

마우스 천식모델에서 淸上秘飲의 기도 과민반응 및 염증의 억제 효과

김 산 · 성병곤 · 이성진 · 임규상
원광대학교 한의학 전문대학원 제 3의학과
원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

Attenuation of airway hyperreactivity and inflammation by *Cheongsangbiyeum* administration in a mouse model of asthma

San Kim · Byung-Gon Sung · Sung-Jin Lee · Kyu-Sang Lim

Objective : Although management of asthma has become increasingly effective, its cure remains elusive, necessitating a new modality to prevent or eliminate causes triggering clinical progress. Based on the clinical experiences, a novel decoction, *Cheongsangbiyeum* (CSB), has been developed to treat asthma, which consists of Polyporus, Semen Myristicae, Pericarpium citri Reticulatae, Rhizoma Cimicifugae, Cortex Albiziae, Fructus Rubi, Rhizoma Zedoariae, and Rhizoma Rhei. In the current study, its anti-asthmatic efficacy was evaluated using a mouse model of asthma.

Methods : Experimental allergic asthma was induced by repeated intraperitoneal sensitization and intranasal challenge of ovalbumin (OVA). Water extract of CSB (1 mg/mouse/day) was administered orally whereas control mice were given with identical volume of phosphate-buffered saline (PBS) for 5 days during the course of antigen challenge.

When airway hyperreactivity(AHR) measured by β -methacoline-induced airflow obstruction was compared, AHR of CSB-treated mice was significantly lower than those of control mice, indicating that CM extract can attenuate an asthmatic symptom. Airway recruitment of leukocytes and eosinophils was also markedly reduced by CSB treatment, suggesting that oral treatment of CSB can alleviate the airway inflammation.

For a better understanding of possible mechanisms underlying anti-asthmatic effect of CSB, cytokine (IL-4, IL-5, IL-13 and IFN γ) levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues were determined.

Results : The results showed that cytokine levels were significantly lowered by CSB treatment. Additionally, number of draining lymph node cells was significantly lower than those of control mice. These data indicate that CSB suppress in vivo allergen-specific response. However, notably, levels of type 2 cytokines such as IL-5 and IL-13 were more profoundly influenced.

Moreover, in vitro OVA-specific proliferative response and type 2 cytokine (IL-4, IL-5 and IL-13) production lymph node cells was markedly decreased in CSB-treated mice, whereas their IFN γ production was not significantly altered. These data clearly showed a preferential inhibition of type 2 T cell (Th2) response by CSB treatment. This finding was also supported

by serum antibody data showing that levels of OVA-specific type 2 antibodies, IgE and IgG1, in CSB-treated mice were significantly lower than in control mice, while type 1 antibody, IgG2a level was rather higher than controls, although the difference was in significant.

Conclusions :In conclusion, oral administration of CSB attenuates asthmatic manifestations including AHR and airway recruitment of eosinophils in a mouse model and which possibly results from selective inhibition of Th2 cell response to allergen. Our data suggest a potential clinical application of CSB for control of allergic asthma.

Key words : *Cheongsangbiyeum*(CSB), airway hyperreactivity, inflammation, eosinophils, cytokine

1. 緒 論

근래 급속한 산업화의 발달에 의한 환경오염으로 여러가지 자극 물질에 많이 노출됨에 따라 알러지 질환은 점점 증가하고 있다. 이 중 기관지 천식도 알러지 반응의 하나로 임상적으로 발작적인 호흡곤란을 나타내며, 기도 염증, 기도내 호산구증가, 점액 과분비를 동반한 점액세포의 과증식 등의 여러 증상을 동반하게 되어 천식을 진단하기 위해 기도의 과민성을 조사하기도 한다¹⁻³⁾.

기관지 천식은 제 2형 조력 T 세포(Th2)에 매개되어지는 질환으로 외부로부터 침입한 알러젠에 과민하게 나타나는 반응^{4,5)}으로, 특히, Th2 세포가 생산하는 Type2 형의 IL-4, IL-5 및 IL-13은 기관지 천식의 중요한 매개역할을 하는 것으로 알려져 있다⁶⁻⁸⁾.

기관지 천식의 처치에는 주로 스테로이드와 같은 항염증제와 기관지 확장제가 복합적으로 사용되고 있으며, 스테로이드는 항염증 작용이 있고 면역 억제 작용이 있어 천식의 증상이 호전⁹⁾되고 염증 반응에 관여하는 주요 세포인 호산구의 수를 감소¹⁰⁾시킨다. 이러한 기작은 염증세포의 침윤을 막아 점

막 상피 손상, 점액의 과분비, 기관지 수축을 억제할 수 있으며, 일부 Phospholipase의 작용을 억제하여 세포 손상에 중요한 역할을 하는 arachidonic acid 대사물의 생성을 감소시켜 기관지 천식을 억제¹¹⁾하지만, 기관지 천식은 단순한 호산구의 침윤을 동반한 염증반응이 아니라 좀더 복잡한 기작을 통해 일어나는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 아울러 스테로이드는 장기간 처치 후에 투여를 중단하게 되면 증상이 재발되는 단점이 있어 천식의 치료제라 할 수 없으며, 보다 근본적으로 천식증상의 원인이 되는 면역 반응을 차단할 수 있는 약제의 필요성이 절실한 실정이다¹³⁾.

알러지성 비염이나 천식 등에서 임상적으로 탁월한 효과를 나타내는 淸上秘飲은 猪苓, 肉苁蓉, 陳皮, 升麻, 合歡皮, 覆盆子, 蓬朮, 大黃의 8가지 약물로 구성된 새로운 처방으로, 이 淸上秘飲이 알러지성 질환을 치료할 수 있는지 실험적 연구의 필요성을 인식하였다.

이에 저자는 OVA(ovalbumin)를 이용한 마우스의 알러지성 천식 모델에서 淸上秘飲의 항알러지성 효과를 확인하기 위하여 淸上秘飲의 기도 염증에 미치는 영향을 확인하기 위하여 기도과민반응(airway hyperreactivity; AHR)과 BALF(bronchoalveolar lavage fluid) 내 백혈구의 수를 측정하였으며, 아울러 淸上秘飲의 항알러지 작용 기작을 확인하고자 알레르겐에 대한 T 림프구의 효과 생산 반응 및 항체 생산 등을 조사한 결과 淸上秘飲의 알러지성 기관지 천식 억제 효과를 관찰하고 유의성 있는 면

교신저자 : 임규상, 전북 익산시 신용동 744번지 원광대학교 한의학 전문대학원 제 3의학과

(Tel. 063-472-5261, E-mail: kslim@wonkwang.ac.kr)

* 본 연구는 2004년도 원광대학교 교내연구비 지원으로 수행되었습니다.

• 접수 2006/03/17 • 수정 2006/07/05 • 채택 2006/07/31

역 조절 기능을 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥 材

본 실험에 사용한 淸上秘飲의 처방내용은 아래와 같으며, 각각의 약재는 원광대학교 부속 익산한방병원과 시중에서 구입하여 정선하여 사용하였다.

Table 1, Prescription of Cheongsangbiyeum(CSB)

韓 藥 名	生 藥 名	重 量 (g)
猪苓	<i>Polyporus</i>	8
肉荳蔻	<i>Semen Myristicae</i>	8
陳皮	<i>Pericarpium citri Reticulatae</i>	8
升麻	<i>Rhizoma Cimicifugae</i>	8
合歡皮	<i>Cortex Albizziae</i>	12
覆盆子蜜炒	<i>Fructus Rubi</i>	12
蓬朮	<i>Rhizoma Zedoariae</i>	8
大黃酒炒	<i>Rhizoma Rhei</i>	8
Total Amount		72

2) 實驗動物

본 실험에서 사용한 실험동물은 생후 3-5주된 Balb/c 마우스를 화학연구소 (대전)에서 구입하였으며, 항은 항습장치 (대종기기산업, 서울) 내에서 사육하면서 생후 7주된 마우스를 실험에 사용하였다.

