

# 가미청폐화담탕이 천식 유발 병태 모델에서 천식 관련 활성 면역세포에 미치는 영향

임동주 · 정혜광<sup>1</sup> · 이용구<sup>2</sup> · 김동희\*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1:조선대학교 약학대학, 2:대전대학교 한의과대학부속병원 내과

## Effects of Gamicheungpyehwadam-tang on Immune-cell Regulation in Association with Bronchial Asthma in OVA-induced Mouse Model

Dong Ju Lim, Hye Gwang Jeong<sup>1</sup>, Yong Gu Lee<sup>2</sup>, Dong Hee Kim\*

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

*1: Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Research Center for Proteineous Materials, Chosun University.*

*2: Department of Internal medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University*

These studies were investigated the effects of Gamicheungpyehwadam-tang (CPHDT) on immune-cell regulation in association with bronchial asthma in OVA-induced mouse model. The administration of 400 mg/kg CPHDT significantly reduced the number of total cells in lung, peripheral lymph node and spleen in OVA-induced bronchial asthma mouse model. The administration of 400 mg/kg CPHDT significantly reduced CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> cell numbers separated from lung, peripheral lymph node and spleen in OVA-induced bronchial asthma mouse model. CPHDT significantly reduced CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, and CD3<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> cell numbers separated from lung, peripheral lymph node and spleen in OVA-induced bronchial asthma mouse model in a dose dependent manner. However, CPHDT significantly reduced CD8<sup>+</sup> cell numbers from only lung and spleen. The administration of CPHDT significantly reduced NK<sup>+</sup> cell numbers separated from lung of OVA-induced bronchial asthma mouse model in all concentrations, but 200 mg/kg CPHDT reduced NK<sup>+</sup> cell numbers separated from peripheral lymph node. These results suggest that CPHDT has anti-asthma and anti-allergy effects. In addition to, CPHDT may be useful treatment of asthma based on the further studies about the individual efficacy search of the components of CPHDT and the adding of variety drugs to CPHDT.

**Key words :** Gamicheungpyehwadam-tang, bronchial asthma, mouse model, immune-cell

### 서 론

최근 천식의 유병률은 생활 환경 및 식생활의 변화로 인하여 전세계적으로 1억 5천만명 정도가 앓고 있는 것으로 추정되며, 매년 20만 명이 사망하는 것으로 집계되고 있다. 천식 치료제의 국내 규모 역시 천억원 이상으로 예측되고 있어, 이로 인한 의료비 부담은 사회적으로 문제로 되고 있다.

현재 천식 치료법으로는 흡입용 교감신경 자극제, 스테로이드제, 크로몰린과 네도크로밀제, 항콜린제, 테오플린제 및 항생

제 등의 약물요법이 주를 이루고 있고, 소수의 환자에게서 탈감작 요법인 면역 요법이 시행된다<sup>1,2)</sup>. 아울러 천식을 유발하는 방아쇠 인자인 환경 요인을 제거하는 환경요법 등이 기본적으로 응용되고 있다.

그러나 이러한 치료제의 개발에도 불구하고, 기관지천식 유병률은 더욱 심화되고 있는 실정이고, 기존 치료제에 반응하지 않는 불응성천식(refractory asthma) 역시 증가 일로에 있다.

한의학에서 천식은 이미 제문헌에서 하나의 증상으로 제시되었으며, ‘咳嗽’, ‘哮喘’, ‘喘呼’, ‘喘嗽’ 등이 이와 유사한 범주로 인식되었고<sup>3,4)</sup>, 임상에서의 치료 역시 이를 근거로 이루어지고 있다.

최근 이에 관한 실험적 연구를 살펴보면, 風, 寒, 热과 이들로 인한 이차적 산물인 痰飲을 제거하는 化痰, 滅熱, 止咳, 平喘

\*교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학

· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2006/04/25 · 수정 : 2006/05/25 · 채택 : 2006/06/14

약물을 중심으로 분자생물학적 검색과 동물 병태 모델을 통한 연구 결과<sup>8-13)</sup>가 주를 이룬다.

특히 치료 처방에 대한 연구는 천식에서 나타나는 점액의 과분비, 기도의 자극, 가스 교환의 비정상으로 인해 나타나는 기침, 객담, 천명음, 호흡곤란 등의 증상이 이차적 병리 산물인 痰飲과 매우 밀접한 관련성이 있어, 二陳湯을 기본방으로 한 연구<sup>8,14-16)</sup>가 대부분을 차지하고 있다.

본 시료인 加味清肺化痰湯은 二陳湯에 宣肺平喘, 清熱化痰 작용이 있는 약물을 가미하여 기관지 염증으로 인한 咳嗽, 喘息 등에 빈용되고 있는 처방이다. 특히 구성 약물중 半夏, 壴角刺, 甘草, 款冬花 등은 이미 항천식 작용이 보고<sup>17,18,19)</sup>된 바가 있으며, 기본방인 二陳湯 역시 상기한 바와 같이 다양한 약물의 가감을 통하여 항천식 작용이 보고<sup>8,14-16)</sup>된 바가 있어, 신규 한방 처방을 개발을 위한 기본 처방으로 유의성있는 결과가 기대된다.

