

# 瓜子金 추출물과 Cyclosporin A가 OVA로 천식이 유발된 생쥐의 염증성 면역세포에 미치는 영향

조은환<sup>1#</sup>, 서영배<sup>1</sup>, 노성수<sup>2\*</sup>

1: 대전대학교 한의과대학 본초학교실, 2: 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

## Effects of Extract of Herba Polygalae Japonica on Inflammation Cells of Lung in Asthma-induced Mice by OVA Exposure

Eun-Hawn Cho<sup>1#</sup>, Young-Bae Seo<sup>1</sup>, Seong-Soo Roh<sup>2\*</sup>

1: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Daejeon University  
2: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

### Abstract

**Objectives :** The present study was carried out to investigate the effect of Herba Polygalae Japonica on the proliferation and activation of eosinophils which were prepared from lung cells of asthma-induced mice by ovalbumin (OVA) treatment.

**Methods :** C57BL/6 mouse was exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lung tissues were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Eosinophils were activated by rIL-3/rmIL-5 co-treatments. The lung cells were treated with extract of Herba Polygalae Japonica (EPJ), incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer, ELISA, RT-PCR and immunocytochemistry stain.

**Results :** A significant cytotoxicity by drug treatment was not observed. The cell number ratio of granulocyte, CD3e-/CCR3+, CD3e+/CD69+, CD4+, CD23+/B220+ cells was increased in rmIL-5/rIL-3 treated control group compared to the normal group. Cells numbers in the experimental animal group treated with EPJ was all decreased.

In ELISA analysis, IL-4, IL-5, IL-13 levels and histamine release level were increased in the control group compared to the normal animal group, then significantly decreased in the experimental group with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EPJ treatment.

In RT-PCR analysis, mRNA expressions of IL-4, IL-5, IL-13, CCR3 and eotaxin were increased in the control group compared to the normal animal group, then decreased in the experimental group with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EPJ treatment.

And eosinophil proliferation levels were 18847 $\pm$ 1527 (cpm) in the control group, 4676 $\pm$ 972 (cpm) in the positive control group, and 7709  $\pm$  549 (cpm), 16839  $\pm$  1403 (cpm), 16385  $\pm$  1723 (cpm) in the

\* 교신저자 : 노성수, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 053-770-2255 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

# 제1저자 : 조은환, 대전시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 042-280-2640 · E-mail : omdchoyh@daum.net

· 접수 : 2008년 5월 16일 · 수정 : 2008년 6월 11일 · 채택 : 2008년 6월 20일

experimental group with 100  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  of EPJ treatment.

**Conclusions :** The present data suggested that *Herba polygalae japonica* may have an effects on the inhibition of parameters associated with asthma responses in eosinophils, and thus implicate the possibility for the clinical application of EPJ.

**Key words :** OVA, Asthma, EPJ (extract of *Herba Polygalae Japonica*), Eosinophil, RT-PCR, Immunocytochemistry

## 서 론

천식이란 기관지가 정상인보다 민감해서 조그마한 자극에도 쉽게 반응하기 때문에 생기는 질병으로,喘鳴을 동반한 발작적인 호흡곤란의 증상으로 정의하는데,喘鳴은 기도가 부분적으로 막혀서 숨을 내쉴 때 쉼썩거리거나 가랑가랑하는 소리가 나는 것을 말한다<sup>1)</sup>.

천식의 원인에 대해서는 알레르기, 감염, 일상의 스트레스에 대한 심인성 생리반응, 공기감염, 자율신경실조 등을 들고 있으며, 아직까지는 알레르기로 대부분 받아들여지고 있다<sup>2)</sup>.

瓜子金은 《植物名實圖考》<sup>3)</sup>에 처음 기재된 이래, 기원은 원지과 식물<sup>4)</sup> 瓜子金 *Polygala japonica* Houtt.의 뿌리와 전초를 씻어서 曬乾하여 사용한다.

화학성분은 수지, 지방유, polygalitol, tetracetyl polygalitol, polygalasaponin I, II, III, IV, poly galasaponin I ~ X IX, polygalasaponins XXVIII- XXXII 등이 함유되어 있다<sup>5)</sup>.

약리작용은 瓜子金 추출액을 복강주사 투여시 생쥐의 자발운동을 현저하게 억제시켜 진정, 최면 작용을 나타내고, 개화된 뿌리와 지상부분의 5% 浸液에는 균일하게 溶血작용이 있고, 이외에도 항균 작용<sup>5)</sup>이 있다.

瓜子金은 味苦하면서 微辛하며 性は 平하여, 肺, 肝, 心經에 歸經하여, 祛痰止咳, 散瘀止血, 寧心安神, 解毒消腫의 效能이 있어, 咳嗽痰多, 跌墮損傷, 風濕痺痛, 吐血, 便血, 心悸, 失眠, 咽喉腫痛, 腫瘤瘡瘍, 毒蛇咬傷을 主治한다<sup>5)</sup>.

서양의학에서 천식의 만성적인 기도 염증을 억제시키는 치료방법이 주효하게 응용되고 있고, 瓜子金의 咳嗽에 대한 效能과 清熱하고 消腫하는 效能으로 천식에서 나타나는 기침과 만성 염증에 대한 치료 효과가 있을 것으로 생각된다.

