

人蔘추출물이 Ovalbumin으로 유도된 喘息의 Cytokine에 미치는 영향

한상엽 · 변성희 · 권영규 · 신상우 · 서성일¹ · 권택규¹ · 김상찬*

대구한의대학교 한의학과, 1: 계명대학교 의과대학

Effects of *Ginseng Radix* Extract on the Cytokine of Experimental Asthma induced by Ovalbumin

Sang Yeob Han, Sung Hui Byun, Young Kyu Kwon, Sang Woo Shin, Seong Il Suh¹, Taeg Kyu Kwon¹, Sang Chan Kim*

College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, 1: College of Medicine, Keimyung University

This study was performed to investigate the effect of oral administration of GSRE against the asthma. Asthma was induced to Balb/c mouse by i.p. injection and aerosol immunization with ovalbumin. It was observed the change of the eosinophil number in the BALF. Concentrations of IL-4, IL-5 in BALF and splenocyte were assessed by ELISA, IgG and IgE from serum were calculated by same method. Concentration of IL-4 in splenocyte was significantly decreased in GSRE group compared with control group. Concentrations of IL-5 from BALF and splenocyte were significantly decreased in GSRE group compared with control group, respectively. Level of IgE in serum was significantly decreased in GSRE group compared with control group, but not IgG. We found that the effect of GSRE extract in asthma was implicated in reductions of IL-4, IL-5 released from Th2 cell, and decreases of IgE, from plasma cell. These findings suggest that GSRE extract can produce anti-asthmatic effect, which may play a role in allergen-induced asthma therapy.

Key words : *Ginseng Radix*, Asthma, IL-4, IL-5, IgG, IgE

서 론

천식은 기도가 광범위하게 수축되어 좁아지고 기도의 수축이 수분내지 며칠 동안 지속되는 기관지폐쇄, 기관지염증을 일으키는 질환이다. 천식은 병리학적으로 기도의 eosinophilic inflammation, bronchospasm과 비특이적 항원흡입에 대한 hyperreactivity로 특징지어질 수 있다¹⁾. 임상적으로는 기침, 천명, 호흡곤란등의 증후를 보이면서, 호산구(Eosinophil)를 위시한 다양한 염증세포들이 기도내로의 침윤을 나타낸다²⁾. 또한, 천식은 알러지성 질환으로 Th1과 Th2 cell간의 imbalance로 인하여 유발되며, 특히 Th2-type의 면역반응이 현저하여 발생된다³⁾. Interleukine(IL)-4, IL-5, IL-10등의 Th2-type cytokine들은

eosinophil과 mast cell, B cell등을 활성화시켜 천식의 진행에 연관된다⁴⁾. 역학적 연구에 의하면 미국에서 천식은 인구의 5-10%에서 발생하며, 천식의 발병률 및 사망율은 세계적으로 증가추세에 있음이 보고되고 있다⁵⁾. 喘息은 발작성의 호흡곤란, 천명, 기침, 나음(rales)을 특징으로 하는 증후군으로⁶⁾, 원인의 대부분을 차지하는 알레르기 외에도 상기도 감염, 정서적 스트레스, 기후 변화, 약물, 운동 등이 천식을 유발할 수 있다⁶⁾.

천식은 한의학적으로 哮喘證에 해당되는데⁷⁾ 喉中有聲響한 것을 哮라하고 呼吸急促한 것을 喘이라하여 구분하기도 하나, 청대 이후로는 哮喘에는 喘促症이 겸하여 나타난다고 하여 哮喘證을 하나의 증후로 보고 있다⁸⁾.

현재까지 천식에 대한 한의학적 연구로 이⁹⁾가 五拗湯의 진해, 항Histamin 및 기관지평활근 이완효과를, 정^{10,11)}은 加味清上補下湯과 定喘湯을 이용하여 폐기관지와 면역기능의 변화를, 박¹²⁾은 千縉導痰湯의 항알레르기 반응과 면역기능에 대한 연구를

* 교신저자 : 김상찬, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2005/01/24 · 수정 : 2005/02/25 · 채택 : 2005/03/25

보고하였다. 인삼에 대한 연구는 이 등¹³⁾이 SK-N-MC 신경아세포주에서 에탄올에 의해서 유발된 Apoptosis는 인삼전탕액에 의하여 억제됨을 밝혔고, 서 등¹⁴⁾은 인삼이 Cyclosporin A로 유발된 백서의 신독성 및 간독성을 회복시키는 효과, 윤 등¹⁵⁾은 인삼이 양막의 염증성 반응을 억제할 수 있음을 보고하였다.

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

실험방법

1. 실험동물의 사육

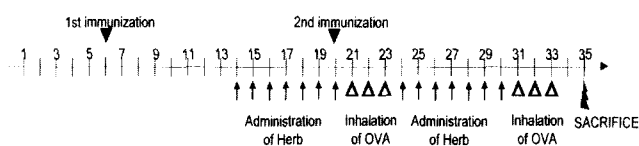
실험동물은 female BALB/c mouse(오리엔트, 대구)를 사용하였는데, 천식을 유도하지 않고 PBS를 투여한 Normal군, 천식을 유도하고 PBS만을 투여한 Control군, 천식을 유도하고 인삼을 투여한 GSRE군으로 나누어 각 군당 5마리씩 총15마리를 사용하였다. 실험동물은 5마리씩 분리하여 polycarbonate cage에 수용하고, 온도 20-25℃ 및 습도 30-35%로 조절된 환온환습 및 공기정정 시스템(동물사육시스템, 한국)에서 사육하였으며, 명암 주기는 12/12시간으로 조절하였다. 사료(한란, 한국) 및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

2. 한약액의 제조 및 투여

인삼 300g을 정제수 2000ml로 3시간 가열 추출한 후, 추출물을 여과지로 1차 여과한 다음, 여과액을 rotary evaporator로 감압농축하여 점조성 추출물을 얻었다. 이 점조성 추출물을 다시 동결건조하여 39.0g(수율 13.0%)의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 검액의 투여는 8mg/20g를 1회/1일 투여량으로 하여, 철제 경구주입기(명진사, 서울)를 사용하여 경구투여하였다.

