

# 地耳草 추출물이 OVA로 천식이 유발된 생쥐의 폐세포에 미치는 영향

이영용<sup>1#</sup>, 서영배<sup>1</sup>, 이영철<sup>2</sup>, 서부일<sup>3</sup>, 노성수<sup>3\*</sup>

1: 대전대학교 한의과대학 본초학교실, 2: 상지대학교 한의학과 본초학교실,  
3: 대구한의대학교 한의학과 본초학교실

## Effects of Extract of *Hyperici Japonici Herba* on Lung Cells in Asthma-induced Mice by OVA Exposure

Young-Yong Lee<sup>1#</sup>, Young-Bae Seo<sup>1</sup>, Young-Cheol Lee<sup>2</sup>,  
Bu-Il Seo<sup>3</sup>, Seong-Soo Roh<sup>3\*</sup>

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

2: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Sangji University

3: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

### ABSTRACT

**Objectives :** The present study was carried out to investigate the effect of *Hyperici Japonici Herba* 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 *Hyperici Japonici Herba*(EHH), incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer, ELISA, RT-PCR, immunocytochemistry stain.

**Results :** The cell number ratio of granulocyte, CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 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 EHH was all decreased.

In ELISA analysis, IL-4, IL-5, IL-13 protein levels and histamine release level were greatly 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 EHH treatment.

In RT-PCR analysis, the HT value of IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, 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 EHH treatment. And eosinophil proliferation levels were 18847 $\pm$ 1527(cpm) in the control group, 4676 $\pm$ 972(cpm) in the positive control group, and 8675 $\pm$ 159(cpm), 11352 $\pm$ 1005(cpm), 14325 $\pm$ 677(cpm)

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

· Tel : 010-9404-9429 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

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

· Tel : 042-280-2640 · E-mail : linglong@korea.com

· 접수 : 2008년 2월 12일 · 수정 : 2008년 3월 12일 · 채택 : 2008년 3월 17일

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

**Conclusions :** The present data suggested that *Hyperici Japonici Herba* 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 EHH.

**Key words :** OVA, Asthma. EHH (extract of *Hyperici Japonici Herba*), Eosinophil, RT-PCR, Immunocytochemistry

## 서 론

地耳草는 《植物名實圖考》<sup>1)</sup>에 ‘地耳草’로 기재되었으며, 이는 물푸레나무과의 애기고추나무 *Hypericum japonicum* Thumb. ex Murray의 전초이며, 봄 가을 개화시에 채취하여 잡질을 제거한 후<sup>3)</sup>, 왜건하거나 생용한다<sup>4)</sup>.

약리작용으로는 항균<sup>8-9)</sup>, 항암<sup>10)</sup>, 간보호<sup>11)</sup>, 면역증강 작용이 있고<sup>7)</sup>, 면역증강 작용은 림프구의 백분율을 증가시키고, T 림프구와 체액성 면역세포에 현저하게 작용한다<sup>12)</sup>.

임상에서 地耳草는, 급만성 간염, 장티푸스와 파라티푸스<sup>7)</sup>, 감기의 예방과 치료, 癰, 癤 등의 기타 피하화농성 감염을 치료에 양호한 효과를 나타낸다<sup>13)</sup>.

천식은 기도의 과민성을 동반한 세기관지의 만성적 염증이며, 소염시키고 거담하는 약물로써 치료될 수 있는데, 地耳草의 항균, 항염증작용과 淸熱解毒하고 消腫하는 效能으로 알레르기성 천식의 만성 기관지 염증에 유효할 것으로 사료되어, 정상 생쥐를 천식 유발시킨 뒤, 생쥐의 폐세포를 분리, *in vitro* 실험을 시행하였다. 또한 양성대조군으로 Cyclosporin A(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 농도로 1주에 3회 복강주사하였는데, Cyclosporin A는 현재 천식에 면역억제제로서 임상에서 사용되고 있다. 실험결과를 분석한 후, 地耳草가 천식 유발 생쥐의 폐세포 억제에 유의성 있는 결론을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물은 수컷 4주령의 C57BL/6 생쥐를 한국생명공학연구원에서 공급받아 실험당일까지 고형사료

