

# 천식모델생쥐에서 宣肺湯의 면역조절 효과

이주관 · 박양춘\*

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

## Effects of Seonpye-tang on OVA-Induced Asthmatic Mice

Ju Guan Lee, Yang Chun Park\*

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

This study aimed to evaluate the anti-asthmatic effects of Seonpye-tang (SPT) using OVA-induced asthmatic mice model. Scavenging activity of SPT on DPPH free radical and SOD-like activity of SPT were measured at final concentration 62.5, 125, 250, 500 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). RBL-2H3 cells were treated with DNP IgE for 24hr, and treated with SPT (1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1hr, followed by treatment with DNP-HSA for 1hr at 37°C. The level of IL-4 and TNF- $\alpha$  were measured by ELISA. Asthmatic mice model was conducted by repeated challenge of OVA using C57BL/6 mice. Each group was treated with distilled water, SPT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract or cyclosporin A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. Immune cells subpopulation, eotaxin, IL-5 and TNF- $\alpha$  in BALF were analyzed. SPT dose-dependently increased Scavenging activity on DPPH free radical and SOD-like activity. SPT significantly ameliorated the increase of total cells number and eosinophil including of immune cell subpopulation of CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> and B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> cells in BALF comparing to control group. Eotaxin and IL-5 level in BALF were significantly decreased by SPT. These results strongly suggest that SPT would be a effective candidate for herbal-originated anti-asthmatic drug. However, this drug should be further studied for characterization of the accurate action and underlying mechanisms using variant disease model in the future.

Key words : Seonpye-tang, asthma, antioxidative effect, immune cell, cytokine

### 서론

기관지천식(이하 천식)은 가장 흔한 만성 염증성질환의 하나로 전 세계적으로 약 3억 명 정도가 앓고 있으며 최근 15-20년 사이에 약 1억 명 정도가 새로 발생한 것으로 추정 된다<sup>1)</sup>. 우리나라에서도 국민건강보험 통계에 따르면 2007년도 인구 1,000명당 치료 유병율이 13.6명에 이르는 것으로 조사되었다<sup>2)</sup>.

알레르기에 의한 천식의 병리과정에는 주로 Th2-type의 림프구, IgE, 비만세포, 호산구, 대식세포와 사이토카인 등이 관여한다<sup>4,5)</sup>. 또한 산화스트레스는 천식의 염증반응을 증강시키는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 따라서 한약처방의 천식에 대한 효능을 평가하는데 있어 항산화 효과를 측정하고, 천식 발병에 관여하는 면역세포, 관련 사이토카인 및 케모카인에 대한 영향을 관찰하는

것은 중요한 방향이 된다.

宣肺湯은 定喘湯<sup>7)</sup>에서 半夏, 桑白皮, 甘草를 빼고 蚯蚓, 川芎, 全蝎, 山查肉, 砂仁을 가한 처방으로 기관지천식을 비롯한 호흡기질환에 대전대학교 부속한방병원 폐계내과에서 사용하는 처방이다. 최근 천식과 관련하여 다양한 單味 및 處方을 대상으로 동물 천식 모델을 이용한 연구<sup>8-15)</sup>가 활발하게 이루어지고 있으며 定喘湯의 천식에 대한 효능을 평가한 연구들<sup>16-19)</sup>이 있었으나 定喘湯의 변용방인 宣肺湯의 실험실적 약효검증은 이루어지지 않았다.

이에 저자는 宣肺湯의 천식에 대한 효능을 실험적으로 규명하고자 in vitro 실험으로 항산화 효과와 IL-4, TNF- $\alpha$ 의 생성에 미치는 영향을 살펴보고, in vivo 실험으로 천식모델생쥐의 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid; BALF)내의 총세포수, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포수, CCR3<sup>+</sup> 세포수, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup> 세포수, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> 세포수, eotaxin, IL-5를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 박양춘, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9 대전대학교 침주한방병원

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

· 접수 : 2009/03/06 · 수정 : 2009/03/15 · 채택 : 2009/03/25

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

宣肺湯 (Seonpye-tang, SPT)의 구성 약물은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다(Table 1).