3) 세포 배양액

본 실험에서 세포의 배양을 위해서는 IMDM (Life Technologies, MD, USA)을 기본배양액으로 하여 10%의 열처리된 비 활성화시킨 우태혈청

(fetal bovine serum; FBS,), 1% antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B, Sigma Chemical, MO, USA), 5x10⁻⁵M 2-mercaptoethanol (2ME)을 첨가한 완전 배양액을 사용하였다.

2. 方法

1) 試料의 製造

淸上秘飲 3첩 분량인 216 g에 증류수 3 l를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거르로 濾過하고 3,000rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 원심분리 후 여과액을 농축기(rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃에서 freeze dryer로凍結乾燥시켜 84.5g의 乾燥抽出物(수득률; 39.12%)을 얻어 試料로 사용하였다.

2) 알러지 모델 및 알러지성 천식의 유도

알러지 기관지 천식을 유도하기 위해서는 Balb/c 마우스에 난 알부민 (ovalbumin; OVA, Sigma) 백혈 µg과 면역증강제인 alum 1 mg을 PBS (phosphate buffer saline, pH. 7.4) 0.3 ml에 혼합하여 마우스의 복강내로 주입하고, 7일후에 다시 전과 같은 과정으로 반복하여 2회 감작시켰으며, 제 15, 16, 18, 3일 동안 2% OVA를 호흡기로 백혈 µl씩 직접 투여 하였다.

3) 試料의 投與

淸上秘飲 투여군에는 淸上秘飲 乾燥抽出物을 0.1 mg/ml와 1 mg/ml를 1회 0.1 ml씩 경구로 강제 투여하고 대조군에는 동량의 PBS를 투여하되 감작된 마우스를 OVA를 투여하기 전날부터 최종 노출시 까지, 즉 제 14일부터 제18일까지 매일 1회, 총 5 일 동안 투여하였다.

4) 기도과민반응(airway hyperreativity; AHR) 측정

최종 면역 1일 후, 즉 실험 제 19일에 Hamelmann 등의 방법¹⁴⁾에 따라 AHR을 측정하였다. β -methacholine (Sigma)의 분무에 노출시키되 methacholine의 농도를 달리하여 0, 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 백혈 mg/ml 농도의 methacholine aerosol에 각각 5분간 노출시킨 후 동물용 체적 변동 측정기(plethysmography, All-Medicus, 서울)를 사용하여 enhanced pause (Penh)를 각 methacholine 농도마다 5분씩 측정하였다.

5) 기관지 폐포 세척액 (bronchoalveolar lavage fluid ; BALF) 검사

최종 면역 1일 후 AvertinTM (1 g당 0.025 ml, Sigma)을 마우스 복강에 주사하여 마취시킨 후 기관지를 개봉한 뒤 폐포의 세척을 위해서 PBS를 기관지로 통해서 1회씩 0.4 ml을 3회 넣어 세척하여 수거한 후 총 백혈구 세포수를 측정하여 비교하였다. 또 Cytospin (LSI Co. UK)를 사용 1,000 RPM에서 슬라이드 글라스에 BALF 200 μ l를 도말한 후 Diff-Quick (Baxter Healthcare, Miami, FL. USA)을 사용하여 염색한 다음 현미경 하에서 대식세포, 호산구, 호중구, 림프구 등의 세포 수를 측정하되 총 백혈0개 이상의 세포수를 측정하여 비교하였다.

6) 혈청의 준비

1 ml 주사기를 사용하여 마우스의 심장에서 혈액을 채취한 후 1.5 ml 원심튜브에 넣고 실온에서 혈액을 응고 시킨 후 효과rocentrifuge (Hanil, 서울)를 이용해 원심분리한 후 혈청을 모아 실험시까지 -30^o C에 보관하였다.

7) 기관지 주변 림프절 세포(peribronchial lymph node cell)의 분리 및 배양

마우스 흉부의 폐 주변에서 같은 숫자의 림프절

을 취하여 림프절 세포를 주사침으로 유리한 후 저장액 충격(hypotonic shock) 방법으로 적혈구를 제거한 후 PBS로 세척한 세포의 농도를 1×10^6 /ml로 조정하여 배양하였다. OVA를 200 μ g/ml의 농도로 가하여 3일 동안 자극시킨 후 원심 분리하여 세포를 침전시키고 배양 상청액을 수거하였다.

8) 세포증식 반응 검사 (티미딘 흡수법)

항원 자극에 의한 림프구의 증식 반응을 측정하기 위해 96 well U-plate에 세포부유액 200 μ l씩 분주한 후 항원 OVA를 농도를 0, 2, 20, 200 μ g/ml로 각각 3 well씩 가하였다. 3일간 배양하되, 배양 최종 18시간 동안 티미딘 (thymidine, New England Nuclear, Boston, MA. USA) 0.5 μ Ci/well을 첨가한 후 세포수거기를 사용하여 세포를 수거하고, 흡수된 방사활성을 liquid scintillation counter(Packard Instrument)를 사용하여 측정하였다.

9) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Microplate (96 well; Nunc A/S, Roskilde, Denmark)에 coating Antibody(1.25 μ g/ml)을 넣어 4^o C에서 12-18시간 동안 부착시킨 후 plate를 wash buffer(9.0 g NaCl, 1ml Tween 20/L pH 7.4)를 이용하여 1회 (400 μ l) 세척한 다음 bloking buffer (8.0 g NaCl, 1.42 Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl, 5.0 g bovine serum albumin (fraction V)/L pH 7.4)를 well당 0.3 ml씩 가하였다. 2시간 bloking 후 wash buffer를 사용하여 4회 세척한 다음 적당한 농도로 희석한 시료들과 표준 효과(standard)을 각 well에 넣고 실온에 1.5시간 동안 정치하였다. 다시 상기한 방법으로 세척하고 적정농도로 희석한 biotinylated detection antibody를 각 well에 가한 후 1시간 동안 반응시켰다. 다시 wash buffer로 4회 세척한

다음 효소 표지된 avidin (avidin-horseradish peroxidase conjugate)을 working reagent에 1:4000-8000으로 희석한 후 각 well에 넣고 다시 45분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를 다시 wash buffer를 이용하여 4회 세척한 다음 기질 (TMB: 3,3',5,5-tetramethyl benzidine, Sigma)를 well당 0.1 ml씩 넣은 후 암소에 정치시켰다. 30분 후 모든 과정을 멈추기 위해 stop solution (1.8N H₂SO₄)를 well당 0.1 ml씩 넣은 뒤 1시간 이내로 분광 광도계(Peckard spectra count TM, A cabberra company)를 이용하여 4백혈nm의 파장에서 O.D값을 구하였다. 실험에서 사용한 모든 항체는 Biosource (Camarillo, CA, USA)와 Phamingen사 (San Diego, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며 모든 과정은 실온에서 실시하였다.

10) OVA-specific IgG1, IgG2a 과 IgM 측정을 위한 ELISA

Microplate (96 well; Nunc A/S)에 백혈 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 OVA를 100 μl 씩 분주 후 4°C에서 OVA를 12-16 시간 부착시킨 후 wash buffer (PBS with Tween 20 0.05%/l)로 3회 wash 후 blocking buffer (PBS with 10% FBS) 200 μl 를 각 well에 가하였다. 1시간 후 wash buffer로 3회 세척 후 적당한 농도로 희석된, 시료를 각각의 well에 넣고 암실에서 정치시켰다. 2시간 후 같은 방법으로 세척 후 적절한 농도로 희석된 biotinlated anti-IgG1, anti-IgG2a 과 효소 표지된 avidin (avidin-horseradish peroxidase conjugate)를 섞어서 각 well에 100 μl 씩 넣은 후 1시간동안 반응시켰다. wash buffer로 7회 세척 후 기질 (TMB: 3,3',5,5-tetramethyl benzidine, Sigma)를 well당 0.1 ml씩 넣은 후 암소에 두었다. 30분 후 모든 과정을 멈추기 위해 stop solution (2N H₂SO₄)를 well당 100 μl 씩 넣은 뒤 1시간 이내로 분광 광도계(Peckard spectra count TM, A

cabberra company)를 이용하여 4백혈nm의 파장으로 O.D값을 구하였다.

