

난알부민으로 유도된 천식 마우스에서 상백피 추출물의 면역조절효능 연구

강석용^{1#}, 우은란², 박용기^{1,3*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 조선대학교 약학대학, 3 : 동국대학교 한방신약개발센터

Effect of the 70% ethanol extract of Mori Cortex Radidus on ovalbumin-induced allergic asthma in mice

Seok Yong Kang^{1#}, Eun-Rhan Woo², Yong-Ki Park^{1,3*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea
2 : College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
3 : Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The root bark of *Morus alba* L. (Mori Cortex Radidus; MCR) has been traditionally used to reduce heat from the lungs, soothe asthma, and edema and to promote urination. In this study, we investigated the effect of MCR ethanol extract on ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma in mice.

Methods : Mice were sensitized at day 0, 7 and 14 with 0.2% OVA and then airway challenged at day 21, 23, 25, 27 and 29 to induce allergic asthma. MCR extracts at doses of 50 and 100 mg/kg body weight (bw) were orally administered during OVA challenge once per a day. The levels of allergic mediators such as histamine, OVA-specific IgE, IFN- γ and IL-4 were measured in the sera of mice by ELISA. The histopathological change of lung tissues was observed with hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Results : MCR extract significantly decreased not only the serum levels of histamine, OVA-specific IgE, and IL-4 compared with those of OVA control group, but significantly increased the serum level of IFN- γ . In H&E staining, MCR extract inhibited the infiltration of inflammatory cells and bronchiolar damage with epithelial thickening in lung tissues of OVA-induced asthma mice.

Conclusions : These results indicate that MCR extract inhibits lung damage by asthma through regulating the allergic immune response, suggesting that MCR may be used as a useful agent for the treatment of allergic asthma.

Key words : *Morus alba* L, Mori Cortex Radidus, allergic asthma, ovalbumin, histamine, immunoglobulin E, Th2 cytokine

서론

호흡기 질환은 상기도, 하기도, 폐조직과 같은 호흡기계에 발생하는 질환으로 폐암, 기관지 천식, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 알레르기성 비염, 폐렴, 폐결핵, 기관지 선종, 감기, 독감, 폐색전증 등이 포함되며, 우리나라는 폐암, 폐렴, 호흡기 결핵, 천식, COPD가 많은 비중을 차지하고 있다¹⁾. 천식

은 호흡곤란을 일으키는 염증성 기도 폐쇄 질환으로 기도 폐쇄로 인한 천명(喘鳴), 호흡곤란, 만성기침의 전형적인 3대 증상을 나타내며, 기도과민증, 기관지 평활근 수축, 점액질에 의한 가역적 기도폐쇄, 기관지 점막과 점막하 부종 등의 생리적 증상과 기도의 만성적인 알레르기 염종의 병리적 증상을 동반하게 된다. 국제보건기구(WHO)에 따르면 전 세계적으로 2억 3,500만 명의 인구가 천식으로 인하여 고통 받고 있다고

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 동대로 123 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 054-770-2661 · FAX : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr
#제1저자 : 강석용, 경북 경주시 동대로 123 동국대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 054-770-2647 · FAX : 054-770-2647 · E-mail : seokppo2@hanmail.net
· 접수 : 2014년 6월 17일 · 수정 : 2014년 7월 22일 · 채택 : 2014년 7월 22일

보고되고 있다²⁾. 또한 2012년도 통계청 자료에 따르면 우리나라는 207만 여명의 천식 환자가 있으며³⁾, 최근 소아청소년층 환자가 노인층에 비해 두드러진 증가추세를 나타내고 있고 연간 2.5조원을 치료비용으로 소모하고 있어 사회 경제적 비용 소모가 매우 큰 사회 문제적 질환으로 인식되고 있다.

천식은 알레르기성 비부동염, 알레르기성 결막염 등과 더불어 대표적인 호흡기 알레르기 질환으로서 제1형 과민반응 (type 1 hyperresponsiveness) 외 알레르기 염증반응이 중요한 병태생리로 알려져 있다⁴⁾. 즉, 비만세포(mast cells), 호산구(eosinophils), T 림프구(lymphocytes), 수지상세포(dendritic cells), 대식세포(macrophages), 중성구(neutrophils) 등 다양한 염증세포와 케모카인(chemokine), 시스테인 류코트리엔(cysteinyl leukotriene), 사이토카인, 히스타민(histamine), 산화질소(nitric oxide), 프로스타글란딘(prostaglandin) D2 등의 매개체가 관여하며 특히 기도 염증에 따른 기도 폐쇄는 비만세포와 호산구가 주로 관여하는 것으로 알려져 있다²⁾. 만약 기도에 꽃가루나 집먼지 진드기 등의 항원(allergen)이 침입하면 체내 면역계가 이를 감지하여 면역글로불린(immunoglobulin) E(IgE)를 생성하게 되고 IgE는 비만세포의 수용체로 작용하여 추후 항원 재투입 시 항원에 반응하여 히스타민과 같은 기도 염증반응 유발 물질을 분비하게 되며, 이를 통해 호산구가 활성화됨으로써 기도 염증반응을 더욱 가속화시키고 기도 점막에 부종과 폐쇄를 유발하게 된다.

