대한한방내과학회지 제27권 2호(2006년 6월)
Korean J. Orient.Int. Med. 2006;27(2)521-532

加味淸上補下湯 열수 및 에탄올 추출물이 천식 관련 cytokine 분비에 미치는 영향

정승연, 이성헌, 황준호, 이건영, 김진주, 정희재, 이형구, 정승기
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

The inhibitory effects of hot water and ethanol extract of Gamichungsangbohatang on cytokines related to ashtma

Seung-Yeon Jeong, Sung-Hun Lee, Joon-Ho Hwang, Kun-Young Lee, Jin-Ju Kim, Hee-Jae Jung, Hyung-Koo Rhee, Sung-Ki Jung
Division of Respiratory System, Deptartment of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Backgrounds and Objectives: A major goal in asthma therapy isto reduce or prevent the inflammatory response associated with bronchial hyperresponsiveness, reversible airway obstruction and airway remodelling. Many studies have shown that eosinophilic infiltration is a prominent feathure in the pathophysiology of asthma. The importance of the presence of eosinophils in the airways of asthmatics has long been recognized, but the mechanism by which these cells are recruited and retained in the lung are only now being elucidated. Production of chemotactic cytokines by bronchial epithelial cells may contribute to the local accumulation of eosinophils in patients with bronchial asthma.

This study was designed to investigate the inhibitory effect of extraction of herbal dicoction, Gamichungsangbohatang(GMCSBHT) on eosinophil chemotactic cytokines .

Material and Methods: We used water and 70% ethanol extracts of GMCSBHT and pulmonary epithelial cell lines A549(human type Ⅱ-like epithelial cells).

We estimated cytotoxic effects of GMCSBHT, and estimated the effects of water and 70% ethanol extracts of GMCSBHT on chemokines from prestimulated A549 cells by sandwich ELISA.

Results: Chemokines of eotaxin, IL-8 were inhibited by GMCSBHT in dose-dependent manner. And ethanol extract of GMCSBHT has more inhibitory effects on eotaxin, IL-8 than hot water extract.

Conculusions: These findings indicate that the supression of the expression of chemokines can be accomplished by GMCSBHT treatment, so GMCSBHT may inhibit the inflammatory process by eosinophils in asthma.

Key Words: Gamichungsangbohatang(GMCSBHT), eosinophil, asthma, cytokine

· 접수일 : 2006년 6월 1일 · 채택일 : 2006년 6월 20일
· 교신저자 정승기 서울시 동대문구 회기동 1
경희의료원 한방5내과 의사실
전화 : 02-958-9147 Fax : 02-958-9148
E-mail : jskes@unitel.co.kr

Ⅰ. 緖 論

기관지천식(이하 천식)은 병리적으로 많은 세포와 세포성 요소들이 역할을 하는 만성 염증성 기도질환이다. 만성 염증은 기도의 과민성을 야기하며 반복적으로 재발되는 천명, 호흡곤란, 가슴 조임, 기침 등의 증상을 일어나게 한다. 이들은 흔히 자연적으로 혹은 치료에 의해서 종종 가역적인 광범위하지만 다양한 기류 제한과 관련이 있다[1].

천식 관련 주된 염증 세포들은 림프구, 호산구, 비만세포, 항원제시세포 등으로, 점액의 과분비, 상피하 그물층의 비후, 평활근의 비후등과 같은 기도에서의 병리학적 변화는 기도 조직에서 이러한 염증 세포들의 직접적인 영향 때문이다[2].

특히 천식에 있어서 병변 부위로 이동한 호산구는 독성이 강한 과립성 물질을 배출함으로써 과민성 반응을 유도하고 기도점막을 파괴하여 기도 염증반응에서 핵심적 역할을 한다. 천식 치료에 있어서 주요 목표가 기관지 과민성, 가역적 기도 폐색 및 기도개형과 관련된 염증 반응을 감소시키거나 억제하는데에 있으므로 호산구의 조직 이동을 차단하는 것은 알레르기 질환의 중요한 치료 전략이며, 현재 호산구의 선택적 침윤 기전의 규명은 천식 분야의 핵심연구과제이기도 하다[3].

말초혈액에서 기도로 호산구가 선택적으로 모여드는 현상은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 호산구의 화학주성 및 혈관내피세포와 세포외 기질에 호산구가 선택적으로 유착됨으로써 일어난다. Cytokine은 호산구의 증식과 분화에 중요 역할을 하며 화학주성을 조절하게 되는데 천식의 병태생리 규명에 있어서 국소적 호산구 집결에 관여하는 중요 autocrine pathway를 형성하여 호산구 유인 및 염증 유발 기능 활성화에 핵심 역할을 하는 eotaxin을 비롯하여 Regulated on Activation in Normal T cell expressed(RANTES), macrophage inflammatory protein(MIP)-1α, monocyte chemotactic protein(MCP)-3, IL-8 등의 chemokine과 IL-3, IL-5, granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)와 같은 호산구에 선택적인 cytokine들의 중요성이 부각되고 있다[4,5].

加味淸上補下湯 엑기스제는 임상적 효과가 보고된 淸上補下湯[6-8]에 熟地黃, 山藥, 山茱萸를 증량한 뒤 열수추출에 의한 엑스과립제로 가공한 것으로 각종 임상연구[9-12]에서 기관지 천식 환자에 대한 유효성이 보고되었으나 그 기전에 대해서는 아직 확실히 규명되지 않았다. 이에 저자는 加味淸上補下湯의 천식 치료 효과에 대한 기전을 연구하기 위하여 천식 발병 주요 원인으로 작용하는 호산구의 유도와 연관된 cytokine인 eotaxin과 IL-8을 중심으로 실험을 진행하였고 엑기스제 가공과정 중 추출방법에 대한 효능 비교를 하기 위하여 加味淸上補下湯 열수추출물과 에탄올추출물 각각의 효과 또한 확인하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용된 加味淸上補下湯의 처방구성은 아래와 같다(Table. 1).