3. 면역반응의 유도

면역반응을 유도하기 위하여 10mg/ml(PBS)의 ovalbumin(Sigma, USA) 5 μ l와 Alum(Imject® Alum, Pierce, USA)50 μ l, PBS 50 μ l를 복각주사로 immunize하였다. 1차 면역 유도 후, 면역 boosting을 위하여 14일 후 동일한 방법으로 2차 면역을 유도하였다.



Scheme 1. Experimental Design.

4. Inhalation

1.0% ovalbumin in PBS를 Nebulizer(Omron, Japan)로 분무

하여 30분간 흡입시킨 후, 기도알러지를 유도하였다.

5. 혈액의 채취

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

6. 실험동물의 희생 및 BALF채취

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

7. Spleen의 적출 및 splenocyte채취

BALF를 채취한 뒤, mouse의 횡경막을 절개하여 spleen을 적출한 다음, 5ml의 RPMI 1640에 spleen을 넣은 다음, 이물질 제거하고 cell strainer(10 μ m, Falcon, USA)를 사용하여 곱게 mash하였다. 이를 4,000rpm으로 3분간 원심분리한 후, 상등액을 제거한 pellet에 RBC lysis buffer 2ml를 넣고 2분간 방치 후, 8ml의 RPMI 1640을 넣은 후 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액은 제거하였다. 각 pellet에 10ml의 RPMI 1640을 넣은 후, cell counting하여 최종 5 \times 10⁵개로 24 well plate에 분주하여 배양하였다.

8. Eosinophil측정

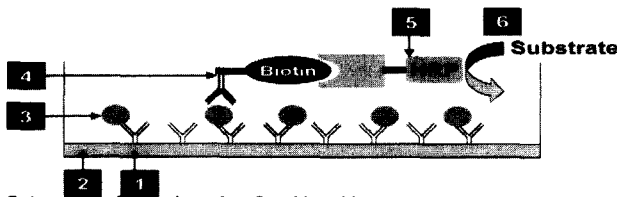
BALF를 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액은 버리고 pellet에 RBC lysis buffer를 200 μ l넣고 vortex 후 얼음에 2분간 방치하였다. 여기에 800 μ l의 RPMI 1640을 넣은 후, 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여, 상등액은 버리고, pellet에는 1ml의 PRMI 1640을 넣어 잘 흔들어 준 후 20 μ l를 취하고, 여기에 다시 trypan blue(Sigma, USA) 60 μ l를 더하여 cell counting하였다. 최종적으로 각 실험 개체당 4 \times 10⁴개의 cell을 취하여 cytocentrifuge(Wesor, USA)에 옮겨, 550rpm으로 5분간 원심분리한 다음, Diff-Quick staining(Sysmax, Japan)으로 염색하고 fixer(Biomedica, Canada)를 10 μ l떨어 뜨린 후 eosinophil의 수를 측정하였다.

9. Antibody측정

1) Microtiter plate (96-well)에 ovalbumin(Sigma, USA) 5 μ l/ml PBSN(PBS+sodium azide 0.02%)을 well당 100 μ l씩 넣고 4℃에서 overnight하여 coating하고, PBSN 으로, 3차례 세척하였다.

- 2) 96-well plate에 1% BSA in PBSN을 150 μ l/well을 넣은 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후, PBSN으로 3차례 세척하였다.
- 3) 실험방법 6에서 준비한 혈액의 상등액 sample을 dilution buffer (0.1% BSA in PBSN)로 희석한 후 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 이상 반응시킨 후, PBSN으로 3차례 세척하였다.
- 4) IgG, IgE의 antibody를 dilution buffer로 희석하여 well당 100 μ l를 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양한 후, PBSN으로 3차례 세척하였다.
- 5) 기질인 pNPP(p-nitrophenyl-phosphate)를 carbonate buffer (pH 9.6)에 1mg/ml로 녹여 각 well당 100 μ l/well 가한 후, 15분 (IgG), 12시간(IgE) 배양하고, spectrophotometer (Tecan, Austria)로 OD(Optical Density)값을 측정하였다. (405nm-492nm)

10. Cytokine 측정



Scheme 2. Procedure for Cytokine Measurement.

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

실험성적

1. BALF에서의 eosinophil의 수적 변화에 미치는 영향
BALF에서 eosinophil의 수는 normal군에서는 13 \pm 9.54개,

control군에서는 166.67 \pm 32.72개, GSRE군에서는 148 \pm 28.62개로 나타났다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성 있게 증가하였다. 그리고, GSRE군은 control군에 비교하여 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의성있는 변화를 나타내지는 못 하였다 (Fig. 1).