천식의 치료는 주로 염증조절 중심으로 흡입 스테로이드, 지속성 흡입 베타2 항진제, 서방형 테오필린, 류코트리엔 조절제, 크로몰린제, 항 IgE항체(Omalizumab) 외 알레르겐 특이 면역요법을 사용하고 있으며, 현재 흡입용 코르티코스테로이드(inhaled corticosteroids), 지속형 베타2 항진제(LABA), 류코트리엔 조절제 등이 치료제 시장을 주도하고 있다⁵⁾. 그러나 현재 시판중인 약물의 각종 부작용과 제네릭 감소로 더 좋은 안전성과 약효 및 지속성을 나타낼 수 있는 새로운 약물 개발과 복합처방에 대한 관심이 증폭되고 있다.

한의학에서 천식은 허증(虛症)질환으로서 호흡이 급하고 빠르며(喘鳴有聲), 천명이 있는 효천증(哮喘證)에 해당하는 것으로 보고 있다⁶⁾. 따라서 효천증의 진단은 허실(虛實)을 가리는데 있으며, 치료는 실증(實證)은 풍한(風寒), 담탁(痰濁) 등의 병사(病邪)가 중심이고, 허증(虛證)은 폐허(肺虛), 신휴(腎虧) 등의 정기가 허한 것(正虛)이 중심이 된다. 또한 천식의 주요 원인을 습담으로 보아 폐가 약한 경우와 신장이 약한 경우로 나누어 각 장부를 보해주는 것을 치료의 기본으로 하고 있다.

최근 천식 및 알레르기 질환을 포함한 각종 면역질환이 증가함에 따라 새로운 치료약물 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 한의약과 한약소재의 다양한 면역조절작용과 치료 효능 및 약리기전에 대한 보고가 많이 이루어지고 있다^{7,8)}.

상백피(桑白皮)는 뽕나무(*Morus alba* Linne, Moraceae)의 뿌리껍질(root bark, *Morus Cortex*)로서 주피를 제거한 것으로 성질이 차갑고 맛은 달며(甘), 귀경은 폐(肺經)로 미감성한(味甘性寒)하여 폐에 들어가 열을 제거하여 기침을 멎게 하고(賜牌平喘), 몸속에 물을 잘 통하게 하여 부종을 치료(行水消腫)하며, 폐열(肺熱)에 의한 감기와 천식을 가라앉히고, 소변불리(小便不利) 등에 응용한다⁹⁾. 상백피의 성분으로는 umbelliferone, scopoletin, morusin, mulberrin, mulberrochromene, cyclomulberin⁹⁾, kuwanon E, G, P, moracin M, C,

sanggenon A, stilbene glycosides 등이 보고되어 있으며¹⁰⁾, 효능에 대한 실험연구로는 몰추출물의 streptozotocin-유도 당뇨병 마우스에서의 혈당강하효과¹¹⁾, 혈액암 세포에서의 세포사멸유도효과¹²⁾, 난알부민(ovalbumin)-유도 천식 마우스에서의 면역조절 T 세포(regulatory T cell) 활성화도 및 Th2 면역반응 조절 효과¹³⁾, 대식세포(RAW 264.7)에서의 항염증 효과¹⁴⁾, 에탄올추출물의 흰쥐에서의 항우울증 효과(antidepressant-like effects)¹⁵⁾가 보고되었다.

본 연구에서는 상백피의 천식개선 및 알레르기 과민성 면역반응 조절 효능을 알아보기 위해 상백피의 70% 에탄올추출물을 제조하여 난알부민 감작(sensitization)과 흡입(airway challenge)으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에 7일간 투여한 후 효능을 확인하여 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 상백피는 뽕나무 뿌리껍질(*Mori Cortex Radicus*; MCR)로서 주피를 제거한 것으로 경주시 양남면에서 생산된 약재를 (주)광명당제약(한국, 울산)에서 구입하여 식품의약품안전처 한약제품표준화연구사업단으로부터 70% 에탄올 추출물(12F1001 - A01BOX1203 B)을 제공받아 사용하였다. 즉, 상백피(12F1001 - A01BOX1203) 100 g을 70% 에탄올로 95℃에서 3시간씩 2회 추출하였으며(수율: 20%), 동결건조한 추출물은 냉동보관하면서 실험직전 멸균수에 녹여 시료로 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 6주령 BALB/c계 수컷 마우스(mouse, 20±2g)를 (주)샘타코(경기도, 한국)로부터 구입하였으며, 고형사료와 물을 제한 없이 공급하면서 온도(23±2℃)와 습도(55±5%)를 일정하게 유지되고, 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하는 환경에서 사육하였다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물실험 윤리위원회 규정에 따라 관리하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약으로는 ovalbumin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), ketotifen(Sigma-Aldrich), Al(OH)₃ gel(InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA), H&E 염색약(Seoulin Biosciences Co., Seoul, South Korea), Histamine enzyme immunoassay(EIA) kit(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), Sandwich ELISA using OptEIA Set mouse OVA-specific IgE Kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA), murine IL-4 또는 IFN-γ ELISA development Kit(PeproTech Inc., London, UK)를 사용하였으며, 실험기기는 nebulizer(Devilbiss Healthcare LLC, Somerset, PA, USA), microplate reader(ASYS Group Asia Pte. Ltd., Hwaseong-si, South Korea), light microscope(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 등

을 사용하였다.