2) 세포주

본 실험에 사용된 A549(human type Ⅱ-like epithelial cells) cell은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받은 세포주이다.

2. 방 법

1) 약물의 조제

추출은 에탄올(이하 EtOH)과 3차 증류수(이하 DW)를 이용한 2가지 종류의 추출물로 실험하였다.

① EtOH 추출물 : 加味淸上補下湯 5貼 분량인 총 335g의 한약재를 분쇄기로 갈아서 약재

의 5배 중량에 해당하는 EtOH에 넣고 1주일간 추출한 후 여과하여 환류농축기로 농축시켰다. 농축액을 -80℃에서 24시간 동안 얼린 후 동결건조를 통하여 81.54g(yield:21.4%)의 에탄올 추출 분말시료를 얻었다.

② DW 추출물 : 加味淸上補下湯 5貼 분량인 총 335g의 한약재를 분쇄기로 갈아서 약재의 10배 중량에 해당하는 DW에 넣고 3시간동안 끓여서 추출한 후 환류농축기로 농축시켰다. 농축액을 -80℃에서 24시간 동안 얼린 후 동결건조를 통하여 51.08g (yield:15.5%)의 물 추출 분말시료를 얻었다.

Table. 1. Contents of Gamichungsangboha-tang

Herb	Scientific Name	Dose(g)
熟地黃	*Rehmannia Radix Vaporata*	8.0
山 藥	*Disocoreae Radix*	6.0
山茱萸	*Corni Fructus*	6.0
白茯苓	*Hoelen*	4.0
牧丹皮	*Moutan Cortex Radicis*	4.0
澤 瀉	*Alismatic Radix*	4.0
五味子	*Maximowiczziae Fructus*	3.0
天門冬	*Asparagi Radix*	3.0
麥門冬	*Liripis Tuber*	3.0
貝 母	*Fritillarriae Rhizoma*	3.0
瓜蔞仁	*Trichosanthis Semen*	3.0
杏 仁	*Ansu Seman*	3.0
半夏(薑製)	*Pinelliae Rhizoma*	3.0
枳 實	*Aurantii Immaturus Fructus*	3.0
桔 梗	*Platycodi Radix*	3.0
黃 芩	*Scutellariae Radix*	3.0
黃 連	*Coptidis Rhizoma*	3.0
甘 草	*Glycyrrhizae Radix*	2.0
Total amount		67.0g

2) 세포배양 및 세포 독성 확인

본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% FBS (JRH BIOSCIENCES, U.S.A.), 1% penicillin/streptomycin (BD Bioscience, U.S.A.) 10mM HEPES (JRH BIOSCIENCES, U.S.A.), 2g sodium bicarbonate (JRH BIOSCIENCES, U.S.A.)가 포함된 RPMI-1640 (BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하였다. 먼저 加味淸上補下湯에 대한 세포 독성을 측정하기 위해 배양한 세포를 96-well plate (Corning, U.S.A.)에 2x105cells/well로 seeding한 다음 24시간 동안 배양한 후 加味淸上補下湯 EtOH 추출물과 DW 추출물을 농도별로 1000, 100, 10, 1, 0.1 ㎍/ml 로 배지에 희석하여 100 ㎕씩 well에 첨가하였다. 24시간 동안 방치한 후 MTS solution (Promega, Madison, U.S.A.)을 20㎕씩 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 다음 흡광도 490에서 흡광도를 측정하였다.

3) Sandwitch ELISA

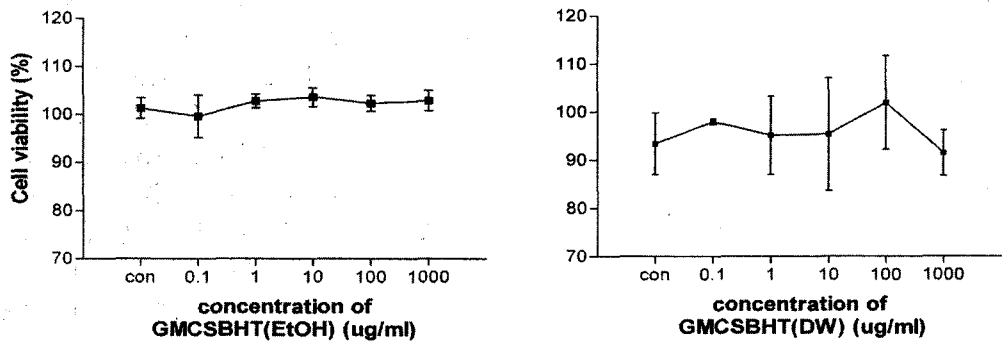

Fig. 1. Identification of A549 cell cytotoxicity for GMCSBHT. Each concentration was assayed in triplication and were measured at 490nm using fluorescence microplate reader.

