

생쥐에서 ovalbumin과 디젤배기가스 입자로 유도된 기도염증과 기도 과민성에 대한 반하 물 추출물의 항천식 효과

김승형², 임흥빈^{1*#}

1 : 충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과, 2 : 대전대학교 한의과대학 동서생명과학연구원

Antiasthmatic effects on *Pinellia ternate* Breitenbach(PTB) water extracts against
airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles with
ovalbumin sensitization in BALB/c mice

Seung Hyung Kim², Heung Bin Lim^{1*#}

1 : Department of Industrial Crop Science & Technology, Chungbuk National University Cheongju, Chungbuk 361-763,
2 : Institute of Traditional Medicine & Bioscience, Daejeon University, Daejeon 300-716

ABSTRACT

Objectives : Asthma is a chronic, complex respiratory disease, caused by airway obstruction, airway eosinophilic inflammation(AEI), and airway hyperresponsiveness(AHR). This study was conducted to determine whether oral administration of crude water extracts of *Pinellia ternate* Breitenbach(PTB) has an antiasthmatic potential in the treatment of asthma in mice.

Methods : Asthmatic AEI and AHR were induced by systemic sensitization to ovalbumin(OVA) by intratracheal instillation with 0.1 mg/mL suspension of diesel exhaust particles(DEP) once a week for 10 weeks in BALB/c mice. Crude PTB water extracts(50 mg/kg and 200 mg/kg) were orally administered 5 times a week for 10 weeks. Cyclosporin(10 mg/kg) was administered the same manner as a positive control.

Results : Long-term treatment with crude PTB water extracts suppressed the infiltration of inflammatory cells, including eosinophils, into airways from blood. It also reduced asthmatic AEI and AHR by attenuating the increase in the levels of cytokines such as interleukin(IL)-4, IL-5 and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid(BALF), as well as the levels of histamine and OVA-specific IgE in blood. However, the effect of crude PTB water extracts(200 mg/kg) was not likely to be stronger than that of cyclosporin(10 mg/kg).

Conclusion : These results suggest that crude PTB water extracts have inhibitory effects on AEI and AHR in a mouse model of asthma and may act as a potential Th2 cytokine antagonist, and have a therapeutic effect on allergic asthma.

Key words : *Pinellia ternate* Breitenbach water extracts, Diesel exhaust particles, Ovalbumin, Airway inflammation, Airway hyperresponsiveness.

서론

사용기간이 오래된 대형 버스나 트럭, 그리고 미니밴 등

디젤 엔진을 사용하는 경유차가 내뿜는 매연에는 다양한 유기 화합물과 중금속 등을 함유하고 있어 가래생성, 기도염증, 암이나 기관지 천식 등 알려지성 만성호흡기 질환의 직접적인

* 교신저자 : 임흥빈, 충북 청주시 개신동 12 충북대학교 특용식물학과
· Tel : +82-43-261-2521 · E-mail : heungbin@chungbuk.ac.kr
제1저자 : 임흥빈, 충북 청주시 개신동 12 충북대학교 특용식물학과.
· Tel : +82-43-261-2521 · E-mail : heungbin@chungbuk.ac.kr
· 접수 : 2012년 12월 10일 · 수정 : 2013년 1월 7일 · 채택 : 2013년 1월 11일

원인이 된다고 보고하고 있다¹⁾. 장기간 실험동물에 디젤배기가스입자 (diesel exhaust particles : DEP)를 알러지원과 함께 호흡기내로 투여했을 때 기도내 호산구성 염증과 함께 기관지 천식이 유발된다고 보고하고 있다²⁾. 또한 디젤배기가스입자를 기도내에 투여하면 B-세포에 의한 IgE 생산을 유도하며, mast cells, macrophages, neutrophils은 물론 eosinophil과 같은 염증세포가 침윤하고, IL-4, IL-5, IL-13과 같은 Th2 cytokine과 major basic protein(MBP), eosinophil cationic protein(ECP), eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis(ECF-A), platelet activating factor(PAF)과 같은 pro-Th2 chemokine이 유리되는 것을 확인하고 있다³⁻⁴⁾. 그리고 DEP를 항원과 함께 생쥐에 투여했을 때 기관지천식의 증상인 세기관지가 광범위하게 좁아지는 현상이 나타내며, 발작성인 호흡곤란이 자연적으로 혹은 치료에 의해서 원 상태로 되돌아가는 가역성의 성질을 보이고, 작은 자극에 의해서도 예민하게 기도과민성이 항진되며, 점액성분이 과다 분비된다고 보고하고 있다⁵⁻⁶⁾.