Table 1. The Compositions of Seonpye-tang (SPT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	10
黃芩	<i>Scutellaria Radix</i>	10
蘇子	<i>Perillae Semen</i>	10
蚯蚓	<i>Lunbricus</i>	15
杏仁	<i>Armeniaca Semen</i>	12
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	10
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	10
全蝎	<i>Scorpio</i>	5
山查肉	<i>Crataegi Fructus</i>	8
砂仁	<i>Amomi Semen</i>	8
白果	<i>Ginkgonis Semen</i>	4
Total amount		102

#### 2) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 코아텍 (Korea)으로부터 공급 받은 체중 18-25 g의 수컷 BALB/c 생쥐로, 실험 당일까지 고형 사료 (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 공급하면서, 실온 22±2℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 12시간 (07:00-19:00), 조도 150-300 Lux로 설정한 실험실 환경에서 2주일간 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 DNase type I, aluminum potassium sulfate (Alum), chicken egg ovalbumin (OVA, Grade IV), cyclosporine A, methacholine, collagenase, RBC lysis solution, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, RPMI-1640 배양액은 Sigma사 (USA) 제품을, fetal bovine serum (FBS)은 Hyclone사 (USA) 제품을, anti-CD3e-PE, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD69-FITC, anti-CD45-FIT, anti-CD22-FITC, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen사 (USA) 제품을, eotaxin, IL-5, TNF-α ELISA kit (Multi-cytokine detection system 2)는 Chemicon사 (USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급을 사용하였다.

기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi, Switzerland), freeze dryer (EYELA, Japan), chemical balance (Cas, Korea), CO<sub>2</sub> 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), Biosystem XA (Buxco research system, USA), centrifuge (Sigma, USA), deep-freezer

(Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech, Germany), ice-maker (Vision scientific, Korea), chemical balance (Cas, Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA) 및 ELISA reader (Molecular Devices, USA), flow cytometry (Becton Dickinson, USA) 등을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 추출물 분리

SPT 2칩 분량에 증류수 1,500 mL를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하였다. 추출액을 흡입 여과한 후 감압 증류장치로 농축하고, 다시 동결 건조기를 이용하여 17.5 g의 분말을 얻었다.

완전 건조한 SPT를 냉동 (-80℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

#### 2) In vitro

##### (1) 항산화 활성 측정

##### ① 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 450에 SPT를 500, 250, 125, 62.5 μg/mL 농도로 희석하여 50 μL씩 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능 (\%)} = \left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{SPT 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

##### ② Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

500, 250, 125, 62.5 μg/mL 농도로 희석한 SPT 0.2 mL에 tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 mL과 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25℃에서 10분 반응 후 1 N HCl 0.1 mL로 반응 정지시켰다. 반응액을 420 nm에서 흡광도를 측정하고 buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 아래와 같이 저해율을 측정하였다.

$$\text{SOD 유사활성 (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{SPT 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

#### (2) 사이토카인 분비 유도 및 측정

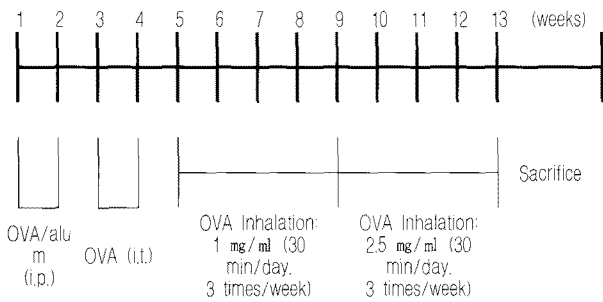
RBL-2H3 세포는 한국 세포주은행에서 분양 받아 10% FBS DMEM (1% penicillin, streptomycin 포함) 배양액으로 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. 세포수를 1×10<sup>6</sup>으로 분주하여 1시간 배양 안정화 시킨 다음 anti dinitrophenol (DNP) IgE를 넣고 24시간 동안 배양 후 SPT를 농도별 (1, 10, 100 μg/mL)로 넣고 1시간 동안 처리하였다. 그 후 100 ng/mL dinitrophenol conjugated human serum albumin (DNP-HSA)으로 1시간 동안 자극한 후 원심 분리하여 상층액을 얻어 TNF-α, IL-4를 ELISA kit을 이용하여 측정하였다.

#### 2) In vivo

##### (1) 기관지 천식 생쥐 모델

500 μg/mL의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma, USA)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물의 pH를

10 N NaOH를 이용하여 6.5로 조정후 상온에서 1시간 동안 방치하고 750×g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심 분리한 OVA/Alum 침전물에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후, 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 1, 2주에 복강으로 (intraperitoneally : i.p.) 주사하여 전신 감작시켰다. 이후 3, 4주에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 µg/ml) 100 µl를 기도 (intratracheally : i.t.) 투여하였다. 분무기를 이용하여 5주부터 8주까지는 1 mg/ml을, 9주째부터 12주째까지는 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도 내로 흡입시켰다(Scheme 1).



Scheme 1. Asthma OVA-induced mouse model.