① 배양한 A549 cell을 5x105 cells/well로 12-well plate (Corning, U.S.A.)에 plating 하여 24시간 배양한 후 serum free media 로 교체한 다음 24시간 방치하고 TNF-α (Biosource, Camarillo, U.S.A.) 25ng/ml과 IL-4(Biosource, Camarillo, U.S.A.) 50ng/ml을 처리하여 eotaxin을 자극하였다. 다시 24시간 배양한 다음 加味淸上補下湯 EtOH 추출물과 DW 추출물을 각각 1000, 100, 10, 1, 0.1㎍/ml의 농도로 배지에 희석 하여 48시간 동안 처리한 후 상등액을 취 하여 eotaxin, IL-8 kit를 이용하여 각각의 cytokine에 대하여 sandwitch ELISA를 실 시하였다.

② eotaxin의 분비량을 측정하기 위하여 96-well plate (Costar, U.S.A.)에 100㎕/well anti-human eotaxin(BD Bioscience, U.S.A.) 을 coating하여 4℃에서 O/N 배양하고 0.05% PBS-tween 20으로 3회 세척한 후 200㎕ Pharmigen's Assay Diluent (BD Bioscience, U.S.A.)로 실온에서 1시간 동안 blocking시켰다. 3회 세척 후 Pharmingen's Assay Diluent에 희석한 standard나 sample 을 100㎕씩 첨가하여 실온에서 2시간 동안 배양한 다음 3회 세척 후 100㎕ anti-eotaxin detection antibody와 Avidin-horseradish peroxidase conjugate를 가하여 1시간 동안 실온에 방치하였다. 7회 세척한 후 100㎕ Tetramethylbenziidine과 Hydrogen peroxide (Pharmingen's TMB Substrate Reagent set, BD Bioscience, U.S.A.)를 첨가하여 30분간 실온에 반응시킨 다음 2N H2SO4 50 ㎕를 첨가하여 반응을 정지시키고 30분 이내에 450 흡광도에서 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

③ IL-8의 분비량을 측정하기 위하여 Human IL-8 Immunoassay Kit(BioSource International, U.S.A.)의 protocol을 이용하 되 Hu IL-8 Antibody가 코팅된 96-well plate(BioSource International, U.S.A.)에 Standard와 Sample을 100㎕씩 분주한 후 Biotin conjugate를 100㎕씩 첨가하고 실온 에서 각각 1시간, 1시간 30분, 3시간 씩 반 응시켰다. Wash buffer로 4번 washing 하고 Streptavidin-HRP Working Solution을 100 ㎕씩 각 well에 첨가하였다. 실온에서 30분 반응 후 wash buffer로 4번 washing 하고 Stabilized Chromogen을 각 well 마다 100 ㎕씩 첨가하였다. 실온의 어두운 곳에서 30 분 동안 반응 한 후 Stop solution을 100 ㎕

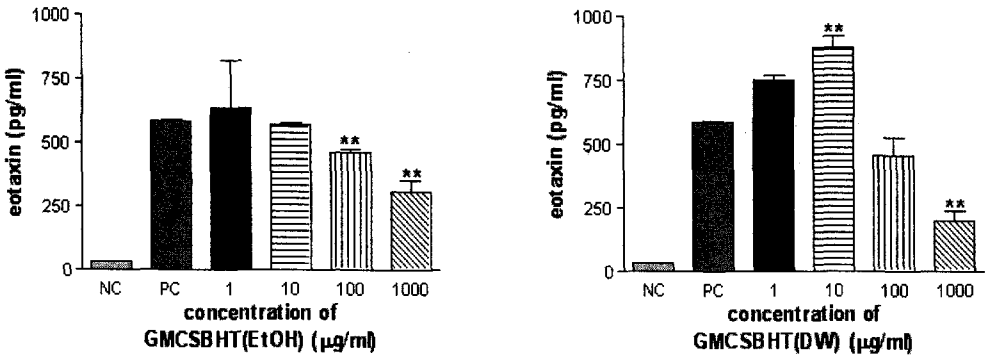

Fig. 2. Eotaxin inhibition effect of GMCSBHT from stimulated A549 cell.

NC: negaive control(only medium)
PC: positive control(stimulation Eotaxin release into the medium was measured by an ELISA.)
* Significant different from control (P<0.05)
** Significant different from control (P<0.01)

씩 첨가 한 후 30분 안에 Micropalte reader (Molecular Devices, U.S.A.)로 450nm에서 읽었다. 이상에서 sample을 제외한 시료는 모두 kit에 포함되어 있는 시약을 사용하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 세포 독성 확인

加味淸上補下湯의 세포 독성을 알아보기 위해 농도별로 처리한 결과 농도에 따른 세포 생존율에 큰 차이가 없는 것으로 보아 A549 cell에 대해 독성은 갖지 않는 것으로 나타났고 본 실험에서 세포 생존율 10%이내의 오차는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다(Fig.1).

2. Eotaxin, IL-8 assay 결과

Eotaxin은 TNF-α(Biosource, Camarillo, U.S.A.)와 IL-4(Biosource, Camarillo, U.S.A.)에 의해 주로 유도되고 IL-8은 TNF-α(Biosource)와 IL-1β (Biosource, Camarillo, U.S.A.)에 의해 발현이 촉진된다고 알려져 있다. 선행 연구[13,14]의 결과 eotaxin을 잘 발현시키는 적절한 농도는 TNF-α (Biosource) 25ng/ml과 IL-4(Biosource) 50ng/ml, IL-8의 경우는 TNF-α(Biosource) 25ng/ml과 IL-1β(Biosource) 10ng/ml 였다.

이에 따라 A549 cell을 Th2 계통의 IL-4, TNF-α, IL-1β cytokine으로 자극한 후 加味淸上補下湯 EtOH 추출물과 DW 추출물로 0.1, 1, 10, 100, 1000 ㎍까지 농도별로 처리한 후 eotaxin, IL-8에 미치는 영향을 살펴본 결과 다음과 같이 나타났다.

