

瓜蒌根이 Th2 T 세포와 호산구에 대한 활성 및 증식 억제에 미치는 영향

노성수*

대구한의원대 한의과대학 본초학교실

Inhibitory Effects of Trichosanthis Radix in the Activity and Proliferation of Th2 T Cells and Eosinophils *in vitro* : Implications on its Regulatory Roles for Asthma

Seong-Soo Roh*

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

ABSTRACT

Objectives : The present study was carried out to investigate the effect of Trichosanthis Radix extract (TRE) 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/rIL-5 co-treatments. The lung cells were treated with TRE, incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer, ELISA and RT-PCR methods

Results : To measure cytotoxicity, mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were pretreated with various concentrations of TRE. TRE at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the highest concentration, examined did not have any cytotoxic effects on mLFCs. In FACS analysis, number of granulocyte/lymphocyte, CD3e-/CCR3+, CD3e+/CD69+, CD4+/CD8+ T cells in asthma-induced lung cells were significantly decreased by TRE treatment compared to the control group. But CD4+/CD25+ T cells were not examined significant change in lung cells treated with TRE. In ELISA analysis, production levels of IL-3, IL-5, IL-13 and histamine in asthma-induced lung cells, which were induced by rIL-3 plus rIL-5 co-treatment, were significantly decreased by TRE treatment.

Conclusions : The present data suggested that Trichosanthis Radix on the inhibition of parameters associated with asthma responses in eosinophils, and thus implicate the possibility for the clinical application of Trichosanthis Radix.

Key words : OVA-induced asthma. TRE (Trichosanthis Radix extract), Eosinophil, ELISA assay, Cytokine

서론

瓜蒌根은 박과에 속한 다년생 덩굴식물인 하늘타리 *Trichosanthes kirilowii* Max. 또는 노랑하늘타리 *T. kirilowii* Max. var. *japonica* Kitamura의 뿌리로, 가을과 겨울에

채취하여 외피를 제거하고 절단하거나 쪄서 건조한 것이다. 性味는 微寒하고 甘微苦酸하여 肺胃經에 歸經하여 清熱生津의 效能으로 熱病煩渴, 內熱消渴, 肺熱燥咳 等に 應用되며 消腫排膿의 效能으로 瘡瘍腫毒, 痔漏, 跌撲損傷 等に 應用된다¹⁾.

* 교신저자 : 노성수, 대구광역시 수성구 상동 165 대구한의원대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 053-770-2255 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr
· 접수 : 2009년 8월 4일 · 수정 : 2009년 9월 16일 · 채택 : 2009년 9월 23일

약리작용으로는 遺産, 抗바이러스, 抗癌, 血糖降下, 抗茵, 免疫調節이 있으며, 주요성분으로는 trichosanthin으로, 이외에 karasurin, momorcharin, aspartic acid, glutamin acid와 다당류 등이 함유되어 있다.

특히 trichosanthin 성분은 OVA에 과민한 C57BL/6N 흰쥐에 면역주사 후 PCA 실험으로 IgE 항체 생성을 연구한 결과, trichosanthin을 주사한 실험군의 IgE 항체생성이 대조군보다 유의성 있게 감소되었다는 보고가 있다²⁾.

최근 연구 결과, Th2 세포는 eotaxin, RANTES, MIP-1a와 MCP-3과 같은 β -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 손상이 유발된다고 보고하였다³⁾.

따라서 Th2 세포 및 호산구의 활성을 억제시키고 폐조직으로의 침윤을 억제시키는 약물 개발이 활발히 진행되고 있고, 이에 저자는 瓜蒌根이 Th2 세포, 호산구에 미치는 영향을 알아보려고 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 웅성 4주령의 BALB/C 생쥐 15수를 한국생명공학연구원에서 공급받아 실험 당일까지 고품사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2°C를 계속 유지하면서 2주일간 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-tetrazolim (MTS), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma 사(USA) 제품을 사용하였으며, 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사(Logan, USA) 제품을, anti-CD3-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 Pharmingen사(Torreyana,

USA) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

② 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기(대웅, Korea), 감압 증류장치(Büchi B-480, Switzerland), 동결건조기(EYELA FDU-540, Japan), CO₂ 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 瓜蒌根은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 대전대학교 한의과대학 본초학교실에서 《대한약전》 기준에 부합되는 것만을 정선하여 사용하였다.

4) 과루근 추출물 분리

과루근 추출물(Trichosanthis Radix extract; 이하 TRE라 명명)을 분리하기 위해, 과루근 200 g에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 과루근 추출물을 냉동(-84°C) 보관하면서 실험시 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) Mouse Lung Fibroblast cells (mLFCs) 배양

생쥐의 정상 lung fibroblast세포(mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐조직을 D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리하고, tube에 DMEM {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)}와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}를 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양한다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양한다. 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양한다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 2×10⁵ cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주한다.