이에 본 연구에서는 加味清肺化痰湯(CPHDT)을 시료로 면역조절을 통한 항천식 효과를 실험적으로 규명하고자 C57BL/6 mouse에 ovalbumin (OVA)으로 알레르기성 천식을 유발한 후 마우스의 lung, PLN (peripheral lymph node), spleen에 존재하는 천식 활성 면역 세포에 대한 영향을 검색하였던 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

## 실험 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 18~25 g의 C57BL/6 샘타코 (주) 쥐로, 실험 당일까지 고령 사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4%이상 (삼양사 배합 사료 Co., korean)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2°C, 상대 습도 50 ± 10%, 조명 시간 12시간 (07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물을 선별하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 加味청폐화담탕 (Gamicheungpyehwadam-tang : 이하 CPHDT로 표기)의 구성 약물을 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

#### 3) 시약 및 재료

본 실험에 사용된 OVA, chicken egg ovalbumin, aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma. Co., U.S.A), trichloroacetic acid, SRB, amphotericin, antibiotics, DNase, containing collagenase, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구 용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, magnesium chloride ( $MgCl_2$ )는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)는 Hyclone 사 (U.S.A) 제품을, PE-anti-CD3 (phycoerythrin),

PE-anti-CD4, PE-anti-CD8 (fluorescein isothiocyanate), PE-anti-DX5 PE-anti-CCR3, PE-anti-B220, anti-CD25-PE, anti-IgE-FITC anti-CD19-PE, anti-CD69-PE, anti-NK와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana U.S.A) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기기는 열탕추출기 (대웅 Co., Korea), rotary vaccum evaporator (Buchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), micro-pipet (Gilson Co., France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimazue Co., Japan), centrifuge (Sigma Co., U.S.A), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), flower cytometometer (Becton Dickinson FACSCalibur Co., U.S.A), thermocycler system (MWG Biotech Co., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI Co., U.S.A), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A), Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, U.S.A) 및 ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A) 등을 사용하였다.

Table 1. The composition of Gamicheungpyehwadam-tang : CPHDT

한약명	생약명	(g)
갈근	<i>Puerariae radix</i>	8
시호	<i>Bupleuri radix</i>	6
반하	<i>Pinelliae rhizoma</i>	6
진피	<i>Citri pericarpium</i>	4
적복령	<i>Poria</i>	4
소엽	<i>Perillae fructus</i>	4
행인	<i>Armeniacae amarum semen</i>	4
상백피	<i>Mori cortex</i>	4
길경	<i>Platycodi radix</i>	6
지각	<i>Aurantii fructus</i>	4
감초	<i>Glycyrrhizae radix</i>	4
관동화	<i>Farfarae flos</i>	6
조각자	<i>Gleditsiae spina</i>	6
생강	<i>Zingiberis rhizoma recens</i>	3
Total amount		69

#### 4) 추출물 분리

CPHDT 4첩 분량을 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하였다. 추출액을 흡입 여과한 후 김압 증류 장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480 Co., Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540 Co., Japan)를 이용하여 24.5 g의 분말을 얻었다. 완전 건조한 CPHDT을 냉동 (-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 5) 기관지 천식 생쥐 모델

500 µg/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma. Co., U.S.A)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 x g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리한 OVA/Alum 침전물을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100

$\mu\text{g}$  OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강내로 주사하여 전신 감작시켰다. 이후 3주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 100  $\mu\text{l}$ 를 기도투여 (i.t)하였다. 4주째부터 분무기를 이용하여 2.5  $\text{mg}/\text{ml}$  난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3 회씩 6 주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다. 이때 대조군으로써 PBS 또는 Alum 단을 주사, 흡입시켰다(Fig. 1).

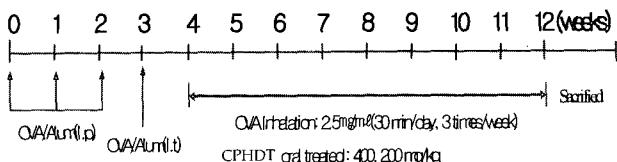


Fig. 1. Asthma OVA-induce mouse model

#### 6) 경구 투여

OVA/Alum로 전신 감작 시킨 후 4주째부터 CPHDT (400, 200  $\text{mg}/\text{kg}$ )을 일주일에 5회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구투여 하였다.

#### 7) Spleen, periripheral lymph node (PLN) 및 lung의 총 면역세포수 측정

실험 종료후 OVA 천식 생쥐를 ethyl ether로 마취시킨 후 spleen, PLN, 그리고 lung를 분리하여 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 이를 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색하여 총 면역세포수를 측정하였다.

#### 8) 폐 적출 및 호산구세포 분리

폐포세척액에서 세포를 분리하고, 폐의 무게를 측정한 후, 폐조직을 잘게 절편하였다. 여기에 2% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 5분간 1800 rpm 배지에서 원심분리하고, 5ml의 RPMI1640 배양액에 50  $\mu\text{l}$ 의 collagenase IV (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 가한 후 37°C shaking 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 2분간 방치하고 상층액을 분리하고 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배양액에 세포를 포집하였다. 이를 5회 이상 조직을 분해하여 폐 호산구세포를 분리하였다. 최종 분리된 폐 호산구세포는 배양액으로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들로부터 적혈구용혈용액 (ACK lysing buffer; 8.3g NH4Cl, 1g KHCO<sub>3</sub>, in 1L of demineralized water + 0.1mM EDTA)을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다.

#### 9) 유세포 분석

실험 종료 후 spleen, lung, PLN를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리 (1700 rpm)하여 2 회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 폐는 잘게 chopping한 후, collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들을 ACK 용액 (8.3 g

NH4Cl, 1 g KHCO<sub>3</sub>, in 1L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총 폐세포수를 측정하였다. 측정한 spleen, lung과 PLN cell을  $5 \times 10^5$  세포로 조정한 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다.

각각에 PE-anti-CD3e, FITC-anti-CD19, PE-anti-CCR3, FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-B220, FITC-anti -IgE, PE-anti-DX5, PE-anti-NK을 넣고 30 분간 염색에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> 그리고 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수 (absolute number)를 산출하였다.

