

三子化痰煎이 천식모델 생쥐의 CD4, CD8 세포에 미치는 영향

남태흥 · 박양춘*

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Effect of Samjahwadam-jeon on CD4, CD8 Cells in OVA-induced Asthmatic Mice

Tae Heung Nam, Yang Chun Park*

Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This study aimed to examine the effects of Samjahwadam-jeon (SJHDJ) on CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in ovalbumin (OVA)-induced asthmatic mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SJHDJ (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lung, peripheral lymph node (PLN), and spleen were removed and CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells for analyzed by flow cytometer. Number of CD4⁺ T cells in lung, PLN and spleen of the SJHDJ group (400 mg/kg and 200 mg/kg) were significantly decreased compared with that of control group. Number of CD8⁺ T cells in PLN and spleen of the SJHDJ group (400 mg/kg, 200 mg/kg) were significantly decreased compared with that of control group. Conclusion : These results suggest that SJHDJ alleviated asthmatic hyperreactivity through CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Further study of relative cytokines is expected.

Key words : Samjahwadam-jeon (Sanzihuatan-jian), asthma, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells

서 론

기관지천식(이하 천식)은 전 세계적으로 유병률이 증가하고 있으며 이에 따라 사회경제적 부담이 증가하고 있는 질환이다¹⁾. 우리나라의 경우 2006년도 국민건강보험 통계지표에 의하면 천식환자가 지난 2001년보다 26.9% 증가하여 488,977명에 이르는 것으로 조사되었다²⁾.

천식은 韓醫學에서 呼吸急促하며 喉中有聲響한 것을 특징으로 하는 哮喘證의 범주에 해당한다. 哮喘의 발생에 대한 素因說에 의하면 특수하게 내재된 素因인 夙根을 가진 사람이 寒冷을 만나거나, 疲勞 혹은 勞力할 때 哮喘이 발생하는 것으로 설명하고 있는데 이는 알레르기에 의한 천식의 발생과 유사하다고 할 수 있다³⁾. 천식의 병리학적 기전에는 다양한 면역세포, 화학매체, 사이토카인 및 유착분자가 관여하는데 이중 T세포는 염증세포를 기도내로 끌어 모으고 활성화시켜 천식 병인에 중요한 역할을 한다.

* 교신저자 : 박양춘, 청주시 상당구 용담동 173-9 대전대학교 청주한방병원

· E-mail : omdpyc@dju.ac.kr, · Tel : 043-229-3704

· 접수 : 2008/08/21 · 수정 : 2008/09/29 · 채택 : 2008/10/01

CD4⁺인 보조T세포(이하 Th세포)는 사이토카인 분비양상에 따라 Th1세포와 Th2세포로 나뉘는데 Th2세포는 IL-3, IL-4, IL-5 등의 사이토카인들을 분비하여 천식의 면역학적 반응에서 중요한 역할을 한다^{4,5)}. CD8⁺ 세포는 세포독성T세포(이하 Tc세포)로 Th세포와 마찬가지로 사이토카인 분비 양상에 따라 IL-2, IFN-γ를 분비하는 Tc1세포와 IL-4, IL-5 등을 분비하는 Tc2세포로 분류하게 되었고⁶⁾, 이후 천식과 같은 알레르기성 기도염증에서 CD8⁺ T세포의 역할에 대한 관심이 높아졌다. 따라서 CD4⁺ T세포와 CD8⁺ T세포에 대하여 한약 처방이 미치는 영향을 관찰하는 것은 천식 치료 약물의 효과 평가에서 매우 중요하다고 할 수 있다.

최근 천식과 관련하여 다양한 單味 및 處方을 대상으로 동물 천식 모델을 이용한 연구⁷⁻¹⁰⁾가 이루어지고 있다. 三子化痰煎은 蘇子導痰降氣湯에 가감한 처방으로 痰涎이 氣道에 壅塞하여 短氣 喘促하며 咳喘 面浮하는 오래된 천식에 사용하는 처방이다¹¹⁾.