2) 세포독성 측정

세포독성방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 배양한 후 TRE (최종 농도 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액(PBS)으로 2회 세척한다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하고 1시간 동안 4°C에 방치한다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조한다. SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온에서 30분간 염색한다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER에서 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

3) 천식모델 생쥐의 폐에서 호산구세포 분리

C57BL/6 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)를 복강내로 주사하여 전신감작을 시킨 후 2주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 µg/ml) 100µl를 기도투여(i.t)한다. 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도 내로 흡입시킨다. 천식이 유발된 생쥐의 폐를 적출하여 폐조직을 잘게 절편 한 후 2% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 µg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 15 ml로 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해하여 폐세포를 분리한다. 분리된 폐세포는 배지로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거한다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포 수를 측정한다.

4) 폐세포 배양

24 well plate에 폐세포(2×10⁶ cells)를 배양하고 파루근 추출물(100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)를 처리하고 1시간 후 rIL-3 (30 U/ml)나 mL-5 (recombinant mouse interleukin-5, 10 µg/ml, PharMingen)로 호산구 활성화 유발을 위하여 각각의 well에 첨가하여 48시간 배양하였다.

5) 유세포 형광분석

배양 후 호산구 세포를 인산완충 생리식염수로 2회 수세하였고, 4°C에서 면역 형광염색을 실시하였다. 각각에 phycoerythrin (PE)-anti-mouse CD69, anti-CD3e-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE 등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산

완충 생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 생쥐 폐 세포에서 CD3e, CD4, CD8, CD69, CCR3의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 CD69/CD3e, CD3e/CCR3, 그리고 CD4/CD8의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

6) ELISA analysis

생쥐 호산구 세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에 2×10⁵ 세포씩 분주하고, TRE (100 µg/ml, 50 µg/ml)를 처리했고, 약물처리 1시간 후 rIL-3과 mL-5를 48시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 IL-4, IL-5, IgE, Histamine, IFN-γ enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A)와 IL-13는 ELISA kit (R&D system)을 48시간 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 호산구 세포 배양상층액(culture supernatant)을 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 leader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 생쥐 호산구 세포 증식

생쥐 호산구세포의 증식을 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2×10⁵ 세포씩 분주하고, TRE (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)등을 처리하였다. 약물처리 1시간 후 rIL-3 (30 U/ml)와 mL-5 를 72시간 동안 동시 배양하였다. 동시 배양 40시간 배양 후 50 µCi/ml의 [methyl-3H] 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.

8) 통계처리

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

성적

1. 세포 독성

LFC에 대한 세포 독성 실험에서 대조군의 세포 생존

율은 100±5.3%로 나타났고, TRE 추출물을 처리한 실험군에서는 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서 각각 103±3.6%, 98±6.2%, 93±5.4%, 91±4.8%로 나타나 세포 독성은 보여지지 않았으나, TRE를 100 µg/ml, 200 µg/ml 농도로 처리한 세포 독성은 유의성 있는(** $p < 0.01$) 독성이 나타났다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicity Effects of TRE on Mouse Lung Fibroblast Cells (mLFCs)

Drugs	Dose (mg/ml)	Percent of control data (%)
		mLFCs
Control	0	100±5.3
Trichisanthis radix extracts (TRE)	1	103±3.6
	10	98±6.2
	50	93±5.4
	100	91±4.8
	200	80±5.3**
	400	71±7.5**

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were pretreated with various concentrations of trichisanthis radix extracts (TRE). The results are expressed the S.E.M (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (** $p < 0.01$).

2. 유세포 형광 분석(FACS analysis)

1) Granulocytes와 lymphocytes 세포 수 분석

정상군의 Granulocytes 총 세포 수가 21.4%인 반면, rmlL-5/rmlL-3를 처리한 대조군은 36.7%로 증가되었다. 반면에 cycloporin A (CsA)를 10 mg/ml 농도로 처리한

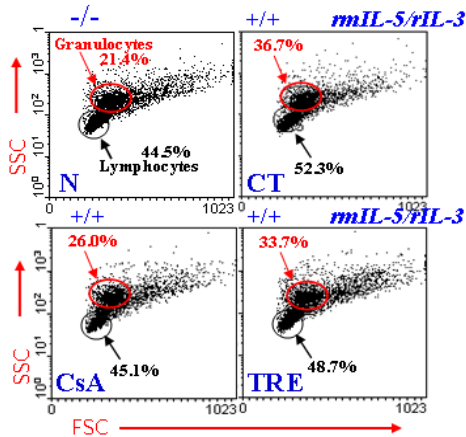


Fig. 1. Inhibitory effect of TRE on granulocytes and lymphocytes population (%) in asthma-induced lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5

C57BL/6 mice were exposed OVA for 6 weeks. The mouse lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase (1 µg/ml). Eosinophils were activated by rmlL-3/rmlL-5. The lung cells were treated with Trichosanthis Radix extract (TRE) and incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer.