#### 10) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean  $\pm$  standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

## 실험 결과

### 1. 총 세포수에 미치는 영향

#### 1) lung

Trypan blue로 염색한 후 총 폐장세포수 (total lung cells)를 측정한 결과, 정상군은  $1.43 \pm 0.08 (\times 10^7)$ , OVA를 투여한 대조군은  $8.20 \pm 0.30 (\times 10^7)$ , 양성대조군 (CsA)은  $4.73 \pm 0.53 (\times 10^7)$ , CPHDT 400  $\text{mg}/\text{kg}$  투여군은  $4.85 \pm 0.20 (\times 10^7)$ , 200  $\text{mg}/\text{kg}$  투여군은  $6.40 \pm 0.10 (\times 10^7)$ 으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 2).

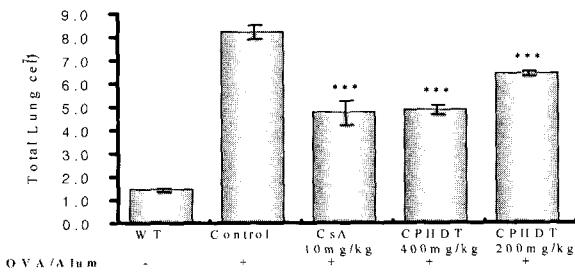


Fig. 2. Effect of CPHDT extract on total lung cells No. in murine OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (three a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of CPHDT (400  $\text{mg}/\text{kg}$  and 200  $\text{mg}/\text{kg}$ ) extract and cyclosporin A (10  $\text{mg}/\text{kg}$ ) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lung were taken out and total cells counted. The results are expressed the mean  $\pm$  S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

#### 2) PLN (peripheral lymph node)

총 말초임파구수 (total PLN cells)를 측정한 결과, 정상군은

$5.31 \pm 0.15$  ( $\times 10^6$ ), OVA를 투여한 대조군은  $9.82 \pm 0.07$  ( $\times 10^6$ ), 양성 대조군 (CsA)은  $8.16 \pm 0.48$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $8.26 \pm 0.63$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $8.88 \pm 1.08$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 400 mg/kg 투여군에서 total PLN cells 수의 유의성 있는 ( $p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 3).

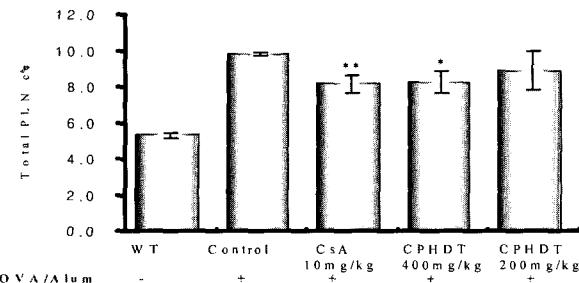


Fig. 3. Effect of CPHDT extract on total PLN cells No. in murine OVA-induced mice

### 3) Spleen

총 비장세포수 (total spleen cell)를 측정한 결과, 정상군은  $8.63 \pm 0.38$  ( $\times 10^7$ ), OVA를 투여한 대조군은  $13.10 \pm 1.10$  ( $\times 10^7$ ), 양성대조군 (CsA)은  $9.13 \pm 0.13$  ( $\times 10^7$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $6.75 \pm 1.25$  ( $\times 10^7$ ), 200 mg/kg 투여군은  $8.38 \pm 0.88$  ( $\times 10^7$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT의 모든 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 4).

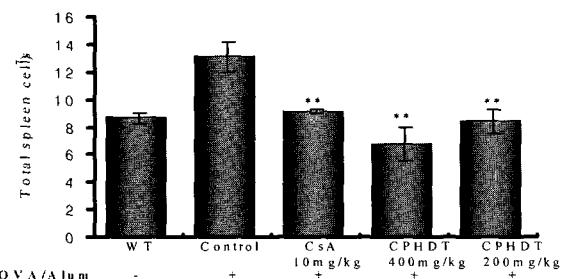


Fig. 4. Effect of CPHDT extract on total spleen cells No. in murine OVA-induced mice

## 2. CD3<sup>+</sup> 세포 수에 미치는 영향

### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $4.8 \pm 0.4$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $38.7 \pm 0.2$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $19.9 \pm 1.9$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $23.8 \pm 0.0$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 2).

### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $40.7 \pm 1.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $83.7 \pm 2.2$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $61.1 \pm 7.7$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $66.2 \pm 12.7$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 2).

### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $53.6 \pm 5.9$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $69.2 \pm 4.2$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $41.0 \pm 9.0$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $51.5 \pm 8.9$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Effect of CPHDT Extract on CD3<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice

	CD3 <sup>+</sup> absolute cell number			
	WT	Control	CPHDT-400	CPHDT-200
Lung ( $\times 10^5$ )	$4.8 \pm 0.4$	$38.7 \pm 0.2$	$19.9 \pm 1.9^{***}$	$23.8 \pm 0.0^{**}$
PLN ( $\times 10^5$ )	$40.7 \pm 1.1$	$83.7 \pm 2.2$	$61.1 \pm 7.7^{**}$	$66.2 \pm 12.7$
Spleen ( $\times 10^6$ )	$53.6 \pm 5.9$	$69.2 \pm 4.2$	$41.0 \pm 9.0^{**}$	$51.5 \pm 8.9$

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of CPHDT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lung, PLN, spleen were removed and CD3<sup>+</sup> T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean  $\pm$  S.E. Statistically significant value compared with control group data by T test (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

### 3. CD19<sup>+</sup> 세포 수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포로부터 CD19<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $6.5 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $29.0 \pm 0.4$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $20.0 \pm 2.5$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $29.0 \pm 0.4$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 3).

#### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포로부터 CD19<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $11.4 \pm 0.5$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $9.5 \pm 0.6$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $18.7 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $20.8 \pm 1.8$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 3).

#### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포로부터 CD19<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $27.8 \pm 2.7$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $57.4 \pm 5.3$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $23.3 \pm 3.3$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $28.0 \pm 0.1$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of CPHDT Extract on CD19<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice

	CD19 <sup>+</sup> absolute cell number			
	WT	Control	CPHDT-400	CPHDT-200
Lung ( $\times 10^5$ )	$6.5 \pm 0.1$	$29.0 \pm 0.4$	$20.0 \pm 2.5^{**}$	$29.0 \pm 0.4$
PLN ( $\times 10^5$ )	$11.4 \pm 0.5$	$9.5 \pm 0.6$	$18.7 \pm 0.3^{***}$	$20.8 \pm 1.8^{***}$
Spleen ( $\times 10^6$ )	$27.8 \pm 2.7$	$57.4 \pm 5.3$	$23.3 \pm 3.3^{***}$	$28.0 \pm 0.1^{***}$

### 4. CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포 수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $1.5 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $10.4 \pm 1.5$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT

400 mg/kg 투여군은  $3.7 \pm 0.2$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $4.2 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 4).

### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포수를 측정한 결과, 정상군은  $1.6 \pm 0.0$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $8.2 \pm 0.6$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $4.8 \pm 1.6$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $3.1 \pm 0.7$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 4).

### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포수를 측정한 결과, 정상군은  $1.3 \pm 0.3$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $3.8 \pm 0.9$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $1.9 \pm 0.5$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $2.4 \pm 0.0$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 감소효과를 나타내었다(Table 4).

**Table 4. Effect of CPHDT Extract on CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice**

CD3 <sup>+</sup> /CCR3 <sup>+</sup> absolute cell number			
	WT	Control	CPHDT-400
Lung ( $\times 10^5$ )	$1.5 \pm 0.1$	$10.4 \pm 1.5$	$3.7 \pm 0.2^{***}$
PLN ( $\times 10^5$ )	$1.6 \pm 0.0$	$8.2 \pm 0.6$	$4.8 \pm 1.6^*$
Spleen ( $\times 10^6$ )	$1.3 \pm 0.3$	$3.8 \pm 0.9$	$1.9 \pm 0.5$
			$2.4 \pm 0.0$

### 5. CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포 수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $0.4 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $5.8 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $2.4 \pm 0.2$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $1.8 \pm 0.2$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 5).

#### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $2.3 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $10.1 \pm 1.3$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $2.2 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $7.2 \pm 2.7$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 5).

#### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포로부터 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $1.5 \pm 0.2$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $5.1 \pm 0.1$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $1.7 \pm 0.3$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $2.8 \pm 0.6$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 5).

**Table 5. Effect of CPHDT Extract on CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice**

CD3 <sup>+</sup> /CD69 <sup>+</sup> absolute cell number			
	WT	Control	CPHDT-400
Lung ( $\times 10^5$ )	$0.4 \pm 0.1$	$5.8 \pm 0.3$	$2.4 \pm 0.2^{**}$
PLN ( $\times 10^5$ )	$2.3 \pm 0.3$	$10.1 \pm 1.3$	$2.2 \pm 0.3^{**}$
Spleen ( $\times 10^6$ )	$1.5 \pm 0.2$	$5.1 \pm 0.1$	$1.7 \pm 0.3^{**}$
			$2.8 \pm 0.6^{**}$

### 6. CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포 수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포에서 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $0.7 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $0.9 \pm 0.4$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $1.6 \pm 0.4$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $1.2 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ( $p<0.05$ ) 증가 효과를 나타내었다(Table 6).

#### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포에서 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $2.8 \pm 0.5$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $2.0 \pm 0.6$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $4.9 \pm 1.1$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $4.9 \pm 0.7$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ) 증가 효과를 나타내었다(Table 6).

#### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포에서 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $0.9 \pm 0.0$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $0.3 \pm 0.2$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $0.8 \pm 0.0$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $0.8 \pm 0.1$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ) 증가 효과를 나타내었다(Table 6).

**Table 6. Effect of CPHDT Extract on CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice**

CD4 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup> absolute cell number			
	WT	Control	CPHDT-400
Lung ( $\times 10^5$ )	$0.7 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.4$	$1.6 \pm 0.4^*$
PLN ( $\times 10^5$ )	$2.8 \pm 0.5$	$2.0 \pm 0.6$	$4.9 \pm 1.1^*$
Spleen ( $\times 10^6$ )	$0.9 \pm 0.0$	$0.3 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.0^{**}$
			$0.8 \pm 0.1^{**}$

### 7. CD4<sup>+</sup> 세포수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포에서 CD4<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $1.4 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $13.0 \pm 0.8$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $4.7 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $5.2 \pm 0.8$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 7).

#### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포에서 CD4<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $24.8 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $57.9 \pm 3.2$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $39.2 \pm 4.6$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $41.0 \pm 8.0$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 7).

#### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포에서 CD4<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $5.2 \pm 1.5$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $17.8 \pm 4.2$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $4.2 \pm 0.5$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $5.0 \pm 0.6$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 7).

**Table 7. Effect of CPHDT Extract on CD4<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice**

CD4 <sup>+</sup> absolute cell number		WT	Control	CPHDT-400	CPHDT-200
Lung ( $\times 10^5$ )	1.4 ± 0.1	13.0 ± 0.8	4.7 ± 0.3***	5.2 ± 0.8***	
PLN ( $\times 10^5$ )	24.8 ± 0.3	57.9 ± 3.2	39.2 ± 4.6**	41.0 ± 8.0*	
Spleen ( $\times 10^6$ )	5.2 ± 1.5	17.8 ± 4.2	4.2 ± 0.5**	5.0 ± 0.6**	

### 8. CD8<sup>+</sup> 세포수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 CD8<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $0.7 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $4.9 \pm 0.6$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $3.4 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $3.5 \pm 0.6$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ( $p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 8).