1) Eotaxin

加味淸上補下湯의 eotaxin 억제 효과를 Sandwitch ELISA를 통해 측정한 결과 EtOH 추출물에서 100, 1000㎍/ml에서 각각 16%와 44%로 유의하게 eotaxin 억제 효과가 나타났으며, DW 추출물에서는 10㎍/ml에서 예외적으로 eotaxin의 증가가 나타났으나 1000㎍/ml에서는 64%의 eotaxin 억제 효과가 나타났다. 세포 독성 실험에서 加味淸上補下湯이 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으

로 확인했기 때문에 eotaxin에 대한 억제효과가 있는 것으로 판단할 수 있었다(Fig. 2).

2) IL-8

加味淸上補下湯의 IL-8 억제 효과를 Sandwitch ELISA를 통해 측정한 결과 EtOH 추출물의 경우 0.1, 1, 10, 100㎍/ml에서 20% 내외의 IL-8 억제 효과가 있었고 1000㎍/ml에서는 39.3%의 IL-8 억제 효과가 나타났다. DW 추출물은 0.1~100㎍/ml에서 별 효과가 없었으나 1000㎍/ml에서는 28.8%의 IL-8 억제 효과가 있었다(Fig. 3).

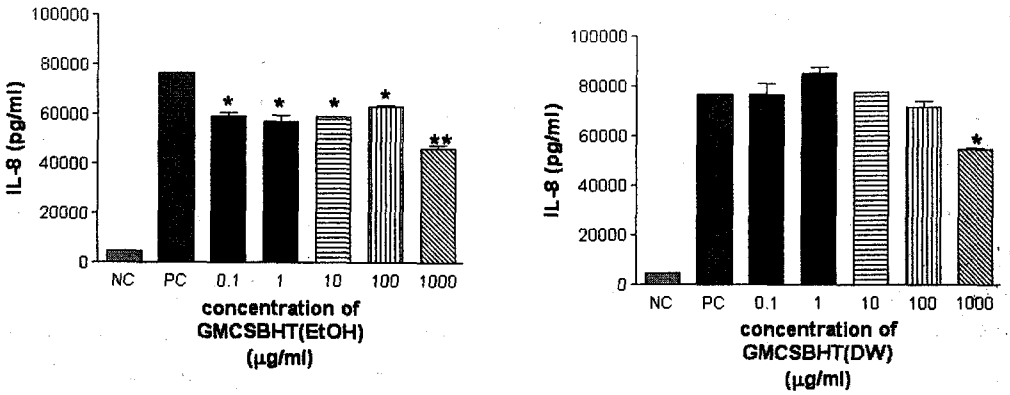

Fig. 3. IL-8 inhibition effect of GMCSBHT from stimulated A549 cell.

NC: negaive control(only medium)
PC: positive control(stimulation IL-8 release into the medium was measured by an ELISA.)
* Significant different from control (P<0.05)
** Significant different from control (P<0.01)

Ⅳ. 考 察

기관지 천식은 알레르겐, 비만세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 약리작용에 의해 발병되거나, 화학매체와 cytokine, 유착분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의해서 발병되는 기도의 만성적 염증 반응으로 이해되고 있다. 천식의 병리에서 기도 염증이 중요시되기 때문에, 천식 치료에서 주목적은 기관지 과민성, 가역적 기도 폐색 및 기도개형과 관련된 염증 반응을 감소시키거나 억제하는데에 있다. 천식에서 주된 염증 세포들은 림프구, 호산구, 비만세포, 항원제시세포 등으로 점액 과분비, 상피하 그물층의 비후, 평활근의 비후등과 같은 기도에서의 병리학적 변화는 기도 조직에서 이러한 염증 세포들의 직접적인 영향 때문이다[2].

그중에서도 호산구의 지속적 존재는 만성 알레르기성 염증의 특징으로, 천식과 알레르기성 비염과 같은 알레르기성 질환에서는 염증 부위에 호산구의 축적이 약 100배 정도까지 증가한다고 한다[15].

알레르기성 염증 부위에 호산구가 선택적으로 모여드는 현상은 우선 모세혈관에서 병변부위로 침윤되는 과정 중 호산구가 혈관내벽세포(endothelial cell)와 유착하고, 이후 화학주성물질(chemoattractant)의 농도에 반응하여 혈관내벽세포를 빠져나와 병변부위로 이동하게 되는 단계를 거친다[3,16].

병변 부위로 이동한 호산구로부터 분비되는 MBP(major basic protein), ECP(eosinophil cationic protein), EPO(eosinophil peroxidase) 등과 같은 매우 독성 강한 단백질과 자유기는 기도 상피의 섬모운동을 억제하고, 상피세포를 탈락시키며, 기도 과민증을 초래한다. 또 활성화된 호산구는 많은 양의 prostaglandin, leukotriene 등을 유리하여 평활근을 수축시키고, 혈관투과성을 증가시켜 알레르겐 흡입 유발시에 조기반응과 후기반응을 일으킨다[17].

Justice 등[18]은 항원에 감작된 쥐에서 호산구를 선택적으로 제거했을시 상피의 비대, 술잔세포의 metaplasia, 점액 생산 등이 감소되고, 기도의 과반응성이 나타나지 않음을 밝혀 호산구가 항원으로 유발된 폐 병리에 직접적인 인과관계가 있음을 입증하였다.