전통적으로 반하(*Pinellia ternate* Breitenbach : PTB)는 뿌리의 외피를 제거하고 건조하여 약재로 사용하는데 성미는 신온유독하며, 약리작용으로는 구토를 멈추게 하고, 담을 제거하고 해수와 천식 해소에 효과가 있다고 알려져 왔다⁷⁾. 반하는 다당류와 전분을 많이 함유하고 있으며, 소량의 아미노산류, 점액물질, 지방산유와 정유성분과 β -sitosterol, β -sitosteryl glucoside, triterpenoid, glucose, glucuronic acid, rhamnose, choline, Ca-oxalate, 그리고 약 1.9%의 무기질 성분 등을 함유하고 있다고 보고하고 있다⁸⁻⁹⁾. 최근에는 반하에 주요 활성성분인 pinellin acid¹⁰⁾, 그리고 강렬한 자극성의 맛을 내는 3,4-dihydroxybenzaldehyde 배당체와 아린 맛을 내는 3,4-diglycosilic benzaldehyde 등의 맛 성분과, 그리고 1-ephedrine과 같은 alkaloid 성분¹¹⁾들이 밝혀지고 있다. 반하의 생리활성 연구로는 스트레스 완화효과¹²⁾, 편두통 완화효과¹³⁾, 미백효과¹⁴⁾, 허혈성 뇌손상 완화효과¹⁴⁾, 생식기능 향상효과¹⁵⁾, 신경세포 보호효과¹⁶⁾ 등이 보고되고 있다. 한편, 반하 추출물은 기관지 상피세포의 과민반응과 염증반응을 완화시키고¹⁷⁾, 또한 Th2 cell들의 침윤을 억제함으로써 만성기도 염증을 완화시킨다고 보고한 바 있다¹⁸⁾. 그러나 대기오염에 따른 천식의 특징인 만성 기도염증과 기도 과민성을 유발하고, 이에 대한 반하 물 추출물의 생리효과는 거의 조사된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 생쥐에 10주 동안 DEP를 알러지 항원과 함께 기도내로 투여하여 천식성 호산구성 기도염증과 기도과민성을 유발하고, 또한 반하 물 추출물을 구강내로 투여하여, 천식성 기도염증과 기도 과민성이 미치는 반하 물 추출물의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. DEP의 포집

DEP는 일본 국립환경연구소 대기영향평가팀으로부터 구입하였다. DEP는 일본 이즈쯔 자동차 주식회사 4JB1형 2740 cc 4기통직분사식 디젤엔진을 1500 rpm, 10 torque(10 kg/m)의 부하조건하에서 운전했을 때 생기는 배기미립자를

glass fiber filter로 포집하고 -20°C로 보관하면서 실험에 사용하였다. DEP를 전자현미경으로 관찰했을 때 공모양으로 평균 직경이 0.4 μ m인 크기를 갖고 있다고 보고하였다¹⁹⁾.

2. 실험동물 사육조건

본 연구에서 사용된 실험동물은 Daehan Biolink Co. (Seongnam, Korea)에서 구입한 BALB/c계 생쥐로 6주령의 21 \pm 1 g인 수컷만을 이용하였다. 생쥐를 정상군, OVA+DEP 처리군, OVA+DEP+CsA 처리군, OVA+DEP+PTB 50 mg/kg 처리군과 OVA+DEP+PTB 200 mg/kg 처리군 다섯 그룹으로 나누고 한 그룹당 16마리씩 사육하여 기도과민성 측정 등에 8마리씩 사용하였고, 혈액과 기도폐 세정액 채취 등에 8마리씩 사용하였다. 동물사육실의 조건은 conventional system으로 온도는 20 \pm 2 °C, 습도는 40~60%, 환기는 1시간당 12~15회로 하였으며, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 실험동물의 사료는 (주)삼양사 (Seoul, Korea)제품의 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 배합사료)를 사용하였다. 그리고 cage는 polycarbonate 재질로 만든 것을 사용하였으며 깔집은 (주)JRS (MK-2000 Corncob, Germany) 제품을 사용하였다. 실험동물의 사육과 모든 실험과정은 대전대학교 동물실험윤리위원회에서 승인되었으며, 국제 동물이용관리 위원회 지침을 준수하였다.

3. 기도내 DEP 투여 및 반하추출물의 처리

0.05% Tween 80을 함유된 50 mM 생리식염수 인산완충 용액 (PBS pH 7.4)으로 1 mg/mL의 농도가 되도록 DEP suspension 용액을 만든 다음, -4°C에서 초음파 세포분쇄기 (Tomy UD-201, Tokyo, Japan)로 50% 최대 출력하에 5분 동안 sonication하였다. 생쥐를 10% chloral hydrate로 마취한 다음, 기도내 투여용 cannula를 이용하여 OVA+DEP 처리군, OVA+DEP+CsA 처리군 및 OVA+DEP+PTB 투여군은 DEP suspension 용액 100 μ L를, 정상군은 50 mM PBS용액 100 μ L를 각각 10주 동안 일주일에 1회 기도내로 투여하였다. 한편 반하는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입 정선한 것을 사용하였으며, 반하추출물은 대전대학교 한의과대학 동서생명과학연구원에서 한약탕기에 황금약재와 증류수를 넣고 3시간동안 달여서 여과하고 농축한 다음, 동결 건조하여 실험에 사용하였으며, 수율은 16%이었다. 정상군과 OVA+DEP 처리군은 50 mM PBS용액만을 식도내로 투여되었고, OVA+DEP+CsA 처리군은 cyclosporin(CsA)을 50 mM PBS 용액으로 희석하여 10 mg/kg 농도로 구강내로 투여되었으며, 두 그룹의 OVA+DEP+PTB 투여군은 반하 물추출물을 50 mM PBS 용액으로 희석하여 각각 50 mg/kg과 200 mg/kg 농도가 되도록 만든 다음 구강내로 투여되었다. CsA 투여와 반하 추출물 투여는 10주 동안 일주일에 5일 수행하였다.

4. OVA 감작화 및 흡입

생쥐에 ovalbumin(OVA) 감작화 및 흡입은 Kim 등의 방법²⁰⁾에 따라 실시하였다. 즉 OVA/alum 용액은 OVA 농도가 500 µg/mL인 50 mM PBS 용액(pH 7.4)과 10%(w/v) aluminum potassium sulfate 용액을 동량 혼합하여 제조하였고, 실온에서 60분 동안 방치한 다음 pH를 6.5로 조정하고 원심분리 (1000 rpm × 5분)하여 상층액을 사용하였다. 정상군을 제외한 나머지 네 그룹은 모두 DEP를 기도내에 투여하기 14일과 7일전에 OVA/alum 용액 0.2 mL씩 생쥐 복강내로 2회 투여하였고, DEP를 기도내 투여하기 11일과 2일 전에는 1% OVA용액 0.1 mL씩 생쥐 복강내로 투여하였다. 또한 250×300×250 mm polycarbonate 재질(DJ-435, Daejong, Korea) chamber안에서 10주 동안 주 1회, 1일 30분 Buxco Aerosol Delivery System (NE-CT10, Buxco, USA)를 이용하여 6주간은 1% OVA 용액, 그리고 마지막 4주간은 2.5% OVA 용액을 aerosol화하여 생쥐에 분무하였다.