(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 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-carboxymethoxy-phenyl-2, 4- sulfophenyl-2H-tetrazolium(MTS), 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액(RBC lysis solution), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma사(U.S.A) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사(Logan, U.S.A) 제품을, anti-CD8-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC anti-B220-PE, anti-CD69-FITC, propidium iodide(PI)와 RNase는 Pharmingen 사(Torreyana, U.S.A) 제품을, rhIL-1 $\beta$ 는 R&D system사(Minneapolis, U.S.A) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### (2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 熱湯抽出器(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, USA), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech, Germany), ice-maker(Vision

scientific Co., Korea), homogenizer(Omni, USA), plate shaker(Lab-Line, USA) 및 ELISA reader(Molecular Devices, USA) 등을 사용하였다.

3) 약재

실험에 사용된 地耳草(Hyperici Japonici Herba)는 중국 베이징 약재시장에서 구입한 것을 대전대학교 한의과대학 본초학교실에서 중국 약전의 기준에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

4) 地耳草 추출물 분리

地耳草 추출물(extract of Hyperici Japonici Herba : 이하 EHH) 분리는 地耳草 200 g에 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 地耳草 추출물을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 천식모델 생쥐의 폐세포 분리

C57BL/5 생쥐에 500 µg/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10 % (w/v) aluminum potassium sulfate(Alum; Sigma)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 / ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도내로 흡입시킨다. 천식이 유발된 생쥐의 폐를 적출하여 폐조직을 잘게 절편한 후 2 % 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 µg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 15 ml로 37℃, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해(digestion)하여 폐세포를 분리한다. 분리된 폐세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거한다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37℃에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04 % trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정한다.

2) 폐세포 배양

24 well plate에 폐세포(2x10<sup>6</sup> cells)를 배양하고 EHH(100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)를 처리하고 1시

간 후 rIL-3(30 U/ml나 rmIL-5 (10 µg/ml)로 호산구 활성화 유발을 위하여 각각의 well에 첨가하여 48 시간 배양하였다.

3) 유세포 형광분석

배양 후 호산구 세포를 인산완충생리식염수(3 % 우태아혈청, 0.1 % NaN<sub>3</sub>)로 2회 수세하였고, 4℃에서 면역 형광염색(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 유세포 형광분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, USA)로 생쥐 폐세포에서 CD3e, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220, CD23 (Fcε) 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 CD69/CD3e, CD3e/CCR3, CD23/B220, 그리고 CD4/CD8의 비율(gated, %)을 산출하였다.

4) 기관지천식 생쥐의 폐조직의 역전사-중합효소 연쇄반응

(1) RNA 추출

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

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75℃에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor(20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH

8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1  $\mu$ l의 M-MLV RT(200 U/ $\mu$ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로써 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20  $\mu$ l의 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)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3  $\mu$ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는  $\beta$ -actin, IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), cyclooxygenase-2, 그리고 NOS-II 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer(20 pmole/ $\mu$ l)와 antisense primer(20 pmole/ $\mu$ l)를 혼합하여 1  $\mu$ l를 가하고, 다시 3  $\mu$ l 2.5 mM dNTPs, 3  $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18  $\mu$ l Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30  $\mu$ l 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95°C 5분, denaturation: 95°C 5분, annealing: 55°C 1분, elongation: 72°C 1분을 25cycles한 뒤 post-elongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20  $\mu$ l씩 1.2 % agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다. Mouse Oligonucleotide의 염기배열은 다음 Table 1과 같다.

Table 1. Mouse Oligonucleotide의 염기배열

| Gene           | Primer    | Sequence                          |
|----------------|-----------|-----------------------------------|
| IL-4           | sence     | 5'-CCGTCGATAGTGGCATCCATGAAAC-3'   |
|                | antisence | 5'-GGACCAATACCTGTATAGGG-3'        |
| IL-5           | sence     | 5'-AACCCCTTACTGAACTCAGATTGTTAG-3' |
|                | antisence | 5'-TAAGTCAGTTTAAATGCTTAGGG-3'     |
| IL-13          | sence     | 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3'     |
|                | antisence | 5'-ACCGATACAGTACAGTACAGTA-3'      |
| IFN- $\gamma$  | sence     | 5'-CCGATATTTAGATACGTTAAAC-3'      |
|                | antisence | 5'-ATGGCCTAGTCAGTCTTAAAT-3'       |
| $\beta$ -actin | sence     | 5'-TGGAACTCTGTGGTCCATGAAAC-3'     |
|                | antisence | 5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'       |