이처럼 호산구가 기관지 염증 과정에서 주요한 역할을 하기 때문에 호산구 동원에 관련된 기전과 분자들을 확인하는 것은 천식의 병태생리를 명확하게 하고 이에 대한 특이적 치료법을 설계하는데 필수적으로 생각된다.

단백 혹은 당단백으로 면역 및 염증 반응을 매개하는 물질인 cytokine은 면역자극에 의하여 생성되어 표적세포에 자가분비 또는 측분비형 자극을 유발하여 자신과 표적세포의 기능 변화를 유도하며 먼 표적기관에 반응하여 내분비형자극을 일으킬 수도 있다. Chemokine은 cytokine 중 화학주성 효과를 갖는 cytokine을 말하는 것으로 알레르기 염증 반응 동안에 백혈구 세포의 이동과 침윤에 관련된 기전에 초점이 맞추어지면서 chemokine은 염증 반응 동안 백혈구의 이동을 조율하는 중요한 인자로서 중요성이 인식되게 되었다.

Chemokine은 순환 백혈구들이 혈류를 떠나 화학주성의 과정을 통해 염증 부위로 이주하도록 유도한다. 또한 호산구, 호염기구 등을 활성화시켜 탈과립을 유도하고 다양한 염증매개체를 분비하게 하여 조직손상 및 염증의 지속을 유발한다. 결과적으로 후기 반응은 chemokine과 관련되어 있다. 그리고 chemokine은 비만세포, 호염기구, 호산구, 호중구를 유인하며 수상세포의 이동의 주요 조절인자로서 알러지 면역 조기 반응 역시 chemokine이 관련되어 있다.

알러지와 천식에 대한 최신 치료는 호산구, 호염기구, Th2 림프구에 의한 조직 침윤과 손상과 같은 알러지성 염증의 주 특징을 저해하거나 감소시킨다는 원리 하에 chemokine과 그 수용체를 목표로 하고 있다[19].

기도 상피세포는 전통적으로 염증 반응의 표적으로 간주되어 왔으나, 단순한 방어벽의 기능만을 가진 것이 아니며, 능동적으로 다양한 화학매체들과 cytokine들을 생산하고 분해함으로써 폐포공간으로 염증 반응을 발전시키거나 해소하도록 조절한다. 폐포 상피 세포에서 chemokine의 생산은 천식 환자에서 염증 세포의 국소 축적에 기여한다. 본 연구에 사용된 type II 폐포 상피세포 계열인 A549 cell은 호산구의 활성에 직간접적으로 영향을 미치는 IL-8, eotaxin 등을 포함한 다양한 chemokine에 대한 mRNA와 immunoreactive protein을 합성한다[20].

加味淸上補下湯은 淸上補下湯에서 熟地黃 4g, 山藥, 山茱萸 각 2g을 증량한 처방이다. 淸上補下湯은 龔廷賢[6]의 壽世保元 哮吼門에 최초로 수록되어 있는 淸上補下丸을 湯劑로 복용할 수 있도록 조제한 方劑로서 주로 上氣, 喘息, 咳嗽, 痰涎壅盛에 이용되는데 肺, 腎의 呼吸機能不足 및 痰으로 인한 哮喘證에 활용할 수 있고, 임상에서 慢性呼吸器疾患 치료에 사용되고 있다. 淸上補下湯은 補陰之劑의 대표방인 六味地黃湯에 滋陰潤燥 淸熱化痰시키는 天門冬, 淸心肺火止渴하는 麥門冬, 開提除肺中風寒 祛痰排膿시키는 桔梗, 除喘咳痰 下氣시키는 杏仁, 斂肺滋腎 久嗽止渴하는 五味子, 淸肺熱而消痰시키는 黃芩, 黃蓮, 潤燥祛痰시키는 貝母, 行氣行血하는 枳實, 除濕化痰시키는 半夏, 淸火除痰 利氣시키는 瓜蔞仁 및 調和解毒시키는 甘草를 가하였

다[21].

이전의 청상보하탕과 加味淸上補下湯에 대한 임상연구를 보면 정[7,8]등은 淸上補下湯에 의한 기관지 천식환자의 임상연구에서 삶의 질(QLQAKA) 및 폐기능 검사상에서 모두 유의한 호전이 있었음을 보고하였고, 약물에 대한 반응도에 있어서 투여 시작부터 투여 2주차까지의 QLQAKA의 호전도가 2주부터 4주까지의 호전도 보다 높게 나타나는 현상으로 淸上補下湯이 기관지 천식의 발병초기 또는 급성기나 실증에도 응용하여 치료효과를 나타낼수 있는 가능성이 있음을 주장했다. 이후에 발표된 정[9]등은 加味淸上補下湯 열수 추출 엑기스제를 사용한 기관지천식 환자 임상연구에서 기존의 한의계의 천식 임상 연구가 환자 집단을 하나의 군으로만 설정하여 중등도에 따른 약물 반응의 차이에 대한 분석이 없었음을 지적하여 GINA 가이드라인에 따른 기관지 천식 환자의 중등도 분류를 통해 각 군에 따른 加味淸上補下湯 엑기스제의 약효에 대하여 분석한 결과 2단계 이상의 지속형 천식 환자에서 지속적인 삶의 질의 향상을 보였고, 고질적인 기도개형 등에 의한 폐기능 저하를 나타내는 4단계의 중증 지속형 천식 환자에게서 폐기능의 유의한 호전을 나타냄을 보고하였다. 이[11]등은 加味淸上補下湯 엑기스제의 4주간 투여 후 중단한 4주 후의 추적조사에서 폐기능 및 삶의 질에서 유의한 감소 없이 약효가 지속됨을 보고하였다. 뒤이은 연구에서 정[12]등은 加味淸上補下湯 열수추출 엑기스제의 4주간 투여 후 유의한 호전을 보였으며 4주간의 중단 뒤에 통계적으로 유의할 만한 폐기능 및 삶의 질의 감소 없이 어느 정도의 지속효과를 보인 환자군을 대상으로 加味淸上補下湯 엑기스제의 용량을 줄여 가공한 AF-365를 다시 투여하여 높아진 폐기능 및 삶의 질을 더욱 개선 또는 적어도 지속적으로 유지시킴을 관찰하여 완해기 천식의 유지 치료에 있어 한약의 장기 복용에 대한 가능성을 제시하였다.

