

小青龍湯이喘息이 유발된 생쥐의 면역 글로블린 분비에 미치는 영향

정선^{1#}, 조수진², 문경일¹, 김형우³, 김부여⁴, 조수인^{5*}

1: 동신대학교 한의과대학, 2: 고려대학교 의과대학 3: 산업용가속기이용 생물연구센터
4: 경희대학교 치의학전문대학원, 5: 부산대학교 한의학전문대학원

Effects of Socheongryong-Tang on Immunoglobulin Production in Asthmatic Mice

Sun Jung^{1#}, Su Jin Cho², Kyoung Il Moon¹, Hyung Woo Kim³,
Bu Yeo Kim⁴, Su In Cho^{5*}

1: College of Korean medicine, Dongshin University 2: College of medicine, Korea University
3: Research Center of Industrial Accelerators 4: School of Dentistry, Kyung Hee University
5: School of Oriental medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : Socheongryong-Tang(小青龍湯, SCRT), a herbal remedy, has been widely used to treat respiratory disease such as cough and asthma in Oriental countries. Recent years SCRT was known as anti-allergic agent. However, its therapeutic mechanisms including immunoglobuline such as IgE, IgG1, IgG2a productions are unclear.

Methods : We investigated the effects of SCRT on levels of antigen specific total antibody, IgE, IgG1, IgG2a using ELISA method in serum from allergen-induced asthma mice.

Results : SCRT decreased level of antigen specific IgE significantly. And SCRT treated mice showed downward tendency of IgG1, a Th1 relative antibody, level. But, SCRT did not affect levels of antigen specific total antibody and IgG2a, a Th1 relative antibody.

Conclusions : we demonstrated the strong possibility of SCRT as a complementary or alternative drug to western drug also demonstrated that regulation of Th1/Th2 imbalance may be one of mechanism contributed to treatment for respiratory disease by SCRT.

Key Words : Socheongryong-Tang, IgE, IgG1, Herbal medicine, Asthma

서 론

21세기에 들어서면서 공해, 좋지 못한 음식, 과도한 스트레스 등으로 인하여, 천식은 가장 빠른 속도로 그 유병률이 증가하고 있는 질환 중 하나¹⁾로서 한의 양의 모두에서 지대한 관심을 가지고 연구하고 있는 질환 중 하나이다. 천식이란 다양한 자극에 대한 기관지의 반응성 증가를 특징으로 하는 기도 질환이다. 천식은 생리적으로 공기 통로의 광범위한 수축을 나타내고, 임상적으로 발작적인 호흡 곤란, 기침, 천명음을 발생시킨다²⁾. 천식은 가역적인 기도폐쇄와 기관지 평활근의 비대, 그리고 만성 염증을 그 특징으로 하는 질환이다. 이러한 만성 염증은 Th2 쪽으로 치우쳐서 일어나게 되며, 이러한 반응에 관여하는 cytokine 중 가장 중요한 것은 interleukin 4(IL-4)이다. 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 된다³⁾.

소청룡탕(小青龍湯)은 한국, 일본, 중국의 동방 삼국에서 가장 잘 알려진 호흡기 질환 치료제로 최근 까지 가장 많이 사용되고 있는 호흡기계 처방 중 하나이다. 한의학 이론에 의하면 소청룡탕은 傷寒表不解, 心下有水氣, 乾嘔, 氣逆, 發熱咳喘에 사용한다고 하였다⁴⁾. 최근들어 소청룡탕에 항히스타민작용이 있는 것이 밝혀졌는데, 다른 항히스타민제제에서 보이는 중추신경 억압에 의한 졸음이나 진정작용이 없어서 더욱 바람직한 항히스타민 제제라는 것을 부가로 밝혔다⁵⁾. 또한 다른 논문에서 소청룡탕은 기관지 평활근의 확장 작용이 있는 것이 밝혀졌다⁶⁾. 소청룡탕은 기도내로의 염증세포 침윤을 막아서 결국 천식 치료에 도움을 주며, 천식 환자에게서 IL-4와 IgE의 레벨을 감소시킨다는 사실도 아울러 알려져 있다⁷⁾. 최근 연구에서 玉屏風散이 생쥐의 면역 글로불린 중, IgG, IgA 등의 isotype의 생성량에 영향을 미친다는 보고가 있었다⁸⁾.

