

난알부민 유도 알레르기 면역반응에 대한 당삼(黨參)에탄올추출물의 효능 연구

강석용^{1#}, 정진기¹, 이상국², 이승호³, 박용기^{1,4*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 서울대학교 약학대학 천연물과학연구소,
3 : 영남대학교 약학대학 천연물화학고실, 4 : 동국대학교 한방신약개발센터

Effects of the ethanol extract of *Codonopsis Pilosulae Radix* on ovalbumin-induced allergic responses in mice

Seok Yong Kang^{1#}, Jin Ki Jung¹, Sang Kook Lee², Seung Ho Lee³, Yong-Ki Park^{1,4*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea
2 : College of Pharmacy, Natural Products Research Institute, Seoul National University
3 : College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Republic of Korea
4 : Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The root of *Codonopsis pilosula* (Fr.) Nannf. (*Codonopsis Pilosulae Radix*) has been traditionally used as a oriental medicine with an anti-thrombotic, antidiabetic, anticancer, and anti-gastric ulcer effects and immunological adjuvant. In this study, we investigated the effect of 70% ethanol extract of *Codonopsis Pilosulae Radix* (CPR-E) on ovalbumin (OVA)-induced allergic responses in mice.

Methods : Mice were sensitized (1, 8, and 15 days) with OVA and airway challenged(22, 24, 26, 28, and 30 days) to induced allergic responses. CPR-E extract at doses of 50 and 100 mg/kg/body weight was orally administered from days 21 to 30 consecutively. The levels of allergic mediators such as histamine, OVA-specific immunoglobulin (Ig) E, and Th1/Th2 cytokines such as IFN- γ and IL-4 were measured in the sera of mice by ELISA. The histological change of lung tissue was observed by hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Results : CPR-E extract significantly decreased the serum levels of histamine, OVA-specific IgE, and IL-4 compared with those of OVA control group, but significantly increased the serum level of IFN- γ . Based on H&E staining, CPR-E extract inhibited the infiltration of inflammatory cells into lung tissues with histological changes.

Conclusions : These results indicate that CPR-E extract has anti-inflammatory and anti-allergic responses through regulating the cytokine balance, suggesting that the extract may be useful for the treatment of allergic inflammatory diseases such as bronchial asthma and allergic rhinitis.

Key words : *Codonopsis Pilosulae Radix*, ovalbumin, allergic response, inflammation, Th1/Th2 cytokine

서론

최근 현대사회는 환경오염과 생활환경의 변화로 인한 수많

은 질병이 유발되고 있고, 현대의학과 더불어 의료기술이 발전했음에도 불구하고 근본적 치료가 여전히 어려운 실정이다. 또한 인구의 고령화에 따른 당뇨병, 고혈압, 퇴행성 관절염,

* 교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학

· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

제1저자 : 강석용, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 054-770-2647 · E-mail : seokppo2@hanmail.net

· 접수 : 2013년 2월 18일 · 수정 : 2013년 3월 21일 · 채택 : 2013년 3월 21일

알레르기 질환 등의 만성 질환은 꾸준히 증가하는 추세이다¹⁾. 알레르기(allergy) 질환은 일반적으로 정상인 사람들에게 별로 해가 없는 외부항원(allergen)에 대한 불필요한 면역반응, 즉 과민반응을 보이는 것으로 항원의 반복적인 노출에 따른 변화된 상태, 즉 이상반응이라는 광범위한 의미에서부터 자극적이거나 해로운 작용을 일으키는 면역반응으로 해석되고 있다²⁻⁴⁾.

알레르기 면역반응은 항원에 대해 IgE에 의해 매개되는 면역반응으로 초기 수분 내 일어나는 즉각적 초기반응과 4~8시간 이후에 일어나는 후기 반응으로 나눌 수 있다. 초기반응은 지속적으로 항원에 노출될 경우 B세포로부터 IgE 항체가 생성되어 비만세포(mast cell)를 활성화시키고 탈과립으로 유리되는 다양한 화학매개물질(histamine, tryptase, chymase, bradykinin, heparin)에 의해 혈관확장, 점막부종, 기관지 평활근 수축, 점액 분비 증가, 콧물 생성 등이 유발되게 된다⁵⁻⁷⁾. 또한, 후기반응으로 비만세포로부터 새로운 염증매개물질(prostaglandin D₂, sulfidopeptidyl leukotriene C₄, D₄, E₄, TNF- α)을 분비함으로써 염증반응을 유발하게 된다.