이번 실험은 이처럼 임상적으로 유효성이 입증된 加味淸上補下湯의 작용 기전을 규명해보고자 加味淸上補下湯이 천식 발병의 주요 원인으로 작용하는 호산구를 유도하는 chemokine의 생산과 생산경로를 저해하거나 차단하는 효과가 있는지 eotaxin과 IL-8을 중심으로 실험을 진행하였다. 또한 민[22]등은 선행된 加味淸上補下湯의 열수 추출물과 에탄올 추출물의 지표물질 및 패턴분석 연구에서 각 구성 한약재의 지표물질의 함량 분석 결과, 일부 성분은 에탄올 추출물에서 더 높게, 나머지 다른 성분은 열수 추출물이 더 높게 나오거나 거의 동등하게 추출되었으며, chromatographic pattern 분석상 전반적으로 열수 추출물에서 지표물질들이 다량 추출되는 결과를 보였으나, 에탄올 추출물에만 들어 있는 특정 성분이 있을 가능성을 제기하였다. 그러나, 기존에 사용되고 있는 加味淸上補下湯 엑기스제는 모두 열수추출을 이용한 것으로서, 이번 실험에서는 추출방법에 따른 치료효과를 비교하기 위해 물추출 외에 에탄올 추출을 함께 사용하여 chemokine에 대한 저해 효과를 비교하였다.

우선 加味淸上補下湯의 독성효과를 알아보기 위하여 0.1, 1, 10, 100, 1000㎍/ml의 농도별로 처리한 결과, 세포 생존율 10%이내의 오차는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 볼때 농도에 따른 세포 생존율에 큰 차이가 없는 것으로 나타나 인간 기관지 상피세포 A549 cell에 대해 독성은 갖지 않는 것으로 생각된다.

Eotaxin의 분비량에 대한 加味淸上補下湯의 영향을 알아보면, eotaxin의 분비량이 加味淸上補下湯 EtOH 100, 1000 ㎍/ml의 농도에서 각각 16%와 44%의 유의한 억제 효과가 있었고, DW 추출물에서는 10㎍/ml에서 예외적으로 eotaxin의 증가가 나타나는 등 전반적으로 유의성이 다소 낮았으나, 1000㎍/ml에서 64%로 현저하게 eotaxin 분비량이 저해되는 것을 확인하였다.

Eotaxin은 소장의 점막에서 가장 높게, 그리고 항상 발현되고 있으며, 그 외에 폐/기관지 상피세

포, fibroblast, smooth muscle cell, 호산구, T cell, 대식세포 등 다양한 세포에서 생산되며 호산구가 발현하는 CCR3(CC Chemokine Receptor 3)만을 수용체로 사용하기 때문에 호산구에 대한 강력한 선택적 활성을 지닌다. Eotaxin은 조직과 혈액 중의 호산구 모두에 신호를 보내어 염증 부위로 호산구를 동원하는 강력한 인자로 폐의 호산구 증가증 발생의 주요 역할을 하며 호산구의 염증 유발 기능을 활성화시켜서 조직손상에도 기여한다[3]. Eotaxin 단독의 상향조절이 폐에서의 중증의 호산구증가증을 유도하는데에는 불충분할지라도, mouse에서 eotaxin 유전자를 제거하면 60%까지 호산구 동원이 감소하였다는 보고가 있다[23]. 또한 천식 치료에 가장 많이 사용되는 corticosteroid는 eotaxin 발현과 폐의 호산구증가증을 효과적으로 감소시켜 유용한 임상적 반응을 나타낸다[24].

최근에는 eotaxin을 eotaxin-1, eotaxin-2, eotaxin-3로 분류하여, 3가지 eotaxin이 호산구 동원의 역동학과 관련하여 독립적인 역할을 수행한다고 보고 있다. 즉 eotaxin-1은 호산구의 화학주성, 골수로부터 호산구와 전구체의 동원, 내피에 호산구의 부착 촉진, 탈과립 유발로 조직손상 등의 기능을 하지만, 항원 유발 48시간 뒤나 장기간 지속되는 임상적 완해기 중에는 eotaxin-1 단백 수준은 정상인과 큰 차이가 없는 반면, 기관지 점막에서 eotaxin-2와 eotaxin-3는 항원 유발 48시간 후에도 유의하게 증가되어 있어 후기 알러지 반응의 강도와 양의 상관관계가 있으며 후기 알러지 반응이 해소된 이후에도 기관지의 호산구증가증이 지속됨을 설명할 수 있다[25].

이처럼 열수 추출과 에탄올 추출 加味淸上補下湯이 호산구의 유인과 염증유발에 중요 역할을 하는 eotaxin의 발현을 유의하게 억제한다는 실험결과는 임상에서 기관지천식에 유효한 加味淸上補下湯의 치료 기전의 한 부분으로 해석할 수 있을 것이다.