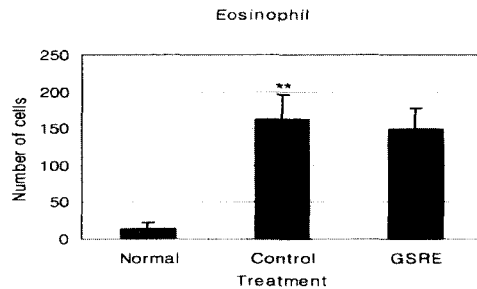


Fig. 1. Eosinophil counts in BALF of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n = 5 for each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

2. BALF에서의 Interleukin-4의 변화에 미치는 영향

BALF에서의 IL-4의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 \pm 0.0152, control군에서는 1.089 \pm 0.0198, GSRE군에서는 1.0808 \pm 0.0381이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-4의 수준을 증가시켰으나, GSRE군은 control에 비교하여 유의성있는 변화를 나타내지 않았다(Fig. 2).

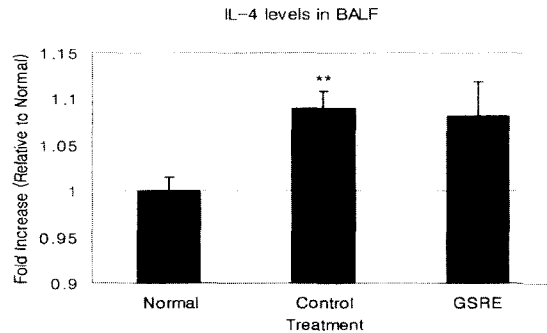


Fig. 2. Interleukin-4 concentration in BALF of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n =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

3. 비장세포의 Interleukin-4에 미치는 영향

Splenocyte를 배양한 배지에서의 IL-4의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 \pm 0.002, control군에서는 1.012 \pm 0.004, GSRE군에서는 1.0032 \pm 0.002였다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-4의 수준을 증가시켰으며, GSRE군은 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 3).

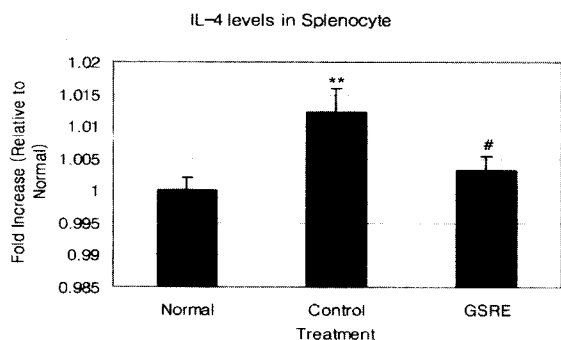


Fig. 3. Interleukin-4 concentration in culture supernatant of splenocyte each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n = 5 for each group). **: P < 0.01 compared with normal, #: P < 0.05 compared with control.

4. 항원자극을 동반한 비장세포의 Interleukin-4에 미치는 영향

OVA를 처치한 splenocyte의 배양액중 IL-4의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.041 , control군에서는 1.026 ± 0.0536 , GSRE군에서는 1.0618 ± 0.030 로 모두 유의한 결과를 나타내지 않았다(Fig. 4).

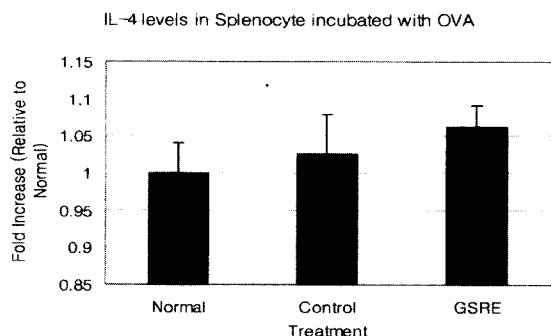


Fig. 4. Interleukin-4 concentration in culture supernatant of splenocyte with OVA each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD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

5. BALF에서의 Interleukin-5의 변화에 미치는 영향

BALF에서의 IL-5의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.022 , control군에서는 1.135 ± 0.058 , GSRE군에서는 1.023 ± 0.0227 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-5의 수준을 증가시켰으며, GSRE군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 5).

6. 비장세포의 Interleukin-5에 미치는 영향

Splenocyte를 배양한 배지에서의 IL-5의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.0162 , control군에서는 1.048 ± 0.024 , GSRE군에서는 1.001 ± 0.015 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-5의 수준을

증가시켰으며, GSRE군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 6).

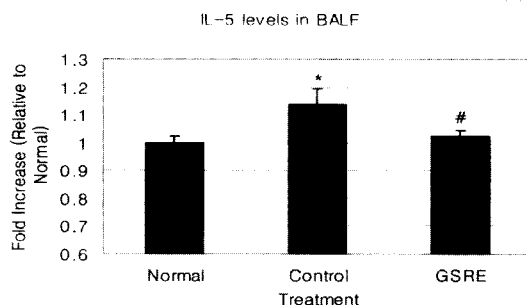


Fig. 5. Interleukin-5 concentration in BALF of each studied groups.

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

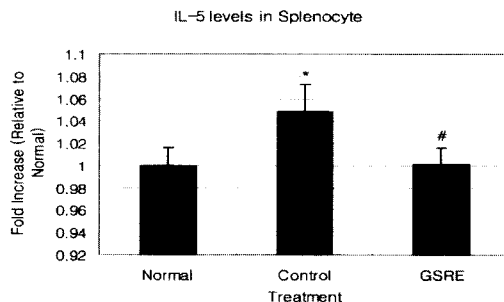


Fig. 6. Interleukin-5 concentration in culture supernatant of splenocyte each studied groups.