- A : Normal C57BL/6 mice.
- B : OVA-induced asthma lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5.
- C : OVA-induced asthma lung cells treated with cyclosporin A (10 mg/ml).
- D : OVA-induced asthma lung cells treated with TRE (100 mg/ml).

실험군은 26.0%로 감소되었고, rmlL-5/rmlL-3와 TRE를 함께 처리한 실험군은 33.7%로 세포 수가 감소되었다(Fig. 1).

정상군의 lymphocytes 총 세포 수가 44.5%인 반면, rmlL-5/rmlL-3를 처리한 대조군은 52.3%로 증가되었다. 반면에 CsA를 10 mg/ml 농도로 처리한 실험군은 45.1%로 감소되었고, rmlL-5/rmlL-3와 TRE를 함께 처리한 실험군은 48.7%로 세포 수가 감소되었다(Fig. 1).

2) CD3e-/CCR3+ 세포 수 분석

정상군의 CD3e-/CCR3+ 세포 수는 48.1%이었고, rmlL-5/rmlL-3만을 처리한 대조군의 CD3e-/CCR3+ 세포 수는 66.0%로 정상군에 비해 크게 증가되었다. 반면에 CsA를 10 mg/ml 농도로 처리한 실험군은 CD3e-/CCR3+ 세포 수가 37.2%로 감소되었고, rmlL-5/rmlL-3와 TRE를 함께 처리한 실험군의 CD3e-/CCR3+ 세포 수는 62.7%로 세포 수가 감소되었다(Fig. 2).

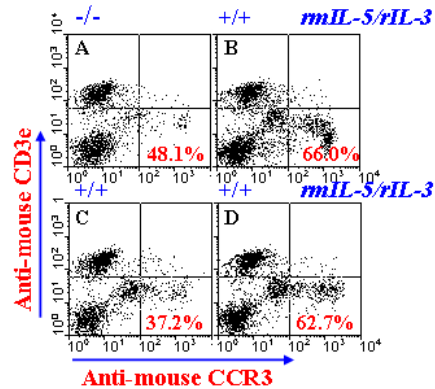


Fig. 2. Inhibitory effect of TRE on CD3e-/CCR3+ lymphocytes population (%) in asthma-induced lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5

- A : Normal C57BL/6 mice.
- B : OVA-induced asthma lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5.
- C : OVA-induced asthma lung cells treated with cyclosporin A (10 mg/ml).
- D : OVA-induced asthma lung cells treated with TRE (100 mg/ml).

3) CD3+/CD69+ 세포 수 분석

정상군의 CD3+/CD69+ 세포 수는 48.1%이었고, rmlL-5/rmlL-3만을 처리한 대조군의 CD3+/CD69+ 세포 수는 66.0%로 정상군에 비해 크게 증가되었다. 반면에 CsA를 10 mg/ml 농도로 처리한 실험군은 CD3+/CD69+ 세포 수가 37.2%로 감소되었고, rmlL-5/rmlL-3와 TRE를 함께 처리한 실험군의 CD3+/CD69+ 세포 수는 62.7%로 세포 수가 감소되었다(Fig. 3).

4) CD4+/CD8+ 세포 수 분석

정상군의 CD4+ : CD8+ 세포 수 비율은 17.8% : 22.5% 이었고, rmlL-5/rmlL-3만을 처리한 대조군의 CD4+ : CD8+ 세포의 비율은 41.6% : 21.8%로 CD4+ 세포 수가 현저히 증가되었다. 반면에 CsA를 10 mg/ml 농도로 처리

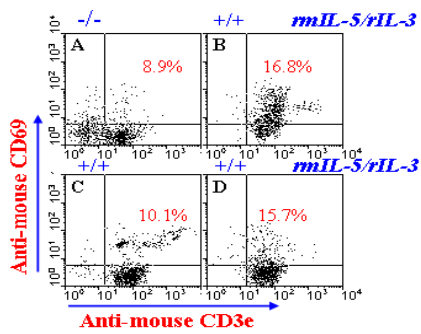


Fig. 3. Inhibitory effect of TRE on CD3+/CD69+ lymphocytes population (%) in asthma-induced lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5

A : Normal C57BL/6 mice.
 B : OVA-induced asthma lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5.
 C : OVA-induced asthma lung cells treated with cyclosporin A (10 mg/ml).
 D : OVA-induced asthma lung cells treated with TRE (100 mg/ml).