### 5) ELISA analysis

생쥐 호산구 세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포씩 분주하고, EHH(100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml)등을 처리였고, 약물처리 1시간 후 rIL-3(30 U/ml)나 rmIL-5(recombinant mouse interleukin-5, 10  $\mu$ g/ml, PharMingen)를 48시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 IL-4, IL-5, IgE, Histamine, IFN- $\gamma$  enzyme-linked immuno-sorbent assay (Endogen, USA)와 IL-13는 ELISA kit (R&D system)을 48시간 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  $\mu$ l씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50  $\mu$ l의 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, EHH(100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml)등을 처리였다. 약물처리 1시간 후 rIL-3(30 U/ml)와 rmIL-5를 72시간 동안 동시 배양하였다. 동시배양 40시간 배양 후 50  $\mu$ Ci/ml의 [methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine(Amersham, USA)을 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) 통계처리

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

## 결 과

### 1. 유세포 형광분석(FACS analysis)

#### (1) Granulocytes/lymphocytes population.

정상군에서의 세포수가 21.4%인 반면, rIL-5/rIL-3을 처리한 대조군에서는 36.7 %로 증가되었다. 반면에 rIL-5/rIL-3과 EHH를 함께 처리한 실험군에서는 29.7 %로 세포수가 감소되었다(Fig. 1).

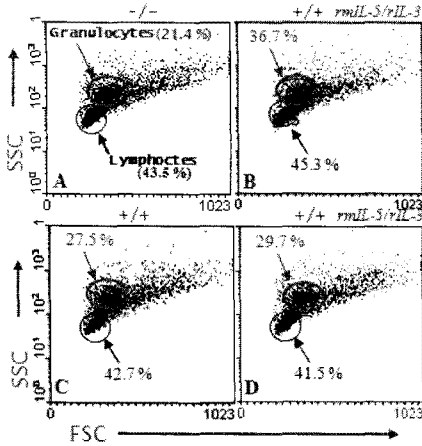


Fig. 1. Inhibitory effect of EHH on the ratio of granulocytes/lymphocytes population(%) in asthma- induced lung cells treated with rIL-3 plus rIL-5

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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Eosinophils were activated by rIL-3/rIL-5 co-treatment. The lung cells were treated with extract of Herba Hyperici Japonici (EHH), incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer.

- A: Normal C57BL/6 mice.
- B: rIL-3/rIL-5 to OVA-induced asthma lung cells.
- C: rIL-3/rIL-5 + Cyclosporin A(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to OVA-induced asthma lung cells.
- D: rIL-3/rIL-5 + EHH(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) to OVA-induced asthma lung cells.

#### (2) CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>

CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 세포수가 대조군은 정상군에 비해 20.8 %로 증가된 반면, EHH를 처리한 실험군은 12.5 %로 세포수가 감소되었다(Fig. 2).

#### (3) CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>

CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수가 정상군에서는 7.8 %였으며, 대조군에서는 56.7 %로 증가되었고, EHH를 처리한 실험군에서는 34.6 %로 감소되었다(Fig. 3).

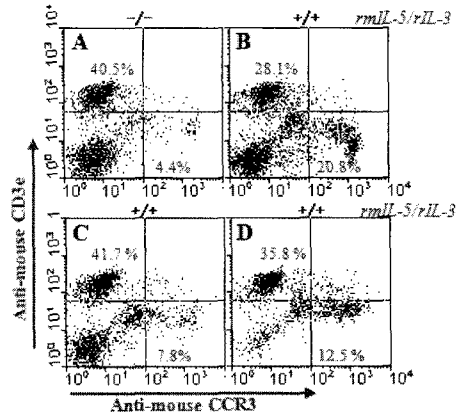


Fig. 2. Inhibitory effect of EHH on the ratio of CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> lymphocytes population(%) in asthma- induced lung cells treated with rIL-3 plus rIL-5