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

7. 항원자극을 동반한 비장세포의 Interleukin-5에 미치는 영향

OVA를 처치한 splenocyte의 배양액중 IL-5의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.004 , control군에서는 1.000 ± 0.004 , GSRE군에서는 0.997 ± 0.022 로 모두 유의한 결과를 나타내지 않았다(Fig. 7).

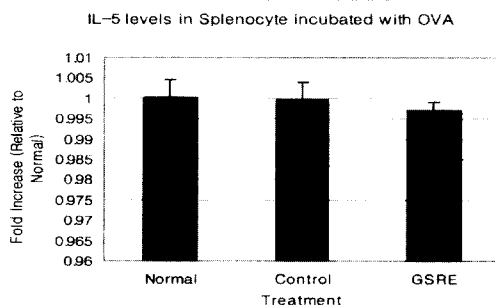


Fig. 7. Interleukin-5 concentration in culture supernatant of splenocyte with OVA each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1%

ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n = 5 for each group).

8. 혈청 Immunoglobulin G의 변화에 미치는 영향

혈청 중 IgG의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.002 , control군에서는 1.266 ± 0.032 , GSRE군에서는 1.235 ± 0.036 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IgG의 수준을 증가시켰으며, GSRE군은 control에 비교하여 유의성있게 변화를 나타내지 못 하였다 (Fig. 8).

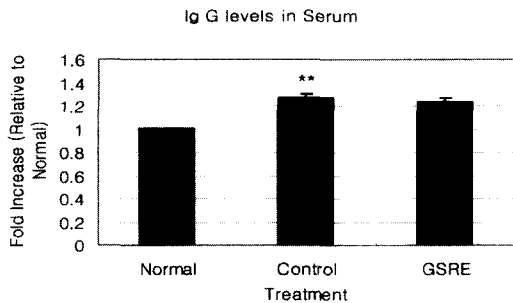


Fig. 8. Immunoglobulin G concentration in serum of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n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

9. 혈청 Immunoglobulin E의 변화에 미치는 영향

혈청 중 IgE의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.207 , control군에서는 7.114 ± 0.888 , GSRE군에서는 4.336 ± 0.525 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IgE의 수준을 증가시켰으며, GSRE군은 control에 비교하여 IgE의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 9).

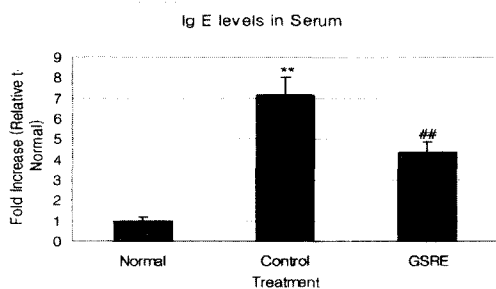


Fig. 9. Immunoglobulin E concentration in serum of each studied groups. Mouse was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n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

고찰

氣管支 喘息은 기관지의 반응성 증가를 특징으로 하며 여러 가지 자극에 의해 기도의 점막에 염증반응을 일으키고 기관지

평활근을 수축시켜 기도폐색을 일으키게 되는데, 이러한 기도의 폐색은 자연적으로 또는 치료의 결과에 따라 회복되는 가역적인 특성을 갖고 있다¹⁶⁾.

喘息을 일으키는 원인으로는 알러젠의 흡입, 호흡기감염, 일상의 스트레스에 대한 심인성 생리반응, 공기오염, 기후, 약물, 운동 등이 있으며, 이 중 喘息發作의 원인이 대부분 알러르기 (allergy)성으로 받아들여지고 있다, 특징적인 증상으로는 발작성의 호기성호흡곤란, 천명, 과호흡, 기침, 나음(rales)을 들 수 있다⁶⁾. 韓醫學에서 喘息은 哮喘證에 相當하는 것으로 인식되고 있으며¹⁷⁾, 實證은 주로 風寒, 痰濁 등의 病邪로 因하며 治療는 祛邪에 중점을 두고, 虛證은 주로 肺虛, 腎虧등으로 因하므로 治療는 扶正에 중점을 두고 있다¹⁸⁾.

본 연구에서는 허증성 병변에 적용될 수 있는 인삼이 천식에 미치는 효과를 알아보고자, Balb/c mouse에 ovalbumin으로 알러르기성 천식을 유발한 후 BALF에 존재하는 eosinophil, IL-4, IL-5, 혈청중 IgG, IgE, splenocyte의 IL-4, IL-5의 량을 관찰 하였다.

인삼에 대한 연구는 이 등¹³⁾이 SK-N-MC 신경아세포주에서 에탄올에 의해서 유발된 Apoptosis는 인삼전탕액에 의하여 억제됨을 밝혔고, 서 등¹⁴⁾은 인삼이 Cyclosporin A로 유발된 백서의 신독성 및 간독성을 회복시키는 효과, 윤 등¹⁵⁾은 인삼이 양막의 염증성 반응을 억제할 수 있음을 보고하였다.