#### 2) PLN

PLN에서 분리한 CD8<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $17.5 \pm 1.0$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $24.5 \pm 1.7$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $23.5 \pm 4.1$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $24.6 \pm 3.9$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다(Table 8).

#### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 CD8<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $21.3 \pm 1.0$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $31.2 \pm 2.3$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $18.0 \pm 4.2$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $20.5 \pm 1.3$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 8).

**Table 8. Effect of CPHDT Extract on CD8<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice**

CD8 <sup>+</sup> absolute cell number		WT	Control	CPHDT-400	CPHDT-200
Lung ( $\times 10^5$ )	0.7 ± 0.1	4.9 ± 0.6	3.4 ± 0.1*	3.5 ± 0.6	
PLN ( $\times 10^5$ )	17.5 ± 1.0	24.5 ± 1.7	23.5 ± 4.1	24.6 ± 3.9	
Spleen ( $\times 10^6$ )	21.3 ± 1.0	31.2 ± 2.3	18.0 ± 4.2 **	20.5 ± 1.3***	

### 9. B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포 수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포로부터 B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수를 측정한 결과, 정상군은  $0.6 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $10.3 \pm 0.5$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $2.3 \pm 0.0$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $5.9 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 9)

#### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포로부터 B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수를 측정한 결과, 정상군은  $0.3 \pm 0.2$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $6.7 \pm 1.7$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $3.2 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $2.0 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 9)

#### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포로부터 B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수를 측정한

결과, 정상군은  $1.7 \pm 0.2$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $7.7 \pm 1.6$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $2.1 \pm 0.5$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $3.3 \pm 0.5$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ,  $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 9).

**Table 9. Effect of CPHDT Extract on B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice**

B220 <sup>+</sup> /IgE <sup>+</sup> absolute cell number		WT	Control	CPHDT-400	CPHDT-200
Lung ( $\times 10^5$ )	0.6 ± 0.1	10.3 ± 0.5	2.3 ± 0.0***	5.9 ± 0.3***	
PLN ( $\times 10^5$ )	0.3 ± 0.2	6.7 ± 1.7	3.2 ± 0.3*	2.0 ± 0.1**	
Spleen ( $\times 10^6$ )	1.7 ± 0.2	7.7 ± 1.6	2.1 ± 0.5**	3.3 ± 0.5**	

### 10. NK<sup>+</sup> 세포수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포로부터 NK<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $0.7 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $3.3 \pm 0.2$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $2.4 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $2.3 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 10).

#### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포로부터 NK<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $0.3 \pm 0.0$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $0.1 \pm 0.0$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $0.5 \pm 0.2$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $0.3 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 200 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 ( $p<0.01$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 10).

#### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포로부터 NK<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $2.2 \pm 0.4$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $3.2 \pm 0.6$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $2.5 \pm 0.4$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $2.1 \pm 0.5$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 감소하였으나 통계학적 유의성은 보이지 않았다(Table 10).

**Table 10. Effect of CPHDT Extract on NK<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice**

NK <sup>+</sup> absolute cell number		WT	Control	CPHDT-400	CPHDT-200
Lung ( $\times 10^5$ )	0.7 ± 0.1	3.3 ± 0.2	2.4 ± 0.1**	2.3 ± 0.1*	
PLN ( $\times 10^5$ )	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1**	
Spleen ( $\times 10^6$ )	2.2 ± 0.4	3.2 ± 0.6	2.5 ± 0.4	2.1 ± 0.5	

### 11. CD3<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> 세포 수에 미치는 영향

#### 1) Lung

Lung에서 분리한 세포에서 CD3<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $0.2 \pm 0.1$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $2.7 \pm 0.6$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $0.6 \pm 0.0$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $1.2 \pm 0.3$  ( $\times 10^5$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 11).

#### 2) PLN

PLN에서 분리한 세포에서 CD3<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $1.4 \pm 0.0$  ( $\times 10^5$ ), 대조군은  $5.0 \pm 0.7$  ( $\times 10^5$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $2.0 \pm 0.4$  ( $\times 10^5$ ), 200 mg/kg 투여군은  $1.7 \pm 0.4$  ( $\times 10^5$ )으로 대조군에 비하여 CPHDT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 11)

### 3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포에서 CD3<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> 세포 수를 측정한 결과, 정상군은  $0.9 \pm 0.3$  ( $\times 10^6$ ), 대조군은  $4.9 \pm 0.5$  ( $\times 10^6$ ), CPHDT 400 mg/kg 투여군은  $1.2 \pm 0.1$  ( $\times 10^6$ ), 200 mg/kg 투여군은  $0.9 \pm 0.2$  ( $\times 10^6$ )으로 나타나, 대조군에 비하여 CPHDT 모든 농도에서 유의성 있는 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) 감소 효과를 나타내었다(Table 11).