따라서 본 논문에서 저자들은 생쥐에 천식을 유발시킨 후, 혈장을 분리하여 항원에 대한 특이 항체의 isotype 중 총 항체량(Total antibody), IgE, IgG1, IgG2a의 생성에 미치는 영향을 조사하여, 의미있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

8주령된 암컷 Balb/c 생쥐를 오리엔트 바이오(서울, 한국)에서 구입하여, 일 주일간 실험실환경에 적응시킨 후 온도와 습도가 조절되는 환경(24±3℃, 12-hr light-dark cycle)에서 고형사료와 물을 마음껏 섭취하게 하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 정해진 규정에 의하여 다루었으며, 실험 프로토콜은 실험동물위원회의 승인을 득하였다.

2) 검액의 준비 및 시료

소청룡탕은 8가지 약제로 구성되는데 그 구성은 다음과 같다(Table 1). 여덟 가지 한약재를 표기된 용량대로 섞어서 전기약탕기(대용, 한국)에 넣고 증류수 1,300 ml를 붓고 3시간 달여 최종 500ml의 검액을 얻었다. 얻어진 검액을 원심분리기를 이용하여 2,200 g에서 20 분간 원심분리한 후, 찌꺼기를 버리고 상층액을 얻었다. 얻어진 약액을 진공 농축기(EYELA, 일본)를 이용하여 1/10로 농축하여 사용할 때까지 영하 20℃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 BCA법으로 다시 정량 하였다.

Table 1. Components and standard materials of SCRT

Herbal name	Standard materials	Amount
Rhizoma Pinelliae	Homogentistic acid	16.86 g
Herba Ephedrae	Ephedrine	16.86 g
Radix Paeoniae	Paconiflorin	16.86 g
Fructus Schisandrae	Schizandrin	16.86 g
Herba Asari	a -Asarone	11.25 g
Rhizoma Zingiberis	6-Gingerol	11.25 g
Ramulus Cinnamomi	Cinnamaldehyde	11.25 g
Radix Glycyrrhizae	Glycyrrhizic acid	11.25 g

Each dosage corresponds to 1-times daily dosage for adult humans(60 kg).

2. 방법

1) 천식 유발과 실험군 선정

100 ul의 용매(phosphate buffer saline, PBS)에

100 ug의 난황(OVA, 항원으로)과 2 mg alum을 녹여 3일간 복강으로 주사한 후, 2주 뒤 생쥐를 케타민(100 mg/kg)과 럼폰(10 mg/kg)으로 마취 시킨 후, 비강 내 점적의 방법으로 25 ug의 항원(PBS 30 ul)을 생쥐에게 2일에 걸쳐 투여하였다. 3일 뒤 같은 방법으로 2번에 걸쳐 비강 내 점적을 시행하여서 총 4번의 비강 내 점적을 시행하였다(Fig. 1). 소청룡탕은 6일간 구강 투여되었는데, 투여용량은 이전 연구에서 생쥐의 대사율과 체중을 고려하며, kg당 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

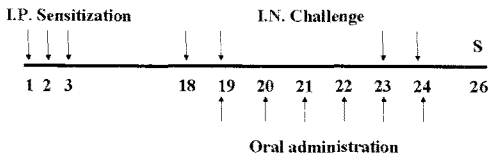


Fig. 1. Experimental schedule

All experimental groups, except normal control group, were sensitized intra-peritoneally 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, Perh : enhanced pause, S : sacrifice

2) 혈장에서 항원 특이 항체량의 측정

총 6일간의 약물 투여가 끝나고, 그 다음날(day 26) 생쥐의 안와 정맥총으로부터 혈액을 채취하여 항원 특이 항체량의 측정에 사용하였다. 혈장 내의 항원 특이 전체 항체, IgE, IgG1, IgG2a isotype은 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)의 방법을 사용하였다. 간단히 실험과정을 요약하자면, 채취된 혈액을 4℃에서 하룻밤을 놓아두어 혈액을 굳게 한 다음 고속원심분리기로 2,800 g에서 10분 동안 원심분리하여 혈장을 얻어 내었다. ELISA를 위하여 1%의 스킴 밀크(skim milk)와 0.05%의 Tween 20을 Phosphate buffer saline (PBS)에 녹인 blocking solution에 50 mg/ml의 용량으로 해독된 난황(OVA, grade V, Sigma- Aldrich) 녹인 다음, 96-well plates (Nunc, USA)에 각각 50 ul씩 분주하고 실온에서 3시간 동안 방치하여 plate 표면에