11) 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 대조군 및 실험군마다 총 10 마리의 마우스로부터 얻은 결과를 종합하여 mean \pm standard error 값으로 나타내었다. 대조군과 실험군 간의 차이에 대한 통계학적 유의성 검정은 student's t test 방법으로 분석하였으며, P값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 인정하여 제시하였다.

III. 實驗 結果

1. 염증 유발에 의한 기관지 수축에 대한 효과

알러지성 과민반응은 여러 요인자에 의한 반응으로, 기관지 수축은 과민반응의 하나의 지표로 이용되고 있다²⁾. 따라서 본 실험에선 알러지 과민반응에 미치는 淸上秘飲의 효과를 조사하기 위해서 알러지 유발마우스의 대조군과 淸上秘飲을 투여한 약제투여군 마우스에 대해 β -methacholine에 대한 Penh 값을 비교하였다.

대조군과 淸上秘飲 투여군 마우스에서 β -methacholine 비말에 노출시킨 후 Penh값은 모두 methacholine의 농도에 의존적으로 Penh 값이 상승하였다(Fig. 1.).

또한 대조군 마우스와 淸上秘飲투여군 간에서는 25 mg/ml의 methacholine의 농도까지는 커다란 차이를 보이지 않았으나, 백혈 mg/ml의 농도에서 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군과 1 mg/ml 투여군에서 대조군에 비해 모두 Penh 값이 낮게 나타났다.

특히 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 Penh 값은 3.1로 대조군의 Penh 값인 4.8에 비해 유의하게 낮은 값을 보였다(P < 0.05, n=10).

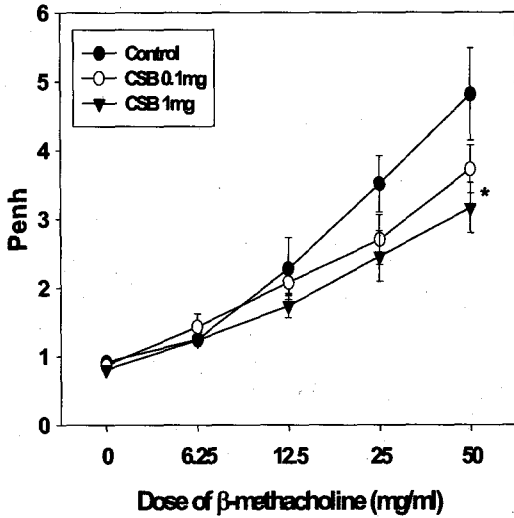


Fig. 1. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on airway hyperreactivity (AHR) of asthmatic mice. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. Twenty four hours after last challenge, airway hyperreactivity was measured by enhanced pause (Penh) under exposure to increasing doses of methacholine. Data are means \pm SE of 10 mice.

*, P<0.05 vs control

2. 염증 유발시 기관지 BALF내의 백혈구 수 변화에 대한 효과

마우스의 알러지성 천식 유발은 기관지 수축으로 인한 호흡량 변화와 폐의 염증유발에 의한 백혈구 수의 증가를 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 따라서 대조군 마우스와 淸上秘飲 투여군 마우스의 염증 반응을 비교하기 위하여 OVA 최종 노출 후 24시간 후 마우스의 기관지 폐포 세척액(BALF)을 수거하여 세포의 수를 측정하였다.

염증을 유도한 대조군 마우스의 BALF내 백혈구 수는 9.6×10^5 개/ml 이었으며, 실험군인 淸上秘飲 0.1 mg 투여군의 BALF내 백혈구 수는 5.8×10^5 개

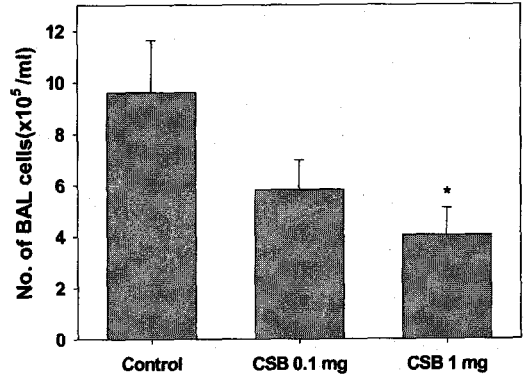


Fig. 2. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on the number of leukocytes in BALF. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. Total number of leukocyte was enumerated in BALF collected 24 hours after last OVA challenge. Data are means \pm SE of 10 mice.

*, P<0.05 vs control

/ml, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군의 BALF내 백혈구 수는 4.0×10^5 개/ml 로 대조군에 비해 현저히 낮은 것으로 나타났다 (P<0.05, n=10).

3. 염증 유발시 기관지 BALF내 백혈구 아군의 변화에 미치는 효과

알러지성 천식 반응에 의한 폐 염증에서는 염증 반응에 관여하는 백혈구들의 다수가 기도에 모여서, 특히 호산구과다증은 마우스 알러지 모델에서 나타나는 두드러진 특징으로 알려져 있다¹⁶⁾.

앞의 결과에서 淸上秘飲 투여군 마우스에서 Penh가 저하되고, BALF내 백혈구 수가 다소 감소하여 BALF 내 백혈구 아군들의 변화를 함께 확인해 보고자 대조군과 실험군 마우스에서 얻은 BALF를 슬라이드 글라스에 도말한 후 Diff-Quik으로 염색하여 이들의 형태학적 차이로서 아군의 분포를 비교하였다.

그 결과 대조군에서 대식세포가 57.0%를 차지한 것에 비해 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군에서 71.5%, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 74.9%로 대식세포의 비율이 증가하였다. 또한 호산구의 수는 대조군에서 24.3%, 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군에서 13.6%, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 8.4%로 유의하게 감소하였으며, 호염구와 림프구에서는 통계적인 유의한 차이를 보이지 않았다.

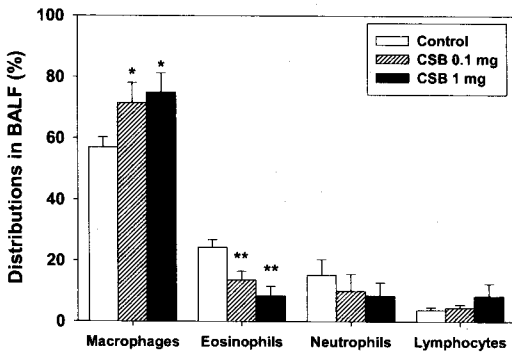


Fig. 3. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on the distributions of leukocyte subpopulations in BALF. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. Data are means±SE of 10 mice.

*, P<0.05 vs control ; **, P<0.01 vs control

4. 림프구의 항원특이적 반응에 미치는 효과

림프절은 면역 세포들이 항원을 인식하고 반응이 일어나는 장소로서 항원이 생체내로 들어오면 항원 제시세포(APC)에 의해 항원이 제시되고 그 항원에 특이적 수용체를 가지는 림프구 클론이 증식하고 수가 증가함으로써 특이적 항원에 강하게 반응하게 된다¹⁷⁾.

이에 in vivo 실험 결과를 얻기 위하여 마우스의 폐 주변 림프절을 얻어 합한 세포수를 비교하였다. 대조군의 경우 8.7×10^6 개/ml에 비해 淸上秘飲

0.1 mg/ml 투여 실험군의 림프절 세포수는 5.1×10^6 개/ml로 다소 감소하였으나 유의한 차이를 보이지는 않았다. 그러나, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여 실험군의 림프절 세포수는 3.9×10^6 개/ml로 대조군에 비해 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

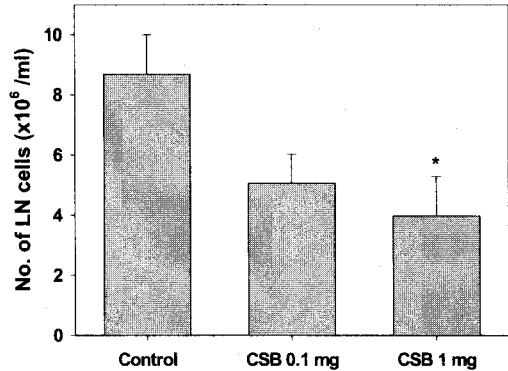


Fig. 4. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on number of peribronchial LN cells. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. LN cells were collected 24 hours after last challenge and total numbers of LN cells were enumerated. Data are means±SE of 10 mice.