Table 11. Effect of CPHDT Extract on CD3<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> Absolute Cell Number in Lung, PLN and Spleen of Murine OVA-induced Mice

	CD3 <sup>+</sup> /DX5 <sup>+</sup> absolute cell number			
	WT	Control	CPHDT-400	CPHDT-200
Lung ( $\times 10^5$ )	$0.2 \pm 0.1$	$2.7 \pm 0.6$	$0.6 \pm 0.0^{***}$	$1.2 \pm 0.3^{**}$
PLN ( $\times 10^5$ )	$1.4 \pm 0.0$	$5.0 \pm 0.7$	$2.0 \pm 0.4^{**}$	$1.7 \pm 0.4^{***}$
Spleen ( $\times 10^6$ )	$0.9 \pm 0.3$	$4.9 \pm 0.5$	$1.2 \pm 0.1^{***}$	$0.9 \pm 0.2^{***}$

## 고 찰

東醫寶鑑<sup>20)</sup>에서는 喘息에 대한 병기 및 증상에 대하여 “喘急者 氣因火鬱而成, 痰在肺胃也. 喘者 火氣甚, 則氣盛而息急也. 呼吸急促者 謂之喘, 喉中有聲響者 謂之哮. 虛者 氣乏身冷, 痰如水, 實者 氣壯胸滿 身熱便硬”이라 언급하였으며, 風寒喘, 痰喘, 氣喘, 火喘, 水喘, 久喘, 胃虛喘 및 隱虛喘 등으로 세분화하였다. 역대 문헌에 나타난 喘息에 대한 병인, 병기 및 치료법에 대한 내용<sup>47)</sup>을 살펴보면 이 역시 동의보감에 기술된 내용과 큰 차이가 없다.

최근 실험적 연구를 살펴보면, 단미 약물에 있어서는 定喘化痰, 清肺瀉熱, 消風散寒 작용이 있는 약물과 二陳湯加味方 및 地黃湯加味方이 주를 이루고 있다. 특히 처방의 선택에 있어서 二陳湯加味方が 빈용된 까닭은 천식에서 나타나는 점액의 과분비, 기도의 자극감수성과 가스 교환의 비정상으로 인한 기침, 객담, 천명음과 호흡곤란 등의 증상이 이차적 병리 산물인 痰飲에 기인한 것으로 인식하고 있기 때문이다.

본 加味清肺化痰湯 역시 祛痰의 대표적인 二陳湯에 消散風熱 작용이 있는 葛根, 柴胡<sup>21)</sup>와 清熱化痰 止咳 平喘 작용이 있는 杏仁, 款冬花, 桔梗, 桑白皮<sup>21)</sup> 및 活血祛瘀 작용이 있는 皂角刺<sup>21)</sup> 등이 가미된 처방이다. 임상에서는 주로 급성기에 热痰이 동반된 경우에 사용된다.

따라서 본 연구에서는 이미 임상에서 유의성 있는 결과가 보고된 加味清肺化痰湯에 대한 작용 기전을 실험적으로 규명하고, 이를 토대로 신규 항천식 치료 처방에 대한 연구를 지속하고자 동물 병태 모델을 이용하여 효능을 검색하였다.

실험은 C57BL/6 mouse에 ovalbumin (OVA)으로 알레르기 성 천식을 유발한 후 기관지 천식 유발 생쥐의 lung, PLN,

spleen을 분리하여 세포 손상, 기관지 천식 관련 활성 면역세포에 대한 영향을 검색하였다.

먼저 OVA를 투여하여 기관지 천식을 유도하고, lung, PLN, spleen을 분리하여 세포수를 측정하였는데, 모든 실험에서 총 세포 수가 감소하는 것으로 나타나 CPHDT에 의해 기관지 천식에 관한 면역 반응이 감소함을 간접적으로 확인할 수 있었다(Fig. 2-4).

만성 염증 반응 등의 면역 반응에는 수많은 면역세포와 염증세포, 각종 화학매개체의 의해 유발된다. 이러한 염증 반응에 관여하는 주된 세포로는 T cell, B cell, 비만세포, 호산구, 호중구 등이 있다.

T cell은 면역 반응을 결정하는 가장 중요한 세포이며, 항체를 생산하는 B cell에 작용하여 항체의 생산 및 대식세포에 작용하여 대식세포를 활성화시키기도 하고, 세포독성 (cell toxicity) T 림프구에 작용하여 그들을 활성화시킨다<sup>22)</sup>. T cell의 membrane molecule로 CD3은 T cell receptor에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하며, T cell의 결정 표지인자이다<sup>23)</sup>. 특히 CD3<sup>+</sup> 세포 수는 T cell의 활성 지표로, FACS를 이용한 본 실험에서 기관지 천식 유발 생쥐의 lung, PLN, spleen내의 CD3<sup>+</sup> 세포 수는 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다(Table 2). 또한, 항원에 의해 자극을 받으면 Th2 세포는 IL-4를 분비하여 B cell의 IgE 생산을 촉진시키는데 B cell의 표면에 발현되는 molecule로 CD19는 B cell의 분화 단계에서 발현되었다가 항체 생성 plasma B cell 단계에서 소실된다<sup>24)</sup>. 이러한 CD19<sup>+</sup> 세포 역시 B cell의 지표인 까닭에 FACS로 검색한 결과, CPHDT에 의한 기관지 천식 유발 생쥐의 lung, PLN, spleen에서의 CD3<sup>+</sup> 세포 수가 유의성 있게 감소함을 확인할 수 있었다(Table 3).

CCR3 수용체는 호산구, 호염기구 및 T 림프구 등의 세포 표면에 존재하는 chemokine receptor로 eotaxin이라는 chemokine에 의해 활성화 되며<sup>25)</sup>, CD69는 활성화된 T cell과 B cell, 대식세포 (macrophage), NK 세포에 분포한다<sup>26)</sup>. 면역능의 지표인 이러한 CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포와 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수의 평가에서는 CPHDT에 의해 lung, PLN, spleen내 세포수가 감소함을 확인할 수 있었다(Table 4,5).