5. 혈액과 기관지폐포세척액 채취

실험 종료 후 생쥐는 복강내로 10% chloral hydrate를 투여하여 마취한 다음 심장채혈법으로 채혈하고, 원심분리 (3,000 rpm × 10분)하여 혈청을 얻었으며, 혈청은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 기관지폐포세척액 (Bronchoalveolar Lavage Fluid : BALF)은 37°C에서 10% fetal bovine serum DMEM 배양액을 기도에 주사기로 주입하고 흡입하여 얻었으며, 이 과정을 3회 반복하였다. Hemocytometer (Fisher)를 이용하여 BALF내 총 세포수를 조사하고, 또한 BALF를 Cytospin centrifuge (Cellspin, Hanil, Korea)를 이용하여 원심분리(400 g × 4분)하고 BALF 세포를 슬라이드 글라스 위에 도말하여 Diff-Quik로 염색한 다음, 백혈구 중 호산구의 세포수를 조사하였다. 폐세정액의 상층액은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

6. 기도과민성 측정

기도과민성의 측정은 Finotto 등의 방법²¹⁾에 준하여 실시하였다. 생쥐의 기도 수축정도는 Buxco system(Biosystem XA; Buxco Electronic Inc, USA)을 이용하여 측정되었다. 기도저항 수치 Pehn값은 아래의 수식에 의해 기계적으로 자동 계산되었다. 10주 동안 DEP의 기도내 투여와 마지막 2.5% OVA 용액을 aerosol화하여 분무하고 난 24시간 후에, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mg/mL의 농도로 제조된 methacholine (MCH)수용액 각각을 aerosol화하여 연속해서 다섯 그룹의 생쥐에 분무하고 기도반응성을 30분 동안 조사하다.

$$Penh = \frac{PEF}{PIF} \times \left(\frac{Te}{Rt} - 1 \right)$$

(Penh = Enhanced Pause, PEF = Peak Expiratory Flow, PIF = Peak Inspiratory Flow, Te = Expiratory Time, Rt = Time to expire 65% of the volume)

7. Enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA)

BALF에서 interleukin(IL)-4, IL-5, IL-13의 농도와 interferon-gamma (IFN-γ)의 농도는 ELISA kit(Biosource, Invitrogen, USA)로, 혈액으로 유리한 히스타민 농도는 ELISA kit(Beckman Coulter, Fullerton, USA)로, 그리고 혈액에서 immunoglobulin-E(IgE) 농도는 ELISA kit(Shibayagi, Shibukawa, Japan)를 이용하여 측정하였다. 즉 well에 각각의 생쥐의 혈청과 BALF를 100 µL씩 분주하고, 1시간동안 실온에서 보관한 다음, 2회 세척용 완충 용액으로 세척하고 biotin-conjugated antibody를 넣어 30분간 방치하였다. 다시 2회 완충용액으로 세척한 다음 avidin-HRP conjugated antibody 100 µL를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. Tetramethylbenzidine 기질을 100 µL씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음, stop 용액 100 µL로 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 조사하고 그 함량을 계산하였다.

8. 통계처리

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 데이터 분석은 StatView version (4.0 Abacus Concepts, Inc, Berkeley, CA)을 이용하였고, Fisher's protected least significant difference test 혹은 Scheffe's F test로 통계적인 유의성을 검정하였다. 두 비교대상 처리군 사이에 p값이 0.05 혹은 0.01보다 작은 값을 나타내었을 때 통계적으로 유의성있는 차이가 있다고 판정하고, 각각의 표와 그림에 표기하였다.

결 과

1. 기도과민성에 대한 효과

그림 1은 다섯 그룹에 MCH를 농도별로 처리하고 asthma Penh값을 측정하여 그룹별 기도과민성을 비교한 결과이다. MCH 처리농도에 따라 정상군의 Penh값은 용량의존적으로 통계적 유의성은 나타나지 않았으나, OVA+DEP 처리군의 Penh값은 용량의존적이었으며, 같은 농도에서 OVA+DEP 처리군의 Penh값은 정상군에 비해 매우 높았다(p<0.01). 따라서 장기간 알려지던 OVA와 함께 기도내 DEP 처리는 기도과민성을 크게 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 기관지 천식 치료제로 사용되는 cyclosporin을 장기간 OVA와 DEP 처리와 함께 처리했을 때 MCH 6.25 mg/mL 분무농도에서부터 기도과민성은 크게 감소하였다 (p<0.01). 한편, OVA와 DEP 처리와 함께 장기간 반하 물 추출물 50 mg/kg 농도로 처리했을 때 OVA+DEP 처리군에 비해 기도과민성은 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성을 나타나지 않았다. 그러나 장기간 반하 물 추출물 200 mg/kg 농도로 처리했을 때는 MCH 50 mg/mL분무농도에서 기도과민성은 크게 완화되었다 (p<0.01).