한의학에서 알레르기 반응은 鼻飢, 鼻塞, 喘息, 咳嗽, 急喉痺, 癩疹, 搔癢, 癩疹 등으로 모두 鼻, 肺, 皮膚과 관련되므로 《素問》〈陰陽應象大論篇〉의 “其在天爲燥 在地爲金 在體爲皮毛 在臟爲肺.....在變動爲咳 在竅爲鼻.....熱傷皮毛.....辛傷皮毛”에서 언급된 바와 같이 肺系統의 질환으로 보고 있다^{8,9)}.

당삼(黨參)은 초롱꽃과(桔梗科 : Campanulaceae)에 속한 多年生 本草인 만삼 *Codonopsis pilosula* (Fr.) Nannf.의 뿌리로, 가을에 채취하여 지상부를 제거하고 진흙을 씻어내어 썬건하여 사용하는 한약재로 우리나라의 강원 등의 깊은 산속에 자생 혹은 재배하며, 중국에서는 동북지방과 산서, 섬서, 감숙, 사천 등에 분포한다. 性은 平하고, 味는 甘하며, 脾와 肺로 歸經 하여 補中益氣, 健脾益肺, 治脾胃虛弱, 氣血兩虧, 體倦無力, 食少, 口渴, 久瀉, 脫肛, 虛喘咳嗽의 효능을 가지고 있다. 補氣力은 人蔘에 미치지 못하나 不燥不膩하고 그 性이 緩和하여, 補氣하는 가운데 養血의 효능이 있어 氣虛血虛에 응용될 수 있다. 특히 補氣효능은 인삼과 기본적으로 비슷하여 일반적으로 補氣劑 중 인삼이 체질상 맞지 않는 경우 등에 응용이 가능하다. 즉 인삼의 熱性을 대체할 수 있는 약물이라고 할 수 있다¹⁰⁾. 또한 당삼의 효능과 관련하여 항혈전 효과¹¹⁾, 신경세포 재생 효과¹²⁾, 항당뇨 효과¹³⁾, 면역증강¹⁴⁾, 위궤양에 대한 효과¹⁵⁾, 항암효과¹⁶⁾에 대한 연구가 이루어져 있다.

난알부민(ovalbumin, OVA)와 같은 항원은 효과적으로 알레르기 과민반응을 유발할 수 있는 물질로써 B세포의 활성화에 의한 혈청 내 IgE 농도의 증가와 더불어 T세포 매개에 의한 염증성 사이토카인들은 물론, 화학주성의원인인 케모카인(chemokine)의 생산을 증가시키는 것으로 알려졌다¹⁷⁾. 특히 난알부민은 명반(alum)과 함께 면역시킬 때 이러한 면역반응을 잘 유발하는 것으로 알려져 있고 천식 및 피부습진을 야기하는 동물모델로 많이 활용되고 있다^{18,19)}. 현재 난알부민으로 알레르기 면역반응 유도 동물모델에서 당삼의 다당류로 면역학적 보조역할에 관련된 연구는 진행되었으나²⁰⁾, 직접적으로 당삼 추출물을 이용한 알레르기 면역반응 조절 효능에 대한 연구는 보고된 것이 없다.

따라서 본 연구에서는 당삼의 70% 에탄올추출물을 제조하여 난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 당

삼의 조절 효능을 확인하고자 수행하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 당삼(*Codonopsis pilosula* (Fr.) Nannf., *Codonopsis Pilosulae Radix*; CPR)은 만삼의 뿌리로서 식품의약품안전청 한약재 품질 표준화 연구사업단으로부터 70% 에탄올추출물(12C)을 제공받아 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 6주령 BALB/c계 수컷 생쥐(mouse, 20±2g)를 (주)샘타코(경기도, 한국)로부터 구입하였으며, 고형사료와 물을 제한 없이 공급하면서 온도(23±2°C)와 습도(55±5%)를 일정하게 유지되고, 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하는 환경에서 사육하였다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물실험 윤리위원회 규정에 따라 관리하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약으로 ovalbumin (OVA)과 ketotifen은 Sigma-Aldrich사(St Louice, CA, USA)로부터 구입하였으며, Al(OH)₃ gel은 InvivoGen사(InvivoGen, San Diego, USA), H&E 염색 시약(Seoulin Biosciences Co., Seoul, South Korea)과 histamine enzyme immunoassay kit(Cayman Chemical, MG, USA), Sandwich ELISA using OptEIA Set mouse OVA-specific IgE Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 및 DuoSet mouse IL-4 ELISA Kits(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다.