(2) 약물 투여

OVA/Alum으로 전신 감작 시킨 후 5주째부터 SPT (400, 200 mg/kg)을 일주일에 6회 경구 투여 하였다. 동시에 양성대조군은 cyclosporine A (CsA)를 20 mg/kg으로 복강 주사 (i.p.)하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구 투여하였다.

(3) 기관지 폐포 세척액 (Bronchoalveolar lavage fluid : BALF) 으로부터 세포의 분리

실험 종료 후 기관지천식 생쥐의 목 부분을 해부하여 폐포 세척액으로부터 세포를 분리하기 위해 10% FBS/DMEM 배양액 1 ml을 넣은 주사기를 기관지 (trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 3회 순환 시켜 분리한 후 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총세포수를 측정하였다.

(4) 유세포 분석

분리한 BALF를 5×10<sup>5</sup> 개로 조정후 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-CD3e-PE, anti-B220-PE, anti-IgE-FITC anti-CCR3-PE, anti-CD69-FITC, anti-CD45-FIT, anti-CD22-FITC를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup> 세포수를 백분율 (%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수 (absolute number)를 산출하였다.

(5) ELISA 분석

천식생쥐에서 분리한 폐포세척액에서 각 사이토카인의 양을 측정하기 위해 IL-5, eotaxin ELISA kit을 이용하여 생산량을 측정하였다. 각 항체 (antibody)를 coating 완충용액에 희석하여

microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 폐포 세척액을 100 µl씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과를 t-test로 분석하여 p값을 구하였다. 각 대조군을 정상군과 비교하고, 실험군을 대조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. In vitro

1) 항산화 활성에 미치는 영향

DPPH의 소거활성은 SPT 62.5, 125, 250, 500 (µg/ml) 농도에서 각각 18.9±0.2, 30.0±0.5, 47.5±3.3, 62.6±1.1 (%)의 소거활성 효과를 나타내었다(Fig. 1A). SOD나 SOD 유사 물질에 의해서만 항산화 활성을 나타내는 pyrogallol을 이용하여 SPT의 항산화 활성을 측정된 결과 62.5, 125, 250, 500 (µg/ml)의 농도에서 각각 1.5±1.3, 13.7±1.4, 36.1±1.0, 50.6±2.9 (%)의 항산화 활성 효과를 나타내었다(Fig. 1B).

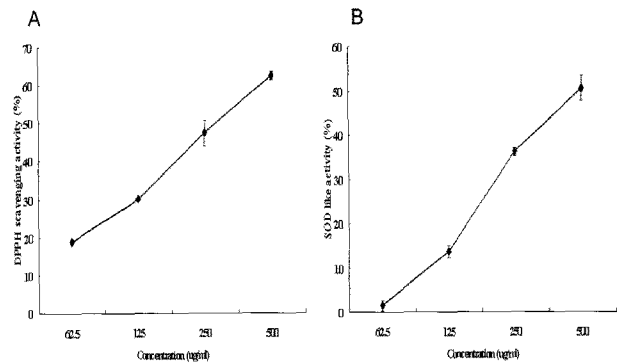
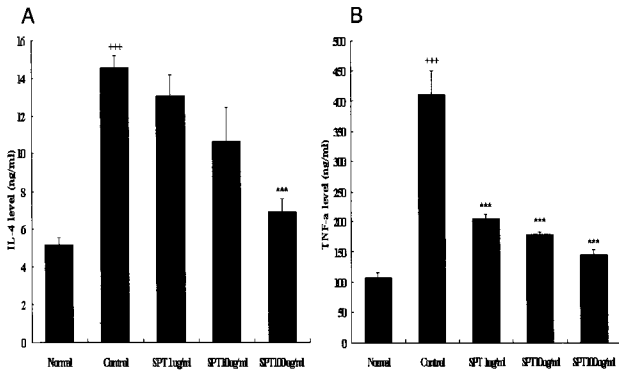


Fig. 1. Scavenging activity of SPT on DPPH free radical (A) and SOD-like activity of SPT (B). SPT were reacted with DPPH for 30 minutes at 37°C, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean±SD of three independent experiments. SOD-like activities of SPT were measured at final concentration 62.5, 125, 250, 500 (µg/ml). The results are the mean±SD of three independent experiments.

2) 사이토카인 분비량에 미치는 영향

IL-4 분비량은 SPT 1 µg/ml 투여군에서 13.06±1.15 ng/ml, SPT 10 µg/ml 투여군에서 10.63±1.84 ng/ml, SPT 100 µg/ml 투여군에서 6.89±0.69 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 SPT 100 µg/ml 투여군에서 유의성 있는 (P<0.001) 감소를 나타내었고(Fig. 2A), TNF-a 분비량은 SPT 1 µg/ml 투여군에서 204.6±8.1 ng/ml, SPT 10 µg/ml 투여군에서 179.0±4.0 ng/ml, SPT 100 µg/ml 투여군에서 144.9±8.0 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 SPT의 모든

투여군에서 유의성 있는 ( $P < 0.001$ ) 감소를 나타내었다(Fig. 2B).

