

小青龍湯이 분화된 Th1 cell 및 Th2 cell cytokine profile에 미치는 영향

정혁준 · 홍무창 · 신민규 · 배현수^{1*}

경희대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

Sochungyong-tang, Traditional Korean Medicine, Suppresses Th2 Lineage Development

Hyuk-joon Jeong, Moo Chang Hong, Min Kyu Shin, Hyun Su Bae^{1*}

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, KyungHee University, 1: Purimed R&D Institute

In this study, the immunological effect of a traditional Korea herbal medicine, Sochungyong-tang (SCRT) that has been widely used for the treatment of various immunological disorders including allergic asthma in Korea, was examined in vitro. In our previous study demonstrated that SCRT decreases the expression of IL-4 mRNA, that plays pivotal role in Th2 cell development, while increases IFN- γ expression, which is one of the key cytokines for Th1 lineage development in Th0 condition. That study strongly implies that SCRT can correct Th2 dominant condition directly affecting to the CD4+ T cell development. Present study designated to further evaluate the SCRT on helper T cell development by monitoring Th1/Th2 specific cytokine secretion patterns in artificially induced Th1 or Th2 polarized condition. The results demonstrated that Th2 cells were dramatically under-populated in Th2 driven condition with SCRT treatment, while Th1 cells were not altered in Th1 skewed condition. Furthermore, under Th2-skewed conditions the levels of and IL-4 were considerably decreased with SCRT treatment. However, the expression of GATA-3, a transcription factor that plays pivotal role in Th2 lineage programming, was not changed with SCRT, suggesting that the suppression of Th2 cell development by SCRT was not mediated by GATA-3. Present study implies that the effect on CD4+ T cell may be the one of key pharmacological effect point for treating IgE mediated allergic asthma by SCRT. These results also suggest that SCRT might be desirable agent for the correction of Th2 dominant pathological disorders.

Key words : Sochungyong-tang, Th1, Th2, allergy, asthma, IFN- γ , IL-4, T-bet, GATA-3

서론

小青龍湯은 漢代 張의 『傷寒論』¹⁾에 처음 기재된 처방으로, 解表散寒, 溫肺化飲, 止咳平喘하는 효과²⁾가 있어 만성기관지염, 기관지천식, 알러지성 비염, 폐렴 및 알러지 질환에 폭넓게 응용되고 있다³⁾.

알러지 (allergy)란 생체가 외부로부터 침입한 세균이나 이종물질에 대하여 면역학적 반응을 일으키는데 이러한 면역기전에 의한 항원항체 반응에 있어 인체에 유해한 반응을 일으키는

것을 말한다⁴⁾. 면역 기능은 생체가自己和非自己를 식별하는 기구이며, 외부로부터 침입하는 미생물 혹은 同種의 조직이나 생체에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 抗體를 생산하고, 또한 이를 제거함으로써 그 개체의 항상성 (homeostasis)을 유지하는 현상이다⁴⁾.

한의학에서 면역의 개념은 인체 내에서 일체의 질병에 저항하는 물질로 臟腑經絡 營衛氣血의 정상적인 생리기능을 포괄적으로 지칭하는 正氣와 인체를 외부로부터 방어 보호하는 작용이 있다고 보는 衛氣의 작용과 기본적으로 일치하며⁵⁾, 질병의 발생과 진행에 있어서 正氣 不음이 중요한 병인임을 강조하였는데 이러한 질병 발생에 있어서의 正氣와 邪氣의 개념은 서양의학의 면역이론과 유사함을 알 수 있다. 면역기능에 대한 최근의 한의

* 교신저자 : 배현수, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : hbae@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0323

· 접수 : 2005/01/26 · 수정 : 2005/02/28 · 채택 : 2005/03/28

학적 연구는 인체의 正氣가 왕성하면 외부로부터 邪氣가 침범하지 못한다는 관점에서 연구되어 왔고, 알러지 질환과 관련하여 한약이 면역기능에 미치는 영향을 확인하려는 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다.

小青龍湯에 대한 연구로는 金 등⁶⁾이 진통 항경련효과를, 安 등⁷⁾은 기관지 평활근수축반응, 진해거담작용 등을, 趙 등⁸⁾은 알러지 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향을, 李 등⁹⁾은 알레르기천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향을 보고하였고, 車 등¹⁰⁾은小青龍湯이 asthma model내의 cytokine IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF-α에 미치는 영향을 보고하였으며, 李 등¹¹⁾은小青龍湯과 加味小青龍湯이 I형 및 IV형 allergy반응과 폐부중에 미치는 영향을 보고하였고, 裴 등¹²⁾은 mouse의 B cell에서 IgE의 분비와 cytokine 생산에 대한小青龍湯의 효과를 보고하였다. 면역반응에서 중요한 역할을 담당하고 있는 helper T cell의 활성화에小青龍湯이 미치는 영향에 대하여는 서 등¹³⁾의 연구가 유일하였다. 기존의 cytokine 발현량의 증가 및 cytotoxic T cell, B cell 등 면역세포의 수적 증가 여부로 알러지 질환의 치료를 연구하는데서 벗어나, 면역계의 이상항진으로 발현하는 알러지성 질환에 사용빈도가 높은小青龍湯이 인위적으로 분화된 Th1 cell 및 Th2 cell의 cytokine 분비에 미치는 영향을 확인한 바 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c 雌性 마우스이며 평균 상태로 관리되어 온 것을 샘타코 코리아(주)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 정도 산업(주)에서 구입하여 공급하였으며 飲用水는 멸균처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 飲用水는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

2. 시료의 제조 및 지표물질 분석

1) 시료의 제조

본 실험에 사용된小青龍湯의 처방 구성은 東醫實鑑에 근거하였으며 약재는 한국생약협회로부터 구입하여 엄선하고 3차 증류수로 세척하여 사용하였다.