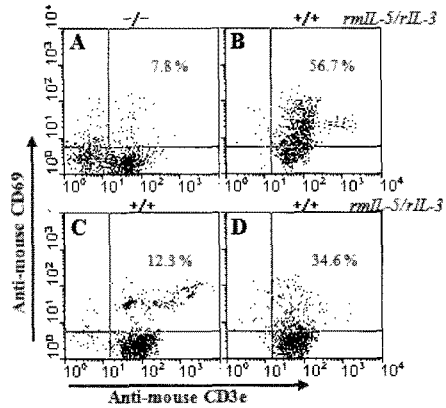


Fig. 3. Inhibitory effect of EHH on the ratio of CD69<sup>+</sup>/CD3e<sup>+</sup> lymphocytes population(%) in asthma- induced lung

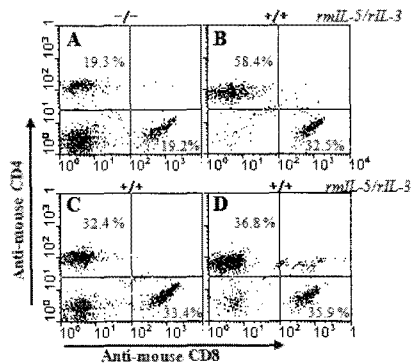


Fig. 4. Inhibitory effect of EHH on the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> lymphocytes population(%) in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rIL-5

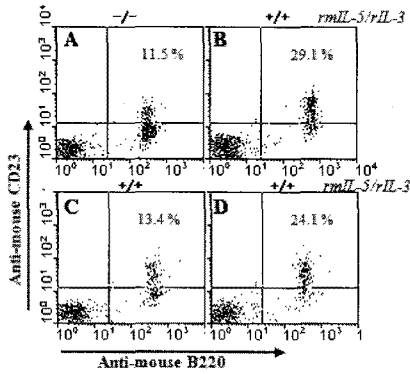


Fig. 5. Inhibitory effect of EHH on the ratio of CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> lymphocytes population(%) in asthma- induced lung cells treated with rIL-3 plus rmlL-5

(4) CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup>

CD4<sup>+</sup>세포의 비율이 정상군에서 19.3 %인 반면, 대조군에서는 58.4 %로 증가되었고, EHH를 처리한 실험군은 36.8 %로 감소되었다. CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>세포의 비율이 대조군에서 1.7:1이었고, EHH를 처리한 실험군의 CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> 비율은 1.02:1이었다(Fig. 4).

(5) CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>

CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포의 비율이 정상군에서는 11.5 %인 반면, 대조군에서는 29.1 %로 증가되었다. EHH를 처리한 실험군은 24.1 %로 감소되었다(Fig. 5).

2. RT-PCR 분석

(1) IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, Eotaxin 생성량 분석

IL-4의 그룹별 HT값을 측정한 결과, rmlL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서의 HT값이 85인 반면, rmlL-5/rIL-3와 함께 EHH를 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml로 각각 처리한 실험군의 HT 값은 24, 69, 87로 감소되었다. IL-5의 그룹별 HT 값을 측정한 결과, 대조군에서의 HT값이 120인 반면, EHH를 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml로 함께 처리한 실험군의 HT값이 19, 86, 114로 감소되었다. IL-13의 그룹별 HT값을 측정한 결과, 대조군에서의 HT값이 68로 증가된 반면, EHH를 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml로 함께 처리한 실험군의 HT값이 34, 52, 98로 감소되었다. CCR3의 그룹별 HT값을 측정한 결과, 대조군의 HT값이 정상군에 비해 60으로 증가된 반면, EHH를 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml 농도로 각각 처리한 실험군의 HT값이 38, 55, 57로 감소되었다. Eotaxin의 그룹별 HT 값을 측정한 결과, 대조군의

|         | HT 값 |     |     |    |    |     |
|---------|------|-----|-----|----|----|-----|
|         | A    | B   | C   | D  | E  | F   |
| IL-4    | 18   | 85  | 16  | 24 | 69 | 87  |
| IL-5    | 47   | 120 | 104 | 19 | 86 | 114 |
| IL-13   | 18   | 68  | 43  | 34 | 52 | 98  |
| CCR3    | 12   | 60  | 16  | 38 | 55 | 57  |
| Eotaxin | 18   | 120 | 90  | 48 | 71 | 117 |