2. 방법

1) 동물모델 제작

알레르기성 천식의 동물모델 제작을 위해 먼저 난알부민 (ovalbumin, chicken egg albumin; OVA) 1 mg을 PBS와 수산화알루미늄 겔(Al(OH)₃ gel)을 1:1로 혼합한 용액 0.3 ml을 실험 시작일로부터 7일 간격으로 하루에 1번 0일, 7일, 14일에 마우스 복강으로 주사하였다. 또한 마지막 복강 주사 7일 후 마우스를 50×15×50 cm 크기의 아크릴 상자 안에 넣고 2 mg/ml OVA 용액을 뉴블라이저(nebulizer) 기기를 이용하여 격일 간격으로 1일 3회 21일, 23일, 25일, 27일, 29일에 분사함으로써 호흡을 통한 알레르기성 천식을 유도하였다. 실험군은 생리식염수를 투여한 정상군(Normal), 난알부민(OVA)-유도 천식 유발군(OVA-Control), 천식 유발군에 70% 상백피 에탄올추출물(MCR-E)을 50 mg/kg body weight(bw)와 100 mg/kg bw 용량으로 투여한 실험군(OVA+MCR-E 50, OVA+MCR-E 100) 및 항히스타민제인 케토티펜(ketotifen)을 10 mg/kg 투여한 대조군(OVA+Keto 10)으로 나누었으며, 각 군 당 6마리의 마우스를 사용하였다. 실험 최종일에 모든 동물을 희생시키고 심장에서부터 혈액을 수집하였으며, 수집된 혈액은 6,000 rpm에서 10분간 2회 원심 분리함으로써 혈청을 분리하였다. 또한 폐의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 각 군으로부터 폐 조직을 수집하였다.

2) 난알부민-특이 IgE 농도 측정

혈청 내 난알부민-특이 IgE 항체(OVA-specific IgE)의 농도를 mouse OVA-specific IgE ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉, capture antibody가 부착된 96-well flat-bottom ELISA plate에 10% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 1×PBS를 넣어 실온에서 1시간 동안 정치하여 blocking한 후 혈청을 각각 100 μl씩 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 다시 washing buffer로 5회 세척한 다음 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 plate를 5회 세척한 다음 각 well에 기질용액인 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) 기질용액을 넣어 10분 동안 암실상태에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였다. 반응이 끝난 후 각 well에 정지액을 50 μl씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 내 IgE의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

3) 혈청 내 사이토카인 농도 측정

혈청 내 IL-4와 IFN-γ의 농도는 Murin IL-4 및 IFN-γ ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well flat-bottom ELISA plate에 0.1 M sodium carbonate 용액으로 희석한 capture antibody(1:250)를 100 μl씩 넣은 후 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 각 well에 10% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 1×PBS를 넣고 실온에서 1시간 동안 정치함으로써 blocking한 후 혈청을 100 μl씩 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 다시

5회 washing buffer로 세척한 다음 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 plate를 5회 세척한 다음 각 well에 기질용액인 TMB를 넣어 10분 동안 암실상태에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였고, 반응종료 후 각 well에 정지액을 50 μl씩 넣어 효소반응을 정지시켰다. 반응액의 흡광도를 microplate reader의 450 nm에서 측정한 후 IL-4 또는 IFN-γ의 농도를 kit 내 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

4) Hematoxylin & Eosin 염색

각 군으로부터 수집한 폐 조직을 4% formaldehyde 용액으로 고정한 후 파라핀으로 포매하여 블록을 제작하고, microtome을 이용하여 3 μm 두께의 절편을 제작하였다. 폐 조직의 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 위해 폐 조직 슬라이드를 60℃에서 30분 간 말린 다음 자일렌(xylene)으로 15분 간 탈파라핀 시키고 100%, 95%, 80%, 75% 알코올 순서대로 함수시켰다. 준비된 조직 슬라이드를 hematoxylin 용액을 떨어뜨려 3분간 반응시키고 증류수로 1분씩 3회 세척한 후 eosin 용액으로 10분간 반응시키고 증류수로 세척하였다. 이를 Permount로 마운팅(mounting)한 후 광학현미경을 이용하여 폐조직의 구조적 변화를 관찰하였다. 이때 hematoxylin은 염기성 염색약(basic stain)으로 세포 핵 내 염색질과 핵막을 염색하여 보라색으로 나타나며, 산성 염색약인 eosin(acid stain)은 염기를 띠는 세포질 단백질과 콜라겐 등과 결합하여 분홍색으로 관찰된다.

5) 통계학적 검정

모든 실험 결과는 GraphPad Prism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software Co., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean±SD)를 이용하여 계산하였으며, 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA를 실시하고, p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 혈청 내 히스타민 분비에 대한 효과

난알부민 감작으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에 상백피 70% 에탄올추출물(MCR-E)을 50 mg/kg와 100 mg/kg를 7일 동안 투여한 후 혈청 내 히스타민의 농도를 EIA 방법으로 측정된 결과, 천식 유발군(OVA-Control)은 정상군(Normal)에 비해 혈청 내 히스타민의 농도가 유의적으로 증가되었으며, 상백피추출물을 투여한 군(OVA+MCR-E 50, OVA+MCR-E 100)에서는 천식 유발군에 비해 투여 용량 모두에서 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 1). 또한 혈청 히스타민의 농도는 상백피추출물 투여 용량에 의존적으로 감소되었으며, 이는 대조약물인 케토티펜 투여군(OVA+Ketotifen 10)과 유사한 것으로 나타났다.