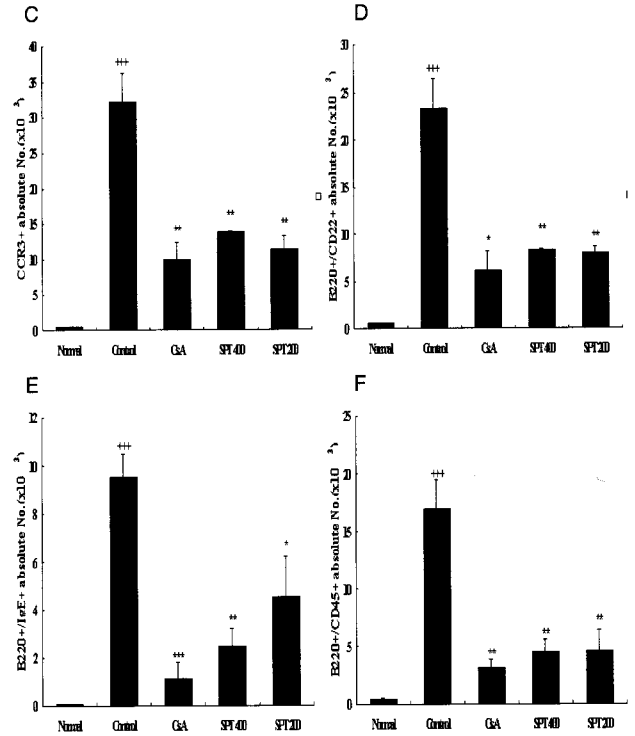


**Fig. 2.** Effect of SPT extract on IL-4 (A) and TNF- $\alpha$  (B) release from RBL-2H3 cells after stimulation with anti DNP IgE and DNP-HSA. RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were treated with DNP IgE for 24hr, and treated with SPT (1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1hr, followed by treatment with DNP-HSA for 1hr at 37°C. The level of IL-4 and TNF- $\alpha$  were measured by ELISA. Values represent the means $\pm$ S.E. + + +:  $P < 0.001$ , compared with normal group. \*\*\*:  $P < 0.001$  compared with control group.

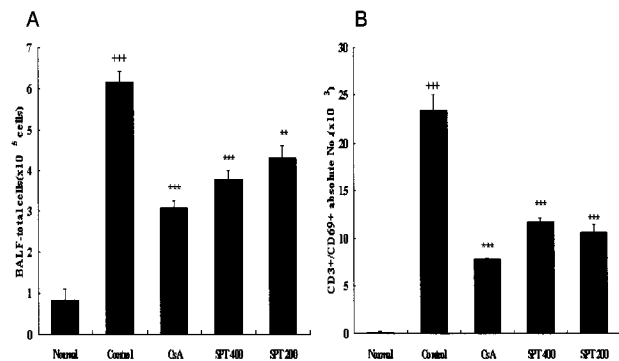
2. In vivo

1) BALF 내 총 세포수 및 면역세포에 미치는 영향

폐에서 분리한 BALF 내 총 세포 수는 SPT 400 투여군, SPT 200 투여군에서 각각  $3.78 \pm 0.22 (\times 10^5)$ ,  $4.32 \pm 0.3 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 모두 유의성 있는 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ) 감소를 나타내었다(Fig. 3A).  $\text{CD}3^+/\text{CD}69^+$  세포 비율은 SPT 400 투여군, SPT 200 투여군에서 각각  $11.6 \pm 0.5 (\times 10^3)$ ,  $10.6 \pm 0.8 (\times 10^3)$ 로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 3B).  $\text{CCR}3^+$  세포 비율은 SPT 400 투여군, SPT 200 투여군에서 각각  $13.7 \pm 0.9 (\times 10^3)$ ,  $11.3 \pm 1.9 (\times 10^3)$ 로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 3C).  $\text{B}220^+/\text{CD}22^+$  세포 비율은 SPT 400 투여군, SPT 200 투여군에서 각각  $8.3 \pm 0.1 (\times 10^3)$ ,  $8.0 \pm 0.6 (\times 10^3)$ 로 나타나 대조군에 비하여 모두에서 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 3D).  $\text{B}220^+/\text{IgE}^+$  세포 비율은 SPT 400 투여군, SPT 200 투여군에서 각각  $2.5 \pm 0.7 (\times 10^3)$ ,  $4.5 \pm 1.7 (\times 10^3)$ 로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) 감소하였다(Fig. 3E).  $\text{B}220^+/\text{CD}45^+$  세포 비율은 SPT 400 투여군, SPT 200 투여군에서 각각  $4.5 \pm 1.1 (\times 10^3)$ ,  $4.6 \pm 1.8 (\times 10^3)$ 로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 3F).



