

소청룡탕이 천식이 유발된 생쥐의 면역세포에 미치는 영향

김 형 우

동신대학교 한의과대학 본초학교실

Effects of Socheongryong-Tang on Inflammatory Cells in Asthmatic Mice

Hyung Woo Kim

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongshin University, Naju, Korea

Abstract

BACKGROUND : Socheongryong-Tang(小青龍湯, SCRT), a herbal medicine, has been widely used for the control of respiratory disease in Eastern countries. Recent years SCRT was known as anti-allergic agent. However, its therapeutic mechanisms, especially an inhibitory effect on inflammatory cell infiltration and airway remodeling in allergic asthma are unclear.

METHODS : We investigated the effects of SCRT on levels of IL-4, and IFN- γ using flow cytometric analysis and infiltration of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid(BALF) using cytopspin methods in allergen-induced asthma.

RESULTS : SCRT decreased levels of IL-4, a Th2-driven cytokine. But INF- γ , a Th1-driven cytokine, was not changed. With SCRT treatment, infiltration of inflammatory cells showed reduced tendency.

CONCLUSION : In conclusion, we demonstrated that regulation of Th1/Th2 imbalance may be one of mechanism contributed to reduction of inflammatory cell infiltration.

Key words : Socheongryong-Tang ; IL-4 ; IFN- γ ; Herbal medicine ; Asthma

* Corresponding author : Hyung Woo Kim, Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongshin University, Naju, Korea Tel : 82-61-330-2972 FAX : 82-61-330-3519 E-mail : kronos7@hanmail.net

I. 서론

천식은 세계에서 제일 흔한 질병 중 하나이며, 최근 들어 유행률이 매우 빠른 속도로 증가하고 있다.¹⁾ 천식은 가역적인 기도폐쇄와 기관지 평활근의 비대, 그리고 만성 염증을 그 특징으로 하는 질환이다. 이러한 만성 염증은 Th2 쪽으로 치우쳐서 일어나게 되며, 이러한 반응에 관여하는 cytokine으로는 interleukin 4(IL-4), IL-13, IL-5, IL-9와 같은 것들이 있다. 이 중 IL-4는 가장 중요한 Th2 skewing cytokine으로 직접적으로 B 세포를 자극하여 IgE를 생산하게 하고, 생산된 IgE가 비만세포(Mast cell)에 부착되게 된다. 이러한 상태에서 재차 항원이 들어오게 되면 비만세포는 천식과 관련된 많은 인자들을 분비하게 되어 급성 과민반응을 일으키게 된다.²⁾

소청룡탕(小青龍湯)은 극동에서 가장 잘 알려진 알러지성 비염과 천식의 치료제이다. 소청룡탕은 후한시대 장중경에 의하여 상한잡병론에 처음으로 기재 되었는데, 그 이론에 의하면, 소청룡탕은 傷寒表不解, 心下有水氣, 乾嘔, 氣逆, 發熱咳喘에 사용한다고 하였다.^{3,4)} 최근 들어 소청룡탕에 항히스타민작용이 있는 것이 밝혀졌는데, 다른 항히스타민제제에서 보이는 충추신경 억압에 의한 졸음이나 진정작용이 없어서 더욱 바람직한 항히스타민 제제라는 것을 부가로 밝혔다.⁵⁾ 또한 다른 논문에서 소청룡탕은 기관지 평활근의 확장 작용이 있는 것이 밝혀졌다.⁶⁾ 소청룡탕은 기도내로의 염증 세포 침윤을 막아서 결국 천식 치료에 도움을 주며, 천식 환자에게서 IL-4와 IgE의 레벨을 감소시킨다는 사실도 아울러 알려져 있다.⁷⁾ 하지만, 인터페론 감마에 대한 작용은 다소 논란의 여지가 있다.^{7,8,9,10)}

본 논문에서 저자들은 생쥐에 천식을 유발

시킨 후, 기관지폐포 세척액 내에서 사이토카인의 변화와 면역세포의 침윤정도를 관찰하고, 이러한 변화에 대하여 소청룡탕이 미치는 영향을 조사하여 의미있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 동물

8주령된 암컷 Balb/c 생쥐를 오리엔트 바이오(서울, 한국)에서 구입하여, 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 온도와 습도가 조절되는 환경($24 \pm 3^\circ\text{C}$, 12-hr light-dark cycle)에서 고형사료와 물을 마음껏 섭취하게 하며 실험에 사용하였다. 실험동물은 정해진 규정에 의하여 다루었으며, 실험 프로토콜은 실험동물 위원회의 승인을 득하였다.

