

半夏가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향

송재진, 박양춘

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Effects of *Pinelliae Rhizoma* on immunocyte and cytokine production in asthma model mouse

Jae-Jin Song, Yang-Chun Park

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

Objective : The purpose of this research is to examine the effects of *Pinelliae Rhizoma* (PR) extract on immune cells and cytokines in ovalbumin (OVA)-induced asthmatic mice.

Methods : In vivo, C57BL/6 mice were sensitized and handicapped by OVA for 12 weeks. During this experiment, the one group was then treated with PR extract for the 8 weeks (3 times per week) and analyzed by ELISA and flow cytometer.

Results : In vivo, there were significant decreases in eosinophils, IL-4, IL-5, IL-13, IgE in BALF (bronchoalveolar lavage fluid) compared with that of control group. However, IFN- γ in BALF of GS group increased significantly, compared with that of control group. Additionally, the population of CD3e⁻/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in the PR group decreased, compared with that of control group.

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

Key Words: *Pinelliae Rhizoma*, asthma, cytokine.

1. 緒 論

기관지천식(이하 천식)은 한의학에서 呼吸急促하며 喉中有聲響한 증상을 나타내는 哮喘證, 哮喘證의 범주에 속하는 질환으로¹ 기도의 만성 염증과 기도 과민성을 특징으로 하며 기도의 만성염증은 활성화된 비만세포, 호산구, T세포와 같은 염증세포들이 기관지점막에 침착하고 이들 세포에서 여러 종류의

케모카인과 각종 사이토카인 등이 발현, 분비되어 발생한다. T조력세포(Th세포)는 분포하는 사이토카인에 따라 Th1세포와 Th2세포로 나뉘어지며 이는 서로 길항작용을 나타내어 작용하며 천식유발에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{2,3}.

최근 천식에 대한 단미 및 처방을 이용하여 염증 반응이나 면역기능에 관한 동물실험^{4,5}과 분자생물학적인 실험기법을 도입하여 사이토카인이나 케모카인에 대한 각종 한방치료제에 대한 실험연구가 이루어지고 있다^{6,7}.

半夏(*Pinelliae Rhizoma*)는 性味が 辛溫有毒하며 和胃止嘔, 燥濕祛痰, 散結消腫의 효능이 있고⁸ 藥

· 접수 : 2005. 2. 5 · 채택 : 2005. 2. 21
· 교신저자 : 박양춘, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9
대전대학교 청주한방병원 내과
(Tel. 043-229-3704 Fax. 043-253-8757
E-Mail : omdpyc@dju.ac.kr)

理作用으로는 嘔吐中樞抑制,⁹ 鎮咳祛痰作用¹⁰ 등이 있다.

최근 半夏에 대한 실험적 연구로는 瘀血病態模型에 미치는 연구¹¹, 비만유도 흰쥐의 혈액 및 유전자 변화에 미치는 영향¹², 신경세포의 상해 및 백서의 기억에 미치는 영향¹³ 등이 있으나 천식과 관련된 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 半夏의 항염증 및 천식치료에 대한 효능을 실험적으로 규명하고자 *in vivo*에서 기관지 폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid; 이하 BALF)내의 호산구, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , IgE의 분비, 폐세포의 CD3e⁻/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺의 비율을 측정하여 결과를 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

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

2) 약재

半夏(*Pinelliae Rhizoma*)는 대전대학교부속한방병원에서 구입 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 기관지 천식 생쥐 모델¹⁴

500 μ g/ml의 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10%(w/v) aluminum potassium sulfate (Alum)를 PBS로 용해한 후 혼합하여 얻은 혼합물에 10N NaOH를 첨가하여 pH가 6.5가 되게 조정하고, 상온에서 1시간 동안 방치한 후 750 \times g에서 5분 동안 원심분리하였다. 분리한 OVA/Alum 침전물(pellet)에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 μ g OVA를 0.2ml로 조정하여 복강내로 주사하여 전신감작을 시켰다. 이후 4주째에 생쥐를 마취

한 후 난알부민(500 μ g/ml) 100 μ l를 기관으로 직접 투여(I.T. : *intra trachea*)하였다. 5~12주간 분무기를 이용하여 2.5mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다.

2) 半夏 추출물 경구 투여

OVA/Alum로 전신감작 시킨 후 5주째부터 半夏 추출물(5mg/20g)을 일주일에 3회 경구로 투여하였다. 대조군은 동량의 증류수를 경구로 8주간 투여하였다.

3) 기관지폐포세척액(BALF)으로부터 세포의 분리

12주 후 기관지천식 생쥐의 눈에서 혈액을 분리하였고, 목부분을 해부하여 주사기를 기관(trachea)에 삽입시키고 끈으로 묶어 고정된 다음 10% FBS/DMEM 배양액 1ml을 3회 순환시켜 기관지폐포세척액을 얻었다. 기관지폐포세척액에 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다.