Table 1. Contents of SCRT (ethanol extract of Sochungyong-tang)

Herbal Medicine	Amount (g)
<i>Epoedrae Herba</i> (麻 黃)	6.0
<i>Paeoniae Radix Alba</i> (白芍藥)	6.0
<i>Schizandrae Fructus</i> (五味子)	6.0
<i>Pinelliae Rhizoma</i> (半 夏)	6.0
<i>Asari Herba Cum Radice</i> (細 辛)	4.0
<i>Zingiberis Rhizoma</i> (乾 姜)	4.0
<i>Cinnamomi Ramulus</i> (桂 枝)	4.0
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘 草)	4.0
total amounts	40.0

각 약재는 Table 1 에 표기된 비율로 혼합하여 총 800 g을

분말한 후 sonicator (Branson, USA)를 이용하여 70% 에탄올로 추출하고 침전물을 다시 80%, 90%, 100% 에탄올에서 같은 방법으로 추출하였다. 수집된 추출액은 60℃에서 감압농축 후 동결건조하여 97.68 g (yield: 12.21%)의 분말 시료를 얻었다.小青龍湯 추출물은 실험 전에 3차 증류수에 녹여 0.22 μm syringe filter로 여과하여 사용하였다.

2) 시료의 지표물질 분석

회수된小青龍湯의 ethanol 건조추출물 약 240 mg을 정밀히 달아 test tube에 넣고 methanol (HPLC reagent, J.T. Baker, U.S.A.) 및 정제수 (18 MΩ 이상의 3차 증류수) 4 ml를 정확히 넣어 녹인 후 0.45 μm syringe filter (PVDF, Waters, U.S.A.)를 통과 시켜서 검액으로 사용하였다.小青龍湯을 구성하고 있는 지표물질은 보건복지부의 표준화연구에 의한 것을 선정하여 마황 (ephedrine), 백작약 (paeoniflorin, Wako Pure Chemical Industries Co. LTD., Japan, 이하 Wako), 오미자 (schizandrin, Wako), 반하 (homogentistic acid, Fluka Chemie, Switzerland), 세신 (α-asarone, Sigma Chemical Co., Germany, 이하 Sigma), 건강 (6-gingerol, Wako), 계지 (cinnamaldehyde, Merck, Germany), 감초 (glycyrrhizic acid, Sigma) 등 중에서 현재 시판하고 있는 것들을 우선 분석하였다. 이들 각각은 약 10 mg을 정밀히 달아 지표물질의 분석조건에 따라 methanol 및 정제수 5 ml에 녹였다. 녹인 표준액은 2, 1.5, 1.0, 0.5, 0.1 mg/ml로 일정하게 희석하여 표준 HPLC chromatogram을 얻고 각 peak의 면적을 측정하여 농도와 면적사이의 상관관계를 최소자승법에 의해 구하였다.

본 연구에서 사용된 HPLC는 Waters Breeze System (717+ Autosampler, 2487 dual λ absorbance detector, 1525 binary HPLC Pump, Waters Co., Milford, U.S.A.)을 사용하였고, data 처리는 Waters Breeze System(Ver. 3.20, Waters Co., Milford, U.S.A.)을 사용하였다. HPLC 분석조건은 다음과 같다.

(1) Column : Symmetry®C18 5 μm (ODS, 4.6×150 mm, Waters, U.S.A.)

(2) Mobile phase :

① α-asarone ; methanol : water = 5 : 95 ⇒ 100 : 0 (v/v)

② cinnamaldehyde ; methanol : water = 40 : 60 (v/v)

③ 6-gingerol ; methanol : water = 65 : 35 (v/v)

④ glycyrrhizic acid ; acetonitrile : 2% acetic acid aqueous solution = 40 : 60 (v/v)

⑤ homogentistic acid ; methanol : 2% acetic acid aqueous solution = 15 : 85 (v/v)

⑥ paeoniflorin ; acetonitrile : 2% acetic acid aqueous solution = 15 : 85 (v/v)

⑦ schizandrin ; acetonitrile : water = 50 : 50 (v/v)

(3) UV Detector : 254 nm (cf., 6-gingerol : 210 nm)

(4) Flow rate : 1 ml/min

(5) Sample injection : 10 μl(cf., poncirin : 20 μl)

(6) Temperature : Room temperature

이 때,小青龍湯의 각 구성한약재에 대한 지표물질의 정량은小青龍湯 ethanol 추출물인 검액의 peak 면적을 표준액의

peak 면적으로 나눈 후, 여기에 지표물질 표준액물질의 양을 곱해서 산출하였고, 시료는 3회 반복 시험 후 평균값을 취하여 계산하였다.

3. Antibody와 medium

본 실험에서는 anti-CD3e (clone:145-2C11), anti-CD28 (clone:37.51), anti-mouse IL-4 (BVD4-1D11), anti-mouse IL-12 (C17.8), FITC-conjugated anti-CD4 antibody, Recombinant Mouse IL-4 (rIL-4), recombinant Mouse IL-12 (rIL-12), (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, U.S.A.), Magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads, Mouse IL-4 Secretion Assay Detection Kit, Mouse IFN- γ Secretion Assay Detection Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 등이 사용되었다.

본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% defined FBS (Hyclone, Logan, U.S.A.), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen Life Technologies, Rorkville, U.S.A.) 10 mM HEPES, 11 mM sodium bicarbonate (JRH Biosciences, Lenexa, U.S.A.)가 포함된 RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies)를 사용하였다.

4. 비장 임파구 준비

적출한 BALB/c 마우스의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer (BD Biosciences Pharmingen)로 걸러내었다. 균질화된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 5 ml Pharm Lyse (BD Biosciences Pharmingen)를 넣고 5분간 반응시킨 후 세포가 부유되어있는 tube에 5 ml의 media를 첨가한 후 300 \times g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 남은 cell pellet은 1 ml의 media로 suspension 한 후 trypan blue로 염색하여 세포수를 측정하였다.