*, P<0.05 vs control

앞 선 실험에서 림프구의 수가 감소하는 것을 확인 한 바, 항원 특이적 증식이 억제 되는지를 좀 더 정확히 확인하고자, 티미딘 흡수법을 이용하여 림프구의 증식능을 조사하였다. 같은 수의 림프구에 항원을 농도별로 처리한 3일간 배양하되 최종 18시간 동안 티미딘을 첨가하고 세포를 수거하여 방사활성을 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였다.

대조군의 림프구는 Fig. 5.에서 보는 바와 같이 항원의 농도에 의존적으로 증식이 증가하였고, 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군의 림프구도 항원의 농도

에 의존적으로 림프구 증식이 증가하였다. 그러나 淸上秘飲 1 mg/ml 1 mg 투여군의 경우 항원의 양이 고농도일 경우 8.4×10^3 cpm으로 대조군의 19.0×10^3 cpm 인데 비해 림프구의 증식이 현저하게 억제되는 것을 확인 할 수 있었다.

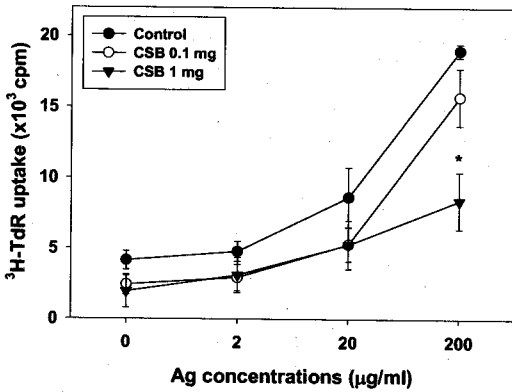


Fig. 5. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on Ag-specific proliferation of LN cells. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. LN cells were collected 24 hours after last challenge and then in vitro stimulated with OVA for 3 days. Data are means±SE of 10 mice.

*, P<0.05 vs control

5. BALF와 염증조직에서 효과 생산에 미치는 효과

항원을 인식한 T림프구는 림프절에서 활성화하여 염증 조직으로 이동¹⁸⁾하게 되며, 본 실험과 같이 OVA 특이적 T림프구들은 다수가 염증 부위인 폐 조직으로 이동하여 효과를 생산¹⁹⁾하므로 따라서 BALF와 폐 조직에 침윤된 효과의 양을 조사하였다.

IFN-γ는 Type1 효과로 Th1 조력세포가 관여하는 세포매개성 면역 반응에 중요한 역할을 하는 효과²⁰⁾으로 Th2 반응과는 길항작용을 하는 것으로 알려져 있으므로²¹⁾ 따라서 淸上秘飲을 투여한 마우

스에서 세포성 면역반응이 증가하는지 확인 하였다.

BALF에서의 IFN-γ는 대조군의 경우 797 pg/ml, 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군에서 582 pg/ml, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 562 pg/ml로 淸上秘飲 투여군 모두에서 IFN-γ가 저하되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 폐 조직에서 생산되는 IFN-γ를 비교한 결과, 대조군이 889 pg/ml 인 것에 비해 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군은 5백혈 pg/ml로 감소하였으나 유의성은 인정되지 않았으며, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군은 496 pg/ml로 유의하게 감소하였다(Fig. 6.).

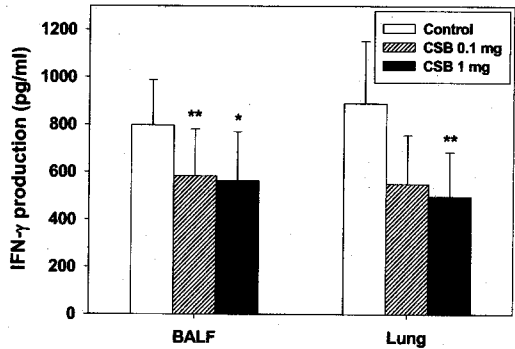


Fig. 6. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on the level of IFN-γ in BALF and lung. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. BALF was collected 24 hours after last OVA challenge and lung was homogenated. Data are means±SE of 10 mice.

*, P<0.05 vs control ; **, P<0.01 vs control

IL-4는 IFN-γ와는 반대로 T 세포의 체액성 면역 반응을 유도하는 효과²²⁾으로 알려져 있다. 즉, B 세포의 활성을 유도하여 항원에 특이적인 면역 글로블린의 생산을 유도하며, 거식세포의 활성을 억제하여 체액성 면역 반응을 유도^{23,24)}하므로, 淸上秘飲을 투여한 마우스에서 체액성 면역반응이 저하

되는지 확인 하였다. BALF내 IL-4의 양은 대조군의 경우 328 pg/ml, 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군에서는 289 pg/ml, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서는 202 pg/ml 로 고농도의 淸上秘飲 투여군에서 대조군에 비해 IL-4의 분비량이 두드러지게 감소하는 것을 확인 하였다. 하지만, 폐 조직에서의 IL-4 양은 대조군의 경우 108 pg/ml, 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군에서는 68 pg/ml, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서는 90 pg/ml 로 두드러진 차이를 보이지 않았다(Fig. 7.).

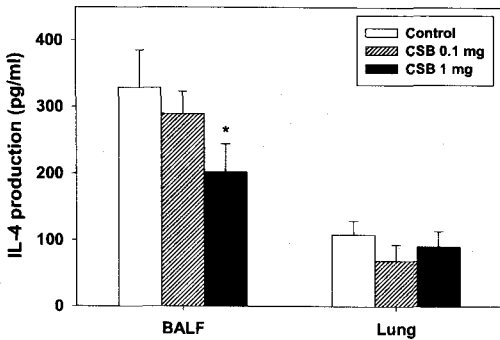


Fig. 7. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on the level of IL-4 in BALF and lung. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. BALF was collected 24 hours after last OVA challenge and lung was homogenated. Data are means±SE of 10 mice.

*, P<0.05 vs control

IL-5는 활성화된 Th2형의 CD4+ T 세포가 생산하는 효과로 호산구의 분열과 활성화에 관여하며, 이러한 세포가 염증부위로 모이게 하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁵⁻²⁸⁾. 따라서 淸上秘飲을 투여한 실험군에서 BALF내 호산구의 수가 줄어드는 이유가 IL-5의 생산과 연관이 있는지를 확인하기 위해 IL-5 생산을 조사하였다.

BALF내 IL-5의 양은 대조군이 1,819 pg/ml 인 것에 비해 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여한 실험군에서 1,110 pg/ml 로 저하되었으나 통계적인 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서는 741 pg/ml 로 현저히 저하되는 것을 확인 하였다. 또한 폐 조직내의 IL-5 양도 대조군이 1,004 pg/ml, 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군은 643 pg/ml 로 감소하였으나 통계적인 유의한 차를 보이지 않았으나, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서는 211 pg/ml 로 대조군에 비해 현저하게 저하되었다..

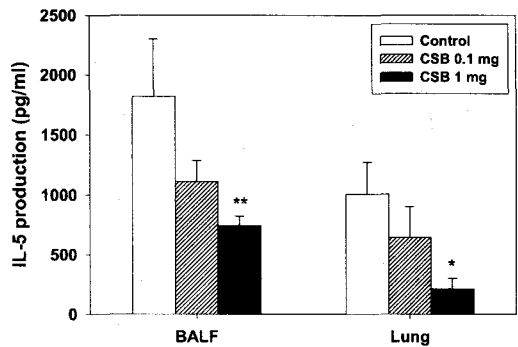


Fig. 8. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on the level of IL-5 in BALF and lung. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. BALF was collected 24 hours after last OVA challenge and lung was homogenated. Data are means±SE of 10 mice.

