타 나 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*\*: P<0.001) 감소하였고, JHG 400 mg/kg, JHG 200 mg/kg 투여군은 각각 2.80 ± 0.73 (x10<sup>5</sup>), 4.54 ± 0.8 (x10<sup>5</sup>)로 나타나, 400 mg/kg 투여군에서 대조 군에 비하여 유의성 있는 (\*\*: P<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 1).

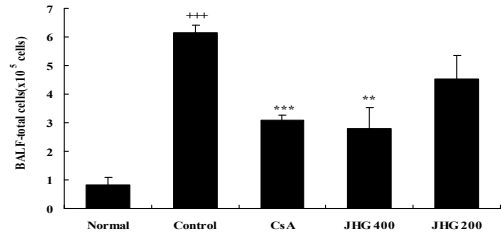


Fig. 1. Effect of JHG extract on total cell in BALF of murine OVA-induced mice C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week for 8 weeks) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of JHG (400, 200 mg/kg) extract and Cyclosporin A (20 mg/kg) for the later 8 weeks. Values represent the means ± S.E. +++: P<0.001, compared with normal group. \*\*\*: P<0.001, \*\*: P<0.01, compared with control group.

2. BALF 내 면역 세포에 미치는 영향

1) CD3+/CD69+ 세포에 미치는 영향

정상군이 0.20 ± 0.1 (x10<sup>3</sup>)로 나타난 반면, 대조군이 23.50 ± 1.6 (x10<sup>3</sup>)로 나타나 정상군 에 비하여 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가 를 나타냈다. CsA 투여군은 7.80 ± 0.1 (x10<sup>3</sup>) 로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*\*: P<0.001) 감소하였으며, JHG 400 mg/kg 투여 군, JHG 200 mg/kg 투여군은 각각 7.70 ± 1.7 (x10<sup>3</sup>), 11.7 ± 2.1 (x10<sup>3</sup>)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 (\*\*\*: P<0.001, \*\*: P<0.01) 감소하였다(Fig. 2).

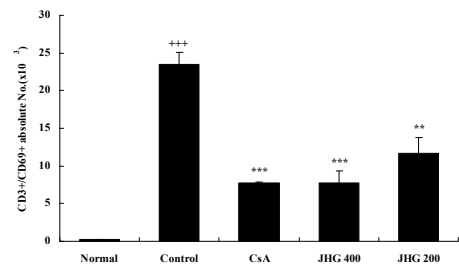


Fig. 2. Effect of JHG extract on CD3+/CD69+ absolute cell number in BALF of murine OVA-induced mice C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week for 8 weeks) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of JHG (400, 200 mg/kg) extract and Cyclosporin A (20 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice BALF were removed and CD3+/CD69+ cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean  $\pm$  S.E. Values represent the means  $\pm$  S.E. +++: P<0.001 compared with normal group. \*\*\*: P<0.001, \*\*: P<0.01 compared with control group.

2) CCR3+ 세포에 미치는 영향

정상군은  $0.50 \pm 0.0$  ( $\times 10^3$ ), 대조군은  $32.10 \pm 4.1$  ( $\times 10^3$ )로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CsA 투여군은  $9.90 \pm 2.5$  ( $\times 10^3$ )로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*: P<0.01) 감소하였으며, JHG 400 mg/kg, JHG 200 mg/kg 투여군은 각각  $7.3 \pm 1.4$  ( $\times 10^3$ ),  $12.9 \pm 5.1$  ( $\times 10^3$ )로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 (\*\*: P<0.01, \*: P<0.05) 감소하였다(Fig. 3).