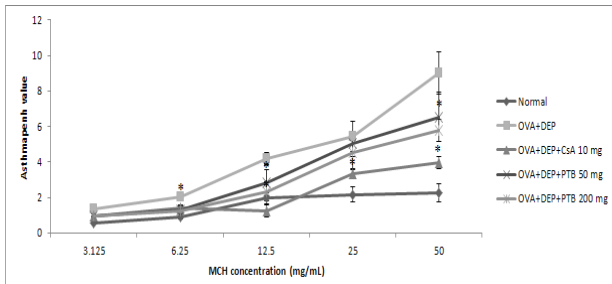


Fig. 1. Change of airway hyperresponsiveness with MCH concentration.

MCH : methacholine, OVA : ovalbumin, DEP : diesel exhaust particle, PTB : crude *Pinellia ternate* Breitenbach (PTB) water extracts (50 mg/kg and 200 mg/kg). CsA : Cyclosporin (10 mg/kg). Values recorded are the mean \pm SD with 8 male Balb/c mice per each group. *Significantly different from OVA+DEP group ($p < 0.01$).

2. BALF에서 세포수의 변화

표 1은 생쥐에 장기간 OVA 감작화와 함께 기도내로 DEP를 투여하고 식도내로 반하 추출물을 투여했을 때 폐의 무게 변화와 BALF에서 총 세포수 및 호산구수를 측정된 결과이다. 계획한 실험절차와 과정을 마친 모든 생쥐를 대상으로 폐를 적출하고, 무게를 잴 때 OVA+DEP 그룹, OVA+DEP+CsA 그룹, OVA+DEP+PTB 투여 그룹 모두 폐의 무게는 정상군에 비해 약간 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. BALF에서 총세포수는 OVA+DEP 그룹이 정상군에 비해 크게 증가되었으며 ($p < 0.01$), OVA+DEP+CsA 그룹은 정상군에 비해 증가되었으나 OVA+DEP 그룹보다 낮았다 ($p < 0.01$). OVA+DEP+PTB 50 mg/kg과 200 mg/kg 그룹도 정상군에 비해 증가되었으나, OVA+DEP 그룹에 비해 그 수는 크게 적었으며 ($p < 0.01$), 두 그룹의 사이의 총세포수는 반하 50 mg/kg 처리 그룹이 200 mg/kg 처리 그룹보다 더 많았다. 폐세정액에서 호산구 수도 OVA+DEP 그룹은 정상군에 비해 약 178배 증가되었으나 OVA+DEP+CsA 그룹은 64배, OVA+DEP+PTB 50 mg/kg 그룹은 121배 그리고 OVA+DEP+PTB 200 mg/kg 그룹은 115배 증가되어 세 그룹 모두 OVA+DEP 그룹에 비해 폐세정액에서 호산구 수가 낮았다 ($p < 0.01$).

Table 1. Change of lung weights, the number of total cells and eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid

	Normal	OVA+DEP	OVA+DEP +CsA	OVA+DEP +PTB50	OVA+DEP +PTB200
lung weights(g)	0.14 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02	0.17 \pm 0.03	0.17 \pm 0.04
Total Cells ($\times 10^5$ cells)	0.30 \pm 0.09	8.59 \pm 1.50*	2.39 \pm 0.02†	4.16 \pm 0.52†	2.51 \pm 0.20†
Eosinophils (x 400)	2.00 \pm 0.20	356.0 \pm 59.0*	128.5 \pm 0.52†	253.0 \pm 48.1†	230.0 \pm 25.0†

OVA : ovalbumin, DEP : diesel exhaust particle, PTB : crude *Pinellia ternate* Breitenbach water extracts (50 mg/kg and 200 mg/kg). CsA : Cyclosporin (10 mg/kg). Values recorded are the mean \pm SD with 8 male Balb/c mice per each group. *Significantly different from normal group ($p < 0.01$)
†Significantly different from OVA+DEP group ($p < 0.01$)

3. 혈액에서 IgE와 히스타민 함량의 변화

표 2는 혈액에서 IgE 함량과 히스타민 함량을 측정하여 생

쥐에 10주 동안 OVA 감작화와 함께 기도내로 DEP를 투여하고 식도내로 반하 물 추출물과 양성대조군인 cyclosporin을 투여했을 때 그 효과를 비교한 결과이다. 혈액에서 IgE의 함량은 OVA+DEP 그룹이 정상군에 비해 약 6.1배 증가하였으나 ($p < 0.01$), OVA+DEP+CsA 그룹, OVA+DEP+PTB 50 mg/kg 그룹과 OVA+DEP+PTB 200 mg/kg은 각각 3.3배, 5.1배와 4.1배 증가하였다 ($p < 0.01$). 또한 OVA+DEP+CsA 그룹의 혈액에서 IgE 함량은 OVA+DEP 그룹에 비해 46.3% 감소하였고 ($p < 0.01$), OVA+DEP+PTB 50 mg/kg 그룹과 OVA+DEP+PTB 200 mg/kg 그룹은 OVA+DEP 그룹에 비해 각각 17.7%와 33.7% 감소하여 ($p < 0.01$), 반하 물 추출물 투여농도가 많을수록 그 함량은 낮았다. 한편, 혈청에서 histamine 함량은 OVA+DEP 그룹, OVA+DEP+CsA 그룹, OVA+DEP+PTB 50 mg/kg 그룹 그리고 OVA+DEP+PTB 200 mg/kg 그룹 모두 정상군에 비해 크게 증가하였으며 ($p < 0.01$), OVA+DEP+CsA 그룹, OVA+DEP+PTB 50 mg/kg 그룹과 OVA+DEP+PTB 200 mg/kg 그룹은 OVA+DEP 그룹에 비해 그 함량은 각각 48.6%, 33.5%와 39.7% 낮게 유지되었다 ($p < 0.01$).