*, P<0.05 vs control ; **, P<0.01 vs control

IL-13의 경우 다른 Type2형의 효과와 같이 활성화된 CD4+ 세포가 생산하는 효과로 IL-4와 같이 B 세포의 IgE isotype switching과 B 세포, 단핵 세포의 구조적 적합 분자인 MHC(major histocompatibility complex) II의 발현을 조절하며, 염증유발 유전자의 발현을 억제 하는 것으로 알려져 있다^{29,30)}. 또한, IL-13은 내피세포의 부착분자인 VCAM-1의 발

현을 억제시켜 호산구와 T 세포의 침윤을 억제³¹⁾ 시키며, 기도의 점액분비를 억제하여 기도 반응을 억제하는 것³²⁾으로 알려져 있다.

BALF내 IL-13의 생산은 대조군이 321 pg/ml 인 것에 비해 淸上秘飲 0.1 mg/ml mg 투여한 실험군에서 230 pg/ml 로 IL-13의 생산이 감소하였으나 통계적인 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여한 실험군에서는 167 pg/ml로 대조군에 비해 현저하게 감소하였다. 또한 폐 조직내의 IL-13생산도 대조군이 84 pg/ml에 비해 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군은 약간 감소하였으나, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여한 실험군에서 8 pg/ml 로 현저한 감소를 나타내었다.

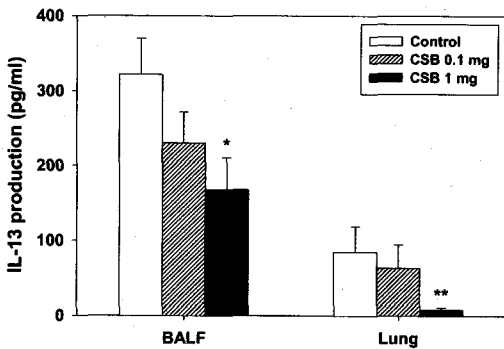


Fig. 9. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on the level of IL-13 in BALF and Lung. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. BALF was collected 24 hours after last OVA challenge and lung was homogenated. Data are means±SE of 10 mice.

*, P<0,05 vs control

6. 림프구의 특이적 항원에 의한 효과 생산에 미치는 효과

림프절은 항원에 대한 면역 반응이 일어나는 곳으로 APC에 의해 항원이 제시되면 그 항원에 특

이적 수용체를 가지는 clone이 증식하고 수가 증가함으로써 특이적 항원에 강하게 반응¹⁷⁾하게 되므로, 대조군과 실험군의 림프구의 특이적항원에 대한 효과의 생산을 비교하였다.

특이적 항원인 OVA로 자극 후 3일간 배양하고 상청액을 수거하여 ELISA로 효과 생산을 비교한바, 대조군과 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여한 실험군에서 효과 생산에는 큰 차이가 없었지만, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군은 전반적으로 모든 효과의 생산이 저하되는 것으로 나타났다. IL-4의 경우 대조군이 637 pg/ml 인 것에 비해 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군은 309 pg/ml 로 나타났고, IL-13의 경우 대조군은 1921 pg/ml 인 것에 비해 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군은 449 pg/ml 로 대조군에 비해 현저히 저하되는 것이 확인되었다.

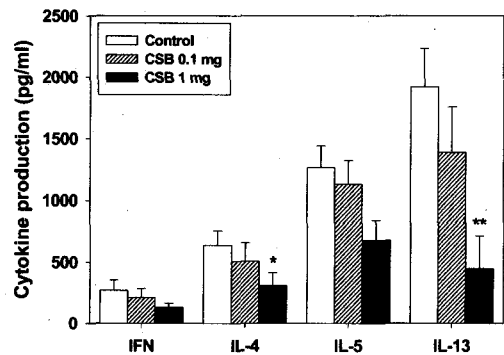


Fig.10. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) treatment on cytokine production by LN cells. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. LN cells were collected 24 hours after last challenge and then in vitro stimulated with OVA (200 µg/ml) for 3 days. Data are means±SE of 10 mice.

*, P<0,05 vs control ; **, P<0,01 vs control

7. 마우스 혈청내 IgE에 대한 효과

IgE는 IgE의 Fc 수용체를 가진 비만세포를 자극

하여 다양한 생리활성 물질의 분비를 유도함으로써 알러지 반응을 일으키며, IgE의 생산은 활성화한 Th2 세포가 IL-4를 생산하여 B림프구의 isotype switching을 유도함으로써 가능³³⁾하게 되므로, 혈청내 IgE 농도는 알러지 증상을 나타내는 중요한 지표가 된다.

전 실험에서 관찰된 淸上秘飲 기도 과민반응의 저하 효과가 IgE 생산의 억제와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 BALF와 혈청내의 항원에 특이적 IgE 생산을 비교하였다. 마우스 혈청내 IgE 생산은 대조군과 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여한 실험군에서는 유의한 차이를 나타내지 않았지만, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 유의한 감소 현상을 나타내었다.

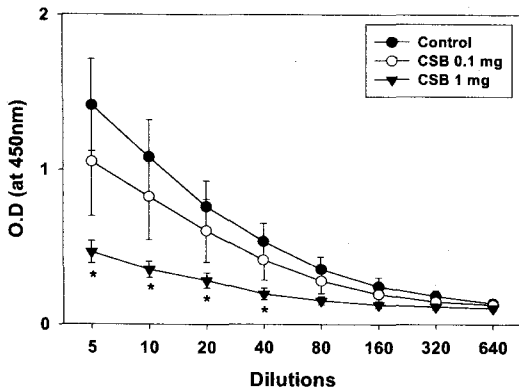


Fig. 11. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) on Ag-specific IgE production in serum. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. Serum was collected 24 hours after last OVA challenge. Data are means±SE of 3 mice.

*, P<0.05 vs control

8. 마우스 혈청내 항원 특이적인 항체 생산에 미치는 효과

앞의 실험에서 항원에 특이적인 IgE의 생산이

淸上秘飲을 투여한 실험군에서 저하되는 것을 확인 하였으므로, in vivo에서 淸上秘飲의 투여가 B세포의 다른 항체 생산에도 영향을 미치는지 IgM, IgG1, IgG2a의 생산량을 조사하였다.

IgM은 면역 반응 초기에 B 세포가 생산하는 항체로 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여한 실험군은 개체 차이가 심하여 통계적 유의차를 보이지 않았지만, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군은 대조군에 비해 현저한 감소 현상을 나타내었다(Fig. 12.).

또한 IL-4에 의해 유도가 되는 IgG1의 생산^{34,35)}을 비교한 결과, Fig. 13.에서 보는 바와 같이 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여한 실험군의 IgG1 생산은 대조군과 차이를 나타내지 않았지만, 淸上秘飲 1 mg/ml 을 투여한 실험군에서는 유의하게 저하되었다.

반면, IFN- γ 에 의해 유도^{34,35)}되는 항체인 IgG2a의 생산은 Fig. 14.에서 보는 바와 같이 淸上秘飲을 투여한 실험군 모두에서 대조군에 비해 오히려 유의하게 증가되어, 앞서의 항체 생산과는 정반대의 결과를 나타내었다.

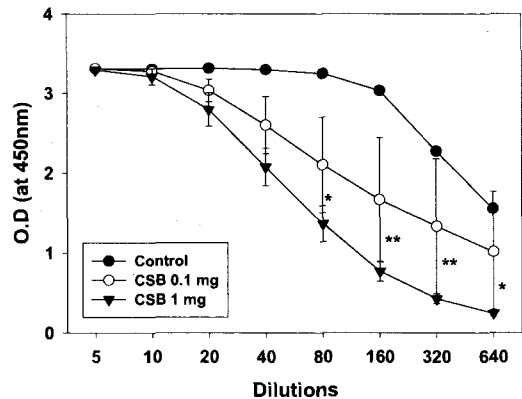


Fig. 12. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) on the serum level of IgM. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. Serum was collected 24 hours after last OVA challenge. Data are means±SE of 3 mice.