T 세포는 세포독성 T 세포와 보조 T 세포로 나누어지는데, 세포독성 T 세포 표면에 CD8 분자를 가지고 있으며 보조 T 세포 표면에 CD4 분자를 가지고 있다. 일반적으로 면역 반응이 활성화될 때 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포가 증가하는데, 본 실험에서는 CPHDT에 의해 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> 세포수가 증가함을 확인할 수 있었다. CD4<sup>+</sup> T 세포는 Th 세포로 분화하며 분화된 Th 세포들이 IL-4를 생성하여 B 세포가 IgE를 생성하도록 유도한다<sup>27)</sup>. CD4<sup>+</sup> T 세포 수를 측정한 결과, 세포수가 감소하였는데(Table 6,7), 이는 IgE 생성 억제 효과와 직접적인 관계가 있는 것으로 사료된다. 또한 CD8<sup>+</sup> 세포는 TC cell로 분화하여 cytotoxic T lymphocyte (CTL)라는 effector cell을 형성하고 CTL은 cytokine을 분비하기보다는 cytotoxic activity를 가지고 있는 altered self-cell을 제거하는 역할을 하는데<sup>28)</sup>, 이 역시 CPHDT에 의해 세포 수가 감소함을 확인할 수 있었다(Table 8).

B cell의 표면에서 발현되는 분자인 B220<sup>+</sup>(CD 45)은 사람에

게는 존재하지 않지만 마우스의 B cell 표면에 존재하며 B cell의 표식자로 이용된다<sup>29)</sup>. 또한 항원에 의해 자극을 받으면 Th2 세포는 IL-4를 분비하여 B cell의 IgE 생산을 촉진시키는데<sup>30)</sup>, 본 실험에서 B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수는 CPHDT에 의해 감소함을 확인할 수 있었다(Table 9).

알레르기 천식에서 관찰되는 기도의 염증은 기능성 T 림프구에서 분비되는 여러 사이토카인의 작용에 기인한다<sup>31,32)</sup>. 이 중 IL-4와 IL-5 등의 Th2 사이토카인은 천식의 가장 중요한 특징이라고 할 수 있는 호산구 폐 이동을 유발시키는 데 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>33,34)</sup>. Naive T 림프구가 기능성 T 림프구로 분화하기 위해서는 항원제시세포를 통한 항원의 인지와 미세 환경 내에 존재하는 사이토카인에 의한 자극이 필요하다<sup>35,36)</sup>. 미세 환경내에 존재하는 사이토카인은 선천성 면역을 담당하는 면역 세포에서 분비되는 것으로 추정되며 이에는 NK 세포, T 림프구 등이 제시되었다<sup>37-39)</sup>. 자연살해세포 (Natural killer cell : 이하 NK 세포)는 원래 MHC-비제한적, 혹은 항체의 존성 세포독성작용(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: 이하 ADCC)으로 표적세포를 살해하는 면역계의 방어 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 세포이다<sup>30)</sup>. 하지만 최근 이러한 세포 살해기능 이외에 바이러스나 세포내 세포에 대한 조기면역작용, 감염에 대한 T세포 반응 조절, 조혈작용, B세포에 대한 면역글로불린의 합성 조절에 대한 역할 등 다양한 면역계에서의 기능이 보고되고 있다. 이러한 다양한 기능들이 세포에서 생성되는 여러 가지 cytokines에 의하여 조절되고 있으며, 특히 NK 세포에서 생성되는 많은 양의 IFN-γ는 Th1혹은 Th2 면역반응의 결정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>40,41)</sup>. 또한 NK 세포 중 T 세포와 NK 세포의 표지자가 동시에 발현되는 NKT 세포의 존재가 발표된 이후 T 세포와 NK 세포의 근원에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있으며, 이들의 IgE 조절에서의 역할에 대하여 특히 새로운 관심이 높아지고 있다<sup>42)</sup>. 특히 사람의 NKT 세포는 IL-4 와 IFN-γ를 생성할 수 있는 것으로 보고 되어 NKT 세포에 의한 Th2 반응의 조절 가능성이 제기되었다<sup>43)</sup>. 본 실험에서 NK 세포 수와 NKT 세포의 표지인 CD3<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> 세포수는 CPHDT에 의해 감소가 나타났는데(Table 10, 11), 이같은 결과는 IL-4와 IL-5 등의 Th2 사이토카인의 감소에 기인한 것으로, CPHDT의 기관지 천식에 대한 효과를 증명하는 것으로 사료된다.

## 결 론

加味清肺化痰湯의 면역 조절을 통한 항천식 효과를 실험적으로 규명하고자, C57BL/6 mouse에 ovalbumin (OVA)으로 알레르기성 천식을 유발한 후 기관지천식 활성 면역세포 변화를 검색하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

加味清肺化痰湯은 기관지천식 동물 모델의 total lung, peripheral lymph node, spleen cell 수를 400 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 감소시켰다. 加味清肺化痰湯은 기관지 천식 동물 모델의 lung, peripheral lymph node, spleen에서 분리한 CD3<sup>+</sup>,

CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>를 400 mg/kg 투여군에서 모두 유의성 있게 감소시킨 반면, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>는 peripheral lymph node, spleen에서만 모든 실험 농도에서 유의성 있게 증가시켰다. 加味清肺化痰湯은 기관지 천식 동물 모델의 lung, peripheral lymph node, spleen에서 분리한 CD3<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/DX5<sup>+</sup> 세포수를 모든 실험 농도에서 유의성 있게 감소시켰으며, CD8<sup>+</sup>은 lung, spleen에서만 모든 실험 농도에서 유의성 있게 감소시켰다. 加味清肺化痰湯은 기관지 천식 동물 모델의 lung에서 분리한 NK<sup>+</sup> 세포수를 모든 실험 농도에서, peripheral lymph node에서 분리한 NK<sup>+</sup> 세포수를 200 mg/kg 투여군에서 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 加味清肺化痰湯의 항천식, 항알레르기 작용이 인정되어, 특이적인 새로운 항 천식 치료에 면역약물학적 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 보이며, 항 후 cytokines, IgE, histamine 생성량 및 조직학적 변화 등의 유관 실험을 통해 본 실험 결과와의 상호 관계에 대한 규명이 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국산업기술평가원에서 지원하는 지역협력연구센터 과제인 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학 연구센터(TBRC, RRC04700, 2005)의 지원에 의해 수행되었음을 밝히며 이에 감사합니다.