4) 호산구 분리 및 측정

BALF로부터 세포를 분리하여 cytopsin(한일과학)에서 1,000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 slide를 건조하였다. 건조된 슬라이드는 Diff-Quick 용액(Baxter Healthcare, U.S.A.)을 이용하여 염색하였다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 염색 특징 등으로 면역세포의 type을 결정하였으며, 광학현미경(Nikon, Japan) \times 400에서 관찰하여 infiltration된 호산구 수를 측정하였다.

5) ELISA analysis

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

6) 형광 유세포 분석

폐와 폐포세척액으로부터 분리한 세포로부터 여러 가지 세포 표면 분자들에 대한 항체를 이용한 염색을 하기 위하여 $2\sim 5 \times 10^5$ 세포로 조정하여 염색 완충용액(1% 우 태아 혈청, 0.01% NaN₃가 포함된

인산염 완충용액, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 이후 FITC(fluorescein isothiocyanate) 또는 PE (phycoerythrin) 형광 물질이 결합된 CD3, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220, CD11b, Gr-1 등의 항체를 시료에 가하여 4℃에서 40분간 반응시키고, 염색 완충 용액으로 2회 세척한 후 세포 표면 분자들의 발현을 유세포 형광분석기(FACS, Becton Dickinson, U.S.A.)로 분석하였다.

7) 통계처리

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

III. 成 績

1. 기관지폐포세척액(BALF)내 호산구수에 미치는 영향

BALF내 호산구수를 측정한 결과를 보면, 정상군은 1.0 ± 0.58 개, 대조군은 127.7 ± 26.8 개, PR를 투여한 실험군은 46.3 ± 5.89 개로 나타나 대조군에 비하여 유의성(P<0.001)있게 감소하였다(Fig. 1).

2. 기관지폐포세척액(BALF)내 사이토카인 분비에 미치는 영향

1) IL-4 분비에 미치는 영향

IL-4 분비를 측정한 결과, 정상군은 4.7 ± 0.6 (pg/ml), 대조군은 27.9 ± 2.1 (pg/ml), PR를 투여한 실험군은 9.8 ± 1.6 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성(P<0.001)있게 감소하였다(Fig. 2).

2) IL-5 분비에 미치는 영향

IL-5 분비를 측정한 결과, 정상군은 0.0 ± 0.0 (pg/ml), 대조군은 8.7 ± 1.1 (pg/ml), PR를 투여한 실험군은 4.3 ± 0.7 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성(P<0.01)있게 감소하였다(Fig. 3).

3) IL-13 분비에 미치는 영향

IL-13 분비를 측정한 결과, 정상군은 4.3 ± 0.9 (pg/ml), 대조군은 76.4 ± 1.3 (pg/ml), PR를 투여한 실험군은 37.5 ± 5.9 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의

성(P<0.05)있게 감소하였다(Fig. 4).

4) IgE 분비에 미치는 영향

혈청내의 IgE 분비를 측정한 결과, 정상군은 0.0 ± 0.0 (ng/ml), 대조군은 14.3 ± 2.1 (ng/ml), PR를 투여한 실험군은 7.8 ± 1.6 (ng/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성(P<0.01)있게 감소하였다(Fig. 5)

5) IFN- γ 분비에 미치는 영향

IFN- γ 분비를 측정한 결과, 정상군은 2.4 ± 0.5 (pg/ml), 대조군은 5.7 ± 0.9 (pg/ml), PR를 투여한 실험군은 17.2 ± 3.6 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성(P<0.01)있게 증가하였다(Fig. 6).

3. 폐세포에 대한 형광 유세포 분석에 미치는 영향

1) CD3e⁻/CCR3⁺에 미치는 영향

폐세포에서 CD3e⁻/CCR3⁺의 비율이 정상군에서는 19.9%, 대조군에서는 34.8%이었고, PR를 투여한 실험군에서는 24.8%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 7).

2) CD69⁺/CD3e⁺에 미치는 영향

CD69⁺/CD3e⁺의 비율이 정상군에서는 4.4%, 대조군에서는 16.3%이었고, PR를 투여한 실험군에는 11.6%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 8).

3) IgE⁺/B220⁺에 미치는 영향

PR 투여군의 C57BL/6의 폐세포를 분리하여 IgE/B220⁺를 관찰한 결과, 정상군에서는 1.2%, 대조군에서는 15.7%, PR 투여군에서는 5.8%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 9).

4) CD11b⁺/Gr-1⁺에 미치는 영향

PR 투여군의 C57BL/6의 폐세포를 분리하여 Gr-1의 비율을 관찰한 결과, 정상군에서는 2.6%, 대조군에서는 9.9%, PR 투여군에서는 3.3%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10).