*, P<0.05 vs control ; **, P<0.01 vs control

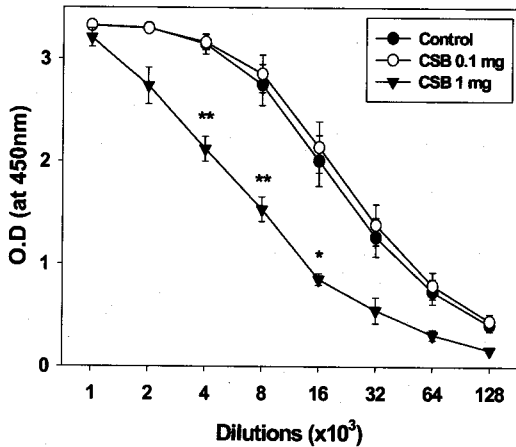


Fig. 13. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) on the serum level of IgG1. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. Serum was collected 24 hours after last OVA challenge. Data are means±SE of 3 mice.

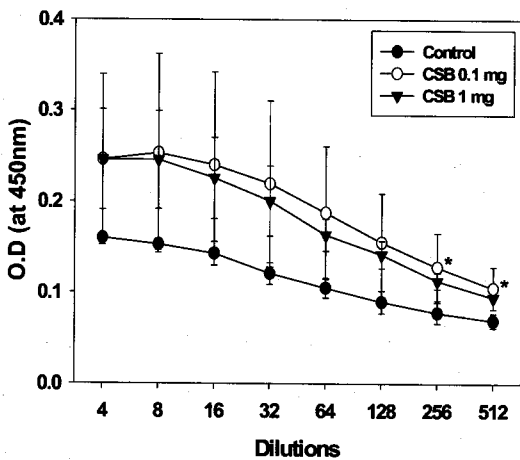


Fig. 14. Effect of *Cheongsangbiyeum*(CSB) on the serum level of IgG2a. Mice were sensitized at days 0 and 7 and then challenged with OVA for 3 days on 15, 16 and 18. Serum was collected 24 hours after last OVA challenge. Data are means±SE of 3 mice.

*, P(0,05 vs control)

IV. 考 察

알러지 반응에 속하는 천식은 항원에 의해 비만 세포의 Fc 수용체와 B 세포가 생산하는 IgE가 결합하여 분비하는 여러 화학매체의 작용과 키모카인과 효과, 부착분자가 관여하여 염증부위로 모인 염증세포에 의해 나타나는 기도의 만성 알러지성 질환으로 이해되고 있다³⁶⁾.

천식의 두드러진 증상은 염증부위에 호산구의 증가와 침윤된 호산구의 활성화로 혈소판활성인자, leukotriene 등과 같은 화학매체를 생성하여, 기도의 수축, 객담 형성, 혈관의 투과성을 증가시키고, 부종을 유발하며, 지속적인 화학주성으로 여러 염증세포들을 염증부위로 유입하여 기도과민성을 증가시키며, 이러한 세포들로부터 유래한 여러 세포독성 단백질들이 기도의 손상을 유발한다³⁷⁾.

최근 기관지천식에 대한 연구가 세포수준에서 많이 연구되고 있다. 즉, 염증면역 반응에 관여하는 세포와 효과가 어떻게 염증반응에 관여하며 이러한 기전에 변화를 초래함으로써 기관지 천식 치료에 새로운 방법을 모색하고 있다³⁸⁾.

기관지 천식에 관여하는 세포 중 Th 세포는 효과 분비 양상과 기능에 따라 Th1과 Th2 세포로 나눈다. Th1 세포는 IL-2, IFN- γ 등을 생산하며 지연형 면역반응⁴²⁾에 관여하며 또한, 대식세포를 활성화시켜 기생충에 대한 방어작용 바이러스에 대한 방어기작에 관여한다. Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며, 알러지성 질환과, 즉시형 과민반응, 기생충 감염에 대한 면역반응에 관여하며⁴⁰⁾, B 세포의 활성화와 항체생산에 관여한다. 이러한 Th1과 Th2 세포는 서로 길항작용을 나타내어 면역반응을 억제하며, 기관지천식의 환자의 폐포세척액에서 주로 Th2 세포가 생산하는 효과가 과다 분비되는 것으로 Th2 세포의 활성이 증가하는 것으로 관찰되고 있다²¹⁾.

알려지성 비염이나 천식 등에서 임상적으로 탁월한 효과를 나타내는 淸上秘飲은 猪苓, 肉苳蔻, 陳皮, 升麻, 合歡皮, 覆盆子, 蓬朮, 大黃의 8가지 약물로 구성된 새로운 처방으로, 이 淸上秘飲의 효과가 면역 반응을 억제시킴으로써 알려지성 질환을 근본적으로 치료할 수 있는지 실험적인 연구의 필요성을 인식하고 실험에 착수하였다.

淸上秘飲의 구성에서 猪苓은 滲濕利水の 작용이 있고, 肉苳蔻는 滲腸止瀉, 溫中行氣의 작용이 있으며, 陳皮는 利氣健脾, 燥濕化痰의 작용이 있다. 또한 升麻는 發表透疹, 清熱解毒, 升舉陽氣의 작용이 있고, 合歡皮는 安神解鬱, 活血消腫의 작용이 있으며, 覆盆子는 補肝腎, 滋精縮尿의 작용이 있다. 그리고 蓬朮은 行氣破血, 消積止痛의 작용이 있으며, 大黃은 攻積導滯, 瀉火涼血, 行瘀通經의 작용이 있다.

이에 본 저자는 마우스 모델을 이용한 기관지천식 유발 마우스에서 淸上秘飲의 항 알려지 작용의 효과를 규명하고자 기관지 수축정도와 폐포액내의 호산구 수와 림프구의 반응, 효과의 생산에 미치는 淸上秘飲의 효과를 측정하였다.

기관지천식은 알러젠에 대해 과민하게 나타나는 반응으로 염증반응 세포들이 염증부위로 침윤되며 이때, 점액세포들이 생산하는 점액의 과잉생산으로 인해 호흡곤란을 야기하여 증상을 측정하는 방법으로 methacholine에 대한 기도 과민반응을 이용하고 있다^{1,2)}.

기관지천식을 유발한 마우스에 淸上秘飲을 0.1 mg/ml, 1 mg/ml을 경구투여하고 대조군에는 동량의 PBS를 투여한 후, methacholine에 대한 기도과민 반응을 조사한 결과 Fig. 1.에서 보는 바와 같이 대조군은 methacholine 농도에 의존적으로 Penh 값이 증가 하였으나, 淸上秘飲 1 mg/ml 을 투여한 마우스에서 고농도의 methacholine 농도에서 Penh 값이 유의하게 감소하여 淸上秘飲의 투여가 마우스의 기도과민 반응을 유의하게 억제함을 보여주었다.

또한, 기도 염증을 확인하기 위하여 기관지 폐포

세척액내의 총 백혈구 수를 측정한 결과 마우스에 투여한 淸上秘飲의 농도가 증가할수록 백혈구 수가 감소하였으며, 특히 호산구의 수가 현저하게 감소되고 상대적으로 대식세포의 수가 유의하게 증가함을 확인하였다(Fig. 2,3.). 이는 淸上秘飲의 투여가 기도과민 반응 뿐만 아니라 기도 염증 반응을 현저히 억제함을 보여주는 결과이다. 특히 호산구는 기생충의 방어작용과 알러지 반응시 비만세포나 호염구가 생산하는 leukotriene, histamine, 혈소판활성인자 등을 분해하는 arylsulphatase, histaminase, phospholipase 등을 분비하는 유익한 세포로 알려졌으나, 알러지 질환이 호산구에 의한 과민반응으로 규명되면서 세포독성 염증세포로 호산구에 대한 인식이 완전히 전환되었다. 이러한 호산구는 IL-3, IL-5등의 효과나 혈소판활성인자, leukotriene 등의 화학매체에 의해 활성화되며, 이들이 생산하는 LTC₄, LTD₄ 등은 평활근 수축제이며, 혈관투과성을 증가시키고 섬모의 운동을 저하시킨다. 따라서 기관지천식 유발 마우스에서 淸上秘飲의 투여에 따른 폐포세척액내 호산구의 수의 감소는 기도 염증을 저하를 통해 천식의 증상을 완화시키는 중요한 기전이라고 생각된다.