5. CD4⁺ T cell 분리

비장임파구 1 \times 10⁷ cells/90 μ l 농도 당 10 μ l의 magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads (Miltenyi Biotec)를 첨가하여 15분간 4 $^{\circ}$ C에서 반응하였다. 300 \times g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 5 ml의 media로 세척하였다. 남은 세포침전물에 1 \times 10⁸/500 μ l의 농도가 되도록 media를 넣고 resuspension하였다. Ls separation column (Miltenyi Biotec)을 varioMACS separator (Miltenyi Biotec)에 장치한 후 3 ml의 buffer (PBS with 2 mM EDTA and 0.5% BSA)로 column을 통과시키고 세포 부유액을 column안으로 주입하였으며 세포 부유액이 column을 통하여 빠져나가면 다시 2 ml의 buffer로 column을 3번 헹구어 내었다. Column을 separator에서 분리해 낸 후 5 ml의 buffer를 넣고 plunger를 눌러서 CD4⁺ T cell을 분리하였다.

6. 생존율 및 증식능 측정

Mitogen으로 자극 받지 않은 비장 임파구의 생존율을 측정하기 위해 CellTiter 96[®] TM Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, U.S.A.)의 protocol을 이용하되 5.의 방법을 이용하여 CD4⁺ T cell을 분리 한 후 4 \times 10⁵ cells/ml의 농도로 100 μ l씩 flat bottomed 96-well plate에

seeding하였다. CD4⁺ T cell가 seeding 된 plate에 소형용량 추출물을 0, 1, 2, 5, 10, 20 μ g/ml 농도로 첨가하고 10 μ g/ml anti-CD3e (clone:145-2C11, BD Bioscience Pharmingen)가 coating된 plate에서 2 μ g/ml anti-CD28 (clone:37.51, BD Bioscience Pharmingen)로 co-stimulation하였다. 이상의 혼합물을 48시간동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator (Nuair, Plymouth, U.S.A.)에서 배양하였다.

7. CD4⁺ T cell을 Th1/Th2 cell으로 분화

10 μ g/ml anti-CD3e가 coating된 12-well plates에 CD4⁺ T cell을 2 \times 10⁶ cells/ml의 농도로 seeding 후 2 μ g/ml anti-CD28로 co-stimulation하였다. SCRT를 0, 1 μ g/ml의 농도에서 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 Th1 cell plate는 50 U rIL-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.)와 10 ng/ml rIL-12, 10 μ g/ml anti-IL-4 (BD Bioscience Pharmingen)를, Th2 cell plate에는 50 U rIL-2와 10 ng/ml rIL-4, 10 μ g/ml anti-IL-12 (BD Bioscience Pharmingen)를 첨가하고 3일 후에 1:2로 split하였다. 48시간 후 cell을 PBS로 세척한 후 10 μ g/ml anti-CD3e와 2 μ g/ml anti-CD28로 re-stimulation한 후 24시간동안 배양처리하였다.

8. Secretion cytokine 측정

CD4⁺ T cell을 7.의 방법과 같이 분화한 후 harvest하기 위하여 wash buffer (PBS/0.5% BSA/2 mM EDTA) 2 ml로 300 \times g에서 5분간 원심분리 한 후 wash buffer로 2번 세척하였다. cold medium으로 90 μ l/10⁶cell 이 되도록 세포침전물을 resuspension 하고 catch reagent (Miltenyi Biotec)를 20 μ l/10⁶cell 을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation하고 warm medium으로 cell 수가 1 \times 10⁵개가 되도록 희석한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 40분간 incubation 하였다. cold buffer 5 ml로 300 \times g에서 10분간 원심 분리하여 세척 후 상층액을 제거하고 cold buffer 90 μ l/10⁶cell 로 cell pellet을 resuspension하였다. 여기에 PE-conjugated Detection antibody, FITC-conjugated anti-CD4 antibody를 첨가 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation하고 cold wash buffer로 2번 세척한 후 FACScan (BD biosciences Becton Dickinson, Franklin Lakes, U.S.A.)으로 분석하였다.

9. Real-time RT-PCR을 이용한 cytokine 발현 측정

1) Total RNA isolation

상기 실험에서와 같은 조건으로 CD4⁺ T cell을 Th1/Th2 cell로 분화한 뒤 cell을 harvest하여 PBS로 세척하고 Trizol solution (Invitrogen Life Technologies)을 이용, 제조사의 protocol에 준하여 total RNA를 분리하였다.

세포침전물은 pellet pestle을 이용하여 균질화하였다. 균질화된 용액에 500 μ l의 Trizol solution을 첨가하고 가볍게 vortex 한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100 μ l의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 250 μ l의 isopropanol을 첨가하여 10분

간 실온에서 반응시켰다가 다시 4°C에서 12,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 침전물을 500 μl의 75% ethanol로 세척한 후 4°C에서 7,500 ×g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 침전물을 건조하여 50 μl의 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Calbiochem, San Diego, U.S.A.) 처리 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, U.S.A.)를 이용하여 정량하였다.

2) cDNA의 합성

cDNA의 합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies)을 이용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시 하였다. 2.5 μg의 total RNA에 1.1 μl의 10× DNase I Reaction buffer, 1 μl의 1 Unit/μl DNase I (Invitrogen Life Technologies)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11 μl가 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었는지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1 μl의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다. 10 μl의 반응액에 1 μl의 0.5 μg/μl Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies)를 첨가한 후 70°C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 μl의 5× first strand buffer, 1 μl의 10 mM each dNTPs, 2 μl의 0.1 M Dithiothreitol, 1 μl의 200 U/μl M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 μl의 40 U/μl RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies, USA), 5.5 μl DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 μl로 만들고 37°C에서 60 분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72°C에서 15분간 배양하여 enzyme을 불활성화 하였다.

3) cDNA의 real-time PCR 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 real-time PCR을 실시하였다. 1 μl의 cDNA에 12.5 μl의 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, U.K.), 각각 1.5 μl의 5 μM sense, antisense primer (Genotech co., Daejun, Korea), 8.5 μl의 증류수를 넣어 25 μl가 되게 한 후 GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, U.K.)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95°C 15초, 60°C 60초를 40 cycle 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), IFN-γ (Interferon-γ), IL-4 (Interleukin-4) 유전자의 primer sequence는 Table 2와 같다.