많은 염증질환은 호산구증다증(eosinophilia)와 관련성이 많다. 예를 들면, 천식(asthma), 알러지성비염(allergic rhinitis), 아토피성 피부질환(atopic skin disease) idiopathic hypereosinophilic syndrome(HES) 그리고, 염증성장질환(inflammatory bowel disease) 등이다¹⁹⁾. 호산구는 천식 기도내에서 흔히 관찰되며, 호산구성 기도 염증은 천식의 가장 특징적인 소견중의 하나이다. Green 등^{30,31)}은 최근의 연구에서 객담 호산구증을 줄이는 치료 전략이 표준임상 가이드라인에 의한 치료 전략보다 천식발작을 줄이는데 훨씬 효과적이라 주장하였으며, 김 등²²⁾은 객담 호산구증은 전형적인 천식의 예측지표가 될 수 있음을 시사한 바 있다. 따라서 호산구의 기도내 유입기전에 대한 연구는 천식의 병리상태를 밝히고 그에 대한 치료를 고안하는데 중요하다고 할 수 있다.

호산구(eosinophil)는 1846년 Wharton Jones에 의해 발견되었고, 이후 Paul Ehrlich에 의해 산성염료인 eosin에 의해 염색된다고 하여 호산구라고 명명하였다. 호산구는 골수에서 IL-3, GM-CSF, IL-5에 의해 CD34(+)세포로부터 분화되어 성숙되는데 3-5일 정도가 걸리고 말초혈액으로 유입된후 반감기가 13-18 시간인 것으로 알려져 있다²³⁾.

호산구를 비롯한 염증성 세포들과 호산구의 활성화시 분비되는 물질인 양이온단백(cationic protein)들이 기도 상피세포 손상에 관여한다²⁴⁾. 호산구의 세포질내에는 대형과립과 소형과립이 있으며, 1975년 특발성 호산구과다증 환자의 호산구연구에서 소형과립 내에 다량의 효소가 함유되어 있다는 것이 밝혀지면서 과립에 관한 연구가 잇달아 진행되어 과립의 구성성분이 밝혀지게 되었다. 대형과립은 형태학적으로는 중심부에 진하게 염

색되는 *internum*과 주변부는 연하게 염색되는 *matrix*로 둘러싸인 형태로 존재하는데, 이는 호산구만의 특징적 과립이며, 세포 독성단백인 *major basic protein*(MBP)이 함유되어 있고, 소형과립에는 *eosinophil cationic protein* (ECP), *eosinophil protein X*(EPX), *eosinophil peroxidase*(EPO), *eosinophil-derived neurotoxin*(EDN)등의 세포단백과 이외에 *phosphatase*, *protease*, *collagenase*, *elastase*, *arylsulfatase B*, *histamine*, *phospholipase B D*, *catalase*, *non specific esterase*등의 다양한 효소가 있다²⁵⁾. 이들 중 천식반응시 주로 관여하는 세포단백인 MBP는 기도점막의 섬모운동을 억제하며, 폐포세포에 독성을 나타내고, 호염기구(*basophil*)로부터 *histamine*을 유리시킨다. 이외에도 *Guinea pig*에서는 기관지 평활근의 이완을 억제시키며, 제2형 폐포세포에 독성을 나타낸다. ECP는 기도점막의 섬모운동을 방해하고, MBP와는 달리 쥐의 비만세포(*mast cell*)로부터 히스타민을 유리시킨다. EPO는 제2형 폐포세포에 직접적 독성을 나타내기는 하나, MBP나 ECP처럼 상피세포에 미치는 영향은 규명되지 않고 있으며, EDN의 천식에서의 역할은 알려진 바가 없다²³⁾.

이는 급성천식환아의 조직검사서서 기도주위에 호산구의 침윤을 특징적으로 관찰할 수 있고 이 과정에서 호산구의 양이온 단백질이 관여하게 되며 호산구의 과립에 있는 4개의 주된 양이온 단백질들은 염기성이 강한 세포독성 단백질로서 *major basic protein*(MBP), *eosinophil cationic protein* (ECP), *eosinophil peroxidase*(EPO), *eosinophil-derived neurotoxin*(EDN) 혹은 *eosinophil protein X*(EPX)등이 있다. 천식환아에서 실험적으로 특이항원 흡입후 천식반응의 초기에 ECP의 증가와 후기 천식반응에 의한 호산구, 림프구 및 단핵구 등 염증세포들의 관련성이 밝혀졌으며, 이들 중 중요한 호산구의 활성도는 기관지 조직내 객담 혹은 혈청 ECP로 측정될 수 있다²⁶⁾.

종합해 보면 호산구는 천식의 후기반응시 기도 내로 유입되어 세포막으로부터 PAF, PGF_{2a}, LTC₄, LTD₄ 등을 생성하여 이들에 의해 강력하게 기관지를 수축시키고, 혈관투과성을 증가시켜 피하조직부종등을 유발시켜 이에 의해 이차적인 기도수축을 유발시키며, 또한 이들의 화학주성능에 의해 호산구 자신과 다른 염증반응세포를 유입시켜 천식반응을 지속시키면서, MBP, ECP 등의 세포독성단백을 분비시켜 기도점막을 손상시키고 점막박탈등을 초래함으로써 기도과민성을 증가시킨다^{23,27)}.

본 실험에서의 BALF에서 *eosinophil*의 수는, control군에서 normal군에 비교하여 유의성 있게 증가하였다. 그러나, GSRE군은 control군에 비교하여 유의성있는 변화를 나타내지는 못 하였다.