2. 검액의 준비 및 시료

소청룡탕은 8가지 약재로 구성되는데 그 구성은 다음과 같다(Table 1). 여덟 가지 한약재를 표기된 용량대로 섞어서 전기약탕기(대웅, 한국)에 넣고 증류수 1,300ml을 붓고 3시간 달여 최종 500ml의 검액을 얻었다, 얻어진 검액을 원심분리기를 이용하여 2,200g에서 20분간 원심분리한 후, 찌꺼기를 버리고 상층액을 얻었다. 얻어진 약액을 진공 농축기(EYELA, 일본)를 이용하여 1/10로 농축하여 사용할 때까지 영하 20°C 의 냉동실에 보관하였다. 최종 산물인 검액은 사용하기 전에 증류수로 지시된 농도로 재희석하여 사용하였다.

난황(OVA albumin)은 시그마(St. Louis, 미국)에서 구입하였고 사용하기 전에 DetoxiGel column(Pierce, New York, USA)을 이용하여 독성을 제거하고 BCA 법으로 다시 정량하였

Table 1. Components and standard materials of SCRT

Herbal name	Standard materials	Botanical name	Amount
Rhizoma Pinelliae	Homogentistic acid	root of Pinelia ternata	16.86g
Herba Ephedrae	Ephedrine	stem of Ephedra sinica	16.86g
Radix Paeoniae	Paeoniflorin	root of Paeonia lactiflora	16.86g
Fructus Schisandrae	Schizandrin	fruit of Schizandra chinensis	16.86g
Herba Asari	a-Asarone	whole plant of Asarum sieboldii	11.25g
Rhizoma Zingiberis	6-Gingerol	root of Zingiber officinale	11.25g
Ramulus Cinnamomi	Cinnamaldehyde	cortex of Cinnamomum cassia	11.25g
Radix Glycyrrhizae	Glycyrrhizic acid	roasted root of Glycyrrhiza uralensis	11.25g

Each dosage corresponds to 1½-times daily dosage for adult humans(60kg).

다. 사이토카인 측정을 위하여, The Multiplex cytokine detection kit은 Bender Med-Systems(Vienna, Austria)으로부터 구입하였다.

3. 천식 유발과 실험군 선정

100ul의 용매(phosphate buffer saline, PBS)에 100ug 의 난황(OVA, 항원으로서)과 2mg alum을 녹여 3일간 복강으로 주사한 후, 2주 뒤 생쥐를 케타민(100mg/kg)과 럼폰(10mg/kg)으로 마취 시킨 후, 비강 내 점적의 방법으로 25ug의 항원 (PBS 30ul)을 생쥐에게 2일에 걸쳐 투여하였다. 3일 뒤 같은 방법으로 2번에 걸쳐 비강 내 점적을 시행하여서 총 4번의 비

강 내 점적을 시행하였다(Fig. 1). 소청룡탕은 6일간 구강 투여되었는데, 투여용량은 이전 연구에서 생쥐의 대사율과 체중을 고려하며, kg 당 정상인의 4배 분량으로 정하였다(data not shown). 실험군은 다음과 같다.

- 1) 정상군(Normal group) : 천식을 유발하지 않고 용매(증류수)만 투여한 군
- 2) 천식 대조군(Experimental control group) : 천식을 유발시키고, 용매(증류수)만 투여한 군.
- 3) 소청룡탕군(SCRT group) : 천식을 유발시키고 소청룡탕을 구강투여한 군.