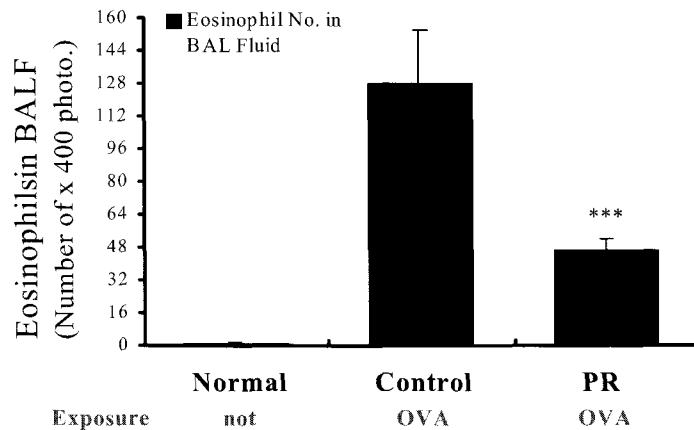


Fig. 1. Effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on eosinophils in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with PR extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and the number of eosinophils was calculated.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

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

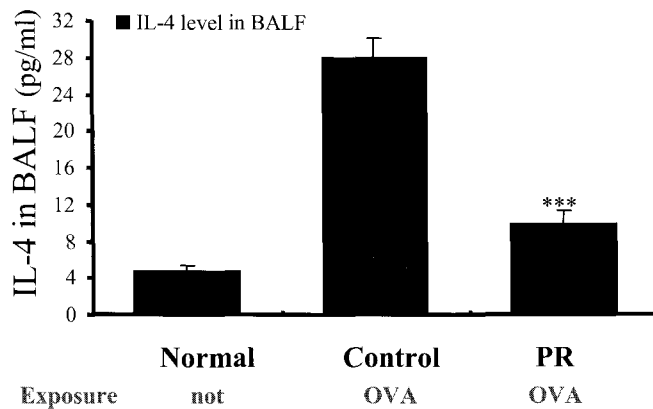


Fig. 2. Effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on IL-4 level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with PR extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IL-4 level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

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

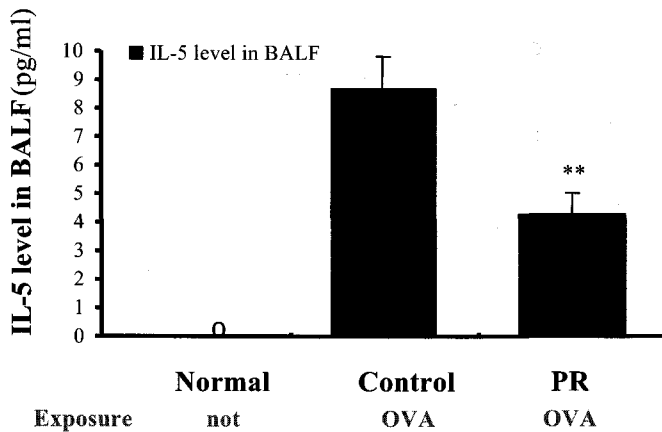


Fig. 3. Effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on IL-5 level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with PR extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IL-5 level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01).

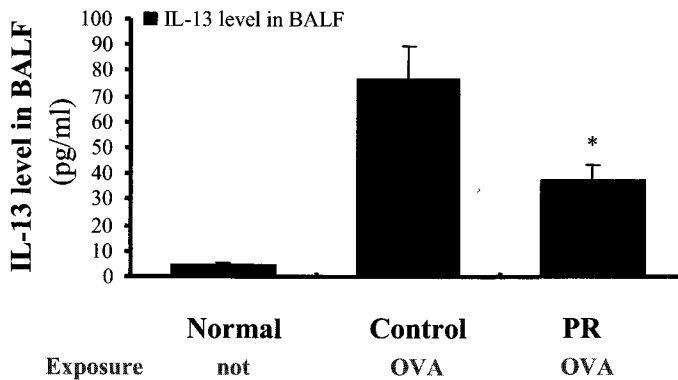


Fig. 4. Effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on IL-13 level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with PR extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IL-13 level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

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

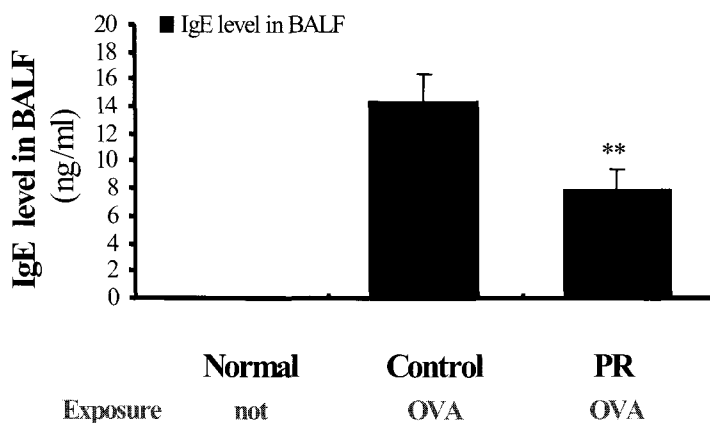


Fig. 5. Effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on IgE level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with PR extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IgE level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01).