난황을 부착 시켰다. 반응이 끝난 후, 난황이 담긴 blocking solution을 제거하고 다시 blocking solution을 부어 혹시 모르는 다른 단백질의 부착을 방지하기를 실온에서 1시간 동안 시행 하였다. 반응이 끝난 후, 100 ul의 희석된 혈장을 각 well에 분주해 준 다음 실온에서 2시간 동안 반응 시켰다. 이때 한 샘플 당, 4가지 서로 다른 희석배율을 적용하였으며, 희석 배율은 각각 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400이었다. 반응이 끝난 후, 희석된 혈장을 제거하고, 세척액(washing buffer, PBST)으로 3번 잘 씻어 준 다음 alkaline phosphatase가 부착된 anti-mouse immunoglobulin을 각 well에 분주한 다음 실온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 후, 세척액(washing buffer, PBST)으로 3번 잘 씻어준 다음, p-NPP (Amresco, USA)를 넣어 반응을 종결 시켰다. Optical density(OD) 값은 microplate spectrophotometer(Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 측정 하였다. 사용된 2차 항체는 각각 goat anti-mouse polyvalent antibody (Sigma, 1 : 1,000), goat anti-mouse IgG1 antibody (Southern Biotech, 1 : 1,000), goat anti-mouse IgG2a antibody (Southern Biotech, 1 : 1,000), and rat anti-mouse Ig E antibody (Southern Biotech, 1 : 1,000)이었다. 기준 혈장으로는 이전 실험에서 동일 계열 동일 주령의 생쥐에 천식을 유발하여 얻은 혈장을 사용하였고, 모든 결과값은 이 기준 혈장의 값에 대한 상대값으로 표시 하였다.

3) 통계 처리

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

성 적

1. 소청룡탕이 항원 특이 전체 항체 및 IgE에 미치는 영향

재료 및 방법에서 논술한 것과 같이 생쥐의 혈장으로부터 ELISA방법을 이용하여 항원 특이 전체 항체 및 IgE의 함량을 측정 하였다. 반복되는 난황의 비강 내 점적에 의하여 천식을 유발한 결과 혈장 내에서 항원 특이 전체 항체 및 IgE의 함량이 정상군에 비하여 대폭 증가하였다. 소청룡탕은 이렇게 증

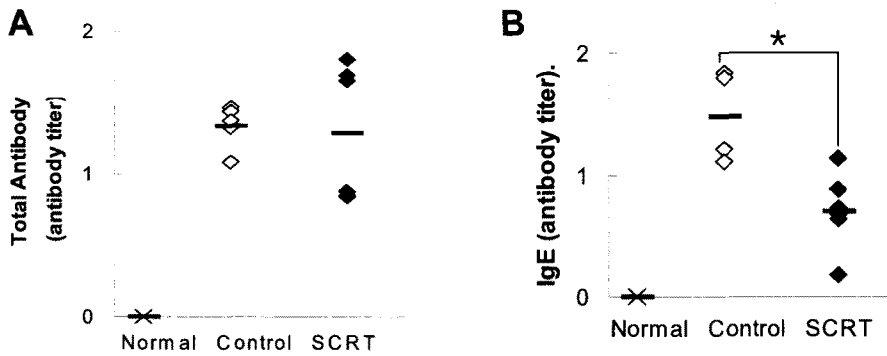


Fig. 2. Effects of SCRT on OVA-specific Total antibody and IgE productions in serum

Solid bar (-) represents the mean value of each group. (A) OVA-specific total antibody, (B) OVA-specific IgE. Results are presented as mean ± SEM. *P<0.05 as compared with control group. Normal: naive (non-asthmatic) group, Control: asthma induced control group, SCRT: SCRT treated group after asthma induction.