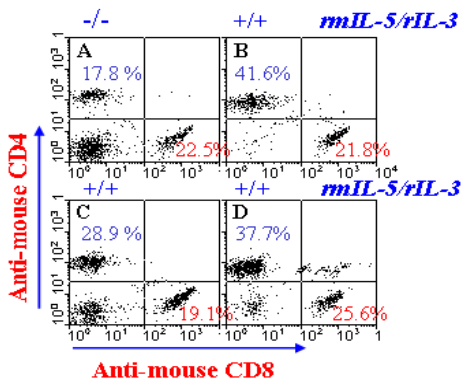


Fig. 4. Effect of TRE on CD4+/CD8+ lymphocytes population (%) in asthma-induced lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5

A : Normal C57BL/6 mice.
 B : OVA-induced asthma lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5.
 C : OVA-induced asthma lung cells treated with cyclosporin A (10 mg/ml).
 D : OVA-induced asthma lung cells treated with TRE (100 mg/ml).

한 실험군의 CD4+ : CD8+ 세포의 비율은 28.9% : 19.1%로 나타났으며, rmlL-5/rmlL-3와 TRE를 함께 처리한 실험군의 CD4+ : CD8+ 세포의 비율은 37.7% : 25.6%로 나타났다(Fig. 4).

5) CD3e+ /CCR3+ 세포 수 분석

정상군의 CD3e+/CCR3+ 세포 수는 15.1%이었고, rmlL-5/rmlL-3만을 처리한 대조군의 CD3e+/CCR3+ 세포 수는 9.7%로 정상군에 비해 크게 감소되었다. 반면에 CsA를 10 mg/ml 농도로 처리한 실험군은 CD3e+/CCR3+ 세포 수가 4.7%로 감소되었고, rmlL-5/rmlL-3와 TRE를 함께 처리한 실험군의 CD3e+/CCR3+ 세포 수는 8.0%로 세포 수가 감소되었다(Fig. 5).

6) CD4+ /CD25+ 세포 수 분석

정상군의 CD4+/CD25+ 세포 수는 1.28%이었고, rmlL-5/

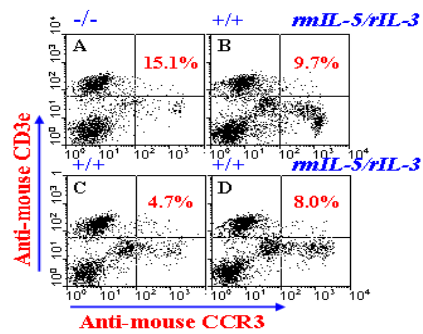


Fig. 5. Inhibitory effect of TRE on CD3e+/CCR3+ lymphocytes population (%) in asthma-induced lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5

A : Normal C57BL/6 mice.
 B : OVA-induced asthma lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5.
 C : OVA-induced asthma lung cells treated with cyclosporin A (10 mg/ml).
 D : OVA-induced asthma lung cells treated with TRE (100 mg/ml).

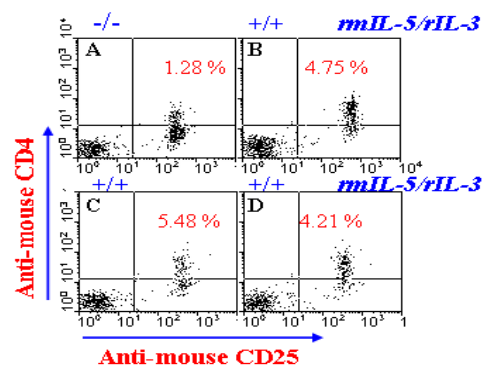


Fig. 6. Effect of TRE on CD4+/CD25+ lymphocytes population (%) in asthma-induced lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5

A : Normal C57BL/6 mice lung cells.
 B : OVA-induced asthma lung cells treated with rmlL-3 and rmlL-5.
 C : OVA-induced asthma lung cells treated with cyclosporin A (10 mg/ml).
 D : OVA-induced asthma lung cells treated with TRE (100 mg/ml).

rmlL-3만을 처리한 대조군의 CD4+/CD25+ 세포 수는 4.75%로 정상군에 비해 증가되었다. 반면에 CsA를 10 mg/ml 농도로 처리한 실험군은 CD4+/CD25+ 세포 수가 5.48%로 증가되었고, rmlL-5/rmlL-3와 TRE를 함께 처리한 실험군의 CD4+/CD25+ 세포 수는 4.21%로 세포 수가 감소되었다(Fig. 6).