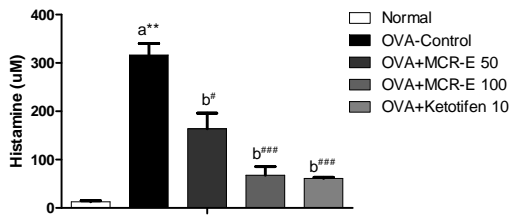


Fig 1. Effect of MCR-E extract on histamine levels in the sera of OVA-induced asthmic mice. MCR-E extract was administrated orally at doses of 50 and 100 mg/kg body weight in OVA-induced asthmic mice. Histamine levels were measured in the sera of OVA-induced asthmic mice by ELISA. Results are expressed as the mean±SD (n=10 per a group). ** P 0.01 normal or # P 0.05, ### P 0.001 and ### P 0.001 vs. OVA-control group.

2. 혈청 내 난알부민-특이 IgE 분비에 대한 효과

난알부민 감작으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에 상백피 70% 에탄올추출물(MCR-E)을 50 mg/kg와 100 mg/kg를 7일 동안 투여한 후 혈청 내 난알부민-특이 IgE(OVA-specific IgE)의 농도를 ELISA 방법으로 측정된 결과, 천식 유발군(OVA-Control)은 정상군(Normal)에 비해 혈청 내 난알부민-특이 IgE의 농도가 유의적으로 증가되었으며, 상백피추출물을 투여한 군(OVA+MCR-E 50, OVA+MCR-E 100)에서는 투여 용량 모두 천식 유발군에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 혈청 난알부민-특이 IgE의 농도는 히스타민에서의 결과와 마찬가지로 상백피추출물 투여 용량에 의존적인 감소를 나타내었으며, 대조약물인 케토티펜 투여군(OVA+Ketotifen 10)에서도 감소 효과를 나타냈다.

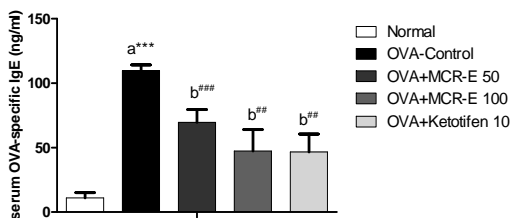


Fig 2. Effect of MCR-E extract on OVA-specific IgE levels in the sera of OVA-induced asthmic mice. MCR-E extract was administrated orally at doses of 50 and 100 mg/kg body weight in OVA-induced asthmic mice. IgE levels were measured in the sera of OVA-induced asthmic mice by ELISA. Results are expressed as the mean±SD (n=10 per a group). *** P 0.001 vs. normal or ## P 0.01 and ### P 0.001 vs. OVA-control group.

3. 혈청 내 알레르기 면역반응조절-사이토카인 분비에 대한 효과

난알부민으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에서 상백피 70% 에탄올추출물(MCR-E)의 알레르기 면역반응조절 Th1/Th2 사이토카인 생성에 대한 조절효과를 확인하기 위해 상백피 70% 에탄올추출물(MCR-E)을 50 mg/kg와 100 mg/kg를 7일 동안 투여한 후 혈청 내 인 IFN- γ 와 IL-4의 농도를 효소면역반응법(ELISA)으로 측정하였다.

그 결과, Th1 사이토카인인 IFN- γ 는 정상군(Normal)에

비해 천식 유발군(OVA-Control)에서 유의적인 감소를 나타내었으며, 이는 상백피추출물의 투여(OVA+MCR-E 50, OVA+MCR-E 100)에 의해 유의적으로 증가하였다(Fig. 3). 특히 상백피추출물 고용량 투여군에서 IFN- γ 의 현저한 증가가 관찰되었으며 이는 대조약물인 케토티펜 투여군(OVA+Ketotifen 10)에 비해 효과적인 것으로 나타났다.

한편, Th2 사이토카인인 IL-4는 IFN- γ 와는 반대로 정상군(Normal)보다 천식 유발군(OVA-Control)에서 유의적인 증가를 나타내었으며, 상백피추출물 투여에 의해 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 4). 또한 이는 대조약물인 ketotifen 투여군에 비해 효과적인 것으로 나타났다.

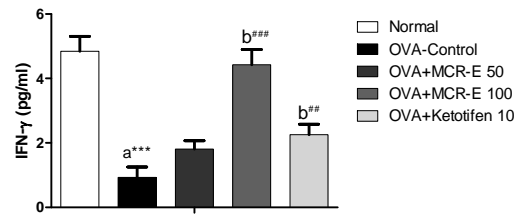


Fig 3. Effect of MCR-E extract on IFN- γ levels in the sera of OVA-induced asthmic mice. MCR-E extract was administrated orally at doses of 50 and 100 mg/kg body weight in OVA-induced asthmic mice. IFN- γ levels were measured in the sera of OVA-induced asthmic mice by ELISA. Results are expressed as the mean±SD (n=10 per a group). *** P 0.001 vs. normal or ## P 0.01 and ### P 0.001 vs. OVA-control group.