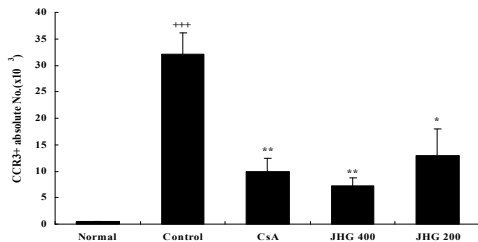


Fig. 3. Effect of JHG extract on CCR3+ absolute cell number in BALF of murine OVA-induced mice C57BL/6 mice were

injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week for 8 weeks) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of JHG (400, 200 mg/kg) extract and Cyclosporin A (20 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice BALF were removed and CCR3+ cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean  $\pm$  S.E. Values represent the means  $\pm$  S.E. +++: P<0.001 compared with normal group. \*\*: P<0.01, \*: P<0.05 compared with control group.

3) B220+ /CD22+ 세포에 미치는 영향

정상군은  $0.60 \pm 0.0$  ( $\times 10^3$ ), 대조군은  $23.30 \pm 3.1$  ( $\times 10^3$ )로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CsA 투여군은  $6.10 \pm 2.1$  ( $\times 10^3$ )로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*: P<0.01) 감소하였으며, JHG 400 mg/kg, JHG 200 mg/kg 투여군은 각각  $3.5 \pm 2.1$  ( $\times 10^3$ ),  $7.9 \pm 0.0$  ( $\times 10^3$ )로 나타나 대조군에 비하여 모두에서 유의성 있게 (\*\*: P<0.01) 감소하였다(Fig. 4).

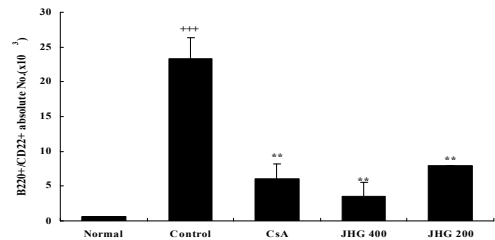


Fig. 4. Effect of JHG extract on B220+ /CD22+ absolute cell number in BALF of murine OVA-induced mice C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week for 8 weeks) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of JHG (400, 200 mg/kg)

extract and Cyclosporin A (20 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice BALF were removed and B220+/CD22+ cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean  $\pm$  S.E. Values represent the means  $\pm$  S.E. +++: P<0.001 compared with normal group. \*\*: P<0.01 compared with control group.

4) B220+/IgE+ 세포에 미치는 영향

정상군은 0.10  $\pm$  0.0 (x103), 대조군은 9.50  $\pm$  1.0 (x103)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CsA 투여군은 1.10  $\pm$  0.7 (x103)로 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*\*: P<0.001) 감소하였다. JHG 400 mg/kg 투여군, JHG 200 mg/kg 투여군은 각각 1.1  $\pm$  0.1 (x103), 2.9  $\pm$  0.7 (x103)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 (\*\*\*: P<0.001) 감소하였다(Fig. 5).

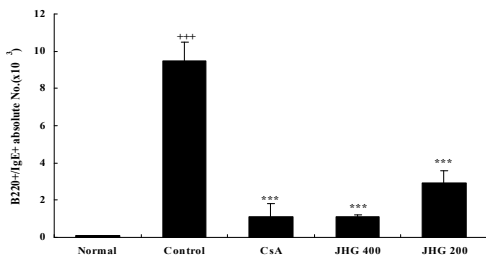


Fig. 5. Effect of JHG extract on B220+/IgE+ absolute cell number in BALF of murine OVA-induced mice C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week for 8 weeks) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of JHG (400, 200 mg/kg) extract and Cyclosporin A (20 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice BALF were removed and B220+/IgE+ cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed

the mean  $\pm$  S.E. Values represent the means  $\pm$  S.E. +++: P<0.001 compared with normal group. \*\*\*: P<0.001 compared with control group.