이에 호흡기질환에 다용하고 있는 三子化痰煎을 대상으로 면역세포에 미치는 영향을 규명하고자 기관지천식 생쥐모델을 통해 폐, 말초림프절, 비장 조직의 CD4⁺세포와 CD8⁺세포의 수의 변화를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

체중 18-25 g의 C57BL/6(샘타코, Korea) 생쥐를 실험 당일 까지 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상 ; 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00-19:00), 조도 150-300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 三子化痰煎(Samjahwadam-jeon, SJHDJ)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Herb Composition of Samjahwadam-jeon(SJHDJ)

구성약물	生藥名	용량(g)
蘇子	<i>Perillae Fructus</i>	12
半夏	<i>Pinelliae rhizoma</i>	6
蘿藦子	<i>Raphani Semen</i>	6
白茯苓	<i>Poria</i>	6
前胡	<i>Peucedani Radix</i>	4
皂角刺	<i>Gleditsiae Spina</i>	4
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
杏仁	<i>Armeniaca Amarum Semen</i>	4
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	4
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	4
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	3
白芥子	<i>Sinapis Semen</i>	3
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	3
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	3
Total amount		73

2. 시약 및 기기

1) 시약

Chicken egg albumin(ovalbumin : OVA), aluminum potassium sulfate (Alum), trichloroacetic acid, SRB, amphotericin, antibiotics, DNase, collagenase, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구 용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, magnesium chloride (mgCl₂)는 Sigma사(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)는 Hyclone사(USA) 제품을 사용하였으며 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2) 기기

기기는 열탕추출기(대웅 Co., Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi, Switzerland), freeze dryer (EYELA, Japan), CO₂ incubator (Forma Scientific, USA), clean bench (Vision Scientific, Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision Scientific, Korea), vortex

mixer(Vision Scientific, Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, USA), deep-freezer(Sanyo, Japan), flow cytometer (Becton Dickinson, USA), thermocycler system(MWG Biotech, Germany), ice-maker(Vision Scientific, Korea), homogenizer(OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA) 등을 사용하였다.

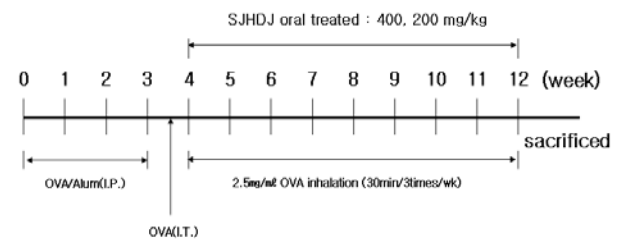
3. 방법

1) 三子化痰煎 추출물 분리

SJHDJ 4첩 분량을 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하였다. 추출액을 여과한 후 감압 증류장치(B-480, BUCHI, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기(FDU-540, EYELA, Japan)를 이용하여 18.5 g의 분말을 얻었다. 완전 건조한 SJHDJ을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 기관지 천식 생쥐 모델

500 µg/µl의 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate(Alum)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 × g 에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리한 OVA/ Alum 침전물을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후, 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강 내로 주사하여 전신 감각시켰다. 이 후 4주째에 생쥐를 마취한 후, 난알부민(500 µg/ml) 100 µl를 기관지로 주사하여 직접 투여(I.T. : intra trachea)하였다. 5주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다. 이 때 음성대조군(wild type)은 PBS 또는 Alum 만을 복강과 기관지에 주사하고, 분무기로 흡입시켰다(Scheme 1).



Scheme 1. Asthma OVA-induced mouse model.

3) 경구 투여

OVA/Alum로 전신 감각시킨 후 4주째부터 SJHDJ (400, 200 mg/kg)을 일주일에 5회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구 투여하였다.

4) 폐장, 말초림프절 및 비장의 면역세포수 측정

실험 종료 후 OVA 천식 생쥐를 ethyl ether로 마취시킨 후 폐장, 말초림프절(lung, peripheral lymph node; PLN), 그리고 비장을 분리하여 buffered ammonium chloride(ACK) 용액을 37℃에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 이를 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색하여 총 면역세포수를 측정하였다.

5) 유세포 분석

실험 종료 후 비장, 말초림프절, 폐를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리(1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 이를 잘게 chopping한 후, collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20 min) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들을 ACK 용액(8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총 세포수를 측정하였다. 측정된 비장, 말초림프절, 폐의 세포를 5×10⁵ 세포로 조정한 후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4⁺, CD8⁺ 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수(absolute number)를 산출하였다.