**Fig. 3.** Effect of SPT extract on total cells (A) and immune cells (B-F) in BALF of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (3 times a week for 8 weeks) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SPT (400, 200  $\text{mg}/\text{kg}$ ) extract and Cyclosporin A (20  $\text{mg}/\text{kg}$ ) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice BALF were removed and  $\text{CD}3^+/\text{CD}69^+$  cells (B),  $\text{CCR}3^+$  cells (C),  $\text{B}220^+/\text{CD}22^+$  cells (D),  $\text{B}220^+/\text{IgE}^+$  cells (E) and  $\text{B}220^+/\text{CD}45^+$  cells (F) analyzed by flow cytometer. Values represent the means $\pm$ S.E. (N=5). + + +:  $P < 0.001$ , compared with normal group. \*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*:  $P < 0.05$  compared with control group.



**Fig. 4.** Effect of SPT on eotaxin (A) and IL-5 (B) level in BALF of OVA-induced asthma mouse. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed (3 times a week for 8 weeks) with OVA for 12 weeks. Two treatment groups were treated with SPT (400, 200  $\text{mg}/\text{kg}$ ) extract and Cyclosporin A (20  $\text{mg}/\text{kg}$ ) for the 8 weeks (6 times a week). Cytokine levels was measured by ELISA kit. Values represent the means $\pm$ S.E. (N=5). + + +:  $P < 0.001$  compared with normal group. \*\*\*:  $P < 0.001$  compared with control group.

2) BALF 내 사이토카인에 미치는 영향

Eotaxin 생성량은 SPT 400 투여군, SPT 200 투여군에서 각각  $35.2 \pm 2.9 \text{ pg}/\text{ml}$ ,  $38.8 \pm 2.5 \text{ pg}/\text{ml}$ 으로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 ( $P < 0.001$ ) 감소하였다(Fig. 4A). IL-5 생성량은 SPT 400 투여군, SPT 200 투여군에서 각각  $11.9 \pm 0.4 \text{ pg}/\text{ml}$ ,

12.2±0.3 pg/ml로 나타나 대조군에 비하여 모두에서 유의성 있게 ( $P<0.001$ ) 감소하였다(Fig. 4B).

## 고 찰

지난 40년간 전 세계적으로 천식의 유병률과 사망률이 가파르게 증가하여 이에 따른 사회경제적 부담도 높아지고 있는 상황으로<sup>1)</sup> 우리나라에서도 천식환자가 늘어남에 따라 치료비용도 지속적으로 증가하고 있다<sup>2)</sup>. 그동안 천식에 대한 서의학적 치료는 많은 진전이 있어 대부분의 천식 환자는 코르티코스테로이드와 베타2 항진제가 효과적으로 작용한다고 알려져 있다<sup>20)</sup>. 그러나 고용량의 흡입용 코르티코스테로이드의 장기 사용은 고령자의 백내장과 골다공증 및 소아의 성장장애를 초래할 수 있으며<sup>21)</sup>, 현행의 치료는 천식의 진행을 변화시키거나 완치시킬 수는 없다는 한계를 갖고 있다<sup>22)</sup>. 또한 5-10%의 중증 천식환자는 기존의 치료에 잘 반응하지 않고, 기존의 치료법으로 조절이 잘되는 천식환자의 경우도 좀 더 효과적인 치료법으로 더 나은 이득을 얻을 수 있다고 알려져 있다<sup>23)</sup>. 따라서 천식의 경과를 개선하거나 완치를 목표로 하는 좀 더 안전하고 효과적인 제제 개발의 필요성이 높게 요구되고 있다.

천식은 韓醫學에서 呼吸急促, 喉中有聲하는 哮喘證의 範疇에 해당하는데, 哮喘의 여러 발병 원인 중 하나인 素因說에 의하면 특수하게 내재된 소인을 夙根이라고 하며 이를 지닌 사람이 寒飭을 만나거나, 疲勞 혹은 勞力할 때 효전을 發한다고 하였는데 이는 알레르기에 의한 천식의 발생 기전과 유사하며, 이는 辨證에 따라 外感風寒은 宣肺定喘하고, 痰濕內盛은 化痰定喘하고, 肺虛는 養肺定喘하고, 心腎虛損은 補益心腎 納氣定喘하고, 上實下虛는 瀉肺化痰 補益腎元하는 처방을 사용한다<sup>3)</sup>.