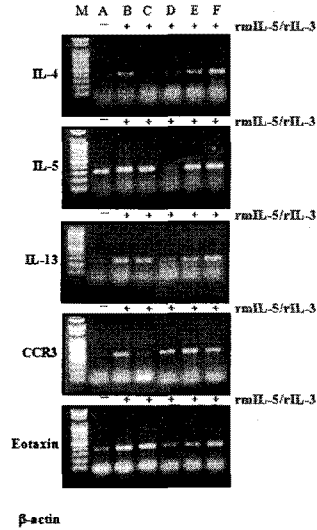


Fig. 6. Effect of EHH on IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, Eotaxin mRNA gene expression in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmlL-5

A: Normal C57BL/6 mice.  
 B: rIL-3/rmlL-5 to OVA-induced asthma lung cells (Control).  
 C: rIL-3/rmlL-5 + Cyclosporin A (CsA, 10  $\mu$ g/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 D: rIL-3/rmlL-5 + EHH (100  $\mu$ g/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 E: rIL-3/rmlL-5 + EHH (10  $\mu$ g/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 F: rIL-3/rmlL-5 + EHH (1  $\mu$ g/ml) to OVA-induced asthma lung cells.  
 Internal loading control:  $\beta$ -actin and DNA 100 bp marker (M).

HT값이 정상군에 비해 120으로 증가된 반면, EHH를 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml 농도로 각각 처리한 HT값이 57, 101, 117로 감소되었다(Fig. 6).

3. IL-4, IL-5, IL-13, histamine 생성량 분석

IL-4의 분석결과, 정상군에 비해 rmlL-5와 rIL-3만을 처리한 대조군에서 IL-4 발현량이 증가되었고, rmlL-5, rIL-3와 EHH를 100  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 실험군은 유의성 있게 감소되었다. IL-5의 분석결과, 정상군에 비해 대조군에서 IL-5 발현량이 증가되었고, EHH를 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다.

IL-13의 분석결과, 정상군에 비해 대조군에서 IL-13 발현량이 증가되었고, EHH를 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다. Histamine production를 살펴본 결과, 정상군에 비해 대조군에서 histamine 발현량이 증가되었고, EHH를 처리한 실험군은 유의성 있게 감소되었다(Fig. 7).

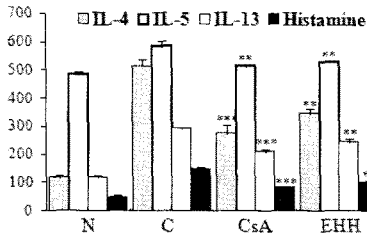


Fig. 7. Effect of EHH on IL-4, IL-5, IL-13, Histamine production level in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5

The results are expressed the mean  $\pm$  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 99 % and 99.9 % or higher (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

#### 4. Eosinophil proliferation assay

rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군에서 eosinophil proliferation은 18847 $\pm$ 1527 cpm인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4676 $\pm$ 972 cpm으로 감소되었다. rmIL-5/rIL-3와 EHH를 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml 농도로 처리한 실험군의 eosinophil proliferation은 8675 $\pm$ 159 cpm, 11352 $\pm$ 1005 cpm, 14325 $\pm$ 677 cpm으로 나타났다(Table 2).