5) B220+/CD45+ 세포에 미치는 영향

정상군은 0.4  $\pm$  0.1 (x103), 대조군은 16.9  $\pm$  2.6 (x103)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (+++: P<0.001) 증가를 나타냈다. CsA 투여군은 3.2  $\pm$  0.7 (x103)로 대조군에 비하여 유의성 있게 (\*\*: P<0.01) 감소하였으며, JHG 400 mg/kg, JHG 200 mg/kg 투여군은 각각 3.7  $\pm$  1.4 (x103), 6.1  $\pm$  3.1 (x103)로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 (\*\*: P<0.01, \*: P<0.05) 감소하였다(Fig. 6).

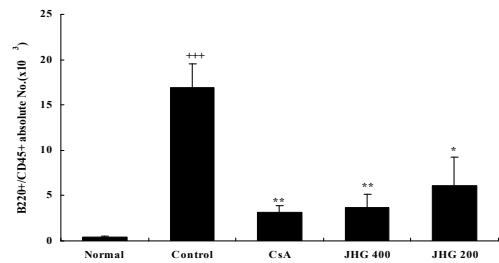


Fig. 6. Effect of JHG extract on B220+/CD45+ absolute cell number in BALF of murine OVA-induced mice C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week for 8 weeks) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of JHG (400, 200 mg/kg) extract and Cyclosporin A (20 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice BALF were removed and B220+/CD45+ cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean  $\pm$  S.E. Values represent the means  $\pm$  S.E. +++: P<0.001 compared with normal group. \*\*: P<0.01, \*: P<0.05 compared with control group.

#### IV. 考 察

천식은 환자 본인뿐만 아니라 사회 경제적으로 심각한 손실을 입히고 있는 질환으로써 이로 인한 직간접적인 사회 경제적 피해가 천문학적 수치에 이른다<sup>28)</sup>. 이러한 현실적 상황으로 인하여 치료 및 예방에 많은 비용이 소모되고 있으며<sup>29, 30)</sup>, 치료제 개발을 위한 다양한 연구가 시도되고 있다.

한의학계에서도 신규 치료제 개발 및 양방 치료의 단점을 보완하기 위하여 다양한 임상 및 실험 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 임상 활용 처방에 대한 객관적 효능 검색을 통한 EBM 구축이 진행되고 있다.

본 시료인 自拟前胡湯 역시 『呼吸科專病 中醫臨床診治』<sup>18)</sup>에 수제된 처방으로 천식을 비롯한 다양한 실증성 호흡기 증상에 사용되는 임상 처방이다. 구성 약물 중 前胡는 降氣祛痰, 宣散風熱 효능으로 風熱咳嗽를 治하며<sup>31)</sup>, 약침 제형으로 본 실험 모델과 동일한 병태 모델에서의 유의성이 보고된 바<sup>19)</sup>가 있다. 杏仁은 降氣止咳平喘, 潤腸通便 효능으로 咳嗽氣喘, 腸燥便秘 등을 治하며<sup>31)</sup>, 나 등<sup>20)</sup>은 桔梗, 杏仁, 배 추출물 배합 투여가 동물병태 모델에서의 기관지 평활근 장력, 호산구 및 IL-4에 미치는 영향을, 박 등<sup>21)</sup>은 杏仁, 瓜蒌仁 추출물의 항산화능을, 황<sup>22)</sup>은 알레르기 천식 억제 효과를 각각 보고한 바가 있다. 桑葉은 疏散風熱, 清肺潤燥, 清肝明目 효능으로 感冒風熱, 肺熱燥咳, 目赤眼花 등을 治하고<sup>31)</sup>, 知母는 滋陰降火, 潤燥滑腸 효능으로 煩熱消渴, 肺熱咳嗽, 大便燥結 등을 治한다<sup>31)</sup>. 관련 연구로 백 등<sup>23)</sup>은 3종 품종 知母의 항산화 효과를 보고한 바가 있다. 麥門冬은 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津 효능으로 肺燥咳嗽, 心煩口渴, 消渴, 熱病傷津, 便秘 등을 治하고<sup>31)</sup>, 관련 연구로 이 등<sup>24)</sup>은 asthma model 内の Cytokine IL-4, IL-5, IL-6 형성에 유의성 있는 감소 효과가 있음을 보고한 바가 있다. 黃芩은 瀉實火, 除濕熱, 止血, 安胎 효능으로 壯熱煩渴, 肺熱咳嗽, 濕熱瀉利 등을 治하며<sup>31)</sup>, 관련 연구로 천식 모델 생쥐내 면