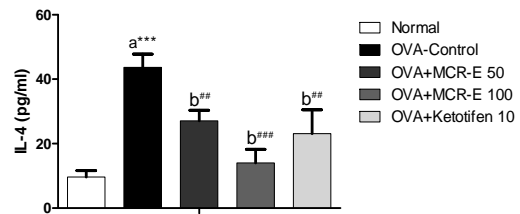


Fig 4. Effect of MCR-E extract on IL-4 levels in the sera of OVA-induced asthmic mice. MCR-E extract was administrated orally at doses of 50 and 100 mg/kg body weight in OVA-induced asthmic mice. IL-4 levels were measured in the sera of OVA-induced asthmic mice by ELISA. Results are expressed as the mean±SD (n=10 per a group). *** P 0.001 vs. normal or ## P 0.01 and ### P 0.001 vs. OVA-control group.

4. 폐 조직 손상에 대한 효과

난알부민으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에서 상백피 70% 에탄올추출물(MCR-E)의 폐 조직 손상에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 H&E 염색을 실시한 결과, 정상군(Normal)에서는 기관지(bronchiole), 세기관지(bronchi), 폐포낭(Alveolar sac) 및 혈관(vein, artery)의 형태가 잘 보존되어 있는 것을 확인하였으며, 난알부민 감작으로 알레르기성 천식이 유발된 대조군(OVA-Control)의 폐 조직에서는 세기관지와 세기관지 내 상피세포층의 손상 및 기관지와 폐포 주변으로의 염증세포 침윤에 따른 세기관지 면적이 좁아지고 기관지 벽이 두꺼워지는 병리학적 조직 손상이 관찰하였다(그림 5). 또한 상백피추출물을 투여한 군(OVA+MCR-E 50,

OVA+ MCR-E 100)에서는 대조군에 비해 폐 조직의 염증과 구조적 손상이 개선되는 것으로 나타났다. 특히 상백피추출물을 고용량 투여한 군에서는 정상군의 폐 조직과 유사하게 염증세포 침윤과 세기관지 변형이 억제되는 것을 확인하였다. 한편 대조약물인 케토티펜 투여군(OVA+Keto 10)에서는 천식 유발군에 비해서는 억제되는 것으로 관찰되었으나 상백피 추출물 투여군 보다 효과적이지 않은 것으로 나타났다.

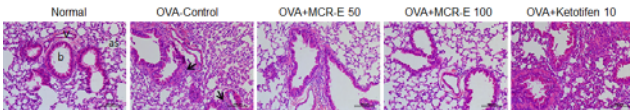


Fig 5. Effect of MCR- on OVA-induced histopathological changes in lung tissue of mice. Lung tissues were stained with H&E (x200). N: Lung tissues were obtained from PBS-administrated mice, OVA-C: OVA-sensitized/challenged mice, OVA-C+W100 or 300: OVA-control group administrated with MCR-E extract 50 mg/kg or 100 mg/kg, and OVA-C+Keto: OVA-control group administrated with Ketotifen 10 mg/kg. v: vein, b: bronchiole, as: Alveolar sac, Arrow: infiltrated inflammatory cells

고찰

기관지 천식은 기도과민증과 가역적인 기도폐쇄의 특징을 보이는 만성 기도 염증성 질환으로 전 세계적으로 약 3억 명 정도가 이환되어 있는 중요 보건학적 문제 질환으로 인식되고 있다. 전 세계적으로 많은 나라에서 유병률이 증가하고 있으며, 국내에서도 소아 및 청소년층에서의 빠른 증가와 40세 이후 성인의 연령 증가에 따라 유병률도 증가하고 있어 고령화 사회로 진입하고 있는 우리나라에서 천식은 향후 사회경제적 중요 질환이 될 수 있다¹⁶⁾.

천식은 여러 면역세포와 다양한 매개체들이 관여하는 기도의 만성 염증성 알레르기 질환이며, 임상적으로는 반복적인 호흡곤란 및 천명음, 기침, 생리적으로는 기도과민증과 가역적인 기도폐쇄, 그리고 병리적으로는 기도의 만성적인 알레르기 염증으로 정의하고 있다¹⁶⁾.

한의학에서 천식은 효천증(哮喘證)으로 보는데 호흡이 빠르고 계속적으로 가래소리가 나며 입을 벌리고 어깨를 들먹이며 신체를 마구 움직이는 증상을 특징으로 한다¹⁷⁾. 효천증은 복합원인질환으로 보아 풍한(風寒)을 만나거나 찬 음식 등으로 체온이 저하되어 발생하는 한랭설(寒冷說), 신경과민, 두려움, 놀람 등의 심리적 급격한 변화에 따른 심인설(心因說), 음식물의 지나친 편식이나 함(鹹)·산(酸)·감(甘)미의 과식으로 인한 울열(鬱熱)로 비생리적인 물질인 담(痰)이 발생되어 나타나는 담인설(痰因說), 태어날 때부터 폐기능이 약하여 나타나는 소인설(素因說), 반복적인 호흡기 질환의 감염에 따른 감염설(感染說), 냄새, 맛, 음식물의 과민반응으로 나타나는 과민반응설(過敏反應說), 호흡의 호기(呼氣)를 담당하는 폐와 흡기(吸氣)를 담당하는 신장의 기능부조에 의해 발병한다는 폐신(肺腎)의 호흡 기능장애 등 다양하게 분류하고 있다.