Table 2. Effect of EHH on the Eosinophil Proliferation from Murine OVA-induced Mouse Lung Eosinophils

| Group                    | Drug (mg/ml) | rmIL-5 / rIL-3 | Eosinophil proliferation (cpm)  |
|--------------------------|--------------|----------------|---------------------------------|
| Eosinophil cells         | -            | -              | 968 $\pm$ 91                    |
| Control                  | -            | +              | 18847 $\pm$ 1527 <sup>***</sup> |
| Cyclosporin A(CsA)       | 10           | -              | 4676 $\pm$ 972 <sup>***</sup>   |
| Extract of <i>Herba</i>  | 100          | +              | 8675 $\pm$ 159 <sup>***</sup>   |
| <i>Hyperici Japonici</i> | 10           | +              | 11352 $\pm$ 1005 <sup>**</sup>  |
| (EHH)                    | 1            | +              | 14325 $\pm$ 677                 |

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% and 99.9% or higher (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### 考 察

기관지 천식의 병인에 관계되는 T 세포는 분비되는 여러 cytokine의 종류에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 나눌 수 있으며, 특히 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 예를 들어 천식과 같은 알레르기성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용에 관여하는데<sup>14-16)</sup>, 알레르기성 천식 환자의 폐포 세척액에는 Th2세포의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다<sup>17)</sup>. Th2세포는 B 세포와 함께 체액성 면역반응에 관여하며, 이들의 과다한 발현은 알레르기 질환을 초래 할 수 있다.

Th2세포는 eoxaxin, RANTES, MIP-1a와 MCP-3과 같은  $\beta$ -chemokine들을 생성하여, 호산구를 기도 내로 주유하며, IL-5, IL-3 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>18)</sup>.

따라서 Th2세포, B세포 활성의 억제가 면역과민 반응을 지연시킬 수 있다고 사료되어, 이에 항염증 작용이 뛰어난 地耳草를 이용하여 급만성적으로 기도 염증을 동반하는 천식에 유효할 것으로 사료되어 地耳草의 면역학적 효능을 살펴보기 위해 FACS를 이용한 각종 cytokine과 케모카인의 발현 경향, 유전자 발현 양상 분석, ELISA, Immunocytochemistry, 호산구 증식 억제 실험을 행하였다.

FACS 분석에서 Granulocytes 숫자는, 정상군에서 21.4 %를 보였고, rmIL-5/rIL-3만을 처리한 대조군은 증가하여 36.7 %를 보이고 있다. 이에 비해 rmIL-5/rIL-3와 EHH를 함께 투여한 실험군에서는 31.4%로 granulocytes의 숫자가 감소되었다. 이는 地耳草가 기관지 및 기도에서 발생하는 만성염증을 유발시키는 세포의 활동을 억제하는 작용이 있음을 나타낸다(Fig. 1).

CD3는 Th1 세포와 Th2 세포 모두에 존재하며 CCR3는 호산구에서 가장 높게 발현이 되고, 호염기구, Th2 세포, 천식 환자의 기도 상피 세포에서 보인다.喘息 유발 생쥐의 기관지 폐포 세척액에서 FACS 분석 결과 CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> 호산구수의 지표로 볼 수 있으며, 대조군에서 20.8 %이었으나 EHH 투여군에서는 12.5 %로 감소된 것을 볼 수가 있다(Fig. 2). 이에 EHH가 호산구 세포의 침윤을 억제하여 천식 치료에 유효할 것으로 사료된다.

CD69는 활성화된 B 세포, 대식 세포, NK 세포에 분포하며<sup>19)</sup>, T 세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 분비되므로 천식환자의 기도에서 호산구 침윤의 표지로 사용될 수 있다<sup>20)</sup>. CD3e<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수를 분석한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 56.7 %로 증가되었으며, EHH 투여군은 34.6 %로 감소되었다. 이는 호산구의 활성화를 감소시키는 것으로 사료된다(Fig. 3).

CD4<sup>+</sup> T 세포는 여러 종류의 사이토카인을 생산하여 B 세포가 효율적으로 항체를 생산하도록 도와 주고 면역반응의 행동세포를 활성화시키는 역할을 하므로 CD4<sup>+</sup> T 세포의 비율은 일반적으로 면역력의 지표로도 광범위하게 응용되고 있다<sup>19)</sup>.

FACS 분석에서 CD4(%)는 대조군에서 58.4 %로 증가되었고, EHH 투여군은 36.8 %로 감소되어 알레르기 반응을 촉진시키는 CD4 세포수의 감소를 보였다(Fig. 4).