역세포 및 사이토카인 조절능에 대한 보고<sup>25)</sup>가 있다. 款冬花는 潤肺下氣, 化痰止咳 효능으로 新舊咳嗽, 喘咳痰多 등을 治하며<sup>31)</sup>, 관련 연구로 곽 등<sup>26)</sup>은 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향을 보고한 바가 있다. 金銀花는 清熱解毒, 涼散風熱 효능으로 風熱感冒, 癰腫, 喉痺, 溫病發熱 등을 治하며<sup>31)</sup>, 枇杷葉은 化痰止咳, 和胃降逆 효능으로 肺熱咳嗽, 氣逆喘急, 胃熱嘔吐 등을 治한다<sup>31)</sup>. 桔梗은 宣肺利咽, 祛痰排膿 효능으로 咳嗽痰多, 胸悶不暢 등을 治하며<sup>31)</sup>, 알레르기 천식 효과가 보고<sup>27)</sup>되었다. 甘草는 和中緩急, 潤肺, 解毒 효능으로 咽喉腫痛, 癰腫瘡瘍 등을 治하며<sup>31)</sup>, 관련 연구로 허 등<sup>32)</sup>은 甘草가 면역 조절 작용을 통해 asthma model 내 cytokine과 다양한 면역세포에 유의성 있는 억제 작용을 발휘함으로써 천식에 주 약물 혹은 가미 약물이므로 활용될 수 있음을 입증하였다.

천식은 폐 뿐만 아니라 기도의 호흡 장애와 기관지의 과민 반응 (hypersensitivity)을 수반하는데, 외부 알러지 유발 물질이 기도에서 인지되면서 면역 반응이 시작된다. 이 때 기도상피, 점막 하층에 다수 존재하는 수지상세포가 알러지 유발 물질을 인식하는 첫 단계의 역할을 하게 된다<sup>33, 34)</sup>. IgE는 알러지 유발 물질과 결합하여 수지상세포가 이들 물질을 인체 안으로 들여오는 것을 촉진시키는데<sup>35)</sup>, 일단 세포 내부에 들어온 알러지 유발 물질은 cathepsin S에 의해 HLA 분자 (MHC class II)에 결합하게 되고 이것은 T 세포들에게 제시가 된다<sup>36)</sup>. 알러지 유발 물질을 인지하는 초기에는 naive T 세포 (Th0)들이 수지상세포가 제시한 항원을 인지하여 감작 (sensitization)을 한다<sup>37)</sup>. 한번 감작된 T 세포들은 항원 제시가 일어난 부분으로 다시 모여드는 현상이 나타나는데, 이 때 CCL11, CCL24 와 같은 케모카인들이 중요한 역할을 하게 된다<sup>38, 39)</sup>. 이와 동시에 T 세포들은 염색체 5번에 존재하는 Th2 사이토카인들을 분비하게 되는데, 이들이 바로 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 사이토카인들이다. 이러한 일련의 반응으로 인하여 기도 주위에

는 Th2 세포들이 주로 분포하게 되는데, 이들이 분비하는 사이토카인들은 2차적으로 대식세포, 호염구, 호산구와 같은 면역세포들이 기도 주변으로 모여들게 하며<sup>40)</sup>, 모여든 면역세포들에 의해 분비되는 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘과 같은 면역 매개물질은 기관지의 염증 반응을 일으켜 천식 증상을 나타나게 한다<sup>41)</sup>. 초기에 나타나는 기도의 알러지 반응은 가역성 기도 폐쇄를 보이지만 만성으로 진행된다면 초기에 Th2 반응을 억제하던 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 와 같은 Th1 사이토카인들은 오히려 기도 주변에 염증을 유발하고 조직을 손상시키는 과정을 통해 기도의 섬유화 과정을 유발한다<sup>42)</sup>. 이로 인해 환자의 환부에는 기도벽 재형성 (airway wall remodeling)이 나타나 만성 상태에서는 비가역성 기도폐쇄까지 이르게 된다<sup>43)</sup>.