Table 2. Change of histamine and IgE levels in serum

	Normal	OVA+DEP	OVA+DEP +CsA	OVA+DEP +PTB50	OVA+DEP +PTB200
IgE (Ug/ml)	26.2 \pm 2.0	161.0 \pm 18.4*	86.5 \pm 8.1*†	132.6 \pm 14.8*	106.8 \pm 12.2*†
Histamine (ng/ml)	46.6 \pm 3.6	178.8 \pm 29.8*	107.2 \pm 15.8*†	138.7 \pm 19.4*†	125.8 \pm 13.0*†

OVA : ovalbumin, DEP : diesel exhaust particle, PTB : crude *Pinellia ternate* Breitenbach water extracts (50 mg/kg and 200 mg/kg). CsA : Cyclosporin (10 mg/kg). Values recorded are the mean \pm SD with 8 male Balb/c mice per each group. *Significantly different from normal group ($p < 0.01$)
†Significantly different from OVA + DEP group ($p < 0.01$)

4. BALF에서 Cytokine 함량의 변화

생쥐에 10주 동안 OVA 감작화와 함께 기도내로 DEP를 투여하고 양성대조군인 cyclosporin과 반하 물 추출물을 식도내로 투여했을 때 BALF에서 cytokine 함량을 조사하여 비교한 결과는 표 3에 나타나 있다. OVA+DEP 그룹은 폐세정액에서 IL-4, IL-5, IL-13 함량과 IFN- γ 의 함량이 정상군에 비해 각각 11.7, 10.5, 13.6배와 10.5배 증가하였으나 ($p < 0.01$), OVA+DEP+CsA 그룹에서 이들의 함량은 정상군에 비해 각각 6.2, 3.0, 4.1배와 1.8배로 OVA+DEP 그룹에 비해 그 증가량이 크게 감소하였다 ($p < 0.01$). 한편 OVA+DEP+PTB 50 mg/kg 그룹 BALF에서 IL-4, IL-5와 IL-13 함량은 각각 OVA+DEP 그룹의 57.4, 66.3와 67.9% 수준으로 감소하였으나 ($p < 0.01$), IFN- γ 의 함량은 OVA+DEP 그룹의 13.6% 수준으로 감소하는 경향만을 보였다. 그러나 OVA+DEP+PTB 200 mg/kg 그룹 BALF에서 IL-4, IL-5, IL-13 함량과 IFN- γ 의 함량은 각각 OVA+DEP 그룹의 53.9, 53.7, 42.7%와 62.9% 수준으로 감소하였다 ($p < 0.01$).

Table 3. Change of cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid.

Cytokine	Normal	OVA +DEP	OVA+DEP +CsA	OVA+DEP +PTB50	OVA+DEP +PTB200
IL-4(pg/ml)	15.7 ± 6.1	183.1 ± 41.7*	97.6 ± 10.2†	105.2 ± 14.5*	98.7 ± 12.2†
IL-5(pg/ml)	48.3 ± 9.2	507.0 ± 87.5*	147.0 ± 12.5†	336.0 ± 48.5†	272.5 ± 31.6†
IL-13(pg/ml)	7.4 ± 2.2	100.3 ± 14.6*	30.3 ± 5.6†	68.1 ± 10.7†	42.8 ± 7.2†
IFN-γ(pg/ml)	12.5 ± 5.6	130.8 ± 14.8*	23.1 ± 3.9†	113.0 ± 15.4*	82.3 ± 14.2†

OVA : ovalbumin, DEP : diesel exhaust particle, PTB : crude *Pinellia ternate* Breitenbach water extracts(50 mg/kg and 200 mg/kg). CsA : Cyclosporin(10 mg/kg). Values recorded are the mean ± SD with 8 male Balb/c mice per each group. *Significantly different from normal group(p<0.01) †Significantly different from OVA + DEP group(p<0.01)

고찰

전 세계 인구 70억 명 중에서 기관지 천식 환자수는 약 3억 명 이상으로 추산하고 있으며, 선진국을 비롯하여 개발도상국에서도 빠르게 증가하고 있다고 한다²²⁾. 기관지 천식은 기관지 이상으로 기도가 좁아지게 되고, 호흡이 가빠지며, 가슴이 빠근해지고, 호흡의 괴로움을 호소하는 질병으로 '섹섹' 등 호흡음과 함께 급격한 가역성의 발작성 호흡곤란을 일으켜 사망할 수도 있는 질병이라고 알려져 있다²³⁾.