이에 瓜子金이 천식의 염증을 유발시키는 염증면역세포에 미치는 영향을 알아보고자 천식 생쥐모델의 폐세포 및 비장세포를 분리하여 in vitro 실험을 시행

하여, 결과를 분석한 후 유의성 있는 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물은 수컷 4주령의 C57BL/6 생쥐를 한국생명공학연구원에서 공급받아 실험당일까지 고휘사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

##### ① 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium(MTS), 2,7-dichloro-di hydro-fluorescein diacetate(DCFH-DA), complete adjuvent, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), collagenase IV, 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV), aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma), formaldehyde, lamide, magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사(Logan, USA) 제품을, anti-CD3-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-CD8-FITC, anti-CD23-PE, anti- B220-PE, anti-CD69-FITC, propidium iodide(PI)와 RNase는 Pharmingen 사(Torreyana, USA), [methyl- 3H] Thymidine (Amersham, USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

##### ② 기기

본 실험에 사용된 기기는 유세포 형광분석기 (Becton

Dickinson, USA), 熱湯抽出器(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (Eyela, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench, water bath, vortex mixer, ice-maker (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), homogenizer (Omni, USA), plate shaker (Lab-Line, USA) 및 ELISA reader (Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

### 3) 약재

실험에 사용된瓜子金 (*Polygala Japonica* Houtt.) 은 중국 북경 약재시장에서 구입한 것을 대전대학교 한의과대학 본초학교실에서 중국 약전의 기준에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

### 4)瓜子金 추출물 분리

瓜子金 추출물(extract of Herba Polygalae Japonica : 이하 EPJ) 분리는瓜子金 200 g에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결건조기를 이용하여 완전 건조한瓜子金 추출물(47.4 g ; 수율 23.7 %)을 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 천식모델 생쥐의 폐세포 분리

C57BL/5 생쥐에 500 µg/ml의 난알부민과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum)를 0.2 ml (100 µg)을 복강 내로 주사하여 전신감작을 시킨 후 2주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 µg/ml) 100 µl를 기도투여(i.t)한다. 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도내로 흡입시킨다. 천식이 유발된 생쥐의 폐를 적출하여 폐조직을 잘게 절편 한 후 2% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 µg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 15 ml로 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해하여 폐 세포를 분리한다. 분리된 폐 세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거한다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하

여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정한다.

### 2) 폐세포 배양

24 well plate에 폐세포(2×10<sup>6</sup> cells)를 배양하고 EPJ (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 rIL-3 (30 U/ml나 rmIL-5 (10 µg/ml)로 호산구 활성화 유발을 위하여 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다.

### 3) 유세포 형광분석

배양 후 호산구 세포를 인산완충생리식염수(3% 우태아혈청, 0.1% NaN<sub>3</sub>)로 2회 수세하였고, 4°C에서 면역형광염색(immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 phycoerythrin (PE)-anti-mouse CD69, anti-mouse IgE, anti-CD3e-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-B220-PE 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD23 등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포형광분석기로 생쥐 폐세포에서 CD3e, CD4, CD8, CCR3, B220, CD23 (Fce) 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 Cell Quest 프로그램으로 CD69/CD3e, CD3e/CCR3, CD23/B220, 그리고 CD4/CD8의 비율(gated, %)을 산출하였다.

### 4) 기관지천식생쥐의 폐조직의 역전사-중합효소연쇄반응

#### (1) RNA 추출

배양한 호산구세포에 RNAzol<sup>ls</sup> 500 µl를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 50 µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

#### (2) 역전사-중합효소연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total

RNA 3  $\mu\text{g}$ 을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5  $\mu\text{l}$  10 mM dNTPs mix, 1  $\mu\text{l}$  random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25  $\mu\text{l}$ ), RNA inhibitor로서 1- $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  100 mM DTT, 4.5  $\mu\text{l}$  5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1  $\mu\text{l}$ 의 M-MLV RT (200 U/ $\mu\text{l}$ )를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이 20  $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

### (3) cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in germany)을 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3  $\mu\text{l}$ 의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는  $\beta$ -actin, IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, eotaxin 그리고 NOS-II 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ $\mu\text{l}$ )와 antisense primer (20 pmole/ $\mu\text{l}$ )를 혼합하여 1  $\mu\text{l}$ 를 가하고, 다시 3  $\mu\text{l}$  2.5 mM dNTPs, 3  $\mu\text{l}$  10 $\times$ PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18  $\mu\text{l}$  Taq polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )를 첨가한 다음 최종 부피가 30  $\mu\text{l}$  되도록 멸균 증류수를 가하고 pre-denaturation: 95°C 5분, denaturation: 95°C 5분, annealing: 55°C 1분, elongation: 72°C 1분을 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20  $\mu\text{l}$ 씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

### 5) ELISA analysis

생쥐 호산구 세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포씩 분주하고, EPJ (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 등을 처리했고, 약물처리 1시간 후 rIL-3 (30 U/ml)나 rmIL-5 (recombinant mouse interleukin-5, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PharMingen)를 48시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 IL-4, IL-5, histamine enzyme-linked immuno-sorbent assay (Endogen, USA)와 IL-13는 ELISA kit (R&D system)을 48시

간 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체(antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 호산구 세포 배양상층액 (culture supernatant)을 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu\text{l}$ 를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50  $\mu\text{l}$ 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6) 생쥐 호산구 세포 증식

생쥐 호산구세포의 증식을 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포씩 분주하고, EPJ (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )등을 처리하였다. 약물처리 1시간 후 rIL-3 (30 U/ml)와 rmIL-5를 72시간 동안 동시 배양하였다. 동시배양 40시간 배양 후 50  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 [methyl-3H] Thymidine을 첨가한 후 최종 48시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기 (Cell Harvester, USA)를 사용하여 유리섬유여지 (Glass microfiber filter, Whatman) 위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

### 7) IL-5R $\alpha$ -chain의 immunocytochemistry

생쥐 호산구 세포를 분리하여 24 well plate의 각 well에 2 $\times$ 10<sup>5</sup>세포씩 분주하고, EPJ (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 등을 처리했고, 약물처리 1시간 후 rIL-3 (30 U/ml)나 rmIL-5 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 24시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 호산구 세포를 인산완충생리식염수(3% 우태아혈청, 0.1% NaN<sub>3</sub>)로 2회 수세하였고, 4°C에서 면역 형광염색을 실시하였다. 각각에 anti-mouse IL-5R  $\alpha$ -chain polyclonal antibody (AF553, R&D system)를 넣고 얼음에서 30분간 반응시켰다. 1,700 rpm에서 5분간 수세한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-goat IgG등을 넣고 다시 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 cytospin (한일과학)에서 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 slide를 건조하였다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 형광염색 특징 등으로 면역세포의 type을 결정한다. 형광광학현미경(Nikon, japan) 400 $\times$ 에서 관찰하여 IL-5R positive한 활성화 호산구를 측정하였다.

8) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. 세포독성 측정

Lung fibroblasts cells에 대한 세포 독성 실험에서 대조군의 세포 생존율은 100±5.3%로 나타났고, EPJ를 처리한 실험군에서는 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서 각각 99±5.4%, 97±4.5%, 94±5.8%, 90±4.9%로 나타나 fibroblast cells에 대한 세포독성은 나타나지 않았다(Table 1).

Table 1. Mouse Lung Fibroblast Cells (mLFCs) were Pretreated with Various concentrations of Extract of Herba Polygalae Japonica(EPJ)

| Drugs                                     | Dose (mg/ml) | Percent of control data(%) |  |
|---|--------------|----------------------------|--|
|   |              | mLFCs                      |  |
| Control                                   | 0            | 100±5.3                    |  |
| Extract of Herba polygalae japonica (EPJ) | 1            | 99±5.4                     |  |
|   | 10           | 97±4.6                     |  |
|   | 50           | 94±5.8                     |  |
|   | 100          | 90±4.9*                    |  |
|   | 200          | 84±5.2**                   |  |
|   | 400          | 77±6.1                     |  |

The results are expressed the S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% or 99% or higher(\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

2. 유세포 형광분석

(1) 과립구와 림프구 세포수 분석

정상군에서의 세포수가 21.4%인 반면, rIL-5/rIL-3을 처리한 대조군에서는 36.7%로 증가되었다. 반면에 rIL-5/rIL-3와 EPJ를 함께 처리한 실험군에서는 32.3%로 세포수가 감소되었다(Fig. 1).

(2) CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 및 CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수 분석

천식 유발 폐세포를 분리하여, rIL-5/rIL-3을 처

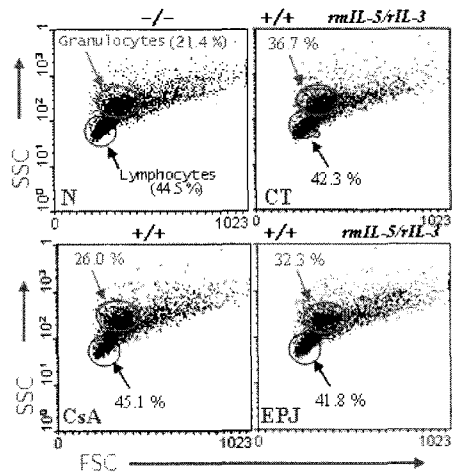


Fig. 1. Inhibitory effect of EPJ on the ratio of granulocytes and lymphocytes population (%) in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rIL-5

C57BL/6 mouse were exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lungs were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1 µg/ml). Eosinophils were activated with rIL-3/rIL-5 co-treatment. The lung cells were treated with extract of Herba Hyperici Japonici (EPJ), incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer.  
 N: Normal C57BL/6 mice.  
 CT: rIL-3/rIL-5 to OVA-induced asthma lung cells.  
 CsA: rIL-3/rIL-5 + Cyclosporin A (10 µg/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 EPJ: rIL-3/rIL-5 + EPJ (100 µg/ml) to OVA-induced asthma lung cells.

리한 대조군과 EPJ를 처리한 실험군의 세포수를 분석하였다. CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포수가 대조군에 비해 20.8%로 증가된 반면, EPJ를 처리한 실험군은 13.4%로 세포수가 감소되었다(Table 2).

CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수가 정상군에서는 7.8%였으며, 대조군에서는 56.7%로 증가되었고, EPJ를 처리한 실험군에서는 36.1%로 감소되었다(Table 2). CD4<sup>+</sup> 세포의 비율이 정상군에서 19.3%인 반면, 대조군에서는 58.4%로 증가되었고, EPJ를 처리한 실험군은 38.2%로 감소되었다. CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> 세포의 비율이 대조군에서 1.7:1이었고, EPJ를 처리한 실험군의 CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> 비율은 1.07:1이었다(Table 2).

CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포의 비율이 정상군에서는 11.5%인 반면, 대조군에서는 29.1%로 증가되었다. EPJ를 처리한 실험군은 23.3%로 감소되었다(Table 2).

2. ELISA 분석

IL-4의 분석결과, 정상군에 비해 rIL-5와 rIL-3

Table 2. Inhibitory Effect of EPJ on the Ratio of Immuno cells (%) in Asthma-induced Lung cells Treated with rIL-3 plus rmIL-5

| Cell type (%)                        | N    | CT   | CsA  | EPJ  |
|--------------------------------------|------|------|------|------|
| CD3e-/CCR3 <sup>+</sup>              | 4.4  | 20.8 | 7.8  | 13.4 |
| CD3e+/CCR3 <sup>+</sup>              | 40.5 | 28.1 | 41.7 | 34.7 |
| CD3e+/CD69 <sup>+</sup>              | 7.8  | 56.7 | 12.3 | 36.1 |
| CD4 <sup>+</sup>                     | 19.3 | 58.4 | 32.4 | 38.2 |
| CD8 <sup>+</sup>                     | 19.2 | 32.5 | 33.4 | 35.7 |
| CD23 <sup>+</sup> /B220 <sup>+</sup> | 11.5 | 29.1 | 13.4 | 23.3 |

N: Normal C57BL/6 mice.  
 CT: rIL-3/rmIL-5 to OVA-induced asthma lung cells.  
 CsA: rIL-3/rmIL-5 + Cyclosporin A (10 µg/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 EPJ: rIL-3/rmIL-5 + EPJ (100 µg/ml) to OVA-induced asthma lung cells.