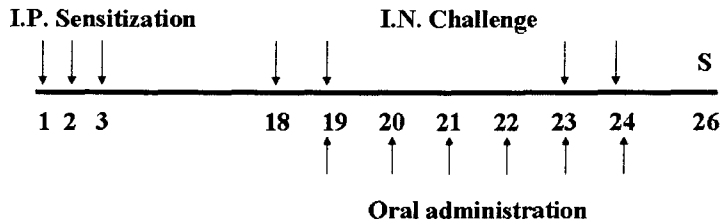


Fig. 1. Experimental schedule

All experimental groups, except normal control group, were sensitized intraperitoneally on days 1, 2, and 3 and challenged intranasally at days 18, 19, 23, and 24. Animals were treated with SCRT and/or PD from days 19 until 24. Airway responsiveness was measured on day 25. All animals were sacrificed on day 26. I.P. intraperitoneal, I.N. intranasal, Penh ; enhanced pause, S ; sacrifice

4. 기관지폐포 세척액

실험 마지막 날, 과도한 용량의 케타민과 럼푼을 주사하여 생쥐를 희생시킨 후, 경부를 절개하고 기관지의 연골사이를 절개하여 개방시킨 후, 연골과 연골사이로 도관 (Insyte, BD)을 삽입하며 기관지 폐포 세척액을 얻었다. 1회 세척당 1.8ml의 PBS를 조심스럽게 밀어넣어 최소한 1.5ml 이상의 세척액을 확보한 것만을 data로 사용하였다. 얻어진 세척액 중 일부는 염증세포의 수를 측정하는데 사용되었고, 일부는 원심분리로 찌꺼기를 없앤 후, 냉장하였다가 cytokine 측정에 사용하였다.

5. 사이토카인 (cytokine)의 측정

얻어진 기관지폐포 세척액을 1,100g로 10간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고 난 후, 얻어진 상층액을 사이토카인을 측정하는데 사용하였다. IL-4, IFN-g의 농도를 측정함에 있어 Chen R. et al의 방법¹¹⁾으로 시행하였다. 간략히 요약하자면, 기관지 폐포 세척액과 농도별로 희석된 스탠다드를 96-well 필터 플레이트 (Millipore, 미국)에 넣은 후, 각각의 사이토카인에 대한 항체가 부착되어 있는 형광 비드 (fluorescent bead)와 비오틴이 부착되어있는 2차 항체를 넣고, 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. 2시간 후, 플레이트를 잘 씻어내고, streptavidin-phycoerythrin를 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후, 잘 씻어내고 남은 검체를 5-ml(SPL, 한국) 튜브에 옮겨 담은 후, 300ul의 PBS를 더해 총 500ul로 만들어 준다. 형광도는 유세포분석기(BD, 미국)를 이용하여 측정하였고, 측정된 값은 flow cytomix pro(Bender Medsystems, Vienna, Austria)를 이용하여 계산하였고, 계산 결과는 picogram/milliliter(pg/ml)로 나타내었다.

6. 면역세포 침윤도 측정

얻어진 기관지폐포 세척액의 일부를 냉장보관 하였다가 면역세포 침윤도 측정에 사용하였다. 면역세포의 개수를 측정하기 위하여, 기관지폐포 세척액을 5배로 희석한 다음, 슬라이드 글라스(MARIENFELD, 독일)에 붙여 말린 후, 각각의 슬라이드 글라스를 헤마톡실린과 에오신으로 염색하고, 400배에서 현미경으로 관찰 하였다.