6) 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다.

결 과

1. CD4⁺ 세포 수에 미치는 영향

1) Lung

Lung에서 분리한 세포에서 CD4⁺ 세포 수를 측정된 결과는 다음과 같다. 정상군은 1.4 ± 0.1 (×10⁵), 대조군은 13.0 ± 0.8 (×10⁵), 양성대조군 (CsA)은 4.4 ± 0.0 (×10⁵), SJHDJ 400 mg/kg 투여군은 6.6 ± 1.0 (×10⁵), 200 mg/kg 투여군은 8.5 ± 0.7 (×10⁵)로 나타나, 대조군에 비하여 SJHDJ 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (****p<0.001, ***p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 1).

2) PLN

PLN에서 분리한 세포에서 CD4⁺ 세포 수를 측정된 결과, 정상군은 24.8 ± 0.3 (×10⁵), 대조군은 57.9 ± 3.2 (×10⁵), 양성대조군 (CsA)은 35.0 ± 4.5 (×10⁵), SJHDJ 400 mg/kg 투여군은 31.6 ± 12.0 (×10⁵), 200 mg/kg 투여군은 35.3 ± 0.3 (×10⁵)으로 나타나, 대조군에 비하여 SJHDJ 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 2).

3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포에서 CD4⁺ 세포 수를 측정된 결과, 정상군은 5.2 ± 1.5 (×10⁶), 대조군은 17.8 ± 4.2 (×10⁶), 양성대조군 (CsA)은 4.6 ± 0.9 (×10⁶), SJHDJ 400 mg/kg 투여군은 6.7 ± 1.2 (×10⁶), 200 mg/kg 투여군은 7.4 ± 1.2 (×10⁶)로 나타나, 대조군에 비하여 SJHDJ 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 3).

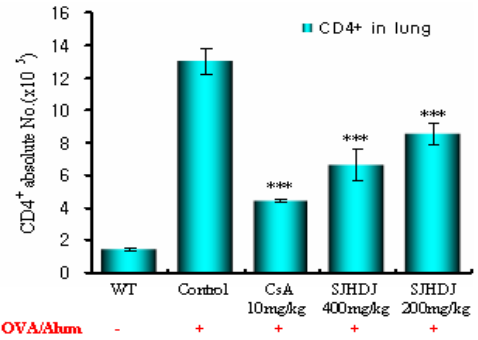


Fig. 1. Effect of SJHDJ extract on CD4⁺ absolute cell number in lung of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SJHDJ (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lung was removed and CD4⁺ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean ± S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (***p<0.001).

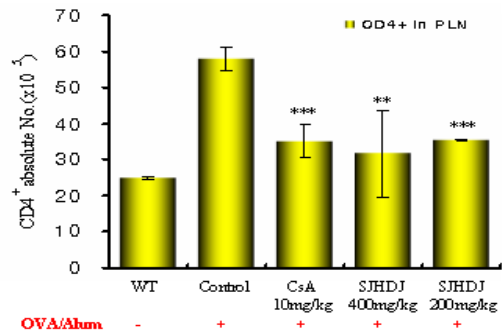


Fig. 2. Effect of SJHDJ extract on CD4⁺ absolute cell number in peripheral lymph node (PLN) of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SJHDJ (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PLN were removed and CD4⁺ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean ± S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

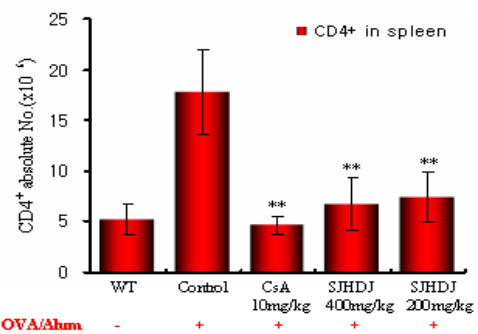


Fig. 3. Effect of SJHDJ extract on CD4⁺ absolute cell number in spleen of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SJHDJ (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice spleen was removed and CD4⁺ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean ± S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01).