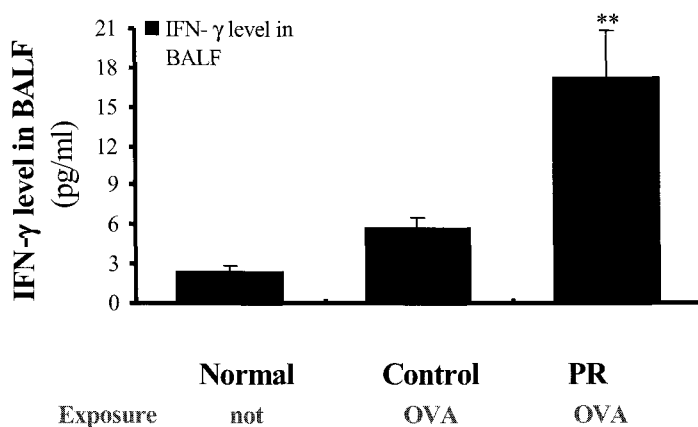


Fig. 6. Effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on IFN-γ level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with PR extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IFN-γ level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01).

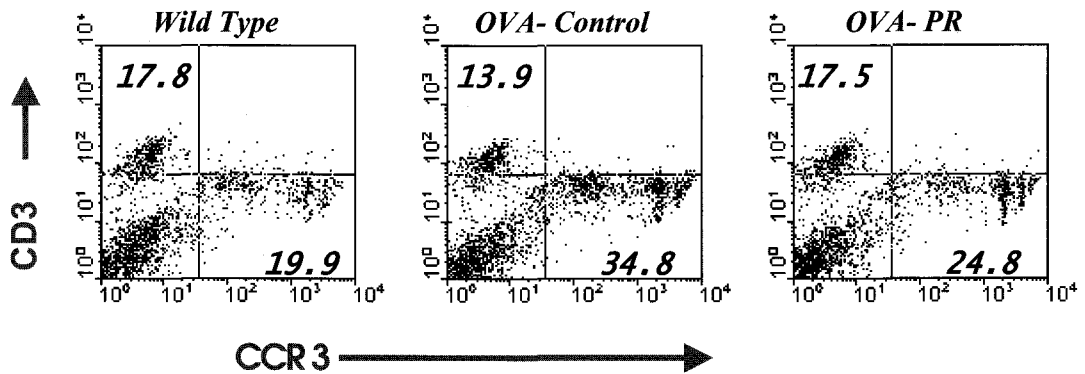


Fig. 7. Inhibitory effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on CD3⁺/CCR3⁺ population(%) in lung cells of OVA-induced asthmatic mouse.

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

WT : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

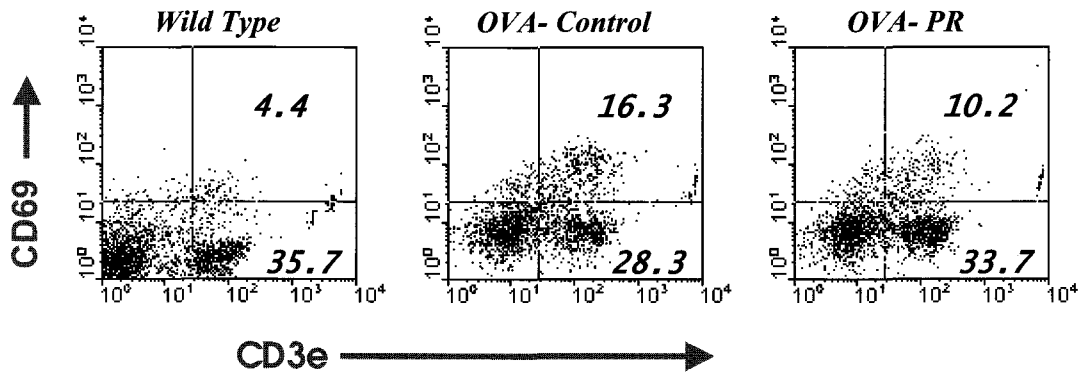


Fig. 8. Inhibitory effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on CD69⁺/CD3e⁺ population(%) in lung cells of OVA-induced asthmatic mouse.