7. 통계 처리

모든 결과는 Mann-Whitney's U test를 통하여 검정하였고 이때에 SPSS version 11.5가 사용되었다. 결과에서 P 값이 0.05이상인 것을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

1. 소청룡탕이 기관지폐포 세척액 내의 사이토카인에 미치는 영향

재료 및 방법에서 논술한 것과 같이 기관지폐포 세척액으로부터 사이토카인의 함량을 형광비드법을 이용하여 측정하였다. 이러한 측정 결과에서, 대조군은 현격한 수준의 IL-4(36.58 ± 3.37 pg/ml) 생성량의 증가를 보임을 확인할 수 있었다. 이때의 정상군이 보인 IL-4 수준은 25.4 ± 4.80 pg/ml이었다. 소청룡탕의 투여는 대조군에서 보인 현격한 IL-4 수준의 증가를 효과적으로 억제하였다. 소청룡탕군은 기관지폐포 세척액 내에서 15.5 ± 9.06 pg/ml의 IL-4 수준을 보였다(Fig 2A).

기관지 폐포 세척액 내에서 IFN-g의 수준역시 조사하였는데, 천식 유발에 의하여 IFN-g의 수준은 현격하게 감소하였다. 이때의 정상군은

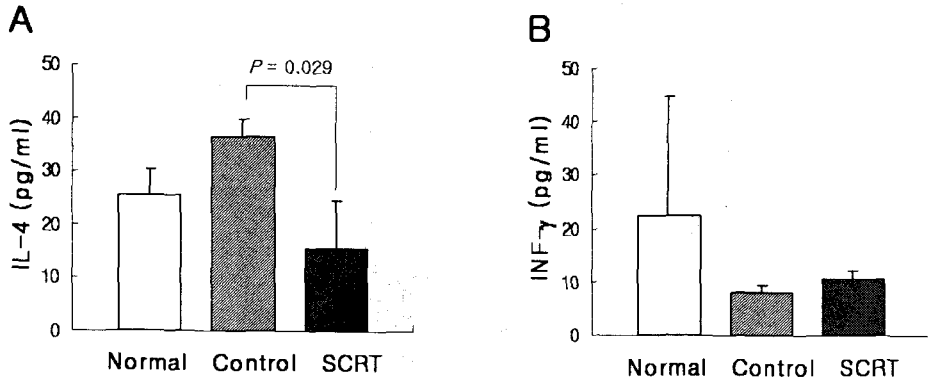


Fig. 2. Effects of SCRT on cytokine production levels in BALF.

Results are presented as mean \pm SEM. P value is represented as compared with control group.

22.33 \pm 10.28pg/ml 이었고, 대조군은 7.90 \pm 1.61pg/ml의 IFN-g 수준을 보였다. 소청룡탕의 투여는 기관지폐포 세척액 내에서 이러한 IFN-g의 감소에는 특별한 영향을 미치지 않았다. 소청룡탕 군은 10.53 \pm 1.61pg/ml의 IFN-g 수준을 보였다(Fig 2B).

2. 소청룡탕이 기관지 조직 내로의 염증세포 침윤에 미치는 영향

소청룡탕이 기관지 조직 내로의 염증세포 침윤에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 기관지 폐포 세척액으로부터 염증세포의 개수와 종류를 조사하였다. 본 실험으로부터 천식을 유발한 대조군에서 정상군에 비해 무려 34.5배나 되는 면역세포가 침윤된다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 염증 세포수의 증가를 소청룡탕의 투여가 효과적으로 억제하였고, 그 억제력은 총 세포 개수 기준으로 65%에 달했다(Fig. 3). 현미경을 통하여 확인된 면역세포들은 대식세포, 그리고 림프구와 호중구나 호산구를 포함하는 다핵형 세포(polymorphonuclear cells) 였고, 각 군에서 가장 대표적인 현미경 소견을 Fig. 4에 제시하였다.