2. CD8⁺ 세포 수에 미치는 영향

1) Lung

Lung에서 분리한 CD8⁺ 세포 수를 측정된 결과, 정상군은 $0.7 \pm 0.1 (\times 10^5)$, 대조군은 $4.9 \pm 0.6 (\times 10^5)$, 양성대조군 (CsA)은 $2.7 \pm 0.5 (\times 10^5)$, SJHDJ 400 mg/kg 투여군은 $3.5 \pm 1.2 (\times 10^5)$, SJHDJ 200 mg/kg 투여군은 $3.6 \pm 0.9 (\times 10^5)$ 로 나타났다(Fig. 4).

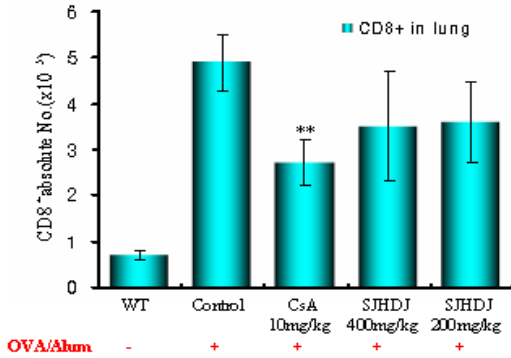


Fig. 4. Effect of SJHDJ extract on CD8⁺ absolute cell number in lung of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SJHDJ (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lung was removed and CD8⁺ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test.

2) PLN

PLN에서 분리한 CD8⁺ 세포 수를 측정된 결과, 정상군은 $17.5 \pm 1.0 (\times 10^5)$, 대조군은 $24.5 \pm 1.7 (\times 10^5)$, 양성대조군 (CsA)은 $19.5 \pm 3.1 (\times 10^5)$, SJHDJ 400 mg/kg 투여군은 $8.8 \pm 2.4 (\times 10^5)$, 200 mg/kg 투여군은 $14.3 \pm 0.7 (\times 10^5)$ 으로 나타나, 대조군에 비하여 SJHDJ 투여군 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (**p<0.001, ***p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 5).

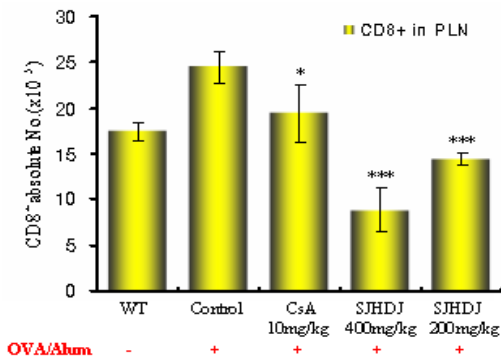


Fig. 5. Effect of SJHDJ extract on CD8⁺ absolute cell number in peripheral lymph node (PLN) of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SJHDJ (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PLN were removed and CD8⁺ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

3) Spleen

Spleen에서 분리한 CD8⁺ 세포 수를 측정된 결과, 정상군은 $21.3 \pm 1.0 (\times 10^6)$, 대조군은 $31.2 \pm 2.3 (\times 10^6)$, 양성대조군 (CsA)은 $19.4 \pm 0.9 (\times 10^6)$, SJHDJ 400 mg/kg 투여군은 $14.9 \pm 4.1 (\times 10^6)$, 200 mg/kg 투여군은 $19.5 \pm 0.5 (\times 10^6)$ 으로 나타나, 대조군에 비하여 SJHDJ 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 6).

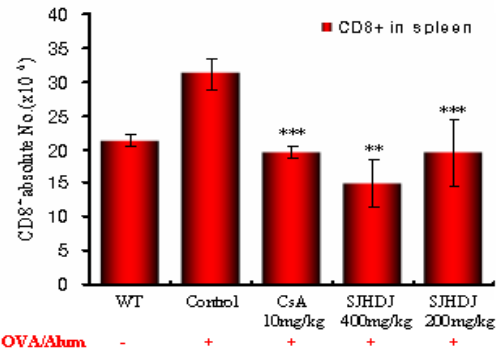


Fig. 6. Effect of SJHDJ extract on CD8⁺ absolute cell number in spleen of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SJHDJ (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice spleen was removed and CD8⁺ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

고찰

천식은 가역적 기도폐색과 기관지과민성이라는 임상적 특징을 갖는 질환이면서 다양한 면역관련 세포가 증가하며 이들을 통해 화학매체, 사이토카인, 유착분자, 성장인자 등의 분비를 일으키는 만성 염증성 질환으로 인식되고 있다¹²⁾. 따라서 천식의 병리에 관여하는 면역세포들의 역할과 이에 대한 조절 가능성은 천식 치료 방법의 개발에서 중요한 부분이라고 할 수 있다.