Table 2. Sequences of primer used for real-time RT-PCR

Gene		Oligonucleotide sequence
GAPDH	RV	5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'
	FW	5'- TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3'
IL-4	FW	5'- ACA GGA GAA GGG ACG CCA T -3'
	RV	5'- GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA -3'
IFN-γ	FW	5'- TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA -3'
	RV	5'- TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG -3'
T-bet	FW	5'- GCC AGG GAA CCG CTT ATA TG -3'
	RV	5'- GAC GAT CAT CTG GGT CAC ATT -3'
GATA-3	FW	5'- GAA GGC ATC CAG ACC CGA AAC -3'
	RV	5'- ACC CAT GGC GGT GAC CAT GC -3'

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification이 threshold에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으로 standard curve를 그려서 정량하였고, 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95°C 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하였다.

실험결과

1. 지표물질의 분석

小青龍湯 각 구성한약재의 지표물질인 α-asarone, cinnamaldehyde, 6-gingerol, glycyrrhizic acid, homogentistic acid, paeoniflorin, schizandrin 을 HPLC 분석하여 선형회귀분석을 실시한 결과, R2값이 0.9963 이상을 갖는 거의 원점을 통과하는 직선성을 나타내었다. 각 지표물질의 회귀직선 방정식과 R2 값, 그리고 standard calibration curve는 생략하였다.

한편,小青龍湯 중에 포함되어 있는 각각의 한약재 중 백작약 (paeoniflorin), 오미자 (schizandrin), 반하 (homogentistic acid), 세신 (α-asarone), 건강 (6-gingerol), 계지(cinnamaldehyde), 감초 (glycyrrhizic acid)에 대한 지표물질 분석결과는 Table 3과 같으며,小青龍湯을 구성하고 있는 각 구성한약재별 HPLC chromatogram은 생략하였다.

Table 3. The quantitative analysis of standard materials of SCRT (Sochungyong-tang) (mg/SCRT of ethanol extract 1 g)

한약재	지표물질	함량 (mg)
白芍藥	paeoniflorin	34.42±1.367 (3.44%)
五味子	schizandrin	2.39±0.010 (0.24%)
半夏	homogentistic acid	17.07±0.318 (1.71%)
細辛	α-asarone	0.18±0.029 (0.018%)
乾薑	6-gingerol	2.11±0.251 (0.21%)
桂枝	cinnamaldehyde	1.84±0.438 (0.18%)
甘草	glycyrrhizic acid	15.39±0.283 (1.54%)

2.小青龍湯 추출물이 분리된 CD4+ T cell의 생존에 미치는 영향

小青龍湯 추출물이 주변의 APC (antigen presenting cell)가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하여 위해 CD4+ T cell을 분리한 후小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 다만 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation시켰을 때에는 1 μg/ml에서 CD4+ T cell의 생존율이 증가되었다 (Fig. 1).

3.小青龍湯 추출물이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 secretion cytokine 발현량에 미치는 영향

Naive CD4+ T cell에小青龍湯 추출물 1 μg/ml을 투여하고 50 U rIL-2, 10 μg/ml anti-IL-4, 10 μg/ml anti-IL-12, 10 ng/ml rIL-12, 10 ng/ml rIL-4을 이용하여 7일 동안 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 Th1/Th2 cell 그룹에서 분비되는 secretion

cytokine 발현량을 flow cytometry로 확인한 결과, Th1 cell skewed 상황에서 IFN- γ 의 발현량을 2.1% 감소시켰으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4의 발현량을 18.8% 감소시켰다 (Fig. 2).

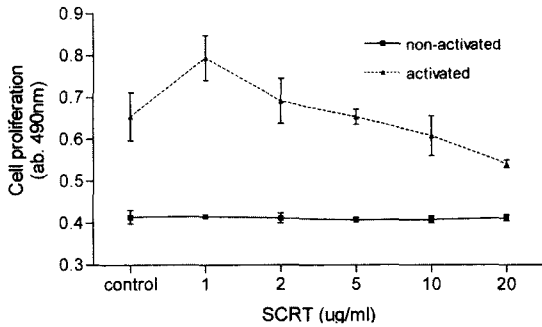


Fig. 1. Proliferation of CD4+ T cell in medium containing various concentration of SCRT extract after 48 hrs incubation. Sorted CD4+ T cell were treated with anti-CD3 ϵ /anti-CD28 antibodies to activate T cell, or not. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M.

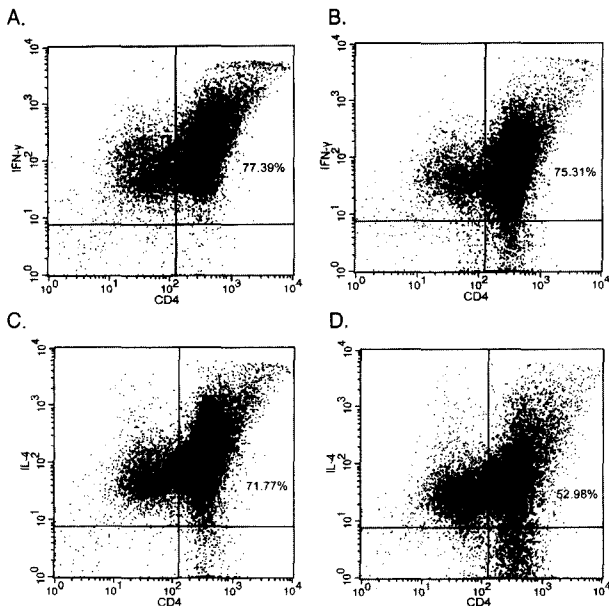


Fig. 2. Secretion cytokine expression of Th1 and Th2 cell polarized from Th0. Sorted CD4+ T cells were treated with rIL-12, rIL-4 antibodies to polarized CD4+ T cell for 7 days. Cells were stained with FITC-conjugated anti-IFN- γ , anti-IL-4 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A, C: Cells were incubated in medium without SCRT extract as control. B, D: Cells were incubated in medium containing 1 μ g/ml SCRT extract.