IV. 고 찰

환자에게 발생하는 증상을 염두에 두고 살펴볼 때, 한의학에서의 효천(哮喘)은 서양의학의 천식(asthma)과 유사성이 있다. 또한, 효천(哮喘)은 한의학적으로 실증(實證)에 속하고, 그 치료 역시 발산풍한(發散風寒)이나 거담(祛痰) 작용이 있는 천민도담탕(千縉導痰湯)이나, 정천탕(定喘湯) 등을 사용한다.³⁾ 한의학 이론에서 짧은 시간동안 강자극에 의하여 유발된 질병은 실증이 될 확률이 많고, 약자극이 오랫동안 지속되면 허증이 유발될 확률이 높다. 이러한 자극시간과 동물의 기초 대사량을 고려해 보았을 때, 동물을 사용한 질환 모델은 한의학적으로 실증에 해당하는 경우가 많다. 실제로 생쥐의 기초 대사량이 대략 사람의 10배 이상 크다. 이러한 내용들을 참고하여 살펴보면, 본 논문에서 사용된 질환 모델은 한의학적으로 실증에 해당한다고 볼 수 있다. 소청룡탕(小青龍湯)은 세계적으로 가장 유명한 실증에 기인한 호흡기 질환 치료제 이지만, 그 치료 기전에 대해서는 명확히 알려진 바가 별로 없

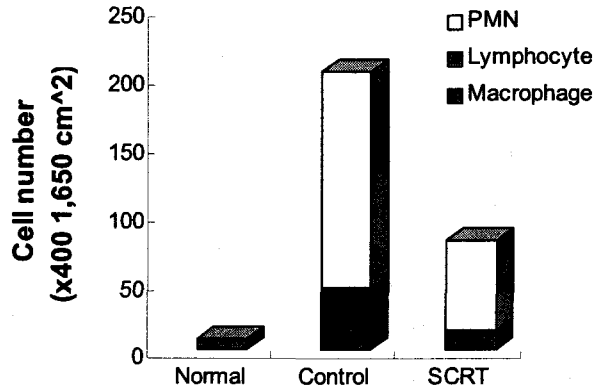


Fig. 3. Effects of SCRT on inflammatory cell number in BALF

The data were represented as the number of all cells, which were observed in same sized square(1,650cm²) at the magnification of 400.

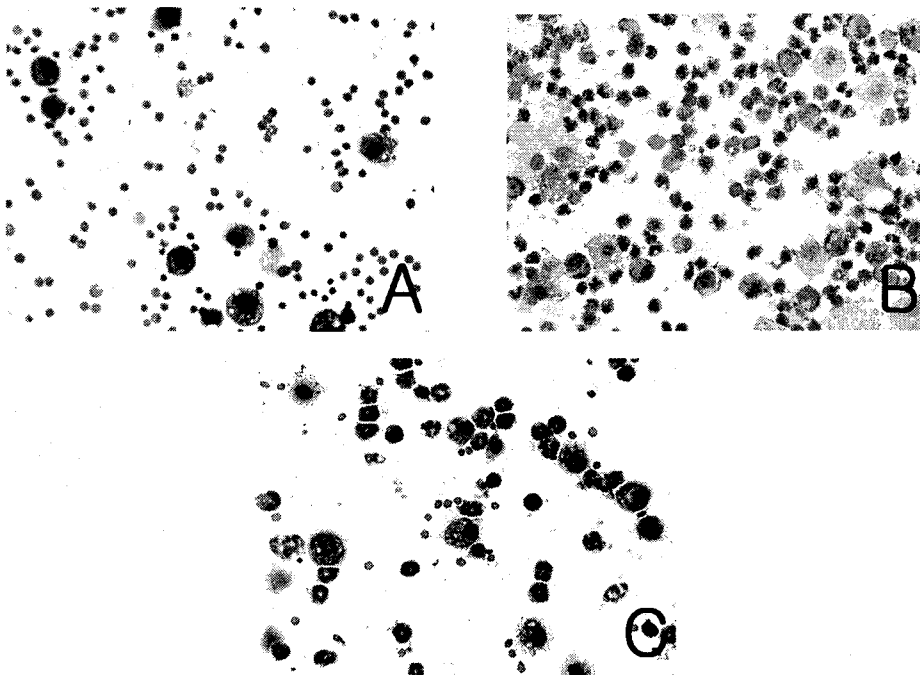


Fig. 4. Effects of SCRT on number and shape of total inflammatory cells in BALF

Total inflammatory cell number and shape are measured using cytopspin methods. The data were observed in same sized square(1,650cm²) at the magnification of 400. (A) Normal group, (B) Control group, (C) SCRT group.