천식의 병리에 중요하게 관여하는 면역세포의 하나인 T세포는 가슴샘 유래의 림프구로 표면 항원 수용체(T cell receptor, 이하 TCR)를 갖는데 TCR은 TCR1과 TCR2로 구별되고 그 중 TCR2를 가진 T세포는 CD4⁺인 보조T세포와 CD8⁺인 세포독성T세포로 나뉜다¹³⁾. 보조T세포(이하 Th세포)는 사이토카인 분비양상에 따라 서로 길항작용을 나타내는 Th1세포와 Th2세포로 나뉜다. 주로 IFN- γ , TNF- β , IL-2를 생산하는 Th1세포는 바이러스 같은 세포내 병원체를 공격하고, 지연형 과민반응을 일으키고, 종양에 대한 숙주반응에 관여하는데 Th1 경로가 지나치게 활성화되면 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 1형 당뇨병과 같은 자가면역질환을 발생시킨다. IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하는 Th2세포는 기생충감염에 대한 방어작용에 관여하는데 Th2 경로는 기관지천식과 같은 알레르기성 질환에서 활발하게 작용하여 천식환자의 기관지 폐포세척액에서 Th2세포 기능의 활성화가 관

찰되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

CD8⁺ 세포는 세포독성T세포로 감염시 적세포를 죽이고 억제하는 기능인 방어세포로서의 기능만 주로 알려져 있었으나^{17,18)}, 항원에 의한 자극에서 CD8⁺ 세포에서도 CD4⁺ 세포와 같이 IL-4의 생성이 많고 IFN- γ 의 생산이 적다고 알려지면서^{19,20)}, Th 세포와 마찬가지로 사이토카인 분비 양상에 따라 IL-2, IFN- γ 를 분비하는 T cytotoxic 1(Tc1) 세포와 IL-4, IL-5 등을 분비하는 T cytotoxic 2(Tc2) 세포로 분류하게 되었다⁶⁾. 또한 기관지천식환자에서 기관지폐포세척액내 CD8⁺ 분율은 정상 대조군에 비해 증가되어 있고, 기관지폐포세척액내 호산구 분율 및 기도폐쇄 정도와 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다²¹⁾. 따라서 CD4⁺ 세포 뿐만 아니라 CD8⁺ 세포도 기관지 천식의 병인에서 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다.

三子化痰煎은 蘇子導痰降氣湯에 溫肺祛痰, 下氣定喘하는 白芥子, 蘿藦子, 宣肺化痰, 止咳平喘하는 杏仁, 款冬花, 消腫排膿하는 皂角子, 破氣行痰하는 枳殼, 利水滲濕하는 白茯苓을 加味한²²⁾ 처방으로 痰涎이 氣道에 壅塞하여 短氣喘促하며 咳喘 面浮하는 오래된 천식에 사용하는 처방이다¹¹⁾. 이에 기관지천식 모델을 대상으로 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포에 대한 영향을 평가해 보고자 하였다.

실험 결과 천식을 유발한 대조군은 폐, 말초림프절, 비장 모두에서 정상군보다 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포의 수가 증가하였으며, 三子化痰煎을 투여하였을 때 CD4⁺ 세포가 폐, 말초림프절, 비장 모두에서 대조군보다 유의하게 감소하였고(Fig. 1-3), CD8⁺ 세포는 폐에서 대조군보다 감소하였으나 유의성은 없었으며(Fig. 4), 말초림프절, 비장에서는 대조군보다 유의하게 감소하였다(Fig. 5, 6). 항원으로 유발한 특이 기관지유발검사의 시행 전후에 측정된 기관지폐포세척액에서 CD4⁺ 세포가 증가한다고 보고되었고²³⁻²⁵⁾, 이후 CD8⁺ 세포 또한 증가하여 기관지천식의 병인에 관여한다는 결과들이 보고되고 있다²⁶⁻²⁸⁾. 특히 호흡기 바이러스 감염은 기관지천식 악화의 가장 중요한 원인으로 알려져 있는데 호흡기 바이러스 감염으로 CD8⁺ 세포가 활성화되는 것이 type2 사이토카인의 과잉 분비를 유발하며 이로 인해 증가된 알레르기 염증 반응이 기관지천식 악화의 기전으로 설명되고 있다²⁹⁻³⁰⁾.