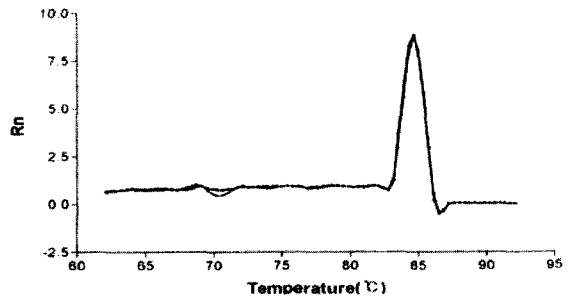
4. 小青龍湯 추출물이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 IFN- γ , IL-4, T-bet, GATA-3 mRNA 발현량에 미치는 영향

小青龍湯 추출물을 투여하여 7일 동안 배양한 Th1/Th2 cell에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR함으로써 유전자의 발현량의 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct 값을 기준으로 작성된 standard curve는 Fig. 3과 같다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R2는 0.9966로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of GAPDH



B. Standard curve of GAPDH

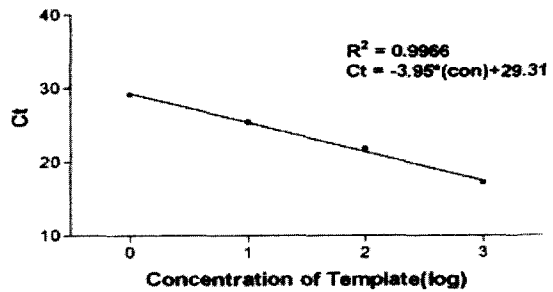
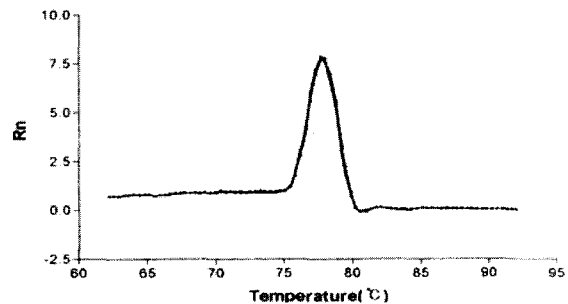


Fig. 3. Dissociation and standard curve of GAPDH as internal control. A: After PCR reaction, the signal of fluorescence at every temperature from 60 to 93°C were detected to confirm no non-specific PCR product and primer dimer. B: Serially diluted cDNA (1, 1/10, 1/100) applied to PCR. The threshold cycle numbers (Ct) of each concentration were used to make standard curve.

2) IFN- γ

IFN- γ 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 4와 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9928로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of IFN- γ



B. Standard curve of IFN- γ

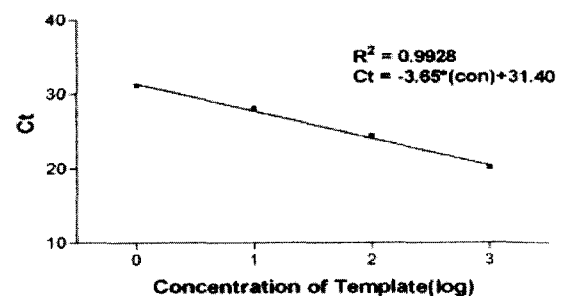


Fig. 4. Dissociation and Standard curve of IFN- γ

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IFN- γ 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 5). Th1 skewed 상황에서 小青龍湯 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여한 군이 control과 비교하여 54% 감소하였다.

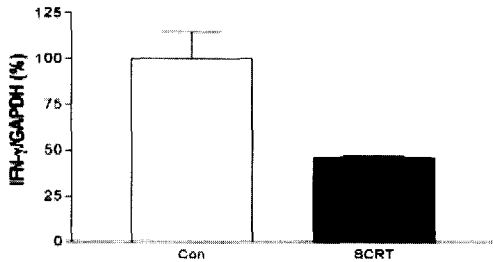
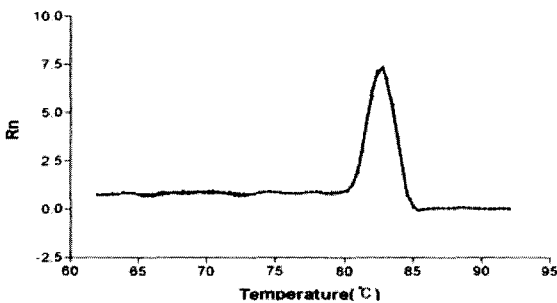


Fig. 5. Expression level of IFN- γ Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

3) IL-4

IL-4 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 6과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9992로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

A. Dissociation curve of IL-4



B. Standard curve of IL-4

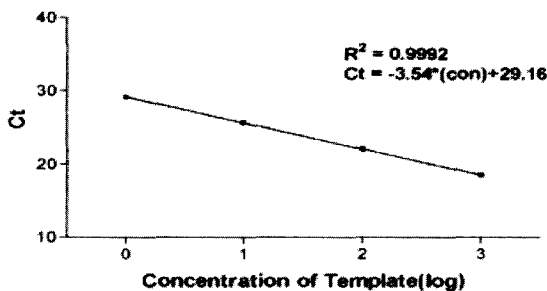


Fig. 6. Dissociation and Standard curve of IL-4

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IL-4 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 7). Th2 skewed 상황에서 小青龍湯 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여한 군이 control과 비교하여 22.8% 감소하였다.