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

WT : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

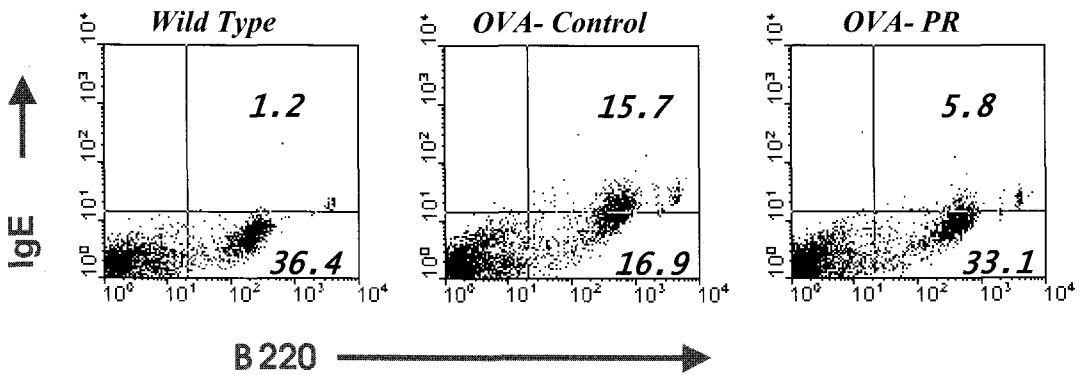


Fig. 9. Inhibitory effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on IgE⁺/B220⁺ population(%) in lung cells of OVA-induced asthmatic mouse.

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

WT : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g).

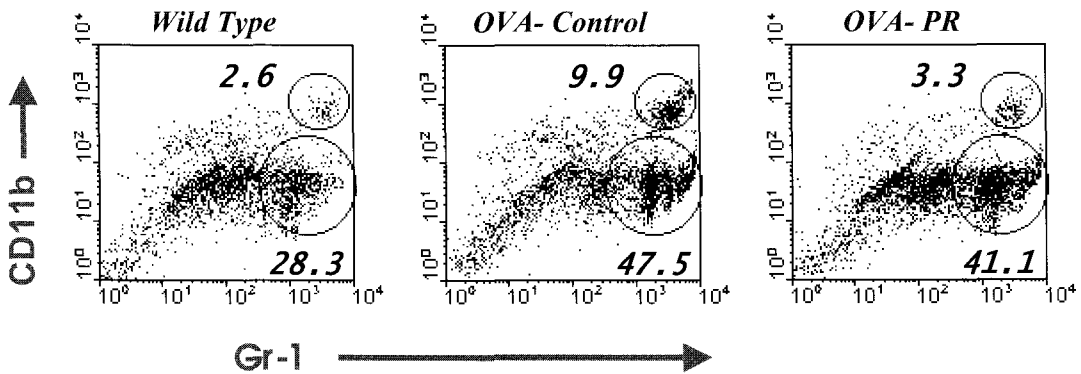


Fig. 10. Inhibitory effect of *Pinelliae Rhizoma*(PR) extract on CD11b⁺/Gr-1⁺ population(%) in lung cells of OVA-induced asthmatic mouse.

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

WT : Normal C57BL/6 mice

OVA-control : Ovalbumin inhalation (control)

OVA-PR : OVA + PR(5mg/20g)

IV. 考 察

기관지 천식(이하 천식)은 기도내에 가변적 혹은 간헐적인 협착에 의해 호흡곤란, 기침, 혹은 천명이 반복적으로 발생하는 질병으로 호산구, 비만세포, T 세포 등 활성화된 염증세포가 침착되어 있는 특징적인 소견을 보인다². 특히 호산구는 활성화되어 과립단백이나 arachidonate 대사물을 분비하여 기도 평활근수축, 기도 상피세포탈락 및 점액분비 증가들을 일으키는 세포로 기관지천식의 병태생리에 중요하다. 호산구가 골수에서 만들어지고 기도내로 이동하여 활성화되는데 이러한 과정에 Th세포에서 분비하는 사이토카인이 중요한 역할을 한다³.

최근 알레르기 질환에 대한 연구는 세포의 염증 발현에 관여하는 세포와 분자수준의 기전에 초점이 맞추어 지고 있다. 즉 세포단계의 염증면역반응에서 각종 사이토카인들이 어떻게 관여하고 역할하고 있는지를 계속적으로 보고하고 있으며 각종 치료제제를 투여함으로써 그러한 변화를 초래하는 기전들을 구체적으로 제시하고 있다^{4,7}.

천식을 유발시킨 동물모형을 이용한 연구에서도 기도과민성이 증가하고 염증, 점막증식이 나타나며 IgE, TNF- α , IL-4, IL-5가 증가해 있고 천식병리에 T세포, 관련 사이토카인 그리고 IgE가 주로 관여하는 것으로 보고되었다⁷.

인터루킨(interleukin : IL)이란 항원과 반응하여 활성화된 림프구가 생성, 방출하는 물질로서 다른 세포에 작용하게 하는 활성물질이며 macrophage가 생성하는 동일한 활성물질인 monokine은 monocyte의 억제작용물질을 의미하는데, 이 둘을 합하여 사이토카인이라고 부른다^{15,16}.