宣肺湯은 清化痰熱, 宣肺平喘하는 定喘湯<sup>3,7)</sup>을 기본으로 하여 半夏, 桑白皮, 甘草를 빼고 清熱定驚 平喘하는 蛭虵, 熄風止癢하는 全蝎, 活血行氣祛風하는 川芎, 消食 芳香化濕하는 山楂肉, 砂仁<sup>24)</sup>을 더하여 구성된 처방이다. 定喘湯은 哮喘 實證 중 痰濕內盛의 痰熱에 사용하는 대표적인 처방으로 평소 食辛熱甘肥하거나 素有內熱하여 痰熱이 內伏하였다가 外邪引動으로 哮喘을 발할 때 宣肺定喘 清熱化痰의<sup>3)</sup> 효능으로 사용된다. 여기에 熄風 止癢하는 蛭虵, 全蝎를 더하여 기관지 연속을 동반하는 哮喘 급성기의 喘促 발작을 가라앉히고, 消食化濕하는 山楂肉, 砂仁을 더하여 비위기능을 도움으로써 천식의 치료 효과를 증대시킬 수 있으리라 기대하였다.

먼저 항산화 효과에 관해 살펴보면 宣肺湯은 농도 의존적으로 DPPH 소거활성과 SOD 유사활성의 증가를 나타내어 항산화 효과를 보였다(Fig. 1). 산화 스트레스는 중증 천식에서 염증반응과 코르티코스테로이드의 감수성을 떨어뜨리고, 항산화제는 담배연기를 비롯한 산화 스트레스로 감소된 코르티코스테로이드 효과를 회복시킬 수 있다<sup>6)</sup>. 또한 산화 스트레스와 그 부산물은 Th2 type 면역반응을 증가시킨다고 알려져 있다<sup>25)</sup>. 따라서 宣肺湯이 보여준 항산화 효과가 천식의 치료에 긍정적으로 작용할 수 있다고 생각된다.

RBL-2H3 세포에서 anti-DNP IgE를 처리하여 IL-4, TNF- $\alpha$ 의 생성을 측정된 결과 宣肺湯은 IL-4, TNF- $\alpha$ 의 생성을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 2). IL-4는 활성화된 T 세포, 비만세포, 호염기구, 호산구 등에서 분비되어 알레르기 염증 발달에 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 Th2 세포의 분화를 촉진하고 Th1 세포 분화를 억제하며, IgE 수용체들을 상향 조절하여 IgE 매개성 면역 반응을 촉진시키고, IgE에 의한 비만세포 활성화를 유도하여 즉각적인 알레르기 반응 발생에 중추적 역할을 할 뿐만 아니라 전액 유전자 발현유도와 점액 과분비로 기도 폐쇄에 관여하며 호산구 성숙분열을 촉진하여 천식의 만성 염증과 기도개형에 관여한다<sup>26,27)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 천식환자에서 기관지평활근에 대한 직접 작용하여 기도과민성을 높이고, T 세포의 사이토카인 분비와 활성을 증가시키며, 호산구, 호중구, 대식세포, 단핵구의 유입을 촉진하고, 상피세포에서 유착분자를 상향조절하며, 비만세포에서 histamine의 분비를 증가시킨다<sup>28)</sup>. 이와 같이 宣肺湯은 천식병리에서 염증세포 및 구조세포 양측에 걸쳐 중요한 역할을 하는 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 생성을 감소시킴으로써 치료효과를 나타낸다고 사료된다.

선폐탕은 BALF 총 세포수와 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> 세포수를 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3).

BALF 총 세포수의 증가는 비만세포, 호산구, 림프구, 대식세포 등의 천식을 일으키는 면역세포들의 증식이나 활성화를 반영한다<sup>29)</sup>. 따라서 BALF 총 세포수가 宣肺湯의 투여로 감소한 것은 宣肺湯이 폐와 기관지에 침윤되는 염증세포들의 증가를 감소시키는 효과가 있는 것으로 생각할 수 있다.

CD3은 T세포 표면분자이고 CD69는 활성화된 B세포, T세포, 대식세포, 세포독성 세포에 존재하는 표면분자로 T세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 분비되므로 천식환자의 기도에서 호산구침윤의 표지로 사용될 수 있다<sup>30)</sup>. 실험군에서 CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> 세포의 수가 대조군에 비하여 감소하는 것은 선폐탕이 T세포의 활성화를 억제하고 호산구의 기도내 침윤을 억제하는 작용이 있음을 시사하는 것으로 생각할 수 있다.