3. ELISA analysis

IL-4, IL-5, IL-13, histamine 생성량 분석결과, 정상생쥐의 폐세포의 IL-4, IL-5, IL-13, histamine 생성량보다 rmlL-5/rmlL-3를 처리한 천식생쥐 폐세포의 사이토카인이 유의성있게 증가되었다. 그러나, rmlL-5/rmlL-3와 TRE를 함께 처리한 천식생쥐 폐세포의 사이토카인은 대조군에 비해 유의성있게 감소되었다(Table 2).

Table 2. Effects of Cytokines Production Levels in Lung Cells

Group	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	Histamine (nM)
Normal	5±1.5	520.7±25.3	28.7±5.7	12.9±1.8
Control	53±2.1**	567.5±13.5**	95.1±7.4**	45.0±2.9**
TRE 100	42.3±2.5**#	537.1±17.7**#	61.8±11.9**#	38.8±2.1**#
TRE 50	45.5±2.8**	547.7±11.4**#	72.5±10.5**	42.3±4.1**

C57BL/6 mice were exposed OVA for 6 weeks. The mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. Eosinophil were activated by rIL-3/rmIL-5. The lung cells were treated with TRE and incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by ELISA. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (# $p<0.05$; ## $p<0.01$).

Normal : Normal C57BL/6 mice lung cells.

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

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

TRE 50 : rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and TRE (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Table 3. Effects of Eosinophil Proliferation in Lung Cells

Group	Drug ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	rmIL-5 + rIL-3	Eosinophil proliferation (cpm)
Eosinophils		-	968±91
Control		+	18847±1527***
Cyclosporin A	10	+	4676±972**#
	100	+	8309±1087**#
TRE	10	+	17839±1503***
	1	+	18385±1223***

C57BL/6 mice were exposed OVA for 6 weeks. The mice lungs were taken out, chopped and disposed with collagenase. Eosinophil were activated by rIL-3/rmIL-5. The lung cells were treated with TRE and incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed. The results are expressed the mean±S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T test (# $p<0.05$; ## $p<0.01$).

Normal : Normal C57BL/6 mice lung cells.

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

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

TRE : rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and TRE (respectively 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

4. 호산구 증식 억제율

천식 유발 생쥐에서 분리한 폐세포에 rmIL-5와 rIL-3을 함께 처리한 대조군의 호산구 증식은 18847±1527로 증가되었으며, CsA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 TRE (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 실험군의 호산구는 대조군에 비해 각각 유의성 있게 감소되었다(Table 3).

고찰

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 쉼쉼거리거나 가랑가랑하는 소리가 나는 것을 말한다.喘息의 병리학적 소견은 첫째, 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민반응이 있어야 한다. 둘째, 광범위한 기도 폐색의 증상이 나타나면서 이 기도 폐색은 치료에 의해, 혹은 자연히 소실되는 특징이 있다. 셋째로 첫째와 둘째의 조건을 충족시키면서, 기도의 염증성 반응을 보이는 질환을喘息이라고 한다.

喘息의 유발인자로 서양의학에서는 Allergy, 식품 또는 식품 첨가물, 아스피린 또는 다른 약제들, 감정, 자극물, 질, 기후 조건 및 대기 오염, 감기와 같은 호흡기 감염,

운동 등을 들고 있는데, 알려지원과 기관지염, 운동이나 스트레스 등의 원인으로 발병, 공기가 폐로 들어가는 통로인 기관지나 세기관지가 부어오르고 분비물(痰)이 늘어나 기관지나 세기관지가 경련을 일으키기 때문에 나타난다고 알려져 있다.

喘息은 한의학에서 '哮喘'의 범주에 속하는데,《黃帝內經》⁴⁾에 이미 '喘呼', '喘息' 등으로 기록되어 있으며 《東醫寶鑑》⁵⁾에서 '喘'은 '呼吸促急 或 氣息促急'한 증상이라 하였다. '哮'는喘의 증상 이외에 喉中痰聲이 있는 것으로, 喉中에 聲響이 있는 것이哮症이다⁶⁾.

최근까지 한약을 이용한 천식 치료 효능을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 저자는 白屈菜, 瓜子金, 地耳草, 木天蓼子, 黃芪, 蛇莓, 重樓에 대한 항천식 연구⁷⁻¹³⁾를 보고하였다. 그러나 한의학적으로 청열생진배농의 효능으로 폐열조해에 응용되는 과루근의 항천식 효능에 대한 연구는 없었다. 이에 저자는 OVA로 천식을 유발시킨 생쥐에서 폐를 적출한 후, 폐세포 및 호산구를 분리하여 배양하면서, TRE가 폐세포 및 호산구에 미치는 영향을 분석하였다.