사이토카인은 어떤 한 가지 항원에 특이적인 적은 수의 림프구로 하여금 그 항원을 제거하는 다양한 실행기전을 활성화시키도록 하는 증폭기전을 제공하므로 사이토카인의 과도한 생성 및 작용은 조직상해를 유발하거나 괴사를 일으킬 수 있다^{15,16}.

천식의 병인에 중요하게 관여하는 Th세포는 서로 길항작용을 나타내는 Th1, Th2세포로 나뉘는데

Th1세포는 주로 IFN- γ , TNF- β , IL-2를 생산하며 바이러스 같은 세포내 병원체를 공격하고, 지연형 과민반응을 일으키고, 종양에 대한 숙주반응에 관여하는데 Th1 경로가 지나치게 활성화되면 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 1형 당뇨병과 같은 자가면역 질환을 발생시킨다. Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 기생충감염에 대한 방어작용에 관여하는데 Th2 경로는 기관지천식과 같은 알레르기성 질환의 기초가 되어 천식환자의 기관지 폐포세척액에서 Th2세포 기능의 활성화가 관찰되고 있다^{17,18}. 즉 항원에 의한 IgE 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2세포는 naive CD4⁺ T세포가 IL-4의 영향으로 항원과 반응시 분화되고 이때 IgE 생성을 방해하는 IFN- γ 를 분비하는 Th1세포는 그 발달이 저해된다. 따라서 항진된 Th2 형의 면역반응을 억제하는 것이 천식의 치료에 있어 중요하게 생각되고 있다¹⁸.

地文, 水玉, 地籟公 등의 이명으로 불리우는半夏는 天南星科(Araceae)식물인 기무릇(*Pinellia ternata*)의 괴경을 건조한 것이다⁸.

半夏의 性味는 辛溫有毒하며 脾胃經으로 歸經하여 和胃止嘔, 燥濕祛痰, 散結消腫의 효능이 있으며⁸半夏에 대한 연구로는 구토중추억제⁹, 진해거담작용¹⁰ 등에 대한 약리작용에 관한 연구가 있으며 강²⁰ 등은 어혈병태모형에서半夏가 혈소판수를 증가시키고, 전혈점도와 혈장점도를 낮추며, 중성지방을 감소시킨다고 하였고, 장¹² 등은半夏가 비만유도 흰쥐의 체중, 지방중량, 총콜레스테롤을 감소시킨다고 하였으나半夏를 이용한 항천식 효과에 대한 연구는 아직 없었다.

천식의 치료에서 實證은 外感風寒, 痰濕內盛으로 나누어 祛風散寒, 祛痰化濕, 宣肺平喘의 治法을 사용하고, 虛證은 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛로 구분하여 養肺, 補益心腎, 瀉肺化痰, 補益腎元의 治法을 사용하는데¹ 虛證과 實證 모두에서 治痰을 겸하게 되며半夏가 다용되고 있다.

이에 저자는半夏의 항염증 및 항천식 효능을 실험적으로 규명하고자 *in vivo*에서 호산구, BALF내

에서 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , IgE의 생성, 면역 유세포 분석에서 CCR3, CD69, B220, Gr-1의 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

In vivo 실험에서 BALF내 호산구수를 측정된 결과를 보면 실험군은 유의성($p < 0.001$) 있는 감소 효과를 나타냈는데(Fig. 1), 이러한 결과는 半夏가 천식병리에서 중요한 의미를 갖는 호산구의 기도내 침윤을 억제함으로써 천식반응을 감소시킬 수 있음을 보여주는 것이라고 생각된다. 천식치료에 사용되는 麥門冬湯, 定喘湯, 定喘湯加減方, 神秘湯, 加味神秘湯, 加味清金降火湯, 加味六味地黃湯이 천식모델 흰쥐의 BALF내 림프구수의 증가를 억제하였고⁵, 杏仁, 甘草가 천식모델 생쥐의 BALF내 림프구수의 증가를 억제한다는 보고^{19,20}와 일치하였다.

ELISA 분석결과를 살펴보면, 혈청내 및 BALF내에서 IL-4, IL-5, IL-13, IgE는 대조군에서 정상군에 비해 분비량이 증가하였고 半夏를 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.001 \sim 0.05$)있게 감소하였다(Fig. 2~5). BALF내 IFN- γ 은 대조군에서 정상군에 비해 약간의 분비량이 증가하였고 실험군에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.01$)있게 증가하였다(Fig. 6).