현재 천식의 치료제로는 코르티코스테로이드, 류코트리엔 대항제 (leukotrien antagonist), 크로몰린, 네도크로몰, 지속성 베타-길항제 등이 제시되고 있다<sup>43)</sup>. 그러나 이들 약물은 소화기 및 신경계에 대한 부작용뿐만 아니라 대부분 일시적인 기도 확보 내지는 항염증제로 사용하는 약물이므로 천식을 근본적으로 치료하지 못하는 단점을 지니고 있다. 따라서 천식에 대해 일시적인 증상 개선이 아닌 근본적으로 질병을 치료할 수 있는 약물의 개발이 시급한 실정이다.

본 연구에서는 효과적인 항천식 치료제 개발을 위한 기본 연구로 현재 임상에서 활용되고 있는 自擬前胡湯을 시료로 천식과 관련된 면역세포들의 변화를 분자생물학적 기법으로 분석하였다.

천식은 다양한 면역세포들에 의해 발생하는 질환으로 우선 동물 모델 생쥐의 BALF 내에 존재하는 총 면역세포의 수를 측정하였다. 그 결과 대조군의 BALF에 존재하는 면역세포의 수가 정상군에 비해 크게 증가한 반면, JHG 투여군에서는 총 면역세포의 수가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 이는 JHG가 면역 조절 작용을 통하여 과민하게 증가된 다양한 면역 세포 활성을 억제함을 간접적으로 증명해 주고 있다.

이렇듯 수적으로 변화가 나타난 면역세포들 중

에서 어떠한 세포가 JHG에 의해 영향을 받았는지 확인하기 위하여 각 면역세포의 분포를 세포 특이적인 세포 표면단백질에 대한 항체를 사용하여 유세포분석기로 분석하였다.

우선 BALF 내에 존재하는 활성화된 T 세포의 분석을 CD3+/CD69+ 에 대한 항체를<sup>44)</sup> 사용하여 분석하였다. 천식 환자의 BALF 내에서는 활성화된 T 세포들이 다수 발견되고 있으며<sup>45)</sup>, 천식 환자의 면역 체계에 있어서 T 세포들이 질환 유발에 있어서 가장 기본적인 역할을 하는 것으로 인식되고 있다<sup>46)</sup>. 특히 CD4+ 에 속하는 TH2 세포들이 IL-4, IL-5, IL-13과 같은 알러지 유발 사이토카인을 분비하면서 천식을 일으키는 주된 역할을 하게 된다<sup>47)</sup>. 따라서 활성화된 T 세포의 활성을 억제하면 천식을 치료할 수 있을 것으로 받아들여지고 있어, GATA-3와 같은 Th2 특이 유전자의 발현을 억제하여 천식을 치료하려는 연구도 진행되고 있다<sup>48)</sup>. 본 실험에서 대조군은 정상군에 비해 크게 증가된 CD3+/CD69+ 세포를 BALF에서 볼 수 있었으나, JHG 투여군에서는 대조군에 비해 약 50% 정도 그 수가 줄어든 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 이 외에 호산구 세포의 수도 대조군에 비해 60~70% 감소한 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 또한 B 세포 중에서도 항체를 생산하는 성숙한 B 세포 (B220+/CD22+)<sup>49)</sup>의 세포수가 JHG 투여에 의해 대조군보다 64~73% 정도 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4).