Mosmann 등¹⁴⁾은 설치류의 T-림프구 클론에서 IL-2와 IFN- γ 를 생성하는 Th1 세포와 IL-5, IL-6 및 IL-10 등을 생성하는 Th2 세포가 존재함을 보고하였다. T 세포는 분비되는 여러 cytokine의 종류에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 나눌 수 있으며 이 중 Th2 세포는 IL-4,

IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응에 대한 방어작용에 관여한다. Th1 세포와 Th2 세포는 서로 길항 작용을 나타내어 기능이 억제되는 현상이 관찰되며 알러지성喘息. 환자의 폐포 세척액에는 Th2 세포의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다¹⁵⁻¹⁸⁾.

Th2 세포는 eoxaxin, RANTES, MIP-1a와 MCP-3과 같은 β -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 유발한다¹⁹⁾.

따라서 Th1 세포와 Th2 세포 간의 상호전환에서의 불균형을 억제하거나, 호산구 및 B 세포를 억제하는 효능으로 천식에 응용이 가능하다고 생각된다.

TRE를 lung fibroblast cells에 분주하고 배양한 후, 세포독성을 측정된 결과 농도 100 μ g/ml에서 91% 이상의 세포 생존율을 보였다. 이는 TRE가 세포독성을 나타내지 않음을 나타낸다(Table 1).

FACS 분석을 통한 granulocytes와 림프구 분포양상을 보면, granulocytes는 정상군에서 21.4%를 보였고, rIL-5/rIL-3을 처리한 대조군에서는 증가하여 36.7%를 보이고 있다. 이에 비해 TRE를 투여한 실험군에서는 33.7%로 granulocytes의 숫자가 감소되었다. 림프구는 정상군에 비해 대조군에서 유의성 있게 증가되었으나, TRE를 처리한 실험군은 대조군보다 세포 수가 감소되었다. 이는 TRE가 기관지 및 기도에서 발생하는 만성염증 유발시키는 세포의 활동을 억제하는 작용이 있음을 나타낸다(Fig. 1).

CD3분자는 T 림프구 항원수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달하는 기능을 맡고 있는데 이 CD3는 Th1 세포와 Th2 세포 모두에 존재한다¹⁷⁾. CD3는 T 세포 결정표식인자로, T 세포 항원 수용체에 항원이 결합된 신호를 세포 안으로 전달한다¹⁹⁾.

CCR3는 케모카인과 반응하는 세포표면표식인자(수용체)로서 호산구, 호염기구, Th2 세포의 세포 표식인자이다¹⁸⁾. 뿐만 아니라 CCR3는 호산구에서 가장 높게 발현이 되고, 호염기구, Th2 세포, 천식 환자의 기도 상피 세포에서 보이며, 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 보여진다²⁰⁾.喘息 유발 생쥐의 기관지 폐포 세척액에서 FACS 분석 결과 CD3-/CCR3+호산구는 대조군에서 66.0%이었으나 TRE 투여군에서는 62.7%로 감소된 것을 볼 수가 있다(Fig. 2).

CD69는 활성화된 B 세포와 T 세포, 대식 세포, NK 세포에 분포하며²¹⁾, T 세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 분비되므로喘息환자의 기도에서 호산구 침윤의 표지로 사용될 수 있다²²⁾. CD3+/CD69+ 세포 수를 분석한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 16.8%로 증가되었으며, TRE 투여군에서는 15.7%로 감소되었다. 이는 과민성 알러지 반응에 주요하게 관여하는 호산구의 침윤양상이 TRE 투여군에서 감소되었음을 의미한다(Fig. 3).

과민성 알러지 피부염 환자의 생검에서 호산구와 CD4+ T 세포의 침윤이 특징적이고, 이들 T 세포에서 Th2 세포 유형의 사이토카인이 분비된다고 하며喘息에서는 BALF에는 CD3+세포, CD4+세포, CD4+/CD8+의 비율이 증가한다. 정상인에서 CD4와 CD8의 비율은 대체로 1.5~2:1의 비율을 유지한다고 한다²³⁾.

CD4+/CD8+세포 수 비율 분석결과, 대조군의 CD4+: CD8+세포 수는 41.6% : 21.8%인 반면, TRE를 처리한 실험군의 CD4+: CD8+세포 수는 37.7% : 25.6%로 불균형이 호전되었다. 이는 TRE가 Th1 세포와 Th2 세포 간의 상호전환에 영향을 미쳐 Th0 세포가 Th2 세포로 전환되는 것을 억제한다고 판단된다.