만을 처리한 대조군에서 IL-4 발현량이 증가되었고, rmIL-5, rIL-3와 EPJ를 100 µg/ml 농도로 처리한 실험군은 유의성 있게 감소되었다. IL-5의 분석결과, 정상군에 비해 대조군에서 IL-5 발현량이 증가되었고, EPJ를 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다. IL-13의 분석결과, 정상군에 비해 대조군에서 IL-13 발현량이 증가되었고, EPJ를 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다. Histamine production를 살펴본 결과, 정상군에 비해 대조군에서 histamine 발현량이 증가되었고, EPJ를 처리한 실험군은 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2).

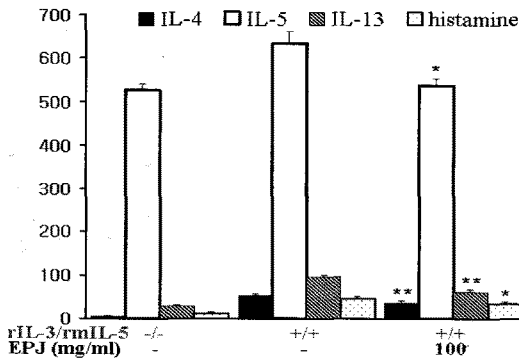


Fig. 2. Effect of EPJ on IL-4, IL-5, IL-13, histamine production levels in asthma-induced lung cells treated with rIL-3, rmIL-5 and EPJ

The results are expressed the mean ± S.E.M. (N=5). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% and 99% or higher(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

### 3. RT-PCR 분석

#### (1) IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, eotaxin mRNA 유전자 발현량 분석

IL-4의 그룹별 HT값을 측정된 결과, rmIL-5/ rIL-3만을 처리한 대조군에서의 HT값이 85인 반면, rmIL-5/ rIL-3와 함께 EPJ를 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml로 각각 처리한 실험군의 HT 값은 15, 16, 76으로 감소되었다(Fig. 3).

IL-5의 그룹별 HT 값을 측정된 결과, 대조군에서의 HT 값이 120인 반면, EPJ를 100 µg/ml, 10 µg/ml,

|         | HT 값 |     |     |    |    |     |
|---------|------|-----|-----|----|----|-----|
|         | A    | B   | C   | D  | E  | F   |
| IL-4    | 18   | 85  | 16  | 15 | 16 | 76  |
| IL-5    | 47   | 120 | 104 | 20 | 36 | 92  |
| IL-13   | 18   | 68  | 43  | 45 | 59 | 110 |
| CCR3    | 12   | 60  | 16  | 47 | 64 | 52  |
| Eotaxin | 18   | 120 | 90  | 65 | 82 | 85  |

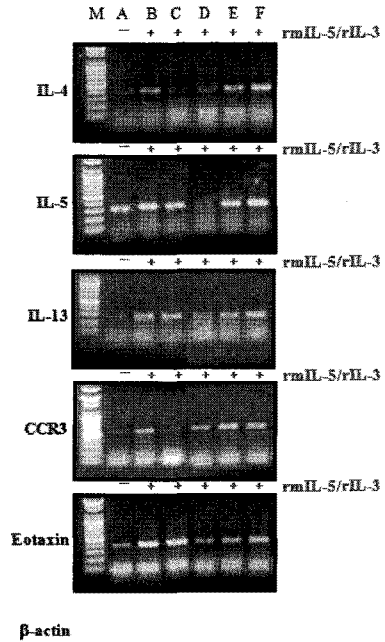


Fig. 3. Effect of EPJ on IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, eotaxin mRNA gene expression in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5

A: Normal C57BL/6 mice.  
 B: rIL-3/rmIL-5 to OVA-induced asthma lung cells (Control).  
 C: rIL-3/rmIL-5 + Cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 D: rIL-3/rmIL-5 + EPJ (100 µg/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 E: rIL-3/rmIL-5 + EPJ (10 µg/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 F: rIL-3/rmIL-5 + EPJ (1 µg/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 Internal loading control: β-actin and DNA 100 bp marker (M).

1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 함께 처리한 실험군의 HT값이 20, 36, 92로 감소되었다(Fig. 3).

IL-13의 그룹별 HT 값을 측정한 결과, 대조군에서의 HT값이 68로 증가된 반면, EPJ를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 함께 처리한 실험군의 HT 값이 45, 59, 110으로 감소되었다(Fig. 3).

CCR3의 그룹별 HT값을 측정한 결과, 대조군의 HT 값이 정상군에 비해 60으로 증가된 반면, EPJ를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 각각 처리한 실험군의 HT값이 47, 64, 52로 감소되었다(Fig. 3).

Eotaxin의 그룹별 HT 값을 측정한 결과, 대조군의 HT 값이 정상군에 비해 120으로 증가된 반면, EPJ를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 각각 처리한 HT 값이 65, 82, 85로 감소되었다(Fig. 3).

#### 4. Eosinophil proliferation assay

rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서 eosinophil proliferation은  $18,847 \pm 1,527$  cpm인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은  $4,676 \pm 972$  cpm으로 감소되었다. rmIL-5/rIL-3와 EPJ를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 실험군의 eosinophil proliferation은  $8,675 \pm 159$  cpm,  $11,352 \pm 1005$  cpm,  $14,325 \pm 677$  cpm으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Effect of EPJ on the Eosinophil Proliferation from OVA-induced Asthma Mouse Lung Eosinophils.

| Group               | Drug (mg/ml) | rmIL-5+ rIL-3 | Eosinophil proliferation (cpm) |
|---------------------|--------------|---------------|--------------------------------|
| Eosinophil cells    | --           | --            | 968±91                         |
| Control             | --           | +             | 18847±1527                     |
| Cyclosporin A (CsA) | 10           | +             | 4676±972***                    |
| Extract of Herba    | 100          | +             | 6355±877***                    |
| Polygalae japonica  | 10           | +             | 8834±183***                    |
| (EPJ)               | 1            | +             | 11296±541***                   |

The results are expressed the mean  $\pm$  S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 99.9 % or higher(\*\*\*p<0.001).