한편, 천식에서 기도내의 *dendritic cell*(수지상세포)은 naive T cell을 Th2 cell로 generation에 하는데 중추적인 역할을 한다²⁸⁾. *Dendritic cell*은 가장 강력한 항원제시세포(*antigen presenting cell*)로서 1차적인 세포성 면역반응을 유발할 수 있는 유일한 세포이며 골수에서 기원해서 미성숙한 형태로 혈류를 거쳐 체내 모든 기관에 이동해 간다²⁹⁾. 수지상세포는 각 조직에서 주변의 항원(*antigen*)을 채집해서 림프기관으로 가서 T 림프구에 항원을 제시하는 역할을 한다^{28,30,31)}. 분화된 Th2 cell은 항원제시

세포와 만나 알러젠의 *peptide*를 공여받게 되면 IL-4, IL-5, IL-13 등의 *cytokine*을 분비하여 알러르기 염증을 발생시키는데 있어 중심적인 역할을 담당한다³²⁾.

IL-5의 분비는 *allergic asthma*를 유발하는 *allergen*이 폐로 흡입되면, *mast cell*과 Th2 cell이 기관지에서 활성화되게 되고, 항원에 의하여 활성화된 Th2 cell은 IL-4, IL-5 그리고 IL-13을 분비하게 되고, *mast cell*은 TNF- α 를 분비한다. IL-4와, IL-13, TNF- α 는 기도에 있는 *epithelial cell*, *smooth muscle cell*, *fibroblast*를 자극하여 *eotaxin*의 분비를 상승적으로 촉진시킨다. *eotaxin*과 IL-5는 폐조직에서 혈관으로 흡수되어 체내를 순환하면서, 골수에서 *eosinophil*의 성장 및 분화를 활성화하여, 다시 병소인 폐, 기관지에 *eosinophil*을 증가시켜 기도의 염증 및 천식을 유발한다^{19,33-35)}.

최근의 연구에 의하면, 이러한 IL-5를 억제시켜 천식 및 다른 *hypereosinophilic disorders*를 치료할 수 있는 가능성을 시사하고 있다^{27,36-39)}. 실제로 Garrete등⁴⁰⁾은 *anti-interleukin-5*인 *mepolizumab*을 인체에 투여하면 *eosinophil*의 활성화를 유의하게 줄일 수 있음을 보고하였다.

또 IL-4는 IgE항체의 생성 및 미감작 CD4⁺ Th cell을 Th2 cell로 발생시키는 주요자극제이다⁴¹⁾. T 림프구에서 유래된 다른 종류의 *cytokine*들은 각각 특정 Ig동형으로의 전환을 유도한다. 이 중 IL-4는 시험된 종(*species*)에서는 모두 IgE에 대한 중요한 전환인자이다. 즉 IL-4는 B cell을 *plasma cell*로의 발달을 이끌어 IgE, IgG등의 생성을 유발시킨다³⁴⁾. 이렇게 생성된 IgE는 *mast cell*에 작용하여 *granule*방출을 유도함으로써 과민반응을 일으킨다⁴¹⁻⁴³⁾.

본 실험에서는 BALF와 *splenocyte*에서 IL-4, IL-5의 량을 측정하여 normal군에 대한 비율로 나타내었다. BALF와 *splenocyte*에서의 IL-4의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성 있게 IL-4의 수준을 증가시켰으나, BALF에서 GSRE군은 유의성을 나타내지 못하였지만, *splenocyte*에서는 유의성을 나타내었다. 실험동물의 *spleen*에서 얻은 *splenocyte*를 배양한 배지에서의 IL-4의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성 있게 IL-4의 수준을 증가시켰으며, GSRE군은 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성 있게 감소시켰다. 그러나, *splenocyte*에 OVA를 처치한 실험군의 배양에서는 유의한 변화를 나타내지 못하였다. IL-5는 BALF에서 control군이 normal군에 비교하여 유의성 있게 IL-5의 수준을 증가시켰으며, GSRE군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성 있게 감소시켰다.

또한, *splenocyte*를 배양한 배지에서의 IL-5의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성 있게 IL-5의 수준을 증가시켰으며, GSRE군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 유의성 있게 감소시켰다. 그러나, OVA를 처치한 *splenocyte*의 배양액중 IL-5의 함량은 IL-4와 마찬가지로 유의한 결과를 나타내지 않았다. IgE는 *plasma cell*에서 분비되는 것으로, IgE는 조직내에서 Fc ϵ R I이라 불리는 고친화성 표면수용체를 매개로 *mast cell*에 강하게 결합한다. 항원이 IgE에 결합하면 이들 수용체들이 교차결합(*cross-links*)하게 되고, 이는 *mast cell*의 *granule*로부터 화학적

매개 물질들의 분비를 유발하게 되어 제1형 과민반응(type 1 hypersensitivity reaction)의 발생에 이르게 된다. 또 basophils (호염구) 및 activated eosinophil(활성화된 호산구)에도 FcεR I가 발현되는데, IgE는 여기에도 결합하여 제1형 과민반응을 일으키는데 관여할 수 있다. 화학적 매개물질들은 주로, histamine과 chymase, tryptase, serine esterase 등의 효소로 이러한 물질들은 조직의 기질단백질을 파괴하고, 조직의 파괴를 유도한다⁴⁴⁾. 또한 IgE는 hay fever, asthma, hives, anaphylatic shock 등의 증후와 관계되는 즉각적인 과민반응을 매개한다고 알려져 있다^{45,46)}.