CD4+/CD25+세포는 T regulatory 세포이며, 이 세포군은 과민 면역질환을 억제하는 기능을 담당하고 있다. 따라서 CD4+/CD25+세포 수를 증강시켜 천식 질환을 치유할 수 있는지 연구하였으나, 대조군과 비교하여 TRE 처리군에 유의성있는 증가는 없었다.

IL-4는 size 129이며 monomer 구조이고, CD124와 CD132의 수용체를 가지고 있으며²²⁾, Th2 세포에서 방출되어 여러 종류의 면역세포에 작용하여 다양한 면역조절 기능을 나타내고 있다. 특히 B 세포의 분화에 관한 작용으로 IgE의 생성과 분비를 유도하고, II형 IgE 수용체인 Fc ϵ R II의 발현을 증가시킨다. 이러한 IL-4의 기능은 알러지 반응의 주요조절인자로서 중요하다.

IL-5는 IL-4와 유사하게 B 세포의 증식과 분화를 자극하는 기능을 가진 분자량 20kD의 사이토카인으로 활성화된 CD4+ 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 알러지성 호흡기질환의 치료에 유용할 것으로 보고되고 있다¹⁸⁾.

IL-13은 Th2에서 분비되는 사이토카인으로 Th1 세포를 억제하며, IgE의 생성을 유도하여 알러지성 염증 반응의 병인에 관여한다고 하였다^{22,24)}.

ELISA 분석을 살펴보면, BALF 내 IL-4, IL-5, IL-13가 rIL-3, mIL-5를 처리한 대조군에서는 현저하게 증가되는 것이 관찰되었고, TRE를 투여한 실험군에서는 유의성 있게 모두 감소되었다(Table 2). 이는 TRE의 알러지 반응 억제 작용을 반영한다고 볼 수 있다.

Histamine은 표적 세포의 수용체에 결합함으로써 효과를 미치는데, 내피세포가 혈관 평활근세포 이완제인 프로스타사이클린(prostacyclin, PGI₂)을 합성하게 하여 이들이 혈관 확장을 일으킨다²²⁾. 히스타민의 이러한 작용에 의해 즉시형 과민반응의 구진과 발적 확장이 일어나게 된다. 히스타민 생성에 미치는 영향을 살펴보면 본 실험에서 대조군에 비하여 TRE가 처리된 경우 히스타민 생성량이 감소되었다(Table 2). 이 결과는 TRE가 알러지 반응에 주된 인자로 알려진 히스타민의 생성 억제에 의한 작용이 있음을 보여준다.

호산구 증식억제실험을 분석해 보면, 대조군에서 eosinophil proliferation은 18847±1527인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4676±972로 감소되었다. TRE를 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 농도로 처리한 실험군에서의 eosinophil proliferation은 8309±1503, 17839±1503, 18385±1223으로 나타났다 (Table 3). 이는 TRE이 호산구 증식에 유의성있게 억제 작용을 하고 있음을 알 수가 있다.

위의 내용을 요약해 보면, 한의학에서 瓜蒌根은 微寒하고 甘微苦酸하고 肺胃經에 歸經하여 清熱生津의 효능으로 肺熱燥咳에 응용되며, 消腫排膿의 효능으로 각종 염증질환에 응용되어 왔음과 상통한다. 또한 약리적으로 抗菌작용과 免疫調節작용이 있어 천식에 동반되는 염증에 유효할 것으로 판단하고 OVA 천식 유발 생쥐를 이용한 실험을 시행하였다. 그 결과 TRE의 세포독성은 없었으며, FACS, ELISA, 호산구 증식 실험 결과에서, Th2 세포와 호산구의 분화, 증식, 활성을 억제시켰음을 알 수 있었다.

결론

TRE가 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. TRE의 세포 독성 실험 결과, TRE 100 µg/ml 농도 처리에서 세포 생존율이 91.48±4.8%로 나타나 세포 독성을 나타내지 않았다 (Table 1).
2. FACS 분석 결과 정상군에서의 granulocytes, CD3e-/CCR3+, CD3e+/CD69+, CD4+ : CD8+ 세포 수에 비해, rmIL-5/rIL-3을 처리한 대조군에서 granulocytes, CD3e-/CCR3+, CD3e+/CD69+, CD4+ : CD8+ 세포 수가 증가되었다. 반면에 rmIL-5/rIL-3와 TRE를 함께 처리한 실험군의 granulocytes, CD3e-/CCR3+, CD3e+/CD69+, CD4+ : CD8+ 세포 수가 감소되었다 (Fig. 1-6).
3. ELISA 분석 결과 rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군에서 IL-4, IL-5, IL-13, histamine release 발현량이 증가한 반면, rIL-3/rmIL-5와 TRE 100 µg/ml, 50 µg/ml 농도로 함께 처리한 실험군에서 IL-4, IL-5, IL-13, histamine release 발현량이 유의성 있게 감소되었다 (Table 2).
4. rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군의 eosinophil proliferation은 정상군에 비해 유의성 있게 증가된 반면, rIL-3/rmIL-5와 TRE 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 농도로 함께 처리한 실험군의 eosinophil proliferation은 대조군에 비해 유의성 있게 억제되었다 (Table 3).