#### 5. IL-5R $\alpha$ -chain의 Immunocytochemistry

rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군(B)에서 호산구의 활성화도가 높은 것을 볼 수 있으며, rIL-3/rmIL-5와 EPJ를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 실험군(D)에서 호산구의 활성이 저하되었음을 볼 수 있다(Fig. 4).

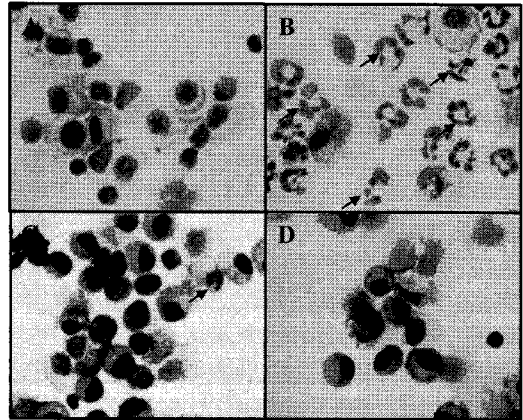


Fig. 4. Effect of EPJ on immunohistological eosinophil in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5

C57BL/6 mice were exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lungs were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Eosinophils were activated by rIL-3/rmIL-5 co-treatment. The lung cells were treated with extract of Herba polygalae japonica (EPJ), incubated for 72 hr at 37°C, and analyzed by immunohistology.

A: Normal C57BL/6 mice.

B: rIL-3/rmIL-5 + OVA-induced asthma lung cells (Control).

C: rIL-3/rmIL-5 + Cyclosporin A (CsA, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

D: rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and EPJ (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 고 찰

천식의 발생은 서구화된 사회에서 지난 20년간 두 배 이상 증가했다<sup>21)</sup>. 이는 고도의 산업화에 따른 새로운 항원의 출현 및 환경공해 특히 대기오염, 흡연 인구의 증가 등으로 인해 사망률도 증가하고 있는 추세이다<sup>6)</sup>.

喘息은 한의학에서 哮喘의 범주에 속하는데, 《黃帝內經·素問》<sup>7)</sup>에 이미 ‘喘呼’, ‘喘息’ 등으로 기록되어 있으며 《東醫寶鑑》<sup>8)</sup>에서 “喘은 ‘呼吸促急 或氣息促急’한 증상이며, 그 형상은 ‘促促氣急 喝喝痰聲 張口擡肩 搖身滾肚 鼻翼瞬動 不得平臥’라 하였다. 이는 호흡기 질환의 痰氣로 인한 痰喘이 심한 증상이다.

哮喘의 한의학적 유발 원인으로서는 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 과민성 반응, 肺腎의 呼吸機能障礙가 있다고 알려져 있고, 哮喘의 종류로는 水哮, 冷哮, 寒包熱哮, 風痰哮, 食哮, 醋酸哮가 있다<sup>9)</sup>.

한의학적 치료 원칙은 발작기에는 宣肺豁痰하는 것이 중점이 되며, 寒熱을 살피서 宣肺散寒과 宣肺清熱로 나누어 치료하고, 완해기에는 肺, 脾, 腎의 근본을 치료하여야 하며, 補益脾肺하거나 肺腎을 雙補한다. 발작기이며 實證일 경우에는 기관지점막의 부종,

기관지 평활근 수축, 점액의 과다분비, 환기관류비 불균 등을 喘息의 발작전 상태로 회복시키는 것이다. 발작기에는 風寒, 痰濁, 肺熱 등의 원인을 없애주는 치료를 하는 것이고, 風寒型의 경우에는 小青龍湯, 痰濁型의 경우에는 三子養親湯, 葶藶大棗瀉肺湯, 肺熱型의 경우에는 解表二陳湯, 麻杏甘石湯 등을 응용하여 체질과 병증에 따라 약물을 적절히 가감하여 치료를 하게 된다. 완해기이며, 虛證일 경우에는 肺, 脾, 腎의 虛한 상태를 개선시키며, 동시에 체질적인 素因도 개선시키는 치료를 하게 된다. 肺虛한 경우에는 生脈散이나 補肺湯, 脾虛한 경우에는 六君子湯, 腎虛한 경우에는 金匱腎氣丸, 金水六君煎 등의 처방으로 치료한다<sup>9)</sup>.

喘息 치료에 대한 최근의 경향은 면역학적 치료 기법이 도입되어, 기관지의 염증 발현에 관여하는 세포와 분자 수준의 기전에 초점이 맞추어지고 있으며, 이러한 의미에서 각종 사이토카인이 어떻게 관여하고 있으며, 역할을 하고 있는 것에 대한 메카니즘에 변화를 초래함으로써 알레르기 질환치료의 새로운 방향을 모색하고 있다<sup>10)</sup>.

한의학적으로는 항염, 항균 작용을 가지고 있는 한약재들이 효과가 있을 것으로 사료되며, 平喘作用과 항염증작용이 있는 瓜子金이 면역학적으로 천식유발 면역세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 세포독성 실험, 유세포 분석을 통한 각종 면역세포 발현 경향과 유전자 분석, ELISA 분석, 면역형광 분석의 실험 방법을 행하였다.

기관지 喘息의 병인에 관계되는 T 세포는 분비되는 여러 cytokine의 종류에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 나눌 수 있으며 Th1 세포는 주로 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 를 생산하며 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여하고, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 예를 들어 喘息과 같은 알레르기성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용에 관여한다<sup>11)</sup>.

Th1 세포와 Th2 세포는 서로 길항 작용을 나타내어 기능이 억제되는 현상이 관찰되며 알러지성 喘息 환자의 폐포 세척액에는 Th2 세포의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다<sup>12)</sup>.

알레르기 질환 가운데 喘息은 기관지 과민 반응을 그 특성으로 하여 여러 가지 알레르겐에 처음 노출되었을 때 B 임파구로부터 특이 IgE가 생산되고, 이 IgE는 비만 세포 및 호염기구의 표면에 존재하는 고친화성 표면 수용체인 Fc $\epsilon$ RI와 강하게 결합한다.