또한 실험기기로는 nebulizer(DeVilbiss, PA, USA), microplate reader(Asys, Eugendorf, Austria), microscope(LEICA, Wetzlar, Germany) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 동물모델 제작

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 동물모델을 제작하기 위해 먼저 난알부민(ovalbumin, chicken egg albumin; OVA) 1 mg을 PBS와 수산화알루미늄 겔(Al(OH)₃ gel)을 1:1로 혼합한 용액 0.3 ml을 실험 시작일로부터 7일간격으로 하루에 1번 3주간(1일, 8일, 15일) 마우스의 복강내 주사하였다. 마지막 복강 주사 7일 후 마우스를 50×15×50 cm 크기의 아크릴 상자 안에 넣고 2 mg/ml OVA 용액을 nebulizer 기기를 이용하여 격일 간격으로 1일 3회 5일 동안 분사함으로써 호흡을 통한 알레르기성 면역반응을 유도하였다.

실험군으로는 생리식염수를 투여한 정상군(Normal), 난알부민(OVA) 감각에 의해 알레르기 면역반응이 유발된 대조군(OVA-Control), 면역반응이 유발된 대조군에 당삼 70% 에탄올 추출물(CPR-E)을 50 mg/kg과 100 mg/kg 용량으로 투여한 실험군(OVA+CPR-E 50, OVA+CPR-E 100) 및 대조

약물로서 항히스타민제인 케토티펜(Ketotifen)을 10 mg/kg 투여한 양성대조군(OVA+Keto 10)으로 나누었으며, 각 군당 6마리의 마우스를 사용하였다. 당삼추출물과 케토티펜은 아크릴 상자 안에서 neublizer를 이용하여 airway challenge 하는 동안 매일 1회 일정 시간에 일정 투여량(0.3 ml)으로 경구 투여하였다.

실험 최종일에 모든 동물을 희생시키고 심장으로부터 혈액을 수집하였으며, 수집된 혈액은 6,000 rpm에서 5분간 2회 원심 분리함으로써 혈청을 분리하였다. 또한 폐의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 각 군으로부터 폐 조직을 수집하였다.

2) Hematoxylin & Eosin 염색

각 군으로부터 수집한 폐 조직을 4% formaldehyde 용액으로 7일간 고정된 후 파라핀으로 포매하여 블록을 제작하고 microtome을 이용하여 폐 조직을 5 µm 두께의 절편을 제작하였다. 폐 조직의 구조적 변화를 관찰하기 위해서 폐 조직 슬라이드를 60°C에서 30분 동안 가열한 다음 xylene으로 15~20분 간 탈파라핀 시키고 100%, 95%, 80%, 75% 알코올 순서대로 함수시켰다. 이를 hematoxylin과 eosin으로 염색색한 후 Permount로 커버 슬립하였다. H&E 염색된 폐 조직 슬라이드에서 기관지 상피세포층의 손상정도, 기관지와 폐포 주위 염증세포 침윤 등을 광학현미경(Leica Co., German)으로 관찰하였다.

3) 혈청 내 히스타민 농도 측정

혈청 내 히스타민의 농도는 histamine enzyme immunoassay kit(Cayman Chemical)를 이용하여 측정하였다. 먼저, 혈청 200 µl와 유도체화 완충용액 50 µl를 잘 섞어 반응시킨 다음 유도체화 시약 20 µl를 넣어 혼합시킴으로써 혈청 내 히스타민 유도체화를 유도하였다. 유도체화 된 혈청을 히스타민에 대한 항체가 붙어있는 96-well plate에 100 µl씩 넣은 후 enzyme conjugate 100 µl를 첨가하여 4°C에서 overnight로 반응시켰다. 다음날 plate를 5회 washing buffer로 세척한 다음 색소기질(chromogenic substrate) 200 µl를 넣고 암실상태에서 60~90분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 발색 정도를 microplate reader의 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 히스타민의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

4) 혈청 내 난알부민 특이 IgE 농도 측정

혈청 내 난알부민 특이 IgE 항체의 농도는 IgE ELISA kit(BD Biosciences)를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well flat-bottom ELISA plate에 0.1 M sodium carbonate 용액으로 희석한 capture antibody(1:250)를 100 µl씩 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 각 well에 10% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 1× PBS를 넣고 실온에서 1시간 동안 정치함으로써 blocking 한 후 혈청을 100 µl씩 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 다시 5회 washing buffer로 세척한 다음 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 plate를 5회 세척한 다음 각 well에 기질용액인 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)를

넣어 10분 동안 암실상태에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였다. 반응이 끝난 후 각 well에 정지액(stop solution)을 50 µl씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 IgE의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

5) 혈청 내 사이토카인 농도 측정

혈청 내 IL-4와 IFN-γ의 농도는 각 사이토카인에 대한 ELISA kit(R&D Systems)를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well flat-bottom ELISA plate에 0.1 M sodium carbonate 용액으로 희석한 capture antibody(1:250)를 100 µl씩 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 각 well에 10% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 1× PBS를 넣고 실온에서 1시간 동안 정치함으로써 blocking한 후 혈청을 100 µl씩 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 다시 5회 washing buffer로 세척한 다음 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 plate를 5회 세척한 다음 각 well에 기질용액인 TMB를 넣어 10분 동안 암실상태에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였다. 반응이 끝난 후 각 well에 정지액을 50 µl씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 IL-4와 IFN-γ의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