한편 예로부터 고서에는 기관지 천식을 예방하거나 치료할 수 있는 천연 약제에 의한 처방이 기록되어 있으며, 최근에는 실험동물을 이용하여 이들 천연 약제가 기관지 천식과 기도염증에 효과가 있는 지 검증하여 의미있는 연구결과가 많이 발표되고 있다²⁴⁻²⁵⁾. 반하는 한국, 일본, 중국, 대만 등 아시아 국가에서 구토를 멈추게 하며, 담을 제거하고 해수와 천식 해소를 위한 복합 탕제에 사용되는 약재로 많이 사용되어왔다²⁶⁾. 따라서 본 연구는 생쥐에 DEP와 항원을 장기간 투여하고, 반하 물 추출물이 천식성 기도염증과 기도 과민성에 효과가 있는 지 조사하였다. 기관지 천식의 기본 병태는 첫 번째 호흡기에 미세한 미립자나 낮은 농도의 알러지원의 작은 자극에도 기도반응이 예민하게 나타나는 비특이적 기도과민성이 특징이기 때문에⁶⁾. 본 연구에서는 생쥐에 10주 동안 알러지원으로서 OVA와 미립자로서 DEP를 기도내로 처리하여 기도과민성을 유발하고 반하 물 추출물의 효과를 조사하였다. 생쥐에 반하 물 추출물 200 mg/kg 농도로의 처리는 OVA와 DEP에 의해 유도된 기도과민성을 크게 완화시켰으나 기관지 천식 치료제로 사용되는 cyclosporin처리에 의한 완화효과보다는 크지 않았다. 따라서 고농도의 반하 물 추출물은 기관지 천식에 의한 기도과민성을 어느 정도 완화시킬 수 있는 효과가 있다고 판단하였다. 두 번째 기관지 천식의 기본 병태는 기도염증이다. 일반적으로 기도의 염증은 물리적, 화학적, 생물학적인 외적요인에 의해서 생기는 생체반응으로서 일반적인 특징은 염증세포의 침윤과 부종과 기관지선의 비대, 그리고 배세포의 증가 등의 병리생태학적 변화가 나타난다고 한다¹⁹⁾.²⁷⁾ 그러나 일반 급성염증에서는 염증부위에 혈액으로부터 백혈구 중 호중구가 침윤하고, 만성염증에서는 주로 림파구가 침윤하는데 반해 기관지 천식성 만성염증에서는 호산구가 침윤하는 특징이 있다. 본 연구에서 생쥐에게 OVA 감작화와 함께 DEP를 기도내로 투여하면 생체의 방어작용으로 혈액의

염증세포가 기도내로 크게 침윤하여 BALF에서의 총 세포수가 증가하여 만성 기도염증이 크게 유도되며, 또한 호산구수가 크게 급증한 것으로 보아 천식성 기도염증이 악화됐다고 생각한다. 그러나 생쥐에 OVA 감작화와 DEP와 함께 장기간 양성대조군인 CsA와 반하 물 추출물을 병용 투여하면 혈액에서 기도내로 침윤하는 총 염증세포 수의 증가가 크게 완화되고, 특히 크게 증가하는 호산구의 침윤도 조절될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 생쥐에 장기간 반하추출물의 투여는 OVA 감작화와 함께 DEP에 의한 천식성 기도 염증을 완화시킬 수 있는 가능성이 있다고 판단된다. 세 번째 기관지 천식의 특징은 혈액에서 기도 염증이 확장되거나 특히 급성 알러지반응으로 나타나는 면역 글로블린 중 IgE 함량과 histamine 함량의 급증이다²⁸⁾. 미세 먼지나 알러지를 일으키는 항원이 호흡기에 들어오면, macrophage가 인식, helper T 세포에서 관련 cytokine이 유리, 그리고 B세포에서 IgE항체가 만들어져 mast세포에 부착시키고, 그 다음 mast세포는 히스타민, ECF-A, prostaglandin, tromboxane, leucotriene C₄, leucotriene D₄, leucotriene E₄ 및 platelet activating factor를 생성하여 유리하는 특징을 갖고 있는데, 특히 히스타민의 유리는 혈액에서 기관지조직에 호산구를 침윤시켜 활성화하는 작용을 하여 알러지성 기관지 천식 발증에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다²³⁾. 본 연구에서도 생쥐에게 장기간 미립자 DEP와 알러지원 OVA를 기도내로 투여했을 때 혈액에서 천식 발증에 중요한 지표인 IgE와 histamine 함량이 크게 증가하였다. 그러나 반하 물추출물의 병행 투여는 혈액에서 증가한 IgE와 histamine 함량 증가를 감소하게 하였으며, 따라서 반하 물 추출물은 기관지 천식에 의해 증가시키는 이들 함량을 조절하는 효과가 있다고 생각된다. 기관지 천식의 네 번째 특징은 폐세정액에서 알러지원과 관련된 몇가지 cytokine들의 함량변화이다. 일반적으로 사람이나 실험동물에 담배연기입자, 자동차배기가스 입자 및 지하철 분진 및 가정분진과 같은 환경오염물질에 노출시키면, 알러지원의 감작화를 더 쉽게 유도하고, 천식의 증상을 악화시키며, 알러지원으로 유도되는 특이 IgE 함량, IL-4, IL-5과 IL-13 함량, 그리고 히스타민 함량을 증가시키는 것이 특징이라고 보고되고 있다²⁹⁾. 본 실험에서도 쥐에 장기간 DEP를 OVA 감작화와 함께 병용투여하면 면역계세포에 면역 조절작용이 현저하다고 알려진 IFR-γ와 같은 helper T1 세포형 cytokine함량과 B세포의 IgE항체생성 촉진작용을 나타내는 IL-4와 B세포의 분화 및 항체생성을 자극하고, IgA 생성을 촉진하고, 또한 백혈구 중 호산구를 활성화시키는 IL-5와 IL-13과 같은 helper T2 세포형 cytokine의 함량도 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 생쥐에 장기간 반하 추출물 병용투여는 OVA 감작화와 DEP 투여로 인한 IL-4, IL-5, IL-13 및 IFN-γ의 함량 증가를 다소 억제하였다. 따라서 반하 물 추출물은 알러지원에 의한 천식성 기도염증과 기도과민성의 특징인 cytokine IL-4, IL-5, IL-13 함량과 IFN-γ의 함량의 증가를 완화시킬 수 있는 효과가 있다는 것을 나타내는 결과라고 판단된다.