IL-4는 세포간의 정보를 전달하는 사이토카인으로, Th세포에서 생성하여 B세포의 분화와 증식을 촉진시키고 Th2세포를 자극하여 IgE 생성을 증가시킨다^{21,22}. IL-5는 IL-4와 유사하게 B세포의 증식과 분화를 자극하는 기능을 가진 분자량 20kD 사이토카인으로 활성화된 CD4⁺ T세포와 비만세포가 분비하고, IL-5는 IL-2또는 IL-4의 B세포 분화성장에 작용하여 IgE 생산을 자극시키는 작용을 한다²³. IL-13은 IL-4와 같은 작용을 하여 세포간의 정보를 전달하는 사이토카인으로, Th세포에서 생성하여 B세포의 분화와 증식을 촉진시키고 Th2세포를 자극하여 IgE 생성을 증가시킴으로 호산구 성장과 분화에 중요한 역할을 한다²⁴. IgE는 특정 항원 분자와 반응하는 항체 특성을 가진 혈청 글로불린으로, 항원이 기도내에 들어오면, 생성되어 비만세포나 호염기구 등의 수용체에 달라붙어서 알레르기 반응에

중요하게 관여하는 면역글로불린이다²⁵. IFN- γ 는 Th2 세포의 생성을 억제하여 IgE 생산을 억제하고 따라서 정상군에서는 IgE 반응들을 상향 조절하는 Th1 유도 사이토카인과 IgE 반응을 하향조절하는 Th1 유도 사이토카인 사이에 균형을 유지시켜 주며, 대식세포를 활성화시킨다²⁶.

이와 같은 결과는 半夏가 천식의 주요 면역반응 경로인 Th2 경로의 항진에 관여하는 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13의 분비를 억제하고, 이에 길항작용을 갖는 IFN- γ 를 증가시킴으로써 IgE의 분비량을 감소시키는 효과를 나타낸다고 생각할 수 있게 하는데, Th2 경로의 항진으로 설명되는 천식의 염증 반응에서 半夏가 Th1과 Th2 사이의 불균형을 회복시키는 효과를 통하여 천식에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

천식을 유발시킨 생쥐에게 半夏를 경구투여(5mg/20g)한 후 폐세포를 유세포분석하여 CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺의 비율에 미치는 영향을 측정한 결과 모든 항목이 실험군에서 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 7~10).

CD3은 T세포의 결정표식인자로 T세포의 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포안으로 전달하는 역할을 하고²⁷, CCR3은 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 인자로 CCR3이 활성화 되면 호산구, 호염기구, Th2세포, 비만세포 등이 활성화되어 조직에 손상을 주며, 이중 Th2세포는 IL-5, IL-3을 분비하여 호산구를 활성화시키고 있다²⁸. 따라서 실험군에서 CD3e⁺/CCR3⁺의 비율이 감소한 것은 半夏가 호산구의 활성화를 억제하여 호산구의 기도내 유입을 억제하는 효과를 나타낼 수 있다고 생각된다.

CD69는 활성화된 B세포, T세포, 비만세포에 분포하는 것으로, 림프구의 신호전달에 관여하는데²⁷ CD69⁺/CD3e⁺의 비율이 실험군에서 농도의존적으로 감소한 것은 半夏가 T세포, B세포 및 비만세포가 관련되는 면역반응을 억제하는 효능을 통하여 천식과 관련된 알레르기 반응을 감소시킬 가능성이 있다고 생각된다.

CD23은 B세포 일부, 단핵구, 수상돌기세포, 호산구, 혈소판에 발현하는 단백질로써, 대식세포와 호산구에 의한 세포독성을 매개하고, 활성화시에는 IgE를 분비하여 호산구를 자극하며 B220은 쥐의 B세포 표면에 있는 표식자로, B세포의 면역증가를 의미한다^{29,30}. 따라서 실험군에서 CD23⁺/B220⁺의 비율이 농도의존적으로 감소함으로써 반하가 B세포의 성장과 IgE의 분비를 조절하는 작용을 나타낼 가능성을 고려해 볼 수 있다고 생각된다.

Gr-1는 과립구에서 발현하는 분자이고, CD11b는 과립구, 단구, NK세포, 비만세포에 발현하는 분자로, 순환 호산구의 표면에 발현하면 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1)과 유착하여 화학주성인자 등에 의해 호산구가 표적장기로 유입되도록 한다³¹. 따라서 폐세포에서 CD11b⁺/Gr-1⁺ 비율의 감소는半夏가 호산구의 내피세포유착을 통한 표적장기로의 유입을 억제하여 천식을 감소시키는 효과를 가질 수 있는 근거로 사료된다.

이상의 결과로 보아半夏는 천식을 유발시킨 생쥐의 폐세포에서 IgE, CD69, CD11b, Gr-1 등의 발현을 억제하고, 염증 및 천식반응을 촉진시키는 IL-4, IL-5, IL-13, IgE의 생성을 유의성 있게 감소시키며 이에 길항하는 IFN- γ 의 분비를 증가시키는 효과를 나타내 천식 치료에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

半夏가 알레르기 천식 모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BALF내에서 호산구수를 측정된 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.001)있게 감소하였다.
2. BALF내에서 IL-4의 분비를 측정된 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.001)있게 감소하였다.
3. BALF내에서 IL-5의 분비를 측정된 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.01)있게 감소하였다.
4. BALF내에서 IL-13의 분비를 측정된 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.05)있게 감소하였다.
5. BALF내에서 IgE의 분비를 측정된 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.01)있게 감소하였다.
6. BALF내에서 IFN- γ 의 생성을 측정된 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.01)있게 증가하였다.
7. 천식을 유발시킨 생쥐에게半夏를 투여하여 폐세포의 CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺의 비율을 측정된 결과 모든 항목에서 대조군에 비하여 감소하였다.