본 실험에서의 혈청 중 IgE의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성있게 IgE의 수준을 증가시켰으며, GSRE군은 control군에 비교하여 유의성있는 감소를 나타내었다.

병원체들이 상피장벽을 통과하여 국소감염을 일으키면 숙주는 자신의 방어체계를 병원체가 성장하는 부위로 이동시킨다. 이들 중의 한 기전은 mast cell에 의해 이루어진다. mast cell은 국소혈관들의 투과성을 급속히 높이는 작용을 하는 histamine을 포함하는 혼합된 화학매개물질들이 있는 독특한 세포질과립들을 갖는 큰 세포이다. mast cell의 FcεR I, FcγRIII receptor는 IgE와 IgG에 각각 결합하여 지질 염증매개 물질(lipid inflammatory mediator) 및 granule을 분비하게 된다⁴⁴⁾.

IgG는 serum에서 가장 풍부한 Immunoglobulin으로 잘 알려져 있다. 이러한 IgG의 역할은 먼저, IgG가 기관지 mast cell에 부착하여 degranulation을 유발할 때, mast cell의 sensitization과 activation을 일으켜서 IgE와 같이 mast cell에 작용한다. 또, IgG가 결합된 mouse에게는 IgE대신 IgG를 생산하여 airway hyperresponsiveness를 일으킨다. 그리고, IgG는 eosinophil의 FcγRII에 부착하여 eosinophil의 degranulation을 유발하기도 한다^{47,48)}. 실제로, 천식에 이완된 어린이에게서는 그렇지 않은 어린이들에 비하여 IgG와 IgE의 level이 유의하게 상승되어 있음이⁴⁹⁾ 보고되고 있다.

본 실험에서의 혈청 중 IgG의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성있게 IgG의 수준을 증가시켰으나, GSRE군에서는 유의한 결과를 얻지 못하였다.

결 론

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

Splenocyte를 배양한 배지에서 IL-4는 GSRE군이 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성있게 감소시켰다. 그러나, OVA를 처치한 splenocyte의 배양액에서는 유의한 변화를 나타내지 못하였다. BALF 및 splenocyte를 배양한 배지에서 IL-5는 GSRE군이 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성있게 감소시켰다. 그러나, OVA를 처치한 splenocyte의 배양액에서는 유의한 변화를 나타내지 못하였다. 혈청 중 IgE의 함량은 GSRE군에서 control군에 비교하여 IgE의 수준을 유의성있게 감소시켰으나, IgG에서

는 유의한 변화를 나타내지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 인삼은 Th2 cell이 매개되는 천식에 유효하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(02-PJ9-PG1-CO04-0009)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Cohn, L., Elias, J.A., Chupp, G.L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol.* 22, 789-815, 2004.
2. 공중보건편집위원회. 예방의학과 공중보건, p 129-145, 서울, 계축문화사, 1992.
3. Chiang, D.J., Ye, Y.L., Chen, W.L., Lee, Y.L., Hsu, N.Y., Chiang, B.L. Ribavirin or CpG DNA sequence-modulated dendritic cells decrease the IgE level and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 168, 575-580, 2003.
4. Corrigan, C.J., Haczku, A., Gemou-Engesaeth, V., Doi, S., Kikuchi, Y., Takatsu, K., Durham, S.R., Kay, A.B. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin 5. *Am Rev Respir Dis.* 147, 540 - 547, 1993.
5. 李珩九, 鄭昇紀. 東醫肺系內科學. p 187-202, 426, 460-461, 468, 서울, 민瑞出版社, 1999.
6. 전국의과대학교수역. 오늘의 진단 및 치료. p 287-297, 서울, 한우리, 1999.
7. 原安徽中醫學院編. 中醫臨床手冊. p 115-116, 서울, 成輔社, 1983.
8. 上海中醫學院編. 中醫內科學. p 17-23, 香港, 商務印書館香港分館, 1975.
9. 李珩九. 五拗湯이 咳嗽 喘息에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1982.
10. 鄭昇紀. 定喘湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 경희대학교 대학원. 1985.
11. 鄭昇紀. 加味清上補下湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 대한한의학회지, 12(1):118-138, 1991.
12. 朴光恩. 千緝導痰湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 경희대학교 대학원. 1993.
13. 이은, 고희, 김이화, 김호현. 인삼전탕액이 신경아세포주에서 에탄올에 의해 유발된 아토피시스에 미치는 영향. 한방내과학회지. 23(3):423-432, 2002.
14. 서호석, 한양희, 박종형, 전찬용, 김동우, 박세기, 이청정혜, 고승희, 고재철, 최유경, 백은기, 홍의실, 박지윤. 인삼이 Cyclosporin A로 유발된 백서의 신손상에 미치는 영향. 한방내과학회지. 22(1):45-54, 2001.
15. 윤성현, 조형래, 김동일, 이태균, 남경수. 인삼이 양수감염에