항원이 IgE에 결합하면 이들 수용체들이 교차결합하게 되고 이는 비만세포로부터 화학적 매개물질들의 분비를 유발하게하여, 결국 제1형 과민반응에 이르게 될 것이다.

B 세포들이 IgE를 생성하도록 클래스 전환하는 것은 Th2 세포들에 의해서 제공되는 각기 다른 두 가지 신호들에 의해서 유도되는데, B 세포표면에 있는 수용체들과 상호작용을 하는 IL-4나 IL-13과 같은 cytokine들에 의해 제공된다.

IgE 반응이 일단 시작되면 IgE 생성을 일으킬 수 있는 호염구, 비만세포, 활성화된 호산구에 의해 훨씬 더 증폭될 수 있다.

이러한 특화된 과립구들의 Fc $\epsilon$ RI결합 IgE가 항원에 의한 교차결합으로 활성화되면 그들은 세포 표면에 CD40L을 표현할 수 있게 되고 IL-4를 분비한다. 따라서 Th2 세포들과 마찬가지로 호염구, 비만세포, 활성화된 호산구는 클래스 전환을 일으킬 수 있으며, B 세포들에 의해 IgE를 생성 할 수 있게 된다<sup>13)</sup>. 이처럼 喘息은 결합한 IgE와 재차 접촉된 알러젠과 상호작용에 의하여 이러한 세포들이 활성화되어 매개물질들 즉 histamine, 해파린, 세로토닌 및 가수분해 효소 등을 방출하고 이 분비된 매개 물질들에 의하여 즉시형 과민 반응이 일어난다<sup>14-15)</sup>.

Th2 세포는 eoxaxin, RANTES, MIP-1a와 MCP-3와 같은  $\beta$ -chemokine들을 생성하여, 호산구를 기도 내로 주유하며, IL-5, IL-13 및 GM-CSF를 분비하여 호산구의 분화, 성숙, 활성화 및 생존을 증가에 관계한다. 기도의 침윤된 호산구 내에서는 MBP, ECP, eosinophil-derived neurotoxin 등이 분비되어 기도 손상을 유발한다<sup>16)</sup>.

瓜子金 추출물을 lung fibroblast cells에 분주하고 배양한 후, 세포독성을 측정한 결과 농도 100  $\mu$ g/ml에서 87% 이상의 세포 생존율을 보였다. 이는瓜子金가 세포독성을 나타내지 않음을 나타낸다(Table 1).

FACS 분석을 통한 과립구와 림프구 분포양상을 보면, 정상군에서 21.4%를 보였고, rmIL-5/rIL-3을 처리한 대조군에서는 유의성 있게 증가하여 36.7%를 보이고 있다. 이에 비해 EPJ를 투여한 실험군에서는 31.4%로 유의성 있게 granulocytes의 숫자가 감소되었다. 이는瓜子金이 기관지 및 기도에서 발생하는 만성염증 유발시키는 세포의 활동을 억제하는 작용이 있음을 나타낸다(Fig. 1).

CD3는 T 세포 결정표식인자로, T 세포 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포안으로 전달한다. CCR3는 케모카인과 반응하는 세포표면표식인자(수용



체)로서 호산구, 호염기구, Th2 세포의 세포 표식인자이다<sup>12)</sup>. 뿐만 아니라 CCR3는 호산구에서 가장 높게 발현이 되고, 호염기구, Th2 세포, 천식 환자의 기도 상피 세포에서 보이며, 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 보인다<sup>17)</sup>.

喘息 유발 생쥐의 기관지 폐포 세척액에서 FACS 분석 결과 CD3e-/CCR3+는 대조군에서 20.8%이었으나 EPJ 투여군에서는 12.7%로 유의성 있게 감소된 것을 볼 수가 있다(Fig. 3). 이는 과민성 알레르기 반응에 주요하게 관여하는 호산구의 분포양상이 EPJ투여군에서 유의성있게 감소되었음을 의미한다(Table 2).

CD69는 활성화된 B 세포와 T 세포, 대식 세포, NK 세포에 분포하며<sup>18)</sup>, T 세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 분비되므로喘息환자의 기도에서 호산구 침윤의 표지로 사용될 수 있다<sup>13)</sup>.

CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수를 분석한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 56.7%로 현저하게 증가되었으며, EPJ 투여군에서는 38.2%로 유의성있게 감소되었다. 이는 T 세포의 활성화를 감소시키는 것으로 사료된다(Table 2).

과민성 알레르기 피부염 환자의 생검에서 호산구와 CD4<sup>+</sup> T 세포의 침윤이 특징적이고 이들 T 세포에서 Th2 세포 유형의 사이토카인이 분비된다고 하며喘息에서는 BALF에는 CD3<sup>+</sup> 세포, CD4<sup>+</sup> 세포, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>의 비율이 증가한다. 정상인에서 CD4와 CD8의 비율은 대체로 1.5~2.1의 비율을 유지한다고 한다<sup>19)</sup>.

CD4<sup>+</sup> T 세포는 여러 종류의 사이토카인을 생산하여 B 세포가 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주고 면역반응의 행동세포를 활성화시키는 역할을 하므로 CD4<sup>+</sup> T 세포의 비율은 일반적으로 면역력의 지표로도 광범위하게 응용되고 있다<sup>18)</sup>.

FACS 분석에서 CD4<sup>+</sup> T 세포는 대조군에서 58.4%로 현저하게 증가되었고, EPJ 투여군에서는 42.7%로 유의성 있게 감소되어 알러지 반응을 촉진시키는 CD4의 감소를 보였다(Table 2).

CD8<sup>+</sup> T 세포의 비율이 정상군에 비해 대조군에서 감소되었고, EPJ투여군에서는 그 비율이 다시 증가되었다(Table 2). 이는 대조군에서 불균형한 T 세포의 양상이 정상군과 유사한 양상으로 전환된 것을 가리킨다.