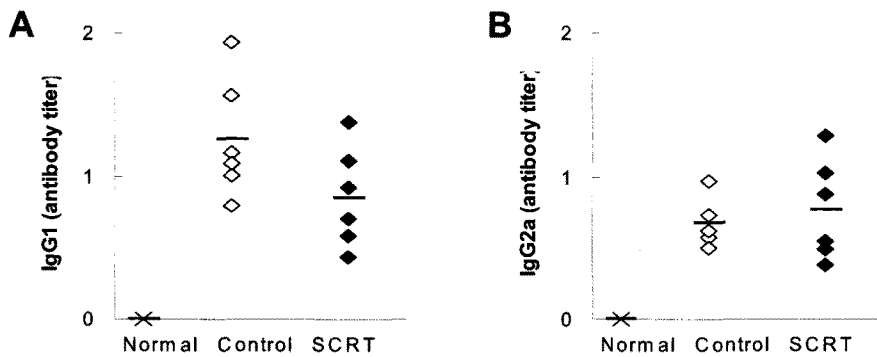


Fig. 3. Effects of SCRT on OVA-specific IgG1 and IgG2a productions in serum

Solid bar (-) represents the mean value of each group. (A) OVA-specific IgG1, (B) OVA-specific IgG2a. Results are presented as mean ± SEM. Normal: naive(non-asthmatic) group, Control: asthma induced control group, SCRT: SCRT treated group after asthma induction.

가된 항원 특이 전체 항체의 양에는 특별한 영향을 미치지 못하였다(Fig. 2A). 이에 반해 천식에 특이적인 IgE의 생성량은 효과적으로 감소시켰으며, 감소량은 천식 대조군 대비 50%가 넘었다(Fig. 2). 또 다른 실험에서 프레드니솔론은 항원 특이 전체항체의 양을 통계적으로 유의한 수준으로 감소시켰다 (data not shown).

량은 정상군에 비하여 크게 증가하였다. 소청룡탕은 이렇게 증가된 항원 특이 IgG2a의 양에는 특별한 영향을 미치지 못하였다(Fig. 3B). 하지만 IgG1의 생성량은 소청룡탕의 투여에 의하여 감소하는 경향을 보였다. Fig. 3A에서 알 수 있듯이 소청룡탕의 투여는 천식 유발에 의하여 증가된 IgG1의 함량을 33% 정도 감소시켰다.

2. 소청룡탕이 항원 특이 IgG1 및 gG2a에 미치는 영향

반복되는 난황의 비강내 점적에 의하여 천식을 유발한 결과 혈장내에서 항원 특이 IgG1 및 IgG2a의 함

고찰

천식의 악화와 호전에 있어서 IgE의 생성 레벨은 매우 중요한 인자 중 하나이다. IgE는 비만세포와

결합하여 비만 세포가 자극 받았을 때, 여러 가지 천식 증상과 관련된 인자들을 배출시키는데 중요한 역할을 한다. 따라서 이전부터 천식의 치료에 있어서 IgE의 생성레벨은 매우 중요한 치료적인 목표로 여겨져 왔다⁹⁾. 본 논문에서 소청룡탕의 투여는 혈액 내에서 항원 특이적인 IgE의 생성수준이 효과적으로 감소시켰다. 이는 천식의 치료에 소청룡탕이 매우 유익함을 나타내는 강력한 증거라 할 수 있다.

천식 치료에 있어서 가장 많이 사용되는 약은 바로 corticosteroide계열이다. 하지만 이러한 코르티코스테로이드 계열의 약물은 그 부작용 때문에 사용을 최소화 하거나 다른 약물로 대체되고 있다¹⁰⁾. 코르티코스테로이드 계열의 약물은 성장에 영향을 주고, 전반적인 면역계를 억압하여 병원균에 의한 기회감염의 확률을 높일 수 있다¹¹⁻¹³⁾. 코르티코스테로이드는 인체의 체액성 면역계도 전반적으로 억압하여 Total antibody, IgG, IgE 등의 생성을 저하시킨다는 보고가 있었다¹⁴⁾. 본 논문의 결과에서 소청룡탕은 항원 특이 전체항체의 양에는 전혀 영향을 미치지 않았다. 이는 코르티코스테로이드와는 상반된 결과로 프레드니솔론에서 보이는 전반적인 면역 억제 기능은 보이지 않는다는 것을 의미한다.

상기한 항원 특이 전체항체와 IgE에 대한 두 가지 결과를 상기하여 볼 때, 소청룡탕은 코르티코스테로이드처럼 천식 치료에 사용될 가능성이 충분하면서도 코르티코스테로이드에서 보이는 가장 중요한 부작용 중 하나인 전반적 면역 억제 작용은 보이지 않는다는 점에서 향후 천식 치료제로서의 가능성은 매우 크다고 생각된다.