4) T-bet

T-bet 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 8과 같다. Dissociation curve는

nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9946로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

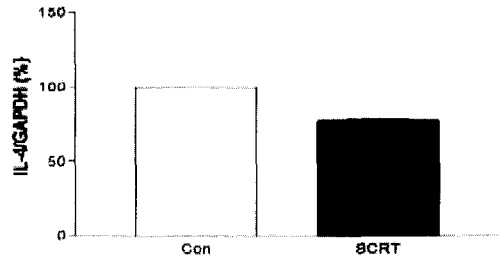
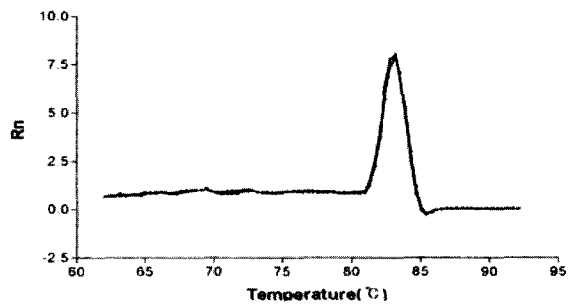


Fig. 7. Expression level of IL-4 Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

A. Dissociation curve of T-bet



B. Standard curve of T-bet

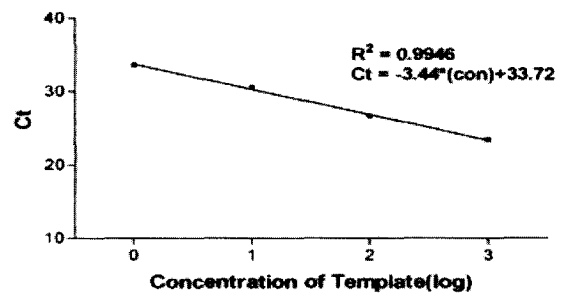


Fig. 8. Dissociation and Standard curve of T-bet

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 T-bet 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 9). Th1 skewed 상황에서는 小青龍湯 추출물을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 투여한 군이 control과 비교하여 39.5% 감소하였다.

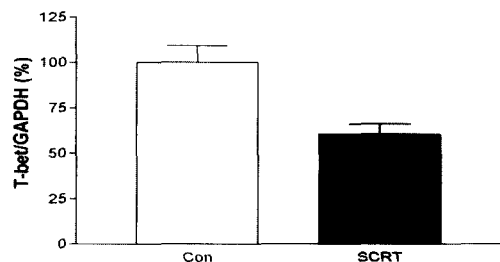


Fig. 9. Expression level of T-bet Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

5) GATA-3

GATA-3 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 Fig. 10 과 같다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9983로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

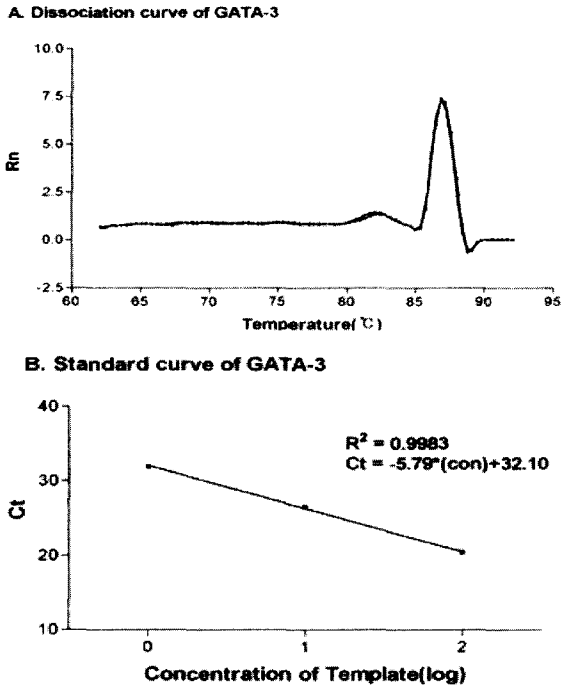


Fig. 10. Dissociation and Standard curve of GATA-3

Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 T-bet 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 11). Th2 skewed 상황에서는 小青龍湯 추출물을 1 µg/ml을 투여한 군이 control과 비교하여 6.8% 감소하였다.

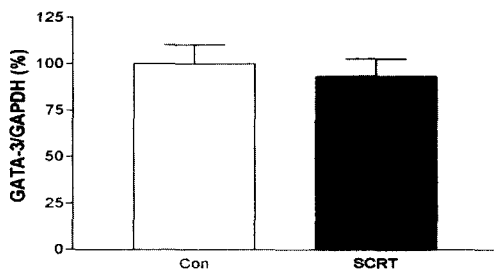


Fig. 11. Expression level of GATA-3 Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

고찰

면역이란 외부로부터의 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 만들며 이것을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상을 말하는 것⁴⁾이

며, 주된 기능으로는 방어기능, 항상성 유지기능, 감독기능 등이 있는데 첫째, 방어기능은 외부로부터의 면역자극에 대한 반응을 나타내는 기능으로, 미생물의 자극에 대한 방어기능이 비정상적으로 과도하게 나타나면 알레르기 반응을 보이고, 반대로 비정상적으로 낮게 나타나는 경우에는 건강인에게는 전혀 문제가 되지 않는 미생물에 대해서도 감염되는 소위 “기회감염”을 일으키게 된다. 둘째, 항상성 유지기능은 생체의 내부환경을 항상 평형상태로 유지 (homeostasis)시켜주는 기능으로, 어떤 면역자극에 의해 이 기능이 지나치게 커지게 되면 면역계 고유의 기능인 “자기 (self)”와 “비자기 (nonself)”를 판별할 능력을 잃게 되어 자가면역질환을 일으키게 된다. 셋째, 감독기능이란 면역자극에 대한 기능이 저하됨으로써 변이를 일으킨 세포를 제거하도록 하는 기능으로서, 감독기능이 제대로 되지 못할 경우에는 변이된 세포를 제거하지 못하는 결과를 초래하여 악성종양을 일으킬 수 있다고 알려져 있다¹⁴⁾. 또한 면역글로불린 (IgE)이 항원과 반응하여 화학전달물질이 방출되거나 T 임파구에 의한 각종 화합물에 의해 혈관의 확장, 모세혈관의 투과성 항진, 평활근의 수축과 경련, 점액의 증가 및 점막이 부종과 염증을 유발시켜 알러지성 기관지염, 기관지 천식, 알러지성 비염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염 등이 일어나는데 특히 호흡기계에 심각한 영향을 주어 기침과 담의 분비, 호흡곤란, 발열, 흉통, 흉민감, 천명 등을 일으킨다고 보고되었다⁴⁾.