CD23은 성숙된 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 수지상 세포등에서 발현되며, Ig E에 대해 낮은 친화력을 가지고 있고, Ig E 합성을 조절하며, CD19, CD21, CD81에 대한 co-receptor를 위한 리간드이다<sup>13)</sup>.

B220은 사람에겐 존재하지 않으나, 생쥐의 B 세포

의 표지분자<sup>20)</sup>이고 아토피질환의 발생에서 중요한 역할을 하는 IgE 항체는 B 림프구에 의해 생성 된다<sup>21)</sup>.

CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수의 변화가 정상군에 비해 대조군에서 29.1%로 현저하게 증가되었으나, EPJ를 처리한 실험군에서의 세포수는 23.2%로 유의성 있게 감소되었다(Table 2). 이는 알레르기 반응에 IgE를 발현시키는 B 세포의 활성이 억제되었음을 의미한다.

RT-PCR 분석을 살펴보면, IL-4는 Th2 세포에서 방출되어 여러 종류의 면역세포에 작용하여 다양한 면역조절기능을 나타내고 있는데 활성화된 B 세포, T 세포 및 thymocyte의 증식을 유도하며, monocyte의 증식을 유도하며, monocyte의 활성화 및 비만세포의 증식과 성숙을 촉진한다. IL-4는 size 129이며 monomer 구조이고, CD124와 CD132의 수용체를 가지고 있다. T cells과 비만 세포에서 생산하며, B 세포를 활성화시키며, IgE를 switching 하여 Th 1 세포를 억제시킨다. 특히 B 세포의 분화에 관한 작용으로 IgE의 생성과 분비를 유도하고, II형 IgE 수용체인 FcεR II의 발현을 증가시킨다. 이러한 IL-4의 기능은 알레르기 반응의 주요조절인자로서 중요하다<sup>14,15)</sup>.

IL-5는 IL-4와 유사하게 B 세포의 증식과 분화를 자극하는 기능을 가진 분자량 20kD의 사이토카인으로 활성화된 CD4<sup>+</sup> T 세포와 비만세포가 분비한다. IL-5는 IL-2 또는 IL-4의 B 세포 분화 성장작용을 상승시키며 성숙 B 세포에 작용하여 IgA 생성을 항진시킨다. 또한 호산구의 분화증식을 항진시켜 호산구 매개염증반응 조절에 관여하므로 IL-5의 억제가 알레르기성 호흡기질환의 치료에 유용할 것으로 보고되고 있다<sup>12,15)</sup>.

IL-13은 Th2에서 분비되는 사이토카인으로 Th1 세포를 억제하며, IgE의 생성을 유도하여 알레르성 염증 반응의 병인에 관여한다고 하였다<sup>13)</sup>.

ELISA 분석을 살펴보면, BALF(폐포세척액) 내 IL-4, IL-5, IL-13가 rIL-3, rmIL-5를 처리한 대조군에서는 현저하게 증가되는 것이 관찰되었고, EPJ를 투여한 실험군에서는 유의성있게 감소되었다(Fig. 2).

Histamine은 표적 세포의 수용체에 결합함으로써 효과를 미치는데, 내피세포가 혈관 평활근세포 이완제인 프로스타사이클린을 합성하게 하여 이들이 혈관 확장을 일으킨다<sup>13)</sup>. 히스타민의 이러한 작용에 의해 즉시형 과민반응의 구진과 발적 확장이 일어나게 된다. 히스타민 생성에 미치는 영향을 살펴보면 본 실험에서 대조군에 비하여 EPJ가 처리된 경우 히스타민 생성량이 감소되었다(Fig. 2). 이 결과는 EPJ이

알레르기 반응에 주된 인자로 알려진 히스타민의 생성 억제에 유의한 작용이 있음을 보여준다.

RT-PCR 분석에서, IL-13, IL-4, IL-5, IL-13의 HT값을 비교 분석한 결과 대조군에 비해 EPJ 투여군에서 HT값이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3). 이는 EPJ가 기관지 천식 염증에 관여하는 호산구, 대식 세포, Th2 세포의 발현양상이 감소됨을 의미하여 면역세포의 증식과 천식 억제 작용이 있음을 나타낸다.

CCR3의 RT-PCR 분석은 각각 EPJ 추출 농도별로 HT 값이 감소함을 볼 수가 있다(Fig. 3). 이는 호산구, Th2 세포의 활성이 억제되었음을 알 수가 있다.

Eotaxin의 RT-PCR 분석은 각각 EPJ 추출 농도별로 HT값이 감소함을 볼 수가 있다(Fig. 3). 이는 호산구의 활성이 감소됨을 볼 수가 있는데, eotaxin은 CCR3를 수용체로 하며 호산구를 target cell로 하는 케모카인이기 때문이다.

호산구 증식 억제 실험을 분석해 보면, 대조군에서 호산구 세포수는 1,8847±1,527인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4,676±972로 감소되었다. EPJ를 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 농도로 처리한 실험군의 호산구 세포수는 7,709±549, 16,839±1403, 16,385±1,723으로 나타났다(Table 2). 이는 EPJ이 호산구 증식에 유의성있게 억제 작용을 하고 있음을 알 수가 있다.

위의 내용을 요약해 보면,喘息은 천명을 동반하는 발작성의 호흡곤란을 특징으로 하는 병이며, 이喘息의 증상은 기도의 염증이 원인으로 기관지가 좁아져서 생기는 것이다. 그러므로喘息치료의 근본은 첫째 기관지의 염증을 어떻게 하면 막을 것인가. 둘째 좁아진 기관지를 어떻게 확장시킬 것인가 하는 것이다. 따라서 瓜子金の 본초학적 효능을 가지고 기관지염증을 치료할 수 있다고 판단하고 본 실험을 시행하였다. 세포독성 실험, FACS를 통한 IgE와 각종 싸이토카인, 히스타민 발현량등을 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였고 RT-PCR과 ELISA 분석방법을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

과립구 및 림프구, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수가 대조군에서는 유의성 있게 증가되었으며, EPJ 투여군에서는 현저하게 감소되었다. 이는 Th2 세포의 비율의 감소, B 세포 활성의 억제, 염증관련 세포의 감소를 의미한다.