CD23은 성숙된 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 수지상 세포등에서 발견되며, Ig E 합성을 조절하는 리간드이다<sup>20)</sup>. B220는 사람에게 존재하지 않는 생쥐의 B 세포의 표지분자<sup>21)</sup>이고 아토피질환의 발생에서 중요한 역할을 하는 Ig E 항체는 B 세포에 의해 생성된다<sup>22)</sup>.

CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수의 변화가 정상군에 비해 대조군은 29.1 %로 증가되었으나, EHH를 처리한 실험군은 23.2 %로 감소되었다(Fig. 5). 이는 알레르기 반응에 주요하게 작용하는 B 세포의 활성이 억제되었음을 의미한다.

RT-PCR 분석을 살펴보면, IL-4는 IgE 항체의 생성 및 민감작 CD4<sup>+</sup> T cell을 Th2 세포로 발생시키는 주요자극제이다<sup>23)</sup>.

IL-5는 IL-4와 유사하게 B 세포의 증식과 분화를 자극하는 기능을 가진 분자량 20kD의 사이토카인으로 활성화된 CD4<sup>+</sup> T 세포와 비만세포가 분비한다<sup>17)</sup>.

IL-13은 Th2에서 분비되는 사이토카인으로 Th1 세포를 억제하며, Ig E의 생성을 유도하여 알레르기성 염증 반응의 병인에 관여한다고 하였다<sup>20)</sup>.

RT-PCR 분석에서, IL-4, IL-5, IL-13, CCR3, Eotaxin의 HT값을 비교 분석한 결과 정상군보다 대조군에서 HT값이 증가되었고, 대조군에 비해 EHH 투여군에서 HT값이 감소되었다(Fig. 6). 이는 EHH가 기관지 천식 염증에 관여하는 호산구, 대식 세포, Th2세포의 발현양상이 감소됨을 의미하여 면역 세포의 증식과 천식 억제 작용이 있음을 나타낸다. Eotaxin HT값 감소는 호산구의 활성이 감소됨을 볼

수가 있는데, eotaxin은 CCR3를 수용체로 하며 호산구를 target cell로 하는 chemokine이기 때문이다.

ELISA 분석을 살펴보면, BALF내 IL-4, IL-5, IL-13가 rIL-3와 rmIL-5만을 처리한 대조군은 증가되는 것이 관찰되었고, 실험군은 유의성 있게 감소되었다(Fig. 7). 이는 EHH의 알레르기 반응 억제 작용을 반영한다고 볼 수 있다.

히스타민 생성에 미치는 영향을 살펴보면 본 실험에서 대조군에 비하여 EHH가 처리된 경우 히스타민 생성량이 감소되었다(Fig. 7). 이 결과는 EHH가 알레르기 반응에 주된 인자로 알려진 히스타민의 생성 억제에 유의한 작용이 있음을 보여준다.

호산구 증식 억제 실험을 분석해 보면, 대조군에서 eosinophil proliferation은 18847±1527 cpm인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4676±972 cpm으로 감소되었다. EHH를 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml 농도로 처리한 실험군의 eosinophil proliferation은 8675±159 cpm, 11352±1005 cpm, 14325±677 cpm으로 나타났다(Table 2). 이는 EHH가 호산구 증식을 유의성 있게 억제 작용하고 있다고 사료된다.

위와 같이 천식 생쥐에 폐세포를 분리하여, 면역과민 반응에 관여하는 B 세포, 호산구, Th2 세포와 비만세포의 활성의 변화를 관찰하였으며, 결과적으로 EHH를 투여한 실험군에서 대조군보다 활성이 저하되었음을 볼 수 있었다. 따라서 地耳草의 추출물이 기관지 천식에 유의한 효능이 있을 것으로 사료된다.

## 結 論

地耳草가 OVA로 유도된 천식 생쥐 모델의 폐세포에 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. FACS 분석 결과, 정상군에서의 granulocytes, 호산구, B 세포수에 비해, rmIL-5/rIL-3을 처리한 대조군에서 granulocytes, 호산구, B 세포수가 증가되었다. 반면에 rmIL-5/rIL-3와 EHH를 함께 처리한 실험군의 granulocytes, 호산구, B 세포수가 감소되었다.