최근 천식, 알레르기 비염, 아토피 등 알레르기성 호흡기 질환이 증가하는 추세에 따라 기존 치료제 보다 안전하고 효과적이며 지속성이 강한 치료소재와 의약품 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 다양한 한약(생약)추출물과 천연물의 다양한 면역조절기전과 치료효능 및 이를 활용한 새로

운 약물개발 연구가 활발히 이루어지고 있다^{7,8,17,18)}. 본 연구에서는 한약재 중 폐경에 작용하여 폐열로 인한 해수(咳嗽)와 천식을 가라앉히고⁹⁾, 습참, 혈담, 부종, 소변불리 등에 효과가 있는 상백피의 70% 에탄올추출물을 제조하고, 난알부민 감작으로 알레르기성 기관지 천식이 유발된 마우스에서 과민성 면역반응조절에 따른 천식의 개선 효능을 확인함으로써 향후 천식 치료제 개발 소재로서의 가능성을 타진해보고자 하였다.

상백피의 효능은 물추출물의 자유기 소거능을 통한 항산화 활성과 DNP-IgE와 human serum albumin(HSA)으로 활성화된 RBL-2H3 흰쥐 호중구세포(basophilic leukemia cell)에서의 β -hexosaminidase 분비 억제 및 염증성 사이토카인(IL-4, TNF- α) 생성 억제효과가 보고되었으며¹⁹⁾, MC/9 마우스 비만세포에서의 PMA와 A23187에 의해 유도된 Th2 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-6, IL-13)의 유전자 발현 억제 및 GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, NF- κ B p65 등의 전사인자발현 조절을 통한 면역반응 조절효능²⁰⁾이 보고되었다. 또한 흰쥐 복강의 비만세포에서의 compound 48/80에 의해 유도되는 탈과립의 억제 및 이를 통한 히스타민 유리 및 칼슘유입의 억제효능이 보고되었다²¹⁾. 본 연구에서는 기존 상백피 물추출물의 알레르기성 면역조절효능 보고에서와 같이 상백피의 70% 에탄올추출물이 난알부민으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에서의 과민성 면역반응 유발물질인 난알부민-특히 IgE의 생성과 히스타민 분비를 유의적으로 감소시키고 Th2 사이토카인인 IL-4는 억제하고, Th1 사이토카인인 IFN- γ 의 생성은 증가시킴으로써 알레르기성 면역반응 조절 및 천식개선 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

케토티펜(ketotifen)은 알레르기성 천식, 비염, 결막염, 음식 알레르기로 인한 과민증상 완화 등에 사용하는 2세대 항히스타민제(antihistamine)로서 혈관의 내피세포나 평활근 수축, 혈관 투과성과 기관지저항 증가, 호산구와 호중구의 화학주성 등을 조절하는 H1 히스타민 수용체에 대해 히스타민과 약리적 길항제(histamine H1 antagonist)로서 작용하여 H1 수용체의 반응을 억제함으로써 개재기, 콧물, 코가려움증, 알레르기 결막염 등의 증상을 감소시키고, 비만세포에서의 화학매개체 분비 억제(mast cell growth inhibitor)를 통해 항알레르기 작용과 항염증 효과는 나타내는 것으로 알려져 있다²²⁾. 케토티펜은 아토피성 천식 환자에서의 천식 증상 개선과 기도 점막 분비 억제를 통한 기도 과민반응 개선²³⁾ 및 사람의 단핵구(monocytes)에서 LPS로부터 유도되는 Th1 케모카인(chemokine)인 interferon-inducible protein 10 (IP-10)/CXCL10, Macrophage-derived chemokine(MDC), interferon-gamma (MIG)/CXCL9 및 IL-8의 발현을 억제함으로써 면역조절을 통한 기도염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 본 연구에서 상백피 70% 에탄올추출물은 고용량 투여군에서 케토티펜과 유사한 히스타민 분비 억제 및 난알부민-특히 IgE 생성 억제 효과를 나타내었으며, 케토티펜 보다 우수한 INF- γ 의 생성 증가와 IL-4의 분비 억제 효과를 나타냄으로써 항히스타민 효과 뿐 아니라 알레르기성 면역반응 조절효과가 우수한 것으로 나타났다.