한국에서 천식 처방에 사용되는 반하가 들어있는 소청령탕 (So-Cheong-Ryong-Tang)은 가정분진을 알러지원으로 유도한 생쥐 천식모델에서 기도염증을 완화시키는 효과가 있다고 보고하고 있다³⁰⁾. 또한 일본에서도 전통 약재로 사용되고

있으며, 한약재 반하가 들어있는 6개의 한약재로 만든 탕제 bakumondo (Mai-Men-Dong-Tang)의 안전성을 평가한 다음, 일반 기침 치료약으로 증상이 나아지지 않는 감염성 만성기관지염 감기 환자를 대상으로 실험한 결과 치료효과가 있다고 보고하고 있다³¹⁾. 한편, 중국에서는 반하가 들어간 8개의 한약재로 만든 Xiao-Qing-Long-Tang이 만성 천식 생쥐모델에서 알러지성 기도염증과 기도변형을 완화시키는 효과가 있다고 보고하고 있다^{26,32)}. 본 실험에서도 장기간 생쥐에 알러지원 OVA 감작화와 DEP 처리로 인한 각종 염증세포의 침윤과 기도 반응성 항진 반응에서도 반하 단독 물 추출물은 알러지와 관련된 면역 항체와 Th2 cytokine들의 증가를 완화시키는 효과가 있었다. 따라서 전통적으로 여러 가지 한약재로 만든 탕제가 감염성 만성 기관지염이나 감기, 기침, 그리고 알러지원에 의한 기관지 천식과 같은 호흡기질환에 치료 효과를 나타내는 것은 탕제의 주재료인 반하가 큰 역할을 하지 않았나 생각된다. 한편 동물실험에서 염증제거에 효과가 있으며, 한방에서 각종 염증치료를 많이 이용하는 약재 중에서 반하 물 추출물은 기관지 천식성 염증을 억제하는 효과가 다른 추출물에 비해서 우수하였다(데이터 미제시). 따라서 반하 물 추출물을 기관지 천식을 치료하기 위한 약제로서 개발 활용하기 위해서는 반하 물 추출물을 계통별로 용매 추출하여 구성 약리성분을 분리하고 구조 확인하며, 이들 성분이 직접적으로 어떻게 작용해서 나타나는 효과인지 아니면 이차 대사산물에 의해 나타나는 효과인지 더 세심한 추가 연구 및 메카니즘 연구가 필요하리라 생각된다.

결론

생쥐에 10주 동안 DEP를 알러지 항원과 함께 기도내로 장기간 투여하여 천식성 호산구성 기도염증과 기도과민성을 유발하고, 또한 반하 물 추출물을 구강내로 투여하여, 천식성 기도염증과 기도 과민성이 미치는 반하 물 추출물의 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 장기간 생쥐에 반하 열수 추출물의 투여는 DEP를 알러지 항원과 함께 기도내로 반복 투여로 인하여 발생하는 기도 과잉반응성을 완화시켰다.
2. 또한 혈액에서 기도내로 침윤하는 총 염증세포 수의 증가와 특히 호산구의 침윤 증가를 완화시켰다.
3. 그리고 기관지폐포세척액에서 cytokine IL-4, IL-5, IL-13 함량과 IFN- γ 의 함량의 증가를 완화시키며, 혈액에서 IgE 함량과 histamine 함량 증가를 조절하였다.

따라서 반하 열수 추출물은 천식성 기도염증과 기도과민성 반응에 대한 치료제로서의 가능성이 있다고 생각되며, 이에 대한 더 세심한 추가 연구 및 메카니즘 연구가 필요하리라 판단된다.

참고문헌

1. Inoue KI, Koike E, Yanagisawa R, Takano H,

- Effects of pulmonary exposure to diesel exhaust particles on extrathoracic CD4 polarization in asthmatic mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009 ; 31(1) : 71-4.
2. Ris C. US EPA health assessment for diesel engine exhaust : a review. *Inhal Toxicol*. 2007 ; 19(s1) : 229-39.
 3. Liu J, Ballaney M, Alalem U, Quan C, Jin X, Perera F, Chen LC, Miller RL. Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. *Toxicol Sci*. 2008 ; 102(1) : 76-81.
 4. Gowdy K, Krantz QT, Daniels M, Linak WP, Jaspers I, Gilmour MI. Modulation of pulmonary inflammatory responses and antimicrobial defenses in mice exposed to diesel exhaust. *Toxicol Applied Pharmacol*. 2008 ; 229(3) : 310-9.
 5. Lim HB, Lee DW. Diesel exhaust particles and airway inflammation: effect of nitric oxide synthase inhibitors. *J Kor Soc Atmos Environ*. 2002 ; 18(E2) : 121-8.
 6. Lim HB, Ichinose T, Miyabara Y, Takano H, Kumagai Y, Shimojyo N, Sagai M. Involvement of superoxide and nitric oxide on airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. *Free Rad Biol Med*. 1998 ; 25(6) : 635-44.
 7. Wang SD, Lin LJ, Chen CL, Lee SC, Lin CC, Wang JY, Kao ST. Xiao-Qing-Long-Tang attenuates allergic airway inflammation and remodeling in repetitive Dermatogoides pteronyssinus challenged chronic asthmatic mice model. *J Ethnopharmacol*. 2012 ; 142(2) : 531-8.
 8. Chen P, Li C, Liang S, Song G, Sun Y, Shi Y, Xu S, Zhang J, Sheng S, Yang Y, Li M. Characterization and quantification of eight water-soluble constituents in tubes of Pinellia ternate and in tea granules from the Chinese multiherb remedy Xiaochaihu-tang. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006 ; 843(2) : 183-93.
 9. Gao WP, Zeng X and Chen JS. Determination and comparison of effective components in polyploid Pinellia ternate and wild Pinellia ternate. *Chin Pharma J*. 2011 ; 46 : 1625-9
 10. Nagai T, Arai Y, Emori M, Nunome SY, Yabe T, Takeda T, Yamada H. Anti-allergic activity of a Kampo(Japanese herbal) medicine "Sho-seiryu-to(Xiao-Qing-Long-Tang)" on airway inflammation in a mouse model. *Int Immunopharmacol*. 2004 ; 4(10-11) : 1353-65.
 11. Cho DS, Shin DS, Paik DH, Yoon DY, Shin DM. Tyrosinase inhibitory effect of 3,4-dihydroxybenz