- 의한 조산에 미치는 영향. 부인과학회지. 13(2):149-165, 2000.
16. 의학교육연수원. 가정의학. p 286-288, 서울, 서울대학교출판부. 1998.
 17. 馬康慈. 中醫師臨床手冊. p 235-240, 臺北, 衆文圖書公司. 1976.
 18. 具本淵, 朴鎬湜, 尹泰汝, 金東圭, 崔治求. 東醫內科學. p 41-47. 서울, 書苑堂. 1992.
 19. Lampinen, M., Carlson, M., Hakansson, L.D., Venge, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 59(8):793-805. 2004.
 20. R. H. Green, C. E. Brightling, G. Woltmann, D. Parker, A. J. Wardlaw, I. D. Pavord. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 57(10):875-879, 2002.
 21. Ruth H Green, Christopher E Brightling, Susan McKenna, Beverley Hargadon, Debbie Parker, Peter Bradding, Andrew J Wardlaw, Ian D Pavord. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet*. 360(9347):1715-1721, 2002.
 22. 김창근, 유진호, 고영률, Hirohito Kita. 기도 내 호산구성 염증에서 IL-5와 Eotaxin의 역할. 천식 및 알레르기학회지, 24(1):127-136, 2004.
 23. 김미경. Biology of eosinophil, 대한천식및 알레르기학회 추계학술대회 초록집, 409-417, 1997.
 24. 박해심. 기관지천식에서의 eosinophil cationic protein과 tryptase. 알레르기, 15(4):596-597, 1995.
 25. Rankin, S.M., Conroy, D.M., Williams, T.J. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today*. 6(1):20-27, 2000.
 26. 김지혜, 오재원, 이하백. 급성 천식 환자에서의 혈청 eosinophil cationic protein치의 변화에 대한 연구. 알레르기, 16(2):219-229, 1996.
 27. Garlisi, C.G., Kung, T.T., Wang, P., Minnicozzi, M., Umland, S.P., Chapman, R.W., Stelts, D., Crawley, Y., Falcone, A., Myers, J.G., Jones, H., Billah, M.M., Kreutner, W., Egan, R.W. Effects of chronic anti-interleukin-5 monoclonal antibody treatment in a murine model of pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20(2): 248-255, 1999.
 28. van Rijt, L.S., Vos, N., Willart, M., Kleinjan, A., Coyle, A.J., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 114(1):166-173, 2004.
 29. Steinman, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol* 9, 271-296, 1991.
 30. Hart, D.M. Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 90(9):3245-3287, 1997.
 31. Banchereau, J., Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673), 245-252, 1998.
 32. 조상현, 장윤석. CpG-ODNs를 이용한 천식의 새로운 면역조절요법. 천식 및 알레르기. 22(1):43-53, 2002.
 33. Sara, M., Rankin, Dolores, M. Conroy and Timothy J. Williams. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Molecular Medicine Today*. 6(1):20-27, 2000.
 34. 최인선. 동물 천식모형에서 선택적 면역 조절 요법. 천식 및 알레르기. 22(4):663-668, 2002.
 35. Walker, C., Virchow, J.C. Jr, Bruijnzeel, P.L., Blaser, K. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J. Immunol*. 146(6):1829-1835, 1991.
 36. Bochner, B.S., Busse, W.W. Advances in mechanisms of allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 113(5):868-875, 2004.
 37. M.J. Koury, J.H. Newman and J.J. Murray, Reversal of hypereosinophilic syndrome and lymphomatoid papulosis with mepolizumab and imatinib. *Am J Med* 115. 587-589, 2003.
 38. J.K. Garrett, S.C. Jameson, B. Thomson, M.H. Collins, L.E. Wagoner, D.K. Freese et al., Anti-interleukin-5 (mepolizumab) therapy for hypereosinophilic syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 113, 115 - 119, 2004.
 39. Koury, M.J., Newman, J.H., Murray, J.J. Reversal of hypereosinophilic syndrome and lymphomatoid papulosis with mepolizumab and imatinib. *Am J Med*. 115(7):587-589, 2003.
 40. Garrett, J.K., Jameson, S.C., Thomson, B., Collins, M.H., Wagoner, L.E., Freese, D.K., Beck, L.A., Boyce, J.A., Filipovich, A.H., Villanueva, J.M., Sutton, S.A. Assa'ad AH, Rothenberg ME. Anti-interleukin-5 (mepolizumab) therapy for hypereosinophilic syndromes. *J Allergy Clin Immunol*. 113(1):115-119, 2004.
 41. 강제성 외. 세포분자면역학(4판). pp198. 258. 서울, 범문사. 2002.
 42. Paul M. O'Byrne, Mark D. Inman and Ellinor Adelroth. Reassessing the Th2 cytokine basis of asthma. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 25(5):244-248, 2004.
 43. Douglas, S. Robinson. New Therapies for Asthma: Where Next? *Pediatric Pulmonology*. 36, 369-375, 2003.
 44. Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik. *Immuobiology*. p 473, 481. Gerald. New York. 2001.
 45. S.I. Mayr, R.I. Zuberi, F.-T. Liu. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 36, 821-827, 2003.
 46. Douglas, S. Robinson. T-cell cytokines: what we have learned from human studies. *PAEDIATRIC RESPIRATORY REVIEWS*. 5(Suppl A), S53-58, 2004.

47. G. J. Gleich, H. Kita. Bronchial asthma: Lessons from murine models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2101-2102, 1997.
48. ROB C. AALBERSE: Specific IgE and IgG Responses in Atopic versus Nonatopic Subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 162, S124-127, 2000.
49. Rizzo, M. C., A. K. Arruda, M. D. Chapman, E. Fernandez-Caldas, D. Baggio, T. A. E. Platts-Mills and C. K. Naspitz. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. *Ann. Allergy.* 71, 152-158, 1993.