림프절은 면역 세포들이 항원을 인식하고 반응이 일어나는 장소로서 외부에서 유입된 항원을 APC가 면역 세포들에게 제시하여 항원을 인식하고 반응이 일어나는 장소로서 그 항원에 특이적 수용체를 가지는 림프구 클론이 증식하고 수가 증가함으로써 특이적 항원에 강하게 반응하게 된다¹⁷⁾.

따라서, in vivo 림프구의 항원특이적 반응을 관찰한 바, Fig. 4에서 보는 바와 같이 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 대조군에 비해 림프절내 림프구의 수가 감소하는 것을 확인하였으며, 이를 좀더 정확히 확인하기 위해 방사선 동위원소가 붙은 티미딘을 이용하여 특이적항원에 대한 림프구의 증식능을 확인한 결과 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 대조군에 비해 증식능이 유의하게 억제되는 것이

확인되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 淸上秘飲이 림프구의 항원특이적 반응을 억제하여 염증반응을 억제하는 것으로 생각된다.

IFN- γ 는 typeII interferon이라고도 부르며 CD4+ T세포나 CD8+ T세포에 의해 만들어지는데 면역반응을 조절하기 때문에 immune interferon이라고도 부른다. IFN- γ 는 CD4+ T 세포를 제1형 조절세포(Th1)로 유도하며, 바이러스 증식의 억제와 같이 세포성 면역반응을 활성화⁴⁴⁾하고, IL-4에 대해 길항작용을 하여 IgE의 생산을 억제한다고 알려져 있어, 대조군과 淸上秘飲 투여군의 폐포세척액과 폐 조직내의 IFN- γ 의 생산을 비교하였다. 그 결과 淸上秘飲 투여군은 대조군에 비해 폐포세척액내의 IFN- γ 의 생산이 유의하게 감소하였으며, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 폐 조직내에서 IFN- γ 또한 감소 현상을 나타내었다(Fig. 6).

IL-4는 T 세포의 체액성 면역 반응을 유도하는 다면성의 면역조절 효과로, 활성화된 Th2 세포나 비만세포, 호산구에 의해 생산되며, IL-4는 활성화된 CD4 T 세포가 관여하는 TH2반응 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 폐포세척액과 폐 조직내의 IL-4의 생산을 비교하였다.

그 결과 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군의 폐포세척액내 IL-4의 생산량이 유의성 있게 감소하였으며, 폐 조직내의 IL-4의 생산에는 큰 차이가 없는 것을 관찰 하였다(Fig. 7).

IL-5는 Th2형의 CD4+ T 세포가 생산하는 homodimer로, 골수에서 호산구의 성숙과 성숙한 호산구의 말초 혈액으로의 유입에 관여²⁷⁾하며, 호산구가 염증부위로 모이게하는 역할을 하는 것²⁵⁻²⁸⁾으로 알려져 있어 BALF내 호산구의 수가 줄어드는 이유가 IL-5의 생산과 연관이 있는지를 IL-5 생산을 조사하였다. 그 결과 Fig. 8.에서 보는 바와 같이 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 대조군에 비해 폐포세척액내의 IL-5의 생산이 유의성 있게 감소하였으며, 폐 조직내의 IL-5의 생산도 유의성 있게

감소하는 것을 관찰 되었다.

IL-13은 활성화 Th2 세포가 생산하여 IgE 생산, 점액 과다분비, 기관지 과민반응, 부착분자 발현, 키모카인등의 발현을 조절하는 효과로, 내피세포의 부착분자인 VCAM-1의 발현을 억제시켜 호산구와 T 세포의 침윤을 억제시키며³¹⁾, 기도의 점액분비를 억제하여 기도 반응을 억제하는 것³²⁾으로 알려진 중요한 효과다.

淸上秘飲 1 mg/ml 투여군은 폐포세척액내의 IL-13의 생산이 유의성 있게 감소하였으며, 폐 조직내의 IL-13의 생산도 있게 감소하는 것을 관찰 하였으나, 통계적 유의차를 보이지 않았다(Fig. 9).

이러한 결과 폐포 세척액과 폐 조직내의 기관지천식과 연관되어지는 효과의 생산을 淸上秘飲이 억제하여, 천식유발을 억제하는 것으로 생각된다.

림프절은 외부항원에 대해 림프구의 반응이 일어나는 곳으로 항원에 대해 반응하는 클론들이 증식하며, 항원에 대해 강한 반응¹⁷⁾는 장소로, 이미 Fig. 5에서 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 림프구의 증식능이 대조군에 비해 현저히 저하되는 것을 확인한 바, 효과의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 림프구의 특이적 항원에 대한 효과의 생산을 비교하였다.

Th1 반응에 관여하는 IFN- γ 는 대조군과 실험군에서 차이를 보이지 않았으며, Th2 반응에 관여하는 IL-4, IL-5 및 IL-13은 대조군 림프구에서 상당히 많이 생산되었지만, 淸上秘飲을 1 mg/ml 투여군에서 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 10). 이러한 결과로 보아 淸上秘飲은 림프구의 항원 특이적 반응을 강력히 억제하는 것으로 생각된다.

B 세포가 생산하는 항체는 체액성 면역반응에 관여하며, IgG는 보통 4개의 아군으로 나누어지며, IgG2a는 IFN- γ 의해서 생산이 유도되며, IgG1은 IL-4에 의해 생산이 유도된다^{34,35)}. IgE는 IgE의Fc 수용체를 가진 비만세포를 자극하여 다양한 생리활성 물질의 분비를 유도함으로써 알려져 반응을 일

으키고, IgE의 생산은 IL-4가 B림프구의 isotype switching을 유도함으로써 가능³³⁾하게 되므로, 혈청내 IgE 농도는 알러지 증상을 나타내는 중요한 지표가 된다.

혈청내의 OVA 항원에 특이적인 IgE의 생산을 비교한 결과, 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군은 대조군에 비하여 혈청내 IgE의 생산은 감소하였지만, 유의한 차이는 나타내지 않았고, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서는 혈청내 IgE의 생산이 대조군에 비해서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 11).

또한 in vivo에서 淸上秘飲의 투여가 B세포의 다른 항체 생산에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여 IgM, IgG1, IgG2a의 생산량을 조사하였다.

IgM은 면역 반응 초기에 B 세포가 생산하는 항체로, 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군의 경우 혈청내 IgM의 생산은 감소하였지만 개체차이가 심하여 유의한 차이는 보이지 않았지만, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군은 대조군에 비해서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 12).

또한 혈청내의 IgG1의 경우 淸上秘飲 0.1 mg/ml 투여군은 대조군과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았지만, 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군의 경우 IgG1 분비는 유의하게 감소되었다(Fig. 13).

반면 Th1 반응시 높게 분비되는 IgG2a의 혈중 농도는 淸上秘飲 1 mg/ml 투여군에서 IgG2a의 생산이 대조군에 비해 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 14).

이와 같은 결과는 淸上秘飲의 투여가 전체적인 면역반응의 저하에 기여하지만, Th1 반응이 Th2 반응만큼 저하되지는 않는다는 증거라고 볼 수 있다.

이상의 실험 결과를 종합하면, 알러지성 천식 마우스 모델에서 淸上秘飲이 기도과민반응과 기도 염증을 완화시킬 수 있음을 확인하였으며, 이와 같은 효능은 Th2 세포가 생산하는 알러지 반응과 연관 있는 효과 생산 및 림프구의 활성화의 억제 등 면역억제를 통하여 나타나는 것으로 판단된다.

그러나 이러한 淸上秘飲의 작용은 단순한 면역억제 작용은 Th2 반응을 보다 강력히 억제하며, Th1 반응의 억제 정도는 상대적으로 약하여 알러지 반응을 유의하게 완화시킬 수 있는 것이 아닌가 사료된다.