는 실정이기 때문에 이러한 실험을 기획하게 되었다.

천식환자는 가역적인 기도의 과민반응을 보이고, Th2 반응에 의한 만성 염증 상태가 지속된다.¹²⁾ 천식 환자의 기관지폐포 세척액, 가래 등에서 Th2 driven cytokine인 IL-4의 레벨은 정상인에 비해 올라가 있고, Th1 driven cytokine 인 IFN-g 레벨은 정상인보다 낮아져 있다.^{13,14,15)} 이러한 과정을 통하여 Th2 반응에 관련된 면역세포들이 기도 내로 침윤되게 되는데, 본 논문에서 사용한 천식 모델은 이러한 천식환자의 상태를 잘 반영하였다.

본 논문과 유사한 다른 논문들에서 대부분 기화된 항원을 분무하는 방식을 이용하여 천식을 유발 하였다.^{6,7,16,17)} 이러한 방식의 문제점은 각각의 개체들의 호흡량과 기타 다른 요인에 따라서 각각의 개체들에게 흡입되는 항원의 양이 상이할 수 있다는 점이다. 그러나, 본 논문에서와 같이 최근 들어 새로 개발된 방법인 비강 내 점적의 방법¹⁸⁾을 사용하게 되면 모든 실험 개체에게 균등한 양의 항원을 빠른 시간 안에 전달 할 수 있다는 장점을 가지게 된다.

이전의 논문들에서 소청룡탕(小青龍湯)의 구강투여는 IL-4와 IL-5의 수준을 효과적으로 낮춘다것이 알려져 있다.^{7,8,9)} 하지만, 소청룡탕이 INF-g 에 미치는 영향은 논란의 여지가 있다. Ikeda와 Tanaka 등^{7,10)}은 소청룡탕(小青龍湯)이 IFN-g의 생성 수준에는 별 영향을 미치지 않는다고 보고 하였다. 하지만, Nagai 등⁸⁾은 소청룡탕(小青龍湯)의 구강투여가 천식 유발에 의하여 감소된 IFN-g의 생성 수준을 정상 수준으로 회복 시켜 줄 수 있다고 보고 했고, 게다가 Ko 등⁹⁾은 소청룡탕의 처지가 IFN-g의 mRNA 발현수준을 향상시킨다는 것을 RT-PCR을 통하여 밝혀냈다. 우리의 결과에서 소청룡탕(小青龍湯)은 천식 유발에 의하여 상승된 IL-4의 수준을 효과적으로 감소시켜 이전의

논문들과 동일한 결과를 나타내었고, IFN-g의 생성 수준에는 별 영향을 미치지 않았다.

소청룡탕(小青龍湯)은 생쥐에서 기관지 확장 작용과 항염증 작용을 보임이 알려져 있고,^{6,8)} Th2 관련 사이토카인의 분비를 억제한다는 사실이 알려져 있다.⁷⁾ 본 논문에서는 이러한 가정에 대한 직접적인 증거로 기관지폐포 세척액 내에서 각종 면역세포의 수가 소청룡탕(小青龍湯)의 투여에 의하여 현저하게 감소함을 보였다.

이러한 결과를 요약해 보면, 소청룡탕(小青龍湯)의 구강투여는 기관지폐포 세척액 내에서 천식 유발에 의하여 증가된 Th2 관련 사이토카인인 IL-4의 수준을 효율적으로 낮추었고, Th1 관련 사이토카인인 IFN-g의 수준에는 특별한 영향을 미치지 않았다. 또한 천식 유발에 의해 현저하게 증가된 기관지 내로의 염증세포 침윤을 효과적으로 억제하였다. 이상의 결과들에서 소청룡탕(小青龍湯)의 염증억제 기전은 Th1/Th2 밸런스를 조절하는 것이 한가지 기전임을 유추해 볼 수 있겠다.