한의학에서는 『素問·上古天眞論』에 “眞氣從之 精神內守 病安從來”, 『素問·刺法論』에 “五疫之至...正氣存內 邪不可干”, 『素問·評熱病論』에 “邪之所湊 其氣必虛”, 『素問·玉機眞藏論』에는 “邪氣勝者 正氣衰也 故病甚”이라 하였으며, 『靈樞·百病始生』에 “風雨寒熱 不得虛 邪不能獨傷人”, 『靈樞·口問』에는 “故邪之所在 皆爲不足”이라 하여¹⁵⁾, 疾病의 發生과 進行에 있어서 正氣 不足이 重要한 誘因임을 強調하였는데 여기서 正氣는 人體의 正常 生理活動 및 體內 抗病能力을 말하고 邪氣는 一切 疾病을 일으키는 素因의 總稱으로서 外界의 六淫之邪 및 體內 陰陽失調로 因한 病理 狀態와 痰飲, 瘀血, 食積 등과 같은 病理產物 등을 指稱한다¹⁶⁾. 이러한 疾病 發生에 있어서의 正氣와 邪氣의 概念은 西洋醫學의 免疫學理論과 類似함을 알 수 있는데, 載¹⁷⁾는 古人들이 疾病은 正邪抗爭의 過程이고, 疾病의 發生 및 轉變을 決定하는 要因으로 正氣의 強弱을 重要視 하였으며, 아울러 扶正祛邪라는 療法를 提示하여 後代에 지대한 影響을 미쳤다고 하였고, 聶¹⁸⁾은 正氣가 人體의 發病에 決定的 作用을 하는데 正氣는 先天의 支配를 받으며 後天의인 脾胃에 의해서 充滿된다고 하였으며 史^{19,20)}은 正氣 虛弱 程度를 免疫反應 低下 程度에 比較하고 非特異的 免疫을 先天之氣에 特異的 免疫을 後天之氣에 該當한다 하였다. 趙²¹⁾는 韓醫學에서는 疾病 成立 過程中에서 治病 素因인 邪氣보다는 오히려 防禦因子인 正氣의 重要性을 強調 하였으며 免疫學的인 側面에서 正氣는 非特異的 防禦反應 및 그에 關與하는 諸 防禦 物質을 總稱한다고 하였다.

이와 같은 면역관련 알러지 반응에 임상적으로 응용되고 있는 小青龍湯은 漢代 張의 『傷寒論』¹⁾에 처음 기재된 처방으로 解表散寒, 溫肺化飲, 止咳平喘하는 효과²⁾가 있어 臨床的으로는

外感風寒으로 水飲이 內停하게 되어 惡寒發熱하나 渴症이 나지 않고 無汗하며 浮腫, 身體疼痛, 胸痞, 乾嘔, 咳喘하고 脈이 浮한 증상을 치료하며 咳嗽하며 痰이 맑고 묽으며 白色으로 거품이 있으며, 舌은 淡하고 舌苔는 白色이며 滑한 증상에 惡寒發熱, 無汗, 有汗과 관계없이 加減하여 응용할 수 있어²⁾, 기관지천식 및 알러지성 비염 등의 알러지 질환에 폭넓게 응용되고 있다³⁾.

기존의 小青龍湯에 대한 연구를 살펴보면 조직해부학적 연구로는 金 등⁶⁾이 진통 항경련효과를, 安 등⁷⁾은 기관지 평활근수축반응, 진해거담작용 등을, 趙 등⁸⁾은 알러지 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향을, 李 등⁹⁾은 알레르기천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향을 보고하였고, 車 등¹⁰⁾은 小青龍湯이 asthma model내의 cytokine IL-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α 에 미치는 영향을 보고하였으며, 李 등¹¹⁾은 小青龍湯과 加味小青龍湯이 I 형 및 IV 형 allergy 반응과 폐부종에 미치는 영향을 보고하였고, 裴 등¹²⁾은 mouse의 B cell에서 IgE의 분비와 cytokine 생산에 대한 小青龍湯의 효과를 보고하였으나 이와 같은 연구에서처럼 in vitro 상 면역기능의 증강이 세포성 면역을 담당하는 T cell의 수나 활성을 증가시키는 것만을 의미하는 것으로 보기는 어려운 것이 사실이며, 면역반응에서 정상면역반응과 이상항진을 의미하는 알러지 반응을 구분하는데 핵심적인 역할을 하는 helper T cell의 분화양상에 대해 연구하여야 한다고 생각하였다.

이에 본 연구에서는 면역반응에서 서 등¹³⁾에 의한 小青龍湯이 helper T cell의 분화에 미치는 영향에 관한 연구결과를 토대로, 小青龍湯이 분화된 helper T cell, 즉 Th1/Th2 cell이 각각 분비하는 IFN- γ /IL-4의 분비량을 측정하고 다시 각각의 전사인자인 T-bet/GATA-3 mRNA의 발현량을 RT-PCR로 관찰함으로써 小青龍湯의 알러지 반응에 대한 영향 기전을 유추해 보고자 하였다. 본 연구를 수행하기 전, 小青龍湯이 주변의 APC가 없이도 직접적으로 CD4⁺ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하기 위해 CD4⁺ T cell을 분리한 후 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4⁺ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 小青龍湯 추출물이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하지는 않는다는 것을 의미하는 것으로 이후 실험결과에 의의를 갖게 하는 것이다. 한편 T cell specific mitogen인 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation시켰을 때에는 1 μ g/ml에서 CD4⁺ T cell의 생존율이 증가되었으나 통계적 유의성은 없었다. 이에 Th1 cell과 Th2 cell로 분화시킨 후 Th1/Th2 cell 그룹에서 분비되는 secretion cytokine 발현량을 확인한 결과, Th1 cell skewed 상황에서 IFN- γ 의 발현량을 2.1% 감소시켰으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4의 발현량을 18.8% 감소시켰다. 이는 자가면역질환 및 정상 면역반응에서 활성화되는 Th1 cell의 활성에 거의 영향을 끼치지 않으면서 알러지 반응시 증가되는 Th2 cell의 활성을 선택적으로 억제하는 결과로 생각할 수 있을 것이다. 또한 real-time RT-PCR을 통해 Th1/Th2 cell의 cytokine mRNA 발현량을 측정한 결과, Th1 skewed 상황에서 IFN- γ 유전자 발현량이 54% 감소하였고, Th2 skewed 상황에서 IL-4 유전자 발현량