- aldehyde isolated from *Pinellia ternate*. *Kor J Herbology*, 2006 ; 21(2) : 1-7.
12. Kim SY, Lm SH, Cho SI, Choi CW, Kim KO. Effects of *Pinellia Rhizoma* extract on sociopsychological stress. *J Orient Neuropsychiatry*. 2009 ; 20(3) : 35-47
 13. Seo BI. A clinical study of *Banhabaechulcheonmatang* on a patient with headache due to retention of phlegm. *Kor J Herbology*. 2007 ; 22(2) : 79-82.
 14. Kim SY, Won HY, Choi CW, Kim KS, Kim KO, Lee DW. The effects of *Banhachulchunma-Tang* on dementia induced by focal brain ischemic injury in rats. *J Orient Neuropsychiatry*. 2006 ; 17(2) : 61-73.
 15. Kim YB, Chai HY, Lee KC, Yun YW, Kim DJ, Nam SY, Ro JS, Hwang BY, Kang HG. Effect on *Pinellia ternata* extract on reproduction of female rats. *Kor J Lab animal Sci*. 2005 ; 21(1) : 39-48.
 16. Kwon GR, Moon IS, Lee WC. Neuroprotective effects of *Pinelliae Rhizoma* water-extract by suppression of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential loss in a hypoxic model of cultures rat cortical cells. *J Life Sci*. 2009 ; 19(5) : 598-606
 17. Hong JH, Seo JC, Jung TY and Han SW. Effect of *Pinelliae Rhizoma* herbal acupuncture on the release of thymus and activation-regulated chemokine in human bronchial cell. *J Kor Acupunc Mixibus Soc*. 2005 ; 22(1) : 155-64.
 18. Lee YC. A therapeutic effect of *Pinelliae ternata* via the increase of CD4+CD25+ regulatory T cells and suppression of CD3+CCR3+ cellular infiltration during allergic airway inflammation. *Kor J Herbology*. 2009 ; 24(1) : 73-8.
 19. Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M, Mori Y. Biological effects of diesel exhaust particles. I. In Vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Radic Biol Med*. 1993 ; 14(1) : 37-47.
 20. Kim SH, Kim BG, Lee YC. Antiasthmatic effects on hesperidin, a potential Th2 cytokine antagonist, in a mouse model of allergic asthma. *Mediators Inflamm*, 2011 ; 2011 : ID 485402, 12 pages.
 21. Finotto S, De Sanctis GT, Lehr HA, Herz U, Buerke M, Schipp M, Bartsch B, Atreya R, Schmitt E, Galle PR, Renz H, Neurath MF. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med*, 2001 ; 193(11) : 1247-60.
 22. Shen J, Oraka E. Complementary and alternative medicine (CAM) use among children with current asthma. *Prev Med*, 2012 ; 54(1) : 27-31.
 23. Platts-Mills TA, Woodfolk JA. Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunol Rev*. 2011 ; 242(1) : 51-68.
 24. Cha JT, Lee JC, Lee YC. Comparative study on anti-asthmatic activities of *Patrinia scabiosaefolia* Fischer ex Link and *Patrinia villosa* Jussieu in a mouse model of asthma. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(3) : 75-82
 25. Jung JK, Park YK. Effects of *Saposhnikovia Radix* on allergic responses in OVA-induced allergic rhinitis mice. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(5) : 85-91.
 26. Wang SD, Lin LJ, Chen CL, Lee SC, Lin CC, Wang JY, Kao ST. *Xiao-Qing-Long-Tang* attenuates allergic airway inflammation and modeling in repetitive *Dermatogoides pteronyssinus* challenged chronic asthmatic mice model. *J Ethnopharmacol*. 2012 ; 142(2) : 531-8.
 27. Lim HB, Kim SH. Antiasthmatic effects on *Scutellaria baicalensis* Georgi extracts against airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles with ovalbumin sensitization. *Kor J Med Crop Sci*. 2012 ; 20(2) : 129-35.
 28. Kuhl K, Hananial NA. Targeting IgE in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2012 ; 18(1) : 1-5
 29. Peden D, Reed CE. Environmental and occupational allergies. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 ; 125(2) : S150-S160.
 30. Kim JY, Natarajan S, Bae HS, Jung SK, Cruikshank W, Remick DG. Herbal medicine treatment reduced inflammation in a murine model of cockroach allergen-induced asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011 ; 107(2) : 154-62.
 31. Irifune K, Hamada H, Ito R, Katayama H, Watanabe A, Kato A, Miyoshi S, Hamaguchi N, Toyozawa R, Hamaguchi S, Abe M, Nishimura K, Higaki J. Antitussive effect of bakumonto a fixed kampo(six herbal components) for treatment of post-infectious prolonged cough : Controlled clinical pilot study with 19 patients. *Phytomedicine*. 2011 ; 18(8-9) : 630-3.
 32. Nagai T, Nakao M, Shimizu Y, Kodera Y, Ohishi M, Maeda T, Yamada H. Proteomic analysis of anti-inflammatory effects of a Kampo(Japanese herbal) medicine "Shoseiryuto(Xiao-Qing-Long-Tang)" on airway inflammation in a mouse model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011 ; 2011 : ID 604196, 13 pages.