결론적으로 본 논문에서는 소청룡탕(小青龍湯)이 천식 치료에 사용될수 있는 매우 강력한 가능성을 제시하며, 아울러 이러한 소청룡탕(小青龍湯)의 천식 치료 기전은 Th1/Th2 밸런스를 조절하는 기능일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 연구비 지원으로 수행 되었음.

참고문헌

- 1) Kao ST, Wang SD, Wang JY, Yu CK, Lei HY. The effect of Chinese herbal

- medicine, xiao-qing-long tang(XQLT), on allergen-induced bronchial inflammation in mite-sensitized mice. *Allergy*. 2000; 55: 1127-1133.
- 2) Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001 Aug; 54(8): 577-89. Review.
 - 3) Hwang DY. *Bang Yak Hap Pyeon*. Seoul: Namsandang 1992: 152.
 - 4) Zuo Yanfu, Zhu Zhongbao, Huang Yuezhong, Tao Jinwen, Li Zhaoguo. Science of prescriptions. *Nanjing*; 2002; 44-46.
 - 5) Sakaguchi M, Iizuka A, Yuzurihara M, Ishige A, Komatsu Y, Matsumiya T, et al. Pharmacological characteristics of Sho-seiryu-to, an antiallergic Kampo medicine without effects on histamine H1 receptors and muscarinic cholinergic system in the brain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1996; 18: 41-47.
 - 6) Kao ST, Lin CS, Hsieh CC, Hsieh WT, Lin JG. Effects of xiao-qing-long-tang (XQLT) on bronchoconstriction and airway eosinophil infiltration in ovalbumin-sensitized guinea pigs: in vivo and in vitro studies. *Allergy*. 2001; 56: 1164-1171.
 - 7) Ikeda Y, Kaneko A, Yamamoto M, Ishige A, Sasaki H. Possible involvement of suppression of Th2 differentiation in the anti-allergic effect of Sho-seiryu-to in mice. *Jpn J Pharmacol*. 2002; 90: 328-336.
 - 8) Nagai T, Arai Y, Emori M, Nunome SY, Yabe T, Takeda T, Yamada H. Anti-allergic activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine "Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)" on airway inflammation in a mouse model. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4: 1353-1365.
 - 9) Ko E, Rho S, Lee EJ, Seo YH, Cho C, Lee Y, et al. Traditional Korean medicine (SCRT) modulate Th1/Th2 specific cytokine production in mice CD4+ T cell. *J Ethnopharmacol*. 2004; 92: 121-128.
 - 10) Tanaka A, Ohashi Y, Kakinoki Y, Washio Y, Yamada K, Nakai Y, et al. The herbal medicine shoseiryu-to inhibits allergen-induced synthesis of tumour necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1998; 538: 118-125.
 - 11) Chen R, L Lowe, J D Wilson, E Crowther, K Tzeggai, J E Bishop, et al. Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using micro-particle based flow cytometric technology. *Clin Chem* 1999; 45: 1693.
 - 12) Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, Locksley RM. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med*. 1996 Jan 1; 183(1): 109-17. Erratum in: *J Exp Med* 1997 May 50; 185(9): 1715.
 - 13) Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 430-438.
 - 14) Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I

- and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003 ; 111 : 1293-1298.
- 15) Lynch EL, Little FF, Wilson KC, Center DM, Cruikshank WW. Immuno-modulatory cytokines in asthmatic inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Dec ; 14(6) : 489-502. Review.
- 16) Wen MC, Wei CH, Hu ZQ, Srivastava K, Ko J, Xi ST, et al. Efficacy and tolerability of anti-asthma herbal medicine intervention in adult patients with moderate-severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 ; 116 : 517-524.
- 17) Nagao K, Akabane H, Masuda T, Komai M, Tanaka H, Nagai H. Effect of MX-68 on airway inflammation and hyperresponsiveness in mice and guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol.* 2004 ; 56 : 187-196.
- 18) Tsitoura DC, Blumenthal RL, Berry G, Dekruyff RH, Umetsu DT. Mechanisms preventing allergen-induced airways hyper-reactivity: role of tolerance and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Aug ; 106(2) : 239-46.