2. RT-PCR 분석결과, IL-4, IL-5, IL-13, CCR3,



Eotaxin의 그룹별 HT 값을 측정 한 결과, 대조군의 HT 값이 증가된 반면, EHH를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 각각 함께 처리한 실험군의 HT 값은 감소되었다(Fig. 7).

3. ELISA분석 결과, 대조군에서 IL-4, IL-5, IL-13, histamine release 발현량이 증가한 반면, EHH 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 실험군은 IL-4, IL-5, IL-13, histamine release 발현량이 유의성 있게 감소되었다.

4. rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군에서 eosinophil proliferation은 18847 $\pm$ 1527 cpm인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4676 $\pm$ 972 cpm으로 감소되었다. EHH 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 실험군의 eosinophil proliferation은 모든 농도에서 유의성 있게 감소되었다.

이상의 결과로 地耳草가 호산구, Th2 세포, B cell, 비만세포에 대해 억제 작용을 가지고 있으며, 이러한 작용으로 천식에 유효한 효과가 있을 것으로 생각되며 임상 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. 吳其溶 選. 植物名實圖考. 北京 : 世界書局. 1984 : 65.
2. 廣東中藥誌編輯委員會著. 廣東中藥誌. 廣州 : 廣東科學技術出版社. 1996 : 34.
3. 徐國均 외 3인 主編. 中國藥材學. 北京 : 中國醫藥科技出版社. 1996 : 1477-8.
4. 全國中草藥匯編編寫組. 全國中草藥匯編(上冊). 北京 : 人民衛生出版社. 1988 : 336-7.
5. 顏正華 主編. 中藥學. 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 217-8.
6. 王本祥 主編. 現代中藥藥理學. 天津 : 天津科學技術出版社. 1997 : 588-90.
7. 강소신의학회 편. 김창민 등 역. 中藥大辭典. 서울 : 정담. 1998 : 5138-41.
8. 陳新謙, 新編藥物學. 第13版. 北京 : 人民衛生出版社. 1986 : 455.
9. 張近的 擇. 地耳草中的新抗菌成分. 國外醫學. 中醫中藥分冊. 北京 : 人民衛生出版社. 1987 : 55.
10. Yang LW, Wu DH, Tang X, Peng W, Wang XR, Ma Y, Su WW. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. J Chromatogr A. 2005 Apr 8 ; 1070(1-2) : 35-42.
11. Jiang H, Huang X, Yang Y, Zhang Q. Studies on the antilipid peroxidation of nine sorts of Chinese herbal medicines with the function of protecting liver. Zhong Yao Cai. 1997 Dec ; 20(12) : 624-626.
12. 李逢春. 魚腥草餘地耳草增強免疫功能的協同作用研究. 實用中西醫結合雜誌. 1995 ; 8(8) : 551.
13. 高墀岩. 七寸金治療傷寒及副傷寒進一步觀察. 福建中醫藥. 1964 ; 9(3) : 196.
14. 조상헌, 송숙희, 김윤근, 지영구, 최동철, 윤호주 등. 아토피 환자에서의 IgE 항체 생성조절기전-말초혈액림프구의 IL-4, IFN- $\gamma$  생성의 불균형. 알러지. 1995 ; 2(2) : 210-2.
15. 어수택, 정성환, 이상우, 김현태, 김용훈, 박춘식. 喘息환자의 기도 내 cytokines표현에 대한 연구. 결핵 및 호흡기질환. 1995 ; 42(1) : 2-3.
16. 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.
17. 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.
18. Conigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Lancet. 1988 ; 1(8595) : 1129-32.
19. 김세중. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994, 3, 8, 25, 26, 28, 31, 32.
20. Charles A Janeway 著. 김태규 외 10인 譯. 면역생물학(제5판). 서울 : 라이프사이언스. 2002 : 698, 703, 714.
21. 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 ; 94(4) , 344-9.
22. 이숙영, 송정섭, 김영균, 김관형, 문화식, 박성학. 기관지천식의 기도과민 반응과 기관지 폐포세척액 소견. 대한내과학회지. 1995 ; 48(2) : 171~80.
23. 강재성 외. 세포분자면역학. 서울 : 범문사. 2002 : 198.