또한 22.8% 감소하였으며, Th1 cell의 subset specific transcription factor인 T-bet 유전자는 Th1 skewed 상황에서 39.5% 감소, Th2 cell의 subset specific transcription factor인 GATA-3의 경우도 Th2 skewed 상황에서 6.8% 감소하였다. 이와 같은 실험결과는 小青龍湯이 Th1/Th2 cell 모두에서 cytokine 분비를 억제한다고 이해할 수 있으며, 이는 이미 보고된 것처럼 naive CD4⁺ T cell의 분화과정에 小青龍湯이 Th1 cell을 선택적으로 활성화시키고, Th2 cell을 선택적으로 억제함과 동시에 분화된 Th1/Th2 cell에서는 cytokine 분비를 함께 억제하는 역할을 하며, 그 결과 小青龍湯이 Th2 cell의 분화발달을 억제함으로써 알러지 반응을 감약시키는 효능이 있다고 사료된다.

결론

小青龍湯이 면역기능의 주된 역할을 하는 분화된 helper T cell에 미치는 영향을 알아보고자 CD4⁺ T cell의 생존률과 cytokine 분비량, mRNA 발현량을 real-time RT-PCR을 통하여 실험한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

CD4⁺ T cell을 분리한 후 小青龍湯 추출물을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4⁺ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었으며 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation 시켰을 때에는 1 μ g/ml에서 CD4⁺ T cell의 생존율이 증가되었으나 통계적 유의성은 없었다. 小青龍湯은 Th1 cell skewed 상황에서 IFN- γ 의 분비량을 2.1% 감소시켰으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4의 분비량을 18.8% 감소시켰다. 小青龍湯은 Th1 skewed 상황에서 IFN- γ 유전자 발현량을 54% 감소시켰고, Th2 skewed 상황에서 IL-4 유전자 발현량 또한 22.8% 감소시켰으며, T-bet 유전자는 Th1 skewed 상황에서 39.5% 감소, GATA-3의 경우도 Th2 skewed 상황에서 6.8% 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때, 小青龍湯 추출물은 Th2 cell response를 억제함으로써 면역기능 이상항진으로 나타나는 allergy성 질환에 대한 억제효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술 연구개발사업의 지원에 의한 것임. (00-PJ9-PG1-CO02-0003)

참고문헌

1. 張仲景, 仲景全書, pp.142-144, 대성문화사, 서울, 1989.
2. 吳謙等 編, 醫宗金鑑, p.230, 木과土, 서울, 2000.
3. 文睿典 외, 傷寒論精解, pp.125-127, 경희대학교출판국, 서울, 1996.
4. 菊地浩吉 외, 最新免疫學, pp.33-35, 26-29, 196-200, 367-388, 204-205, 211-212, 316-337, 集文堂, 서울, 1989.
5. 정규만, 알레르기와 한방, pp.15-26, 60-61, 圖書出版第一路, 서울, 1990.

6. 김기창, 이형구, 小青龍湯의 진통, 항경련 및 흰쥐의 폐손상에 미치는 영향, 경희한의대논문집 8(1):129-138, 1985.
7. 안철 채병운, 小青龍湯의 효능에 관한 실험적 연구, 경희한의대논문집 10:643-664, 1987.
8. 조영민 외, 小青龍湯이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향, 경희의학 15(1):78-89, 1999.
9. 이준우 외, 小青龍湯이 알레르기천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향, 경희대학교 석사학위논문, 2001.
10. 차은수, 정희재, 정승기, 이형구, 小青龍湯이 Asthma model내의 cytokine 에 미치는 영향, 경희한의대논문집 23(1):71-88, 2000.
11. 이해향 외, 小青龍湯과 加味小青龍湯이 I 형 및 IV 형 allergy 반응과 폐부종에 미치는 영향, 대전대 석사학위논문, 1996.
12. 배한호, 생쥐의 B 세포에서 IgE의 분비와 cytokine 생산에 대한 小青龍湯의 효과, 대전대 석사학위논문, 2003.
13. 서영호, 배현수, 신민규, 홍무창, 小青龍湯이 Helper T cell의 활성화에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 16(4):693-700, 2002.
14. Roitt, L., Brostoff, J. and Male, D., Immunology 4th Ed, pp.1.1-2.18, Mosby Publishing, U.K., 1998.
15. 洪元植 編, 精校黃帝內經, p.37, 38, 55, 57, 78, 82, 118, 119, 122, 181, 213, 249, 256, 304, 305, 319, 326, pp.347-378, 東洋醫學研究院出版部, 서울, 1981.
16. 劉正才, 中醫免疫, p.9, 北京出版社, 北京, 1983.
17. 載新民, 中醫免疫學, pp.1-51, 啓業書局有限公司, 臺北, 1985.
18. 聶惠民 외, 正常 생쥐 및 cyclophosphamide에 의해 免疫이 抑制된 생쥐에 對한 健脾金丹의 免疫機能 增強作用, 中西醫結合雜誌 4:42, 1993.
19. 史松任 외, 中醫學與免疫學研究, 中西醫結合雜誌 4(6):381-384, 1984.
20. 孫燕, 扶正中藥의 免疫調節作用, 中西醫結合雜誌 4(6):368-370, 1984.
21. 趙鍾寬, 免疫에 關한 東洋醫學의 考察, 東洋醫學 12(1):19-23, 1986.
22. 이상인, 김동걸, 이영중, 노승현, 주영승, 방제화, pp.50-52, 영림사, 서울, 1990.