CCR3은 호산구 뿐만 아니라 호염기구, 비만세포, Th2 CD4<sup>+</sup> 세포와 같은 알레르기 염증세포의 주된 케모카인 수용체이다<sup>31,32)</sup>.

따라서 CCR3의 발현을 조절함으로써 천식에 효과를 나타내는 치료제의 가능성이 모색되고 있는데<sup>33,34)</sup>, 실험군에서 CCR3<sup>+</sup> 세포의 수가 대조군에 비하여 감소한 것은 선폐탕이 호산구를 비롯한 염증세포의 기도조직 내 유입을 감소시킴으로써 천식에 대한 효과를 나타낼 수 있다는 가능성을 보여준다고 생각된다.

B220은 쥐의 B세포 표면에 있는 표식자로, B220의 증가는 B세포의 면역증가를 의미하며<sup>35)</sup>, CD22와 CD45는 B 세포의 항원수용체 신호를 조절하여 B 세포를 활성화하고<sup>36,37)</sup>, 활성화된 B세포는 IgE를 분비한다<sup>38)</sup>. 따라서 실험군에서 B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>의 세포수가 대조군보다 감소한 것은 선폐탕이 B세포의 성장과 IgE의 분비를 조절하는 작용을 나타낼 가능성을 의미하는 것으로 생각된다.

BALF 내 eotaxin, IL-5의 양은 미치는 영향을 살펴보면, 선

폐당을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4).

Eotaxin은 화학주성을 갖는 사이토카인인 케모카인의 일종으로 호산구의 화학주성과 상피를 통한 migration에서 많은 역할을 하고<sup>39)</sup>, IL-5는 IL-2 또는 IL-4의 B세포 분화성장에 작용하여 IgE 생산을 자극시키는 작용과 호산구의 분화, 활성화, 생존 연장에서 중요한 역할을 한다. 따라서 宣肺湯은 Th2 경로의 항진에 관여하는 사이토카인인 IL-5의 분비를 억제하고, 염증세포의 호흡기 유입에 관여하는 eotaxin의 분비를 억제함으로써 천식의 주요 병리기전인 알레르기성 염증반응을 억제하는 작용을 나타낸다고 생각된다.

이상의 결과로 보아 宣肺湯은 in vitro에서 항산화 효과와 IL-4, TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하였고 in vivo에서 BALF 내의 총세포수, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> 세포수 및 eotaxin, IL-5의 생성을 유의성 있게 감소시키는 효과를 나타내어 천식 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

宣肺湯의 항산화 효과와 알레르기 천식 모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

宣肺湯은 농도 의존적으로 DPPH 소거활성과 SOD 유사활성의 증가를 나타냈다. 설페당은 RBL-2H3 세포에 anti-DNP IgE를 처리하여 측정된 IL-4의 생성을  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의성 있게 감소시켰고, TNF- $\alpha$ 의 생성을 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 모든 농도에서 유의성 있게 감소시켰다. 설페당은 천식모델 생쥐의 BALF 내에서 측정된 총 세포수, CD3<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup>, CCR3<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD22<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/IgE<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> 세포수를 400 mg/kg, 200 mg/kg 두 농도 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다. 설페당은 천식모델 생쥐의 BALF 내에서 측정된 eotaxin, IL-5의 양을 400 mg/kg, 200 mg/kg 두 농도 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다.