천식에서 기도 염증이 일어나는 가장 중요한 요인 중에 하나가 외부 알러지 물질에 의한 제 I 형 과민반응이다. 이 반응은 항원과 결합한 IgE가 비만세포와 호염구의 활성화를 일으켜 히스타민, 류코트리엔, TNF- $\alpha$ 와 같은 물질을 분비하여 기도 과민 반응이나 점액을 과량 분비하게 하여 천식 증상이 나타나게 된다<sup>50)</sup>. 제 I형 과민 반응에서 가장 중추적인 역할을 하는 것은 IgE로 생각되어지는데 항체를 생산할 수 없는 생쥐에 IgE 또는 IgE를 생산하는 B 세포를 주입하게 되면 기도 과민반응에 의한 천식 반응을 일으키는 연구 결과가 이를 입증하고 있다<sup>51, 52)</sup>. 따라서 IgE를



생산하는 B세포를 억제하면 천식을 치료할 수 있을 것으로 가정되어지는데, 본 연구에서도 JHG 투여시 대조군에 비해 IgE를 생산하는 B 세포의 수가 80~90% 감소하는 것으로 나타났다 (Fig 5). 이러한 실험 결과는 JHG가 림프구의 활성화를 억제하는 효능을 가지고 있음을 시사해 주고 있다.

호산구는 천식에 있어서 또 하나의 중요한 세포로 인식되고 있다. T 세포와 마찬가지로 호산구는 천식 환자의 객담, BALF, 기도 등에 다수 존재하고 있으며<sup>53, 54)</sup> 천식의 증상 정도와 호산구의 수는 밀접한 상관관계를 나타내고 있어서 증상이 심해질수록 기도에 존재하는 호산구의 수가 증가되어 있다고 보고되고 있다<sup>55)</sup>. 호산구는 granule basic protein, eicosanoid, 활성산소, 사이토카인, 케모카인 등을 분비하여 조직을 손상시키고 기도의 과민 반응을 유도하여 천식의 증상을 나타내는 역할을 한다<sup>56)</sup>. 이처럼 천식에 있어서 중요한 역할을 하는 호산구는 골수에서 CD34+ 전구 세포들이 분화해서 만들어지는데 이때 IL-5의 역할이 필수적이다<sup>57)</sup>. IL-5는 호산구의 최종 분화를 유도할 뿐만 아니라 호산구의 생존기간을 늘려주고 세포의 활성화를 일으키는 역할을 한다<sup>57, 58)</sup>. 활성화된 호산구는 주로 T 세포 또는 기도 상피세포에 의해 발현되는 eotaxin에 의해 기도 및 점막 주위로 모여들게 된다<sup>57, 59)</sup>. 이때 호산구는 케모카인의 수용체인 CCR3를 세포 표면에 발현하고 있는데 이 수용체는 eotaxin을 인식하여 세포를 기도로 이동하게 하는 역할을 한다<sup>60)</sup>. 본 연구에서도 JHG이 호산구에 영향을 주었는지 확인하기 위하여 CCR3+를 인식하는 항체를 사용하여 BALF 내에 존재하는 호산구의 수를 조사하였다. 그 결과 JHG를 투여하게 되면 BALF 내에 존재하는 CCR3+ 세포의 수가 대조군에 비하여 55~60% 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3).

## V. 結 論

임상에서 활용되고 있는 自拟前胡湯(JHG)을

OVA 유발 천식 동물 모델에 투여하여 BALF 내 면역세포 변화에 미치는 영향을 검색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. JHG는 BALF 내 총세포수를 400 mg/kg 농도 투여군에서는 대조군에 비하여유의성 있게 감소시켰다.
2. JHG는 BALF 내 CD3+/CD69+ 세포수를 400, 200 mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
3. JHG는 BALF 내 CCR3+ 세포수를 400, 200 mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
4. JHG는 BALF 내 B220+/CD22+ 세포수를 400, 200 mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
5. JHG는 BALF 내 B220+/IgE+ 세포수를 400, 200 mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.
6. JHG는 BALF 내 B220+/CD45+ 세포수를 400, 200 mg/kg 농도 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 自拟前胡湯의 면역조절 작용을 통한 항천식 효능이 객관적으로 인정되어, 향후 다양한 병리적 인자 및 개별약물에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 參 考 文 獻

1. Holgate, S.T., Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*, 38(6): 872-97, 2008.
2. Bousquet, J., et al., The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ*, 83(7): 548-54, 2005.
3. Masoli, M., et al., The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*, 59(5): 469-78, 2004.