알레르기성 면역반응에서 조력 T 세포(helper T cell, Th)는 IL-2, IFN- γ 등을 분비하는 Th1 세포와 IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 등을 분비하는 Th2 세포가 존재하며 많은 연구에서 Th1과 Th2 반응은 서로 길항작용을 하며 균형을 유지하고 있고, Th1/Th2 반응의 불균형이 천식 발병의 핵심적

인 요인으로 보고 있다²⁵⁾. 제1형 과민성 면역반응인 알레르기성 면역반응의 환자는 실제 정상인에 비해 Th2 세포로의 분화가 더 많이 일어나게 되며 이러한 Th1/Th2의 불균형은 천식과 같은 알레르기성 질환의 중요한 병리기전 중 하나이다²⁶⁾. 한편 알레르기성 천식은 IgE와 관련되는데 Th0 세포가 Th2 세포로 분화되어 Th2 사이토카인을 분비하면 이들은 각종 세포들을 자극하여 IgE 및 염증매개물질들을 분비시킴으로써 기관지 과민성 및 기도폐쇄를 일으켜 천식 증상 발생에 기여하게 된다²⁷⁾. B 세포에서 생성된 IgE는 혈관을 타고 순환하다 조직 내의 비만세포나 말초혈액 내 호염구(basophil)와 만나면 이들 세포표면에 있는 high-affinity IgE 수용체(FC ϵ RI)와 결합하거나, 림프구, 호산구, 혈소판, 대식세포 표면에 있는 low-affinity IgE 수용체(FC ϵ RII 또는 CD23)와 결합함으로써 세포 활성화를 통한 히스타민, 류코트리엔(leukotriene), 사이토카인 등 각종 매개물질 분비 및 기도염증반응에 관여하게 된다. 따라서 천식과 같이 알레르기성 질환 치료약물은 일시적 증상 개선 외에 Th1/Th2 면역반응의 불균형을 해소시킴으로써 알레르기성 면역조절을 통한 치료 가능성이 중요한 전략이 될 수 있다. 본 연구에서 상백피의 70% 에탄올추출물은 난알부민으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에서 Th1 사이토카인인 INF- γ 의 생성을 증가시키고, Th2 사이토카인인 IL-4의 분비를 억제시킴으로써 Th1/Th2 면역조절 효과가 있는 것으로 나타났으며, 이는 상백피가 알레르기성 천식의 개선효과를 기대할 수 있는 약물로서 치료제 개발 가능성을 갖고 있음을 의미한다.

한편, 천식에서의 기도 염증은 비만세포, 호산구, 림프구 뿐 아니라 대식세포나 호중구, 기도 상피세포 등 다양한 염증세포들로부터 나타나며, 이들로부터 합성, 분비되는 다양한 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , GM-CSF)이나 케모카인, 염증효소(iNOS, COX-2)가 만성 염증반응에 기여하게 된다. 실제 알레르기성 천식 환자에서 기도 염증반응은 기도의 구조적 변형(airway remodeling)으로부터 폐 기능의 지속적인 이상 소견을 초래하는 것으로 알려져 있고, 폐의 조직학적인 변화로 기관지와 혈관 주변으로의 염증세포 침윤과 기관지상피세포의 술잔세포 증식(goblet cell hyperplasia), 기도 내강으로의 점액 분비 및 부종 소견 등이 관찰되게 된다²⁹⁾. 본 연구에서 상백피의 70% 에탄올추출물은 난알부민으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스의 폐 조직에서 염증세포 침윤 및 기관지 상피세포층 손상, 폐 조직 내 기관지, 세기관지, 폐포낭, 정맥 및 동맥 등의 구조적 손상을 억제시키는 것으로 나타났다. 이는 상백피가 천식에서 알레르기성 염증반응에 따른 기관지와 폐 조직 손상으로부터 이들 조직을 보호함으로써 천식 증상을 개선시킬 수 있음을 의미한다.

결론적으로 상백피의 70% 에탄올추출물은 난알부민 감작으로 천식이 유도된 마우스에서 혈청 내 히스타민과 난알부민 특이-IgE 및 IL-4의 분비를 감소시키고, INF- γ 의 분비 증가와 폐 조직에서의 염증세포 침윤을 효과적으로 억제함으로써 알레르기성 염증반응 조절을 통해 천식을 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.

결론

본 연구는 난알부민 감작(sensitization/challenge)으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에서 상백피의 70% 에탄올추출물의 알레르기성 면역반응 조절효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 상백피의 70% 에탄올추출물은 천식 마우스에서 혈청 히스타민과 난알부민-특이 IgE의 분비를 유의적으로 감소시켰다.
2. 상백피의 70% 에탄올추출물은 천식 마우스에서 혈청 내 Th2 사이토카인인 IL-4분비는 감소시키고, Th1 사이토카인인 INF- γ 의 분비를 증가시켰다.
3. 상백피의 70% 에탄올추출물은 천식 마우스의 폐 조직에서 기관지와 혈관의 구조적 손상을 막고, 폐 조직으로의 염증세포 침윤을 억제함으로써 염증반응을 억제하였다.

본 연구결과로부터 상백피의 70% 에탄올추출물은 알레르기성 면역반응 매개물질들의 분비 억제와 Th1/Th2 사이토카인 조절작용을 통해 천식에서의 알레르기성 염증반응 억제를 통한 기관지 천식 개선 효능을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 식품의약품안전청 한약재품질표준화연구사업의 연구비 지원(12172한약표989-2202)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Cause of death Korean Statistical Information Center, Statistics Korea, 2012 : 6-7.
2. World health organization, Asthma, Retrieved July, 20, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>
3. Statistics korea, Classifieds of disease patients, Retrieved July, 20, 2014, from http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=350&tblId=TX_35001_A061&vw_cd=&list_id=&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=K1&path=
4. Ishmae FT, The inflammatory response in the pathogenesis of asthma, J Am Osteopath Assoc, 2011 ; 111(11) : S11-7.
5. Cho SH, Park HW, Rosenberg DM, The current status of asthma in Korea, J Korean Med Sci, 2006 ; 21(2) : 181-7.
6. Holgate ST, Bousquet J, Chung KF, Bisgaard H, Pauwels R, Fabbri L, Rabe K, Doherty M, Snell NJ, Cuss F, D'Amato M, Reginster JY, Group for