加味淸上補下湯의 IL-8에 대한 영향을 Sandwitch ELISA를 통해 측정한 결과 IL-8의 분비량이 加味淸上補下湯 EtOH 추출물의 경우 0.1, 1, 10, 100㎍/ml에서 20%내외의 억제 효과가 있었고 1000㎍/ml에서는 39.3%의 억제 효과가 나타났다. DW 추출물은 0.1, 1, 10, 100㎍/ml에서 효과가 없었으나 1000㎍/ml에서는 28.8%의 IL-8 억제 효과가 있었다. 이전 연구에서 金銀花[13] 열수 추출물의 경우 IL-8에 대한 mRNA 발현량이 100㎍/ml에서 유의한 감소효과를 보였으나, 牧丹皮[14]의 경우는 통계적으로 유의한 감소효과를 보이지 않았다.

IL-8은 호중구의 화학주성인자로서 기도에 호중구를 축적시킨다. 호산구에는 특정 상황에서 작용하여 정상인이 아닌 아토피 환자로부터 분리된 호산구는 IL-8에 반응하며, 호산구 동원과 활성화에 상승작용을 할 수 있는데 cytokine으로 초회감작된 호산구에 대한 화학주성 인자로 기능할 수 있으며[26], 호산구가 IL-8에 용량 의존적으로 반응하여 이주, 조직 호산구증가증에서 일정 역할을 할 것이라고 생각되기도 한다[27].

한편 IL-8가 주도적으로 작용하는 호중구의 경우 현재까지 알레르기 염증반응의 병인에서 호중구의 역할은 호산구에 비해 많은 연구가 이루어지지 않았다. 하지만 최근 급성 천식 및 중증 천식 환자의 기도 조직과 객담 분석을 통하여 호중구의 역할이 부각되고 있다. 실제 바이러스 감염에 의한 천식의 악화, 급성 천식으로 기관내삽관 또는 기계호흡을 시행한 환자, 지속적 천명이 있는 소아환자에서 호산구보다 IL-8 및 호중구 침윤 증가가 보고 되었으며[4,17,28,29], 따라서 천식의 중증 악화 중에 호중구와 IL-8과 같은 호중구 chemokine에 치료의 방향을 둬야 함을 제시하기도 하였다[30].

加味淸上補下湯이 EtOH 추출과 물추출에서 높은 농도에서 IL-8에 대한 유의한 억제를 보인 것은 급성 중증 천식이나 천식 지속상태에서 호중구의 증가 현상에도 유익한 치료효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 이는 CC chemokine 및 호산구에 대해서는 유의한 억제효과를 보이지

만 IL-8 상승과 호중구증가증을 유발하는 corticosteroid와는 다른 치료기전을 가진 것으로 보인다[24].

이상의 실험 결과에서 보면 加味淸上補下湯의 천식 치료기전은 호산구의 기도 축적에 관여하는 chemokine 중 eotaxin과 IL-8에 대한 저해효과와의 관련 가능성을 생각해 볼 수 있으며, 특히 eotaxin에 대한 저해효과가 가장 커 eotaxin 발현 억제가 핵심 기전임을 추정해볼 수 있다. 또한 加味淸上補下湯 열수 추출물과 에탄올 추출물의 eotaxin, IL-8의 분비량 억제 효과에 있어서는 에탄올 추출물이 열수 추출물과 비교해서 동등하거나 그 이상의 효과를 보였다. 본 연구의 결과로만 加味淸上補下湯의 열수 추출물과 에탄올 추출물의 효과의 우열 비교는 어려우나, 현재 임상적 유효성이 입증된 加味淸上補下湯 엑기스제는 열수 추출물에 의한 것만 사용되고 있는 실정으로 본 실험을 통해 향후 에탄올 추출물에 의한 엑기스제 개발에 대한 가능성을 확인하였다.

이번 연구에서 in vitro 상 加味淸上補下湯의 chemokine 저해 효과에 대해 확인하였다. 이를 바탕으로 향후 실제 천식 환자에게 加味淸上補下湯 엑기스제 투여 후 환자의 기도 생검, 기관폐포세척액 등의 관찰을 통해 천식 환자에서 chemokine 생산 및 호산구수 변화에 대한 加味淸上補下湯 엑기스제의 영향 및 폐기능과의 연관성 등을 관찰하는 연구가 뒤따라야할 것으로 생각된다.

V. 結 論

에탄올 추출 및 열수 추출 加味淸上補下湯이 천식 관련 cytokine 분비에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 독성 실험, sandwitch ELISA를 이용한 eotaxin, IL-8과 같은 cytokine 분비 억제효과에 대한 in vitro 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성은 加味淸上補下湯 에탄올 추출 및 열수 추출 모두에서 0.1, 1, 10, 100, 1000㎍/ml의 농도별로 관찰한 결과 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.
2. Eotaxin의 분비량은 에탄올 추출 加味淸上補下湯 100, 1000 ㎍/ml의 농도에서 각각 16%와 44%의 유의한 감소효과가 있었고, 열수 추출 加味淸上補下湯에서는 10㎍/ml에서 오히려 eotaxin이 증가하는 등 전반적으로 유의성이 다소 낮았으나, 1000㎍/ml에서 64%로 현저하게 eotaxin 분비량이 저해되는 것을 확인하였다.
3. IL-8의 분비량이 에탄올 추출 加味淸上補下湯의 경우 0.1, 1, 10, 100㎍/ml에서 20% 내외의 감소효과가 있었고 1000㎍/ml에서는 39.3%의 감소효과가 나타났다. 열수 추출물은 0.1, 1, 10, 100 ㎍/ml에서 효과가 없었으나 1000㎍/ml에서는 28.8%의 감소효과가 있었다.
4. 이상의 결과에서 볼 때 加味淸上補下湯의 에탄올 추출물이 열수 추출에 비하여 저농도에서부터 eotaxin과 IL-8의 분비량 억제효과를 보였다.