RT-PCR에서 대조군에서는 B세포에서 분비되는 IL-4, IL-5, IL-13이 증가되었고, EPJ를 처리한 실험군에서는 모두 감소되었다.

ELISA 분석 방법을 통한 IL-4, IL-5, IL-13, histamine의 분비량 실험에서 대조군에 비해 EPJ를 처리한 실험

군에서 모두 유의성있게 감소되었는데, 이는 B 세포, 호산구, Th2 세포와 비만세포의 활성이 저하되었음을 의미한다. 따라서 瓜子金の 추출물이 기관지 천식에 유의한 효능이 있을 것으로 사료된다.

## 결론

瓜子金이 호산구의 증식과 활성화에 대한 미치는 영향을 알아보기 위해, C57BL/6 정상 생쥐에 OVA를 감작시켜 천식을 유발시킨 뒤, 폐를 적출하여, 세포를 분리 배양하고 *in vitro* 실험을 시행하여 성적을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 瓜子金の 세포 독성 실험 결과, EPJ 100 µg/ml 농도 처리에서 세포 생존율이 87.68±6.8%로 나타나 세포 독성을 나타내지 않았다.

2. FACS 분석 결과, 정상군에서의 과립구, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수에 비해, rmIL-5/rIL-3를 처리한 대조군의 세포수는 증가되었다. 반면에 rmIL-5/rIL-3와 EPJ를 함께 처리한 실험군의 면역세포수는 감소되었다.

3. RT-PCR 분석결과, IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, eotaxin mRNA 유전자 발현량을 분석한 결과, 대조군의 IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, eotaxin mRNA 유전자 발현량이 증가된 반면, EPJ를 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml로 각각 함께 처리한 실험군의 mRNA 유전자 발현량은 감소되었다.

4. ELISA분석 결과, 대조군에서 IL-4, IL-5, IL-13, histamine 발현량이 증가된 반면, EPJ 100 µg/ml 농도로 처리한 실험군은 IL-4, IL-5, IL-13, histamine release 발현량이 유의성있게 감소되었다.

5. 호산구 증식 억제 실험 결과, rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군의 호산구가 증가된 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 감소되었으며, EPJ를 처리한 실험군의 호산구 증식 세포수는 모든 농도에서 유의성 있게 감소되었다.

6. Immunochemistry 분석 결과, rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군에서 호산구의 활성도가 높은 것을 볼 수 있으며, rIL-3/rmIL-5와 EPJ를 100 µg/ml 농도로 함께 처리한 실험군의 호산구의 활성이 저하되었음을 볼 수 있다.

이상의 결과로 보아 瓜子金이 호산구와 Th2 세포의 분화, 성숙, 활성화에 억제 작용을 가지고 있으며,

이러한 작용으로 천식에 유효한 효과가 있을 것으로 생각되며 임상 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 전국의과대학교수 역. *오늘의 진단 및 치료*. 서울 : 한우리. 1999 : 287-95.
2. 李珩九, 鄭昇杞. *동의계계내과학*. 서울 : 민瑞出版社. 1990 : 192-3.
3. 吳其溶選. *植物名實圖考*. 北京 : 世界書局印行. 1987 : 383.
4. 全國韓醫科大學 共同教材編纂委員會 編著. *本草學*. 서울 : 永林社. 2004 : 535.
5. 中華本草編委會. *中華本草 5卷*. 上海 : 上海科學技術出版社. 1999 : 57.
6. 金達鎬. *黃帝內經·靈樞(全)*. 서울 : 醫聖堂. 2002 : 779, 1054.
7. 許浚 著. 東醫寶鑑國譯委員會 譯. *東醫寶鑑*. 서울 : 法人文化社. 1999 : 1247-64
8. 方藥中外. *實用中醫內科學*. 서울 : 醫聖堂. 1993 : 157-9.
9. Barnes PJ. Cytokine-directed Therapies for The treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003 ; 14(6) : 511-22.
10. 박수영, 조영주. 내인성喘息 및 외인성喘息 환자의 CD8 양성세포에서 interleukin4 및 interferon gamma 생산.喘息 및 알레르기. 2001 ; 21(1) : 66-7.
11. Kasakura S. A role for T helper type 1 and type 2 cytokine in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori. Symp*. 1998 ; 46(9) : 915-21.
12. Charles A Janeway 著, 김태규 외 10인 譯. *면역생물학(제5판)*. 서울 : 라이프사이언스. 2002 : 698, 703, 714.
13. Hida M. Histamine releasing mechanism from rat peritoneal mast cells by phospholipase. *Biochem. Pharmacol*. 1978 ; 27 : 2115-8.
14. Yurt RW, Leid RW and Austen KF. Immunologic release of heparin from purified rat peritoneal mast cells. *J Immunol*. 1977 ; 118 : 1201-7.
15. Tanaka S, Ohishi N and Tominaga Y. Histochemical demonstration of adrenergic nerve fibers serotonin coating mast cells of The knee joint synovial membrane in rats. *Experientia*. 1977 ; 33 : 52-3.
16. Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T-lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet*. 1988 : 1129-32.
17. Nicolas W. Lukacs. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature review*. 2001 ; (1) : 108-16.
18. 김세중. *면역학*. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 25, 26, 28, 31, 32.
19. Bousquet J et al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990 ; 323 : 1033-9.
20. Mehlhop PD, Van De Pijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, Oett gen HC. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of Ig E in a mouse model of asthma. *Immunology*. 1997 : 1344-9.
21. 이숙영, 송정섭, 김영균, 김관형, 문화식, 박성학. 기관지천식의 기도과민 반응과 기관지폐포세척액 소견. *대한내과학회지*. 1995 ; 48(2) : 171-80.