그러므로 淸上秘飲은 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 모두 억제할 수 있으나 특히 체액성 면역반응을 보다 강력히 억제하는 처방으로 생각되며, 알러지성 천식이나 비염 등 알러지 질환 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

8가지 약제로 구성된 淸上秘飲의 항 알러지성 효과와 더불어 최근 염증반응에 중요시되고 있는 CD4+ helper T lymphocyte에서 분비되는 사이토카인의 변화에 미치는 영향을 알고자 OVA를 이용하여 알러지를 유발시킨 mouse의 AHR을 측정하고, BALF 내 macrophage, eosinophils, neutrophil, lymphocyte 수, 사이토카인의 변화, 혈청내 Ig E의 변화, 항원특이적 반응에 미치는 淸上秘飲의 알러지성 기관지 천식 억제 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

1. 淸上秘飲은 마우스의 기도과민 반응을 유의하게 억제하였다.
2. 淸上秘飲은 염증을 유도한 마우스의 BALF내 백혈구 수를 현저히 감소시켰으며, 이중 대식세포의 증가와 호산구의 감소를 나타내었다.
3. 淸上秘飲은 림프절 세포수를 유의하게 감소시켰으며, 항원의 농도에 의존적으로 증식이 증가한 림프구를 고농도 투여군에서 현저하게 감소시켰다.
4. 淸上秘飲은 대조군에 비하여 BALF와 염증조직에서 IFN- γ 를 저하시켰으며, IL-4는 BALF내

에서만 감소시켰다. 또한 IL-5와 IL-13의 생산도 현저하게 감소시켰다.

5. 淸上秘飲은 고농도 투여군에서 림프구의 특이적 항원에 의하여 증가된 IL-4, IL-13을 유의하게 감소시켰으며, IFN- γ 와 IL-5도 감소시켰다.
6. 淸上秘飲은 고농도 투여군에서 IgE 생산을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다.
7. 淸上秘飲은 고농도 투여군에서 혈청내 IgM 과 IgG2a 의 현저한 감소 현상을 나타냈다.

이러한 결과를 종합하면, 淸上秘飲의 투여는 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 모두 억제하나 체액성 면역반응을 보다 강력히 억제함으로써 알러지성 천식과 비염 등 알러지 질환의 치료에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Adelroth, E., Hargreave, F.E., and Ramsdale, E.H: Do physicians need objective measurements to diagnose asthma? *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:704-707,1986.
2. Palmerio, E.M., Hopp, R.J., Biven, R.E., Bewtra, A.K., Nair, N.N., and Townley, R.G: Probabilis of asthma based on methacholine challenge. *chest*, 01:630-633,1992.
3. Kay, A.B: Asthma and Inflammation. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 87:893-910,1991.
4. Wills-Karp, M: Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol.* 17:255-281,1999.
5. Del Prete, G.F., De Carli, M., De Caril, M.M., D'Elios, P., Maestrelli, M., Ricci, Fabbri, L., and Romagnani, S: Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur. J. Immunol.* 23:1445-1449,1993.
6. Coyle, A.J., Le Gros, G., Bertrand, C., Tsuyuli, S., Heusser, C.H., M. Kopf, M., and Anderson, G.P: Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 13:54-59,1995.
7. Nakajima, H., Iwamoto, I., Tomoe, Matsumura, R., Tomooka, H., Takatsu, and Yoshid, S: CD4+ T-lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146:374-377,1992.
8. Wills-Karp, M., Jackie, L., Xueying, X., Brian, S., Tamlyn, Y.N., Christopher, L.K., and Debra, D.D: Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma. *Science.* 282:2258-2261,1998.
9. Bhagat, R.G., Grunstein, M.M: Effects of corticosteroid on bronchial responsiveness to methacholine in asthmatic children. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131:902-906,1985.
10. Horn, B.R., Robin, E.D., and Theodore, J: Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N. Engl. J. med.* 292:1152-1155,1975.
11. Schleimer, R.P: The mechanism of anti inflammatory steroid action in allergic diseases. *Am. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25:381-412,1985.
12. Bousquest, J., Chanez, P., Lactoste, J.Y., White, R., Vic, P., Godard, P., and michel, F.B: asthma : a disease remodeling the airway. *Allergy.* 47:3-11,1992.

13. Caramori, G., and Adcock, I: Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.*16:247-277,2003.
14. Hamelmann, E., Schwarze, J., Takeda, K., Oshiba, A., G.L. Larsen, G.L., Irvin, C.G., and Gelfand, E.W: Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 156:766-775,1997.
15. Pare, P.D. and Bai, T.R.: The consequences of chronic allergic inflammation. *Thorax*, 50:328-332,1995.
16. Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J.Y., Barneon, G., Ghavanian, N., and Godard, P: Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* 323:1033-1039,1990.
17. Burnet, F.M: The Clonal selection Theory of Acquired Immunity. London Cambridge University Press 1959.
18. Beasley, R., Roche, W.R., Roberts, J.A., and Holgate, S.T: Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:806-817,1989.
19. Donald, Y.M., Leung, S., Szeffler, J., and Harold, S.N: The role of lymphocytes in allergic disease. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 105:399-408,2000.
20. Schreiber, R.D., Hicks, L.J., Celada, A., Buchmeier, N.A., and Gray, P.W; Monoclonal antibodies to murine γ -interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J. Immunol.* 134:1609-1618,1985.
21. Kasakura, S: A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori.* 46:915-21,1998.
22. O'Garra, A., and Arai, N: The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends. Cell. Biol.* 10:542-50,2000.
23. Paul, W.E., and Ohara, J: B-cell stimulatory factor-1/interleukin4. *Annu. Rev. Immunol.* 5:429-459,1987.
24. Gordon, S: Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3:23-25,2003.
25. Lopez, A.F, Sanderson, C.J., Gamble, J.R., Campbell, H.D., IG Young, I.G., and Vadas, M.A: Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J. Exp. Med.* 167: 219-224,1988.
26. Yamaguchi, Y., Hayashi, Y., Sugama, Y., Miura, Y., Kasahara, T., Kitamura, S., Torisu, M., Mita, S., Tominaga, A., and Takatsu, K: Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J. Exp. Med.* 167:1737-1742,1988.
27. Clutterbuck, E.J., Hirst, E.M., and Sanderson, C.J: Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood.* 73:1504-1512,1989.
28. Foster, P.S., Hogan, S.P., Ramsay, A.J., Matthaei, K.I., and 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.
29. Pascale, V.G., Guan, J., Liu, L., Kuivenhoven, J.A., Robert, D.R., William C.S., and William C.A: A vascular bed - specific pathway regulates cardiac expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 103:799-805,1999.
30. Andrew, D.P., Chang, M.S., McNinch, J., Wathen, S.T., Rihanek, M., Tseng, J., . Spellberg, J.P., and Elias 3rd, C.G: STCP-1 (MDC) CC Chemokine Acts Specifically on Chronically Activated Th2 Lymphocytes and Is Produced by Monocytes on Stimulation with Th2 Cytokines IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 161:5027-5038,1998.
31. Bochner, B.S., Klunk, D.A., Stensky, S.A., Coffman, R.L., and RP Schleimer, R.P: IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J. Immunol.* 154:799-803,1995.
32. Alimam, M.Z., Piazza, M.F., Selby, D.M., Letwin, N, Huang, L., and Rose, M,C : Muc-5/5ac Mucin Messenger RNA and Protein Expression Is a Marker of Goblet Cell Metaplasia in Murine Airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22:253-260,2000.
33. DeKruyff, R.H., Turner, T., Abrams, J.S., Palladino, M.A.Jr., and Umetsu, D.T: Induction of human IgE synthesis by CD4+ T cell clones. Requirement for interleukin 4 and low molecular weight B cell growth factor. *J. Exp. Med.* 170:1477-1493,1989.
34. Herrod, H.G: IgG subclass deficiency. *Allergy. Proc.* 13:299-302,1992.
35. Ward, E.S., and Ghetie, V: The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. *Thera. Immunol.* 2:77-94,1995.
36. 홍천수, 김규언 : 기관지 천식-병인 및 역학. 천식 및 알러지. 237-256,2002.
37. Frigas, E., and Gleich, G.J: The eosinophil and pathology of asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 77:527-537,1986.
38. Barnes, P.J: Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:511-522,2003.