參考文獻

1. 전국한의과대학폐계내과학교실 편저. 동의폐계내과학, 서울: 한문화사; 2002, p.162-202.
2. National Institutes of Health. Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention, NIH Publication 2002. No02-3659.
3. Roitt I, Brostoff J and Male D. Immunology, 2nd edition: Gower medical Publishing; 1989, p.1911-20.
4. 이준우, 정희재, 정승기, 이형구. 소청룡탕이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향. 경희의학 2001;17(2):242-53.
5. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 가미청금강탕 및 가미육미지황탕이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지 2003;24(3):1-10.
6. 정진용. 소청룡탕과 소청룡탕 가 사삼이 BEAS-2B 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 경희

- 대학교 대학원. 2002.
7. 조일현, 정희재, 이형구, 정승기. 사백산이 천식에 미치는 효능에 관한 분자생물학적 연구. *경희의학* 2001;17(2):214-29.
 8. 전국한외과대학 본초학교수편. 본초학. 서울: 영림사; 1994, p.448-9.
 9. 왕신지, 한군영, 진하화 주편. 중화실용중풍병대전. 북경: 인민위생출판사; 1996, p.887-92.
 10. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외 번역. 중약대사전. 서울: 정담; 1998, p.1961-71.
 11. 강선태, 이태호. 어혈병태모형에 미치는 천궁, 석창포 및 반하의 효능에 관한 실험적 연구. *동의병리학회지* 1989;4(1):57-73.
 12. 장병수, 정석희, 이종수, 김성수, 신현대. 반하가 비만유도 흰쥐의 체중 지방조직, 혈액 및 유전자 변화에 미치는 영향. *한방재활의학회지* 1999;9(1):103-28.
 13. 강상열, 반하가 CT105에 의한 신경세포 상해 및 백서의 기억에 미치는 영향. *대구한외과대학 대학원*. 2003.
 14. Dohi M, Tsukamoto S, Nagahori T, Shinagawa K, Saitoh K, Tanaka Y et al. Noninvasive system for evaluating the allergen-specific airway response in a murine model of asthma. *Lab Invest*. 1999;79(12):1559-71.
 15. 김세종. IMMUNOLOGY. 서울: 고려의학; 2000, p.1, 65, p154-6, 260-5.
 16. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology, Philadelphia: Saunders; 1997, p.250-77.
 17. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003;8(3):223-46.
 18. Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res*. 2001;2(2):66-70.
 19. 황대룡, 강영성, 김성수, 김대한, 신민교, 송호준. 행인의 알레르기 천식 효과에 대한 연구. *대한본초학회지* 2003;18(2):201-8.
 20. 한영주, 박양준. 감초가 천식모델 생쥐의 BALF 내 면역세포 및 Cytokine에 미치는 효과. *대한한방내과학회지* 2004;25(3):408-17.
 21. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, de Vries JE. Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. *Allergy*. 1994;49(8):576-86.
 22. Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res*. 2001;2(2):66-70.
 23. Brostoff J, Hall T. Hypersensitivity-Type I. In: Roitt I, Brostoff J, Male D editor. *Immunology*(5th edi.), London, Mosby, 1998, p.304, 313.
 24. 송소향, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학. 호산구의 혈관내피세포 접착에 대한 IL-13의 영향. *천식 및 알레르기*, 1999;19(1):31-41.
 25. Oettgen HC, Geha RS. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J Clin Invest*. 1999;104(7):829-35.
 26. 김관형, 김석찬, 김영균, 권순석, 김치홍, 문화식 등. 기관지천식에서 Interferon-Gamma 치료의 효과. *결핵 및 호흡기질환*. 1997;44(4):822-35.
 27. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology*. 1993;80(2):281-6. .
 28. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000;95(10):3032-43.
 29. 조상현. IgE 항체 생성과 조절. *알레르기*. 1993; 13:460-4.
 30. Nakamura T, Kloetzer WS, Brams P, Hariharan

K, Chamat S, Cao X et la. In vitro IgE inhibition in B cells by anti-CD23 monoclonal antibodies is functionally dependent on the immunoglobulin Fc domain. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(2):131-41.

31. Spoelstra FM, Hovenga H, Noordhoek JA, Postma DS, Kauffman HF : Changes in CD11b and L-selectin expression on eosinophils are mediated by human lung fibroblasts in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(3):769-7.