- the Respect of Ethics and Excellence in Science: Asthma section, Summary of recommendations for the design of clinical trials and the registration of drugs used in the treatment of asthma. *Respir Med*, 2004 ; 98(6) : 479-87.
7. Li XM, Srivastava K. Traditional Chinese medicine for the therapy of allergic disorders. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 ; 14(3) : 191-6.
 8. Li XM, Brown L. Efficacy and mechanisms of action of traditional Chinese medicines for treating asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 ; 123(2) : 297-306.
 9. The whole country a college of Oriental medicine The joint textbook publish commission compilation, *Herbology*. Seoul : Younglimsa, 2004 : 521-3.
 10. Piao SJ, Chen LX, Kang N, Qiu F. Simultaneous determination of five characteristic stilbene glycosides in root bark of *Morus albus* L. (*Cortex Mori*) using high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal*. 2011 ; 22(3) : 230-5.
 11. Chen F, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*folium mori*) and cortex *mori radiceis* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi*. 1995 ; 115(6) : 476-82.
 12. Nam SY, Yi HK, Lee JC, Kim JC, Song CH, Park JW, Lee DY, Kim JS, Hwang PH. *Cortex mori* extract induces cancer cell apoptosis through inhibition of microtubule assembly. *Arch Pharm Res*. 2002 ; 25(2) : 191-6.
 13. Kim HJ, Lee HJ, Jeong SJ, Lee HJ, Kim SH, Park EJ. *Cortex Mori Radicis* extract exerts antiasthmatic effects via enhancement of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells and inhibition of Th2 cytokines in a mouse asthma model. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 138(1) : 40-6.
 14. Seo CS, Lim HS, Jeong SJ, Ha H, Shin HK. HPLC-PDA analysis and anti-inflammatory effects of *Mori Cortex Radicis*. *Nat Prod Commun*. 2013 ; 8(10) : 1443-6.
 15. Lee MS, Park WS, Kim YH, Kwon SH, Jang YJ, Han D, Morita K, Her S. Antidepressant-like effects of *Cortex Mori Radicis* extract via bidirectional phosphorylation of glucocorticoid receptors in the hippocampus. *Behav Brain Res*. 2013 ; 236(1) : 56-61.
 16. Korean Asthma Management Guideline for Adults. COAD Research Center, The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. Jin Publishing & Printing Co. 2011 : 2-45.
 17. The future of natural drug. *Bio Medicine*. Chungnam National University. 2013.
 18. Mali RG, Dhake AS. A review on herbal antiasthmatics. *Orient Pharm Exp Med*. 2011 ; 11(2) : 77-90.
 19. Kim JM, Baek JM, Kim HS, Choe M. Antioxidative and anti-asthma effect of *Morus Bark* water extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutri*. 2010 ; 39(9) : 1263-9.
 20. Lee KJ, Kim BK, Kil KJ. Suppressive effects of *Morus alba* Linne root bark (MRAL) on activation of MC/9 mast cells. *Kor J Herbology*. 2013 ; 28(1) : 33-42.
 21. Chai OH, Bae HW, Lee MS, Lee JI, Song CH. Effects of *Cortex mori* on the activation of rat peritoneal mast cells by human seminal plasma. *J Asthma Allergy Clin Immunol*. 1999 ; 19(5) : 666-76.
 22. Riccioni G, Di Ilio C, D'Orazio N. Review: Pharmacological treatment of airway remodeling: inhaled corticosteroids or antileukotrienes? *Ann Clin Lab Sci*. 2004 ; 34(2) : 138-42.
 23. Hoshino M, Nakamura Y, Sim JJ, Tomioka H. A comparative study of the effects of ketotifen, disodium cromoglycate, and beclomethasone dipropionate on bronchial mucosa and asthma symptoms in patients with atopic asthma. *Respir Med*. 1998 ; 92(7) : 942-50.
 24. Hung CH, Suen JL, Hua YM, Chiang W, Chang HC, Chen CN, Jong YJ. Suppressive effects of ketotifen on Th1- and Th2-related chemokines of monocytes. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007 ; 18(5) : 378-84.
 25. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989 ; 170(6) : 2081-95.
 26. Kim YM, Kim YS, Jeon SG, Kim YK. Immunopathogenesis of allergic asthma: more than the th2 hypothesis. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013 ; 5(4): 189-96.
 27. National Asthma Education and Prevention Program. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. 2004.
 28. Siraganian RP. Biochemical events in basophil or mast cell activation and mediator release. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. *Allergy: principles & practice*. 5th ed. Vol. 1. St. Louis: Mosby-Year Book, 1998 : 204-27.
 29. Oh SW, Pae CI, Lee DK, Jones F, Chiang GK, Kim HO, Moon SH, Cao B, Ogbu C, Jeong KW, Kozu G, Nakanishi H, Kahn M, Chi EY,

Henderson WR Jr. Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol* 2002 ; 168(4) : 1992-2000.