4. Gold, D.R. and R. Wright, Population disparities in asthma. *Annu Rev Public Health*, 26: 89-113, 2005.
5. McFadden, E., Asthma. 16 ed, ed. F.A. Kasper DL, Longo DL. 2004: McGraw-Hill. 1508-1516.
6. Mazzarella, G., et al., Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy*, 55 Suppl 61: 6-9, 2000.
7. Bochner, B.S., B.J. Udem, and L.M. Lichtenstein, Immunological aspects of allergic asthma. *Annu Rev Immunol*, 12: 295-335, 1994.
8. Corrarino, J., New guidelines for diagnosis and management of asthma. *MCN Am J Matern Child Nurs*, 33(2): 136, 2008.
9. Salpeter, S.R., et al., Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Ann Intern Med*, 144(12): 904-12, 2006.
10. 전국한의과대학 폐계내과학교실 : 동의폐계내과학, 도서출판 국진, p.329-331, 2004.
11. 정승기 외 : 哮喘의 원인 및 치법에 관한 연구. *대한한의학회지* 1986;7(1) :60-67.
12. 許建中 외 : 中西醫結合哮喘病學, 人民衛生出版社, pp14-20. 2001.
13. 주중영 외 : 증상감별진단학, 상해과학기술회사, pp.65-70, 1984.
14. 牛子范 외 : 咳喘奇效良方, 인민군출판사, pp152-170. 2007.
15. 장중경 : 금계요략, 도서출판 현담, pp.60-67, 2000.
16. 방광 편주 : 丹溪心法附餘, 대성문화사, p.339, 1982.
17. 허준 : 동의보감, 법인문화사, pp.2323-2356, 2005.
18. 마유무 외 : 호흡과전병 중의임상진치. p352-359, 인민위생출판사. 2000.
19. 노홍표 외 : 전호약침(前胡藥鍼)이 Ovalbumin-induced Asthma Mouse Model 에 미치는 영향, *大韓鍼灸學會誌*, Vol.22 No.6, pp.1- 15, 2005.
20. 나창수 외 : 배(梨) 추출 Phenolic Compound 및 길경, 행인 배합 투여가 Ovalbumin으로 유발된 천식 동물 모델에서 기관지 평활근 장력, 호산구 및 IL-4에 미치는 영향, *大韓本草學會誌*, Vol.22 No.2, pp.25-30, 2007.
21. 박정운 외 : 행인 과루인 추출물이 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포주의 iNOS 발현 및 Superoxide 형성에 미치는 영향, *대한한방중양학회지*, Vol.5 No.1, pp.137-150, 1999.
22. 황대룡 외 : 행인의 알레르기 천식 효과에 대한 연구, *大韓本草學會誌*, Vol.18 No.2, pp.201-208, 2003.
23. 백광현 외 : 서로 다른 품종 3종 지모(知母)의 향산화 효과, *大韓本草學會誌*, Vol.22 No.3, 2007.
24. 李同生 외 : 麥門冬과 五味子が Asthma model 内の Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響, *慶熙醫學*, Vol.16 No.2, pp.170-181, 2000.
25. 조철준 : 황금이 천식 모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2005.
26. 광상교 : 款冬花가 천식모델 생쥐의 BALF 내 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2004.
27. 김성수 외 : 桔梗에 의한 알레르기 천식효과에 대한 연구, *大韓本草學會誌*, Vol.19 No.2, pp.61-70, 2004.
28. Birnbaum, H.G., et al., Direct and indirect costs of asthma to an employer. *J Allergy Clin Immunol*, 109(2): 264-70, 2002.
29. Weiss, K.B. and S.D. Sullivan, The