따라서 三子化痰煎이 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포의 증가를 모두 억제하는 것은 항원에 의한 기관지천식의 알레르기 염증반응 뿐만 아니라 주요악화 요인인 호흡기 바이러스 감염에 의한 염증반응을 포함한 좀 더 다양한 병리기전에 작용할 가능성을 보여주는 것으로 생각된다. 이는 기존의 천식모델을 대상으로 한 연구에서 神秘湯과 神秘湯加味³¹⁾, 定喘湯³²⁾, 加味清金降火湯³³⁾은 CD4⁺ 세포의 증가를 억제하고 CD8⁺ 세포의 증가에는 유의한 효과를 나타내지 않았으나, 麥門冬湯³⁴⁾과 加味地黃湯³⁵⁾이 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포의 증가를 모두 유의하게 억제한 것으로 나타난 결과와 유사하였다. 향후 각 처방의 약물구성과 결과와의 연관성을 분석하는 연구도 필요하리라 생각된다.

이상의 결과는 三子化痰煎이 기관지천식의 병리에서 T 세포와 관련된 염증반응에 일정하게 작용한다는 근거를 제시하는 것으로 생각되며, 향후 三子化痰煎을 대상으로 기관지천식에 관련

되는 다양한 세포들과 사이토카인 및 케모카인에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

천식을 유발시킨 생쥐에 三子化痰煎(200, 400 mg/kg)을 투여하여 폐, 말초림프절, 비장의 CD4⁺ 세포의 수를 측정된 결과 두 농도 모두에서 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였고, 폐, 말초림프절, 비장의 CD8⁺ 세포의 수를 측정된 결과 말초림프절과 비장에서 두 농도 모두 대조군에 비하여 유의성있게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 三子化痰煎이 기관지천식으로 인한 과민반응에 영향을 나타내는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Braman, S.S. The global burden of asthma. *Chest* 130(1 Suppl):4S-12S, 2006.
2. 건강보험심사평가원. 건강보험통계지표. http://www.hira.or.kr/cms/rg/rgc/pds_02/1186060_1278.html, 2006년.
3. Busse, W.W., Lemanske, R.F. Asthma. *N Engl J Med*, 344(5):350-362, 2001.
4. Constant, S.L., Bottomly, K. Induction Th1 and Th2 CD4+ T cell responses. The alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 15: 97-322, 1997.
5. Sad, S., Marcotte, R., Mosmann, T.R. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*, 2(3):271-279, 1995.
6. 전국한의학대학폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울, 한문회사, pp 329-331, 2002.
7. Ko, E., Rho, S., Cho, C., Choi, H., Ko, S., Lee, Y., Hong, M.C., Shin, M.K., Jung, S.G., Bae, H. SoCheongRyongTang, traditional Korean medicine, suppresses Th2 lineage development. *Biol Pharm Bull*, 27(5):739-743, 2004.
8. 한영주, 박양춘. 감초(Glycyrrhiza uralensis Fisch, GLU)가 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 Cytokine에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 25(3):408-417, 2004.
9. 곽상고, 최선미, 박양춘. 관동화가 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 19(3):716-721, 2005.
10. 조철준, 임도희, 황지호, 양수영, 박양춘. 황금이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 27(1):114-125, 2006.
11. 김운길, 박양춘. 가미지황당이 천식모델 생쥐의 CD4, CD8 세포에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 21(2):438-443, 2007.
12. 최인선. 천식의 병리. *대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환*. 서울, 군자출판사, pp 257-264, 2002.