參考文獻

1. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Bethesda (MD): National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute; 2002.
2. Darryl Adamko, Solomon Olawole Odemuyiwa, Redwan Moqbel. The eosinophil as a therapeutic target in asthma: beginning of the end, or end of the beginning?. *Current Opinion in Pharmacology*. 2003:3:227-32.
3. 정일엽, 박춘식. 호산구와 관련된 chemokine에 대한 새로운 조명. 천식 및 알레르기. 2001; 21(2):161-72.

4. Rojas-Ramos E, Avalos AF, Perez-Fernandez L, Cuevas-Schacht F, Valencia-Maqueda E, Teran LM. Role of the chemokines RANTES, monocyte chemotactic proteins-3 and -4, and eotaxins-1 and -2 in childhood asthma. *Eur Respir J.* 2003;22(2):310-6.
5. Ljubov S, Paul SF. Chemokine and cytokine cooperativity: Eosinophil migration in the asthmatic response. Immunology and Cell Biology. 2000;78:415-22.
6. 龔廷賢. 壽世保元. 北京:人民衛生出版社; 1993, p.166-70.
7. 정승기, 황우석, 주창엽, 이재성, 조일현, 정희재. 청상보하탕의 기관지천식환자에 대한 임상적 효과. 대한한의학회지. 2002;23(4):151-60.
8. 황우석, 최준용, 이재성, 주창엽, 정희재, 이형구, 정승기. 청상보하탕의 기관지천식환자에 대한 스테로이드 절약효과. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):1-10.
9. 정승기, 정희재, 이재성, 이건영, 정승연, 이형구, 최준용. 加味淸上補下湯 엑기스제제의 기관지천식환자의 중증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지. 2004;25(2):110-118.
10. 최준용, 이재성, 정승연, 이건영, 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 虛實辨證과 加味淸上補下湯의 임상효과. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):379-387.
11. 이건영, 최준용, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 加味淸上補下湯 엑기스제의 치료중단 후 천식환자의 임상증상 변화 관찰. 대한한방내과학회 추계학술대회 논문집. 2004:56-64
12. 정승연, 이재성, 최준용, 이건영, 정희재, 이형구, 배현수, 정승기. 천식 완해기 유지치료로서 AF-365의 임상적 효과. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):1-11.
13. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 金銀花가 喘息유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):129-42
14. 문성훈, 정희재, 정승기, 이형구. 牧丹皮가 喘息유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):199-212
15. Wardlaw A. Eosinophil trafficking: new answers to old questions. *Clin Exp Allergy.* 2004;34(5):676-9.
16. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Eng J Mde.* 1998;338:1592-1600.
17. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기질환. 서울:군자출판사; 2002, p.55-8,245-7.
18. Justice JP, Borchers MT, Crosby JR, Hines EM, Shen HH, Ochkur SI, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. Ablation of eosinophils leads to a reduction of allergen-induced pulmonary pathology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Jan;284(1):169-78.
19. Gangur V, Oppenheim JJ. Are chemokines essential or secondary participants in allergic responses? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000;84(6):569-79
20. Cheng G, Ueda T, Eda F, Arima M, Yoshida N, Fukuda T. A549 cells can express interleukin-16 and stimulate eosinophil chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(2):212-8.
21. 李龍城編著. 經藥分類典 서울: 정담; 2002 p. 7, 12, 15, 16, 17, 20, 22, 24, 27, 30, 49
22. 민정기, 정희재, 이형구, 정승기. 加味淸上補下湯 熱水抽出物과 알코올抽出物의 指標物質 및 패턴의 比較分析. 대한한방내과학회지. 2006;27(1):55-71
23. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces

antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med.* 1997 Feb 17;185(4):785-90.
24. Fukakusa M, Bergeron C, Tulic MK, Fiset PO, Al Dewachi O, Laviolette M, Hamid Q, Chakir J. Oral corticosteroids decrease eosinophil and CC chemokine expression but increase neutrophil, IL-8, and IFN-gamma-inducible protein 10 expression in asthmatic airway mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Feb;115(2):280-6.
25. Ravensberg AJ, Ricciardolo FL, van Schadewijk A, Rabe KF, Sterk PJ, Hiemstra PS, Mauad T. Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Apr;115(4):779-85.
26. Shute J. Interleukin-8 is a potent eosinophil chemo-attractant. *Clin Exp Allergy.* 1994;24(3):203-6.
27. Erger RA, Casale TB. Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. *Am J Physiol.* 1995;268(1 Pt 1):L117-22.
28. Kikuchi S, Nagata M, Kikuchi I, Hagiwara K, Kanazawa M. Association between neutrophilic and eosinophilic inflammation in patients with severe persistent asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;137 Suppl 1:7-11.
29. Kim CK, Kim SW, Kim YK, Kang H, Yu J, Yoo Y, Koh YY. Bronchoalveolar lavage eosinophil cationic protein and interleukin-8 levels in acute asthma and acute bronchiolitis. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(5):591-7.
30. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(4 Pt 1):1185-90.