천식환자는 가역적인 기도의 과민반응을 보이고, Th2 반응에 의한 만성 염증 상태가 지속된다¹⁵⁾. 천식 환자의 기관지폐포 세척액, 가래 등에서 Th2 driven cytokine인 IL-4의 레벨은 정상인에 비해 올라가 있고, Th 1 driven cytokine인 IFN-g 레벨은 정상인보다 낮아져 있다^{10,16,17)}. 이러한 과정을 통하여 Th2 반응에 관련된 면역세포들이 기도내로 침윤되게 되는데, 본 논문에서 사용한 천식 모델은 이러한 천식환자의 상태를 잘 반영하였다.

본 논문에서 Th1 반응과 관련된 항체인 IgG2a는 소청룡탕 투여에 의하여 전혀 영향을 받지 않았다. 하지만 Th2 반응과 관련 있는 IgE는 효과적으로 감소시켰고, IgG1 역시 감소하는 경향을 보였다. 이러한 점들을 고려하여 볼 때, 소청룡탕은 Th1/Th2 반응의 불균형을 해소함으로써 천식 치료에 기여하는 것으로 생각된다. 소청룡탕이 Th1/Th2 불균형에 관

여한다는 증거는 cytokine의 측정에 의한 이전의 논문들에서도 찾을 수 있다^{17,18,19)}.

결론

이러한 결과를 요약해 보면, 소청룡탕(小靑龍湯)의 구강투여는 천식 유발 생쥐의 혈액내에서 항원 특이 천식의 전변과 악화에 있어서 매우 중요한 IgE 수준을 효과적으로 낮추었고, IgG1 수준 역시 감소시키는 경향을 보였다. 하지만 전반적인 체액성 면역 상태를 표현하는 항원 특이 전체항체의 양과 Th1반응 관련한 항체인 IgG2a의 생성량에는 특별한 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과들에서 소청룡탕(小靑龍湯)의 면역억제 기전은 Th1/Th2 밸런스를 조절하는 것이 한 가지 기전임을 유추해 볼 수 있다.

결론적으로 본 논문에서는 소청룡탕(小靑龍湯)이 천식 치료에 보조약으로서 또는 코르티코스테로이드에 대한 대체약으로서 사용될 수 있는 가능성을 제시하는 바이며, 소청룡탕은 Th1/Th2의 불균형을 해소함으로써 천식을 치료하는데 기여하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업자문부 지정 동신대학교 산학협력단 부설 산업융가속기이용생물연구센터(RIC)로부터 연구비의 일부를 지원받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

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. KJ Isselbacher, E Braunwald, JD Wilson, JB Martin, AS Fauci, DL Kasper. *Harrison's principles of internal medicine*. 13th ed. Seoul : Jung Dam. 1997 : 1258.
3. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001 ; 54(8) : 577-589.

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. Mikino T, Sasaki SY, Ito Y, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicine: effects of Gyokuheifusan on murine antigen-specific antibody production. *Biol Pharm Bull*. 2005 ; 28(1) : 110-113.
9. Balzar S, Strand M, Rhodes D, Wenzel S. E. IgE expression pattern in lung: Relation to systemic IgE and asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 ; 119(4) : 855-862.
10. 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.
11. Gea-Banacloche JC, Opal SM, Jorgensen J, Carrillo JA, Sepkowitz KA, Cordonnier C. Sepsis associated with immunosuppressive medications: an evidence-based review. *Crit Care Med*. 2004 ; 32 : 578-590.
12. Eid N, Morton R, Olds B, Clark P, Sheikh S, Looney S. Decreased morning serum cortisol levels in children with asthma treated with inhaled fluticasone propionate. *Pediatrics*. 2002 ; 109 : 217-221.
13. Visser MJ, van der Veer E, Postma DS, Arends LR, de Vries TW, Brand PL, et al. Side-effects of fluticasone in asthmatic children: no effects after dose reduction. *Eur Respir J*. 2004 ; 24 : 420-425.
14. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 ; 108 : 430-438.
15. 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.
16. Lynch EL, Little FF, Wilson KC, Center DM, Cruikshank WW. Immuno-modulatory cytokines in asthmatic inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 ; 14(6) : 489-502.
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. 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.
19. Ko E, Rho S, Lee EJ, Seo YH, Cho C, Lee Y, Min BI, Shin MK, Hong MC, Bae H. Traditional Korean medicine (SCRT) modulate Th1/Th2 specific cytokine production in mice CD4+ T cell. *J Ethnopharmacol*. 2004 ; 92 : 121-128.