## 참고문헌

1. 대한 천식 및 알레르기 학회 : 천식과 알레르기 질환, 군자출판사, pp 244-254, 2002.
2. 전국의과대학교수 역 : 오늘의 진단 및 치료, 도서출판 한우리, pp 287-296, 1999.
3. 김영호 외 : 소아 천식 유지법 실태와 천식 환자와 가정생활에 미치는 영향에 대한 조사. 소아 알레르기 및 호흡기 학회지 15권 4호. 2005.
4. 전국한의과대학폐계내과학교실 편저 : 동의폐계내과학, 한문화사, pp 162-202, 2002.
5. 금관수. 天門冬이 氣管支 喘息 動物模型의 免疫反應에 미치는 影響, 상지대학교대학원 석사학위논문, 2002.
6. 이명부 외. 長江醫脈, 북경과학기술출판사, pp 185-197, 1989.
7. 종의연구원. 종의증상감별진단학, 인민위생출판사, pp 229-233, 1987.
8. 박광운. 千繕導痰湯이 喘息에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究, 경희대학교대학원 석사학위논문, 1993.
9. 노성수. rmIL-5로 유도된 호산구의 활성화 및 성장에서 백골채의 천식반응 억제효과, 대전대학교대학원 석사학위논문, 2005.
10. 문성훈. 牡丹皮가 喘息유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향, 경희대학교대학원 한의학과 박사학위논문, 2005.

11. 조철준. 黃芩이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. 대전대학교대학원 석사학위논문, 2005.
12. 김성수 외. 桔梗에 의한 알레르기 천식 효과에 대한 연구. 원광대학교대학원 원한의학과 박사학위논문, 2004.
13. 이해자. 青皮가 천식유발 백서에서 VEGF에 미치는 영향. 원광대학교대학원한의학과 박사학위논문, 2004.
14. 김문수. 加味解表二陳湯이 알레르기 喘息 白鼠의 呼吸 樣相과 氣管 組織에 미치는 影響, 동의대학교대학원한의학과 석사학위논문, 2001.
15. 염종훈 외. 정천탕과 정천탕가감방이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지, 24(1):169-180, 2003.
16. 김진주 외. 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지, 23(1):37-49, 2002.
17. 송재진. 半夏가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. 대전대학교대학원 박사학위논문, 2005.
18. 송상진. 皂角刺가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. 대전대학교대학원 박사학위논문, 2005.
19. 한영주. 감초가 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 Cytokine에 미치는 효과. 대한한방내과학회지, 25(3):408-417, 2004.
20. 허준. 동의보감, 범인문화사, pp 2323-2356, 2005.
21. 全國韓醫科大學本草學教授 공편. 本草學, 永林社, p 148, 149, 460, 478, 482, 484, 1991.
22. Griffiths, P.D., Grundy, J.E. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J.* 241:313-324, 1987.
23. Bromberg, J.S. The biology of CD2: adhesion, transmembrane signal, and regulatory receptor of immunity. *J Surg Res.* 54:258-267, 1993.
24. Hardy, R.R., Hayakawa, K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol.* 19:595-621, 2001.
25. Erin, E.M., Williams, T.J., Barnes, P.J., Hansel, T.T. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 1:201-214, 2002.
26. Sancho, D., Gomez, M., Sanchez-Madrid, F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26:136-140, 2005.
27. Hoglund, P. Induced peripheral regulatory T cells: the family grows larger. *Eur J Immunol.* 36:264-266, 2006.
28. Laky, K., Fleischacker, C., Fowlkes, B.J. TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development. *Immunol Rev.* 209:274-283, 2006.
29. Dorshkind, K., Narayanan, R., Landreth, K.S. Regulatory cells and cytokines involved in primary B lymphocyte production. *Adv Exp Med Biol.* 323:119-123, 1992.
30. Driver, D.J., McHeyzer-Williams, L.J., Cool, M., Stetson, D.B., McHeyzer-Williams, M.G. Development and maintenance of a B220-memory B cell compartment. *J Immunol.* 167:1393-1405, 2001.
31. Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham, S.R., Kay, A.B. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 326:298-304, 1992.
32. Watanabe, A., Mishima, H., Renzi, P.M., Xu, L.J., Hamid, Q., Martin, J.G. Transfer of allergic airway responses with antigen-primed CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells in brown Norway rats. *J Clin Invest.* 96:1303-1310, 1995.
33. Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Chensue, S.W., Kunkel, S.L. interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 10:526-532, 1994.
34. Foster, P.S., Hogan, S.P., Ramsay, A.J., Matthaei, K.I., Young, I.G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med.* 183:195-201, 1996.
35. Tsuyuki, S., Tsuyuki, J., Einsle, K., Kopf, M., Coyle, A.J. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med.* 185:1671-1679, 1997.
36. Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 145:3796-3806, 1990.
37. Fearon, D.T., Locksley, R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 272:50-53, 1996.
38. Bendelac, A., Fearon, D.T. Innate pathways that control acquired immunity. *Curr Opin Immunol.* 9:1-3, 1997.
39. Medzhitov, R., Janeway, C.A. Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91:295-298, 1997.
40. Biron, C.A. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol.* 9:24-34, 1997.
41. Scharton-Kersten, T.M., Sher, A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr Opin Immunol.* 9:44-51, 1997.
42. Yoshimoto, T., Bendelac, A., Watson, C., Hu-Li, J., Paul, W.E. Role of NK1.1<sup>+</sup> T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science.* 270:1845-1847, 1995.
43. Prussin, C., Foster, B. TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J Immunol.* 159:5862-5870, 1997.