이상의 결과로 보아 TRE가 Th2 세포 및 호산구의 분

화, 성숙, 활성화에 억제 작용을 가지고 있으며, 이러한 작용으로 천식에 유효한 효과가 있을 것으로 생각되며 임상 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 대구한의대학교 기린연구비 지원에 의한 것으로, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 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. 서울 : 2007 ; 205-6.
2. 김호철. 한약약리학. 과주 : 집문당. 2001 ; 122-4.
3. Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Lancet. 1998 ; 1129-32.
4. 金達鎬. 黃帝內經 靈樞(全). 서울 : 醫聖堂. 2002 ; 779, 1054.
5. 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.
6. 李珩九, 鄭昇杞. 동의폐계내과학. 서울 : 아트동방. 1999 ; 162-202.
7. 노성수. 백굴채(白屈菜)가 천식유발 생쥐의 폐조직에서 호산구 증식과 면역 세포 활성화에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2008 ; 23(2) : 99-109.
8. 조은환, 서영배, 노성수. 과자금(瓜子金)추출물과 Cyclosporin A가 OVA로 천식이 유발된 생쥐의 염증성 면역세포에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2008 ; 23(2) : 87-97.
9. 이영용, 서영배, 서부일, 이영철, 노성수. 지이초(地耳草) 추출물이 OVA로 천식이 유발된 생쥐의 폐세포에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2008 ; 23(1) : 75-83.
10. 이영철, 김승형, 이장진, 노성수, 서영배. OVA로 유도된 천식 모델 생쥐에서 木天蓼子가 조절 T 세포, NK T 세포 및 Gammadelta T 세포 수 변화에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2006 ; 21(1) : 51-6.
11. 임중근, 길기정, 이영철, 노성수, 서영배. 사마가 Ovalbumin감작으로 유발된 천식 생쥐 모델에서 기관지염증 억제에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2005 ; 20(1) : 73-83.
12. 신미경, 길기정, 이영철, 노성수, 김진숙, 서영배. rmIL-5로 유도된 호산구의 활성화 및 성장에서 중추의 천식반응 억제효과. 2005 ; 20(2) : 159-69.
13. 이민형, 노성수, 서영배. 황기(黃芪)의 재배년차(栽培年差)에 따른 천식(喘息)의 면역학적 치료효과에 대한 비교연구. 2008 ; 23(2) : 111-21.

14. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones. *J Immunol.* 1986 ; 136 : 2348-57.
15. 조상현, 송숙희, 김윤근, 지영구, 최동철, 윤호주 등. 아토피 환자에서의 IgE항체 생성조절기전 : 말초혈액림프구의 IL-4, IFN- γ 생성의 불균형. *알러지.* 1995 ; 15(2) : 210-12.
16. 어수택, 정성환, 이상우, 김현태, 김용훈, 박춘식.喘息환자의 기도 내 cytokines 표현에 대한 연구. *결핵 및 호흡기질환.* 1995 ; 42(1) : 2, 3.
17. 박수영, 조영주. 내인성喘息 및 외인성喘息환자의 CD8양성세포에서 interleukin4 및 interferon gamma 생산. *喘息 및 알레르기.* 2001 ; 21(1) : 66-7.
18. 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.
19. Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB. T-lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet.* 1988 : 1129-32.
20. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울 : 군자출판사. 2002 : 31-44, 59-67, 237-326
21. Nicolas W Lukacs. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature review.* 2001 ; 1 : 108-16.
22. Charles A Janeway 著, 김태규 외 譯. 면역생물학. 제5판. 서울 : 라이프사이언스. 2002 : 698, 703, 714.
23. 김세중. 면역학. 서울 : 고려의학. 1994 : 3, 8, 25, 26, 28, 31, 32.
24. 이숙영, 송정섭, 김영균, 김관형, 문화식, 박성학. 기관지천식의 기도과민 반응과 기관지폐포세척액 소견. *대한내과학회지.* 1995 ; 48(2) : 171-80.