13. 김세중. 면역학. 서울, 고려의학, pp 150-153, 1994.
14. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*, 8(3):223-246, 2003.
15. Mazzeo, G., Bianco, A., Catena, E., De, Palma. R., Abbate, G.F. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. *Allergy*, 55(Suppl 61):6-9, 2000.
16. Brightling, C.E., Symon, F.A., Birring, S.S., Bradding, P., Pavord, I.D., Wardlaw, A.J. TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol*, 110(6):899-905, 2002.
17. Mehrotra, P.T., Wu, D., Crim, J.A., Mostowski, H.S., Siegel, J.P. Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*. 151(5):2444-2452, 1993.
18. Horvat, B., Loukides, J.A., Anandan, L., Brewer, E., Flood, P.M. Production of interleukin 2 and interleukin 4 by immune CD4-CD8+ and their role in the generation of antigen-specific cytotoxic T cells. *Eur J Immunol*. 21(8):1863-1871, 1991.
19. Seder, R.A., Boulay, J.L., Finkelman, F., Barbier, S., Ben-Sasson, S.Z., Le Gros, G., Paul, W.E. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol*. 148(6):1652-1656, 1992.
20. Croft, M., Carter, L., Swain, S.L., Dutton, R.W. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J Exp Med*. 180(5):1715-1728, 1994.
21. 이숙영, 윤형규, 신윤, 이상학, 김석찬, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학. 기관지천식 환자의 기관지폐포세척액내 T 세포 아형과 임상양상과의 관계. *천식 및 알레르기* 19(6):904-911, 1999.
22. 전국한외과대학본초학교수 공편. 본초학. 서울, 영림사, pp 121-123, 136-137, 178-179, 369-370, 440-441, 450-451, 478-479, 481-485, 540-541, 587-588, 1991.
23. Yurovsky, V.V., Weersink, E.J., Meltzer, S.S., Moore, W.C., Ostma, D.S., Bleeker, E.R., White, B. T-Cell repertoire in the blood and lungs of atopic asthmatics before and after ragweed challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 18(3):370-383, 1998.
24. Gerblich, A.A., Salik, H., Schuyler, M.R. Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. *Am Rev Respir Dis*. 143(3):533-537, 1991.
25. Corrigan, C.J., Haczku, A., Gemou-Engesaeth, V., Doi, S., Kikuchi, Y., Takatsu, K., Durham, S.R., Kay, A.B. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis*. 147(3):540-547, 1993.
26. 이상엽, 이승룡, 김제형, 신철, 심재정, 강경호, 유세화, 인광호, 이지혜, 정운용, 김한겸. 천식과 호산구성 기관지염에서 CD4, CD8 림프구 침윤. *결핵 및 호흡기질환* 55(5):459-466, 2003.
27. 박수영, 조영주. 내인성 천식 및 외인성 천식 환자의 CD8 양성 세포에서 interleukin 4 및 interferon gamma 생산. *천식 및 알레르기* 21(1):65-72, 2001.
28. Cho, S.H., Stanciu, L.A., Holgate, S.T., Johnston, S.L. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 171(3):224-230, 2005.
29. O'Sullivan, S., Cormican, L., Faul, J.L., Ichinohe, S., Johnston, S.L., Burke, C.M., Poulter, L.W. Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med*. 164(4):560-564, 2001.
30. Stanciu, L.A., Roberts, K., Papadopoulos, N.G., Cho, S.H., Holgate, S.T., Coyle, A.J., Johnston, S.L. IL-4 increases type 2, but not type 1, cytokine production in CD8+ T cells from mild atopic asthmatics. *Respir Res*. 6: 67, 2005.
31. 염종훈, 정희재, 정승기, 이형구. 定喘湯과 定喘湯加減方이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. *대한한의학회지* 24(1):169-180, 2003.
32. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 加味清金降火湯 및 加味六味地黃湯이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. *대한한의학회지* 24(3):1-10, 2003.
33. 김승수, 정희재, 정승기, 이형구. 신비탕 및 신비탕가미방이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 연구. *대한의학회지* 23(2):198-210, 2002.
34. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동탕 및 정천화담강기탕이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 연구. *대한의학회지* 23(1):37-49, 2002.
35. 김운길, 박양춘. 가미지황탕이 천식모델 생쥐의 CD4, CD8 세포에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 21(2):438-443, 2007.