- health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economic impact. *J Allergy Clin Immunol*, 107(1): 3-8, 2001.
30. Van Ganse, E., et al., Persistent asthma: disease control, resource utilisation and direct costs. *Eur Respir J*, 20(2): 260-7, 2002.
31. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會 : 本草學. 永林社. p. 498, p. 515, pp. 182- 183, pp. 203-205, pp. 647-648, pp. 218-219, p. 519, pp. 242-243, pp. 512 -513, pp. 499-500, pp. 586-587, 2004.
32. 허태석 : 사백산과 감초가 asthma model 내의 cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 2000.
33. Von Garnier, C., et al., Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol*, 175(3): 1609-18, 2005.
34. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 118(2): 331-6, 2006.
35. Kitamura, K., et al., Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol*, 178(1): 480-8, 2007.
36. Riese, R.J. and H.A. Chapman, Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 12(1): 107-13, 2000.
37. Smit, J.J. and N.W. Lukacs, A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol*, 533(1-3): 277-88, 2006.
38. Garcia, G., V. Godot, and M. Humbert, New chemokine targets for asthma therapy. *Curr Allergy Asthma Rep*, 5(2): 155-60, 2005.
39. Kallinich, T., et al., Chemokine-receptor expression on T cells in lung compartments of challenged asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*, 35(1): 26-33, 2005.
40. Anderson, G.P., The immunobiology of early asthma. *Med J Aust*, 177 Suppl: S47-9, 2002.
41. Bradding, P., A.F. Walls, and S.T. Holgate, The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 117(6): 1277-84, 2006.
42. Truyen, E., et al., Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax*, 61(3): 202-8, 2006.
43. 서울대학교의과대학 : 호흡기학, 서울: 서울대학교 출판부, pp.305-328, pp. 351-355, 2006.
44. Bieber, T., et al., CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol*, 98(5): 771-6, 1992.
45. Wilson, J.W., et al., Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavage and peripheral blood in atopic asthma. *Am Rev Respir Dis*, 145(4 Pt 1): 958-60, 1992.
46. Djukanovic, R., et al., Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am Rev Respir Dis*, 145(3): 669-74, 1992.
47. Robinson, D.S., et al., Predominant

- TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 326(5): 298-304, 1992.
48. Finotto, S., et al., Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med*, 193(11): 1247-60, 2001.
49. Leprince, C., et al., CD22 associates with the human surface IgM-B-cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8): 3236-40, 1993.
50. Coyle, A.J., et al., IL-4 differentiates naive CD8+ T cells to a "Th2-like" phenotype: a link between viral infections and bronchial asthma. *Ann N Y Acad Sci*, 796: 97-103, 1996.
51. Lack, G., et al., Transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by IgE-positive B cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 152(6 Pt 1): 1765-73, 1995.
52. Oshiba, A. et al., Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice. *J Clin Invest*, 97(6): 1398-408, 1996.
53. Montefort, S., et al., Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J Clin Invest*, 93(4): 1411-21, 1994.
54. Woolley, K.L., et al., Effects of allergen challenge on eosinophils, eosinophil cationic protein, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 151(6): 1915-24, 1995.
55. Louis, R., et al., The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(1): 9-16, 2000.
56. Kariyawasam, H.H. and D.S. Robinson, The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med*, 27(2): 117-27, 2006.
57. Robinson, D.S., et al., Eosinophil development and bone marrow and tissue eosinophils in atopic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 118(2-4): 98-100, 1999.
58. Yamaguchi, Y., et al., Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med*, 167(5): 1737-42, 1988.
59. Williams, T.J. and P.J. Jose, Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma. *Chem Immunol*, 78: 166-77, 2000.
60. Sehmi, R., et al., Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology*, 109(4): 536-46, 2003.