## 참고문헌

- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59(5):469-478, 2004.
- 국민건강보험공단. 최근 6년(2002~2007)간 황사관련 봄철 다발성 질환 건강보험 의료기관 이용자 분석. <http://www.nhic.or.kr>.
- 전국한외과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울, 한문회사, pp 329-331, 2002.
- 홍천수, 김규연. 기관지천식-병인 및 역할, 대한 천식 및 알레르기학회, 천식과 알레르기 질환. 서울, 군자출판사, pp 244-245, 2002.
- Holgate, S.T. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 38(6):872-897, 2008.
- Kirkham, P., Rahman, I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 111(2):476-494, 2006.
- 허준. 동의보감. 서울, 남산당, p 480, 1986.
- 한영주, 박양춘. 감초(Glycyrrhiza uralensis Fisch, GLU)가 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 Cytokine에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 25(3):408-417, 2004.
- 송상진, 박양춘. 조각자가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 26(1):143-155, 2005.
- 송재진, 박양춘. 반하가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 26(1):156-168, 2005.
- 임지택, 박양춘. 자하거 약침이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 19(2):408-417, 2005.
- 곽상교, 최선미, 박양춘. 관동화가 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 19(3):716-721, 2005.
- 조철준, 임도희, 황지호, 양수영, 박양춘. 황금이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 27(1):114-125, 2006.
- 나도균, 박양춘. 가미자황탕이 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향. *대한한의학회지* 29(2):7-20, 2008.
- 이정은, 박양춘. 삼자화담전이 천식모델 생쥐의 면역세포인에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 29(3):742-751, 2008.
- 정승기, 이형구. 정천탕이 천식에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *경희의학* 3(1):91-102, 1987.
- 이영우, 정희재, 이형구, 정승기. 정천탕과 청상보하탕이 asthma model 내의 cytokine에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 22(3):367-377, 2001.
- 염종훈, 정희재, 정승기, 이형구. 정천탕과 정천탕가미방이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. *대한한의학회지* 24(1):169-180, 2003.
- Son, C.G., Seol, I.C. The experimental study of Jungchun-tang on allergies. *대한한의학회지* 24(3):65-71, 2003.
- Bateman, E.D., Boushey, H.A., Bousquet, J., Busse, W.W., Clark, T.J., Pauwels, R.A., Pedersen, S.E. GOAL Investigators Group. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study. *Am J Respir Crit Care Med.* 170(8):836-844, 2004.
- Schäcke, H., Döcke, W.D., Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 96(1):23-43, 2002.
- Adcock, I.M., Caramori, G., Chung, K.F. New targets for drug development in asthma. *Lancet.* 372(9643):1073-1087, 2008.

23. Rabe, K.F., Adachi, M., Lai, C.K., Soriano, J.B., Vermeire, P.A., Weiss, K.B., Weiss, S.T. Worldwide severity and control of asthma in children and adults: the global asthma insights and reality surveys. *J Allergy Clin Immunol.* 114(1):40-47, 2004.
24. 전국한의과대학 본초학교실. 本草學. 서울, 영림사, p 295, 370, 409, 506, 509, 1994.
25. Related Articles, LinksKing, M.R., Ismail, A.S., Davis, L.S., Karp, D.R. Oxidative stress promotes polarization of human T cell differentiation toward a T helper 2 phenotype. *J Immunol.* 176(5):2765-2772, 2006.
26. Chung, K.F., Barnes, P.J. Cytokines in asthma. *Thorax.* 54(9):825-857, 1999.
27. Dabbagh, K., Takeyama, K., Lee, H.M., Ueki, I.F., Lausier, J.A., Nadel, J.A. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol.* 162(10):6233-6237, 1999.
28. Brightling, C., Berry, M., Amrani, Y. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 121(1):5-10, 2008.
29. Booth, B.W., Newcomb, D.C., McKane, S.A., Crews, A.L., Adler, K.B., Bonner, J.C., Martin, L.D. Proliferation of the airway epithelium in asthma: are inflammatory cells required? *Chest.* 123(3 Suppl):384S-385S, 2003.
30. Hartnel, A., Robinson, D.S., Kay, A.B., Wardlaw, A.J. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology.* 80(2):281-286, 1993.
31. Combadiere, C., Ahuja, S.K., Murphy, P.M. Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor. *J Biol Chem.* 270(28):16491-16494, 1995.
32. Sabroe, I., Conroy, D.M., Gerard, N.P., Li, Y., Collins, P.D., Post, T.W., Jose, P.J., Williams, T.J., Gerard, C.J., Ponath, P.D. Cloning and characterization of the guinea pig eosinophil eotaxin receptor, C-C chemokine receptor-3: blockade using a monoclonal antibody in vivo. *J Immunol.* 161(11):6139-6947, 1998.
33. Erin, E.M., Williams, T.J., Barnes, P.J., Hansel, T.T. Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 1(2):201-214, 2002.
34. Gangur, V., Birmingham, N.P., Thanesvorakul, S., Joseph, S. CCR3 and CXCR3 as drug targets for allergy. principles and potential. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2(1):53-62, 2004.
35. Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Ryan, C.A., Hulette, B.C., Chaney, J.G., Skinner, R.A., Dearman, R.J., Kimber, I. Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicol Sci.* 68(2):420-428, 2002.
36. Tedder, T.F., Tuscano, J., Sato, S., Kehrl, J.H. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 15: 481-504, 1997.
37. Justement, L.B. The role of the protein tyrosine phosphatase CD45 in regulation of B lymphocyte activation. *Int Rev Immunol.* 20(6):713-738, 2001.
38. 조상현. IgE 항체 생성과 조절. *알레르기*, 13: 460-464, 1993.
39. Forssmann, U., Ugucioni, M., Loetscher, P., Dahinden, C.A., Langen, H., Thelen, M., Baggiolini, M. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med* 185(12):2171-2176, 1997.