6) 통계학적 검증

모든 실험결과는 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검증은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램을 이용하여 one-way ANOVA와 Tukey's test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 혈청 내 히스타민 분비에 대한 효과

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 당삼 에탄올추출물(CPR-E)의 히스타민 생성에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 혈청 내 히스타민의 농도를 효소면역분석법으로 측정하였다. 그 결과, 그림 1에서와 같이 혈청 내 히스타민의 농도는 정상군(Normal)에 비하여 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(OVA-Control)에서 현저히 증가되었다. 반면, 당삼추출물을 50 mg/kg 투여한 군(OVA+CPR-E 50)과 100 mg/kg 투여한 군(OVA+CPR-E 100)에서는 모두 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 또한 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서도 대조군에 비해 히스타민의 농도가 유의적으로 감소하였다.

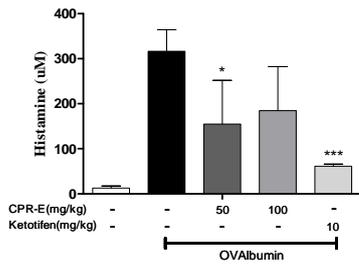


Fig 1. Effect of CPR-E on OVA-induced release of histamine in the sera of mice. Serum was collected from the mice treated with or without CPR-E extract at doses of 50 and 100 mg/kg during airway challenge of OVA in mice. The control group was sensitized/challenged of OVA with PBS. The histamine levels was analyzed in the ssera of mice by enzyme-immunoassay as described in the Materials and Methods. Results are expressed as the mean±SD (n=6 per a group). PR-E, PR-E extract-administrated group and Keto, Ketotifen 10 mg/kg-administrated group. **P* < 0.05 and ****P* < 0.001 vs. OVA-control group.

2. 혈청 내 난알부민 특이 IgE 분비에 대한 효과

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 당삼 에탄올추출물(CPR-E)의 IgE 항체 생성에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 혈청 내 난알부민-특이 IgE의 농도를 효소 면역반응법으로 측정하였다. 그 결과, 그림 2에서와 같이 혈청 내 난 알부민 특이 IgE의 농도는 정상군(Normal)에 비해 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유발된 대조군(OVA-Control)에서 현저히 증가되었다. 반면, 당삼추출물을 50 mg/kg 투여한 군(OVA+CPR-E 50)과 100 mg/kg 투여한 군(OVA+PR-E 100)에서는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서도 대조군에 비해 IgE의 농도가 유의적으로 감소하였다.

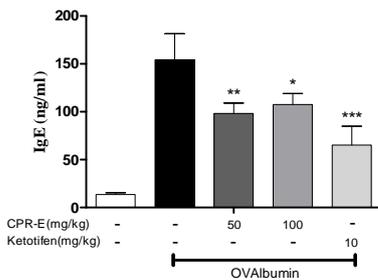


Fig 1. Effect of CPR-E on OVA-induced release of IgE in the sera of mice. Serum was collected from the mice treated with or without CPR-E extract at doses of 50 and 100 mg/kg during airway challenge of OVA in mice. The control group was sensitized/challenged of OVA with PBS. The OVA-specific IgE levels was analyzed in the ssera of mice by enzyme-immunoassay as described in the Materials and Methods. Results are expressed as the mean±SD (n=6 per a group). PR-E, PR-E extract-administrated group and Keto, Ketotifen 10 mg/kg-administrated group. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs. OVA-control group.

3. 혈청 내 면역조절 사이토카인 분비에 대한 효과

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 당삼 에탄올추출물(CPR-E)의 알레르기 면역반응에 대한 조절 효과를 확인하기 위해 혈청 내 Th2 사이토카인인 IL-4와

Th1 사이토카인인 IFN- γ 의 농도를 효소면역반응법으로 측정하였다. 그 결과, 그림 3에서와 같이 혈청 내 IL-4의 농도는 정상군(Normal)보다 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(OVA-Control)에서 현저히 증가하였다. 반면, 당삼추출물을 50 mg/kg 투여한 군(OVA+CPR-E 50)과 100 mg/kg 투여한 군(OVA+CPR-E 100)에서는 대조군에 비해 감소하였으나 100 mg/kg 투여한 군보다 50 mg/kg 투여한 군에서 IL-4농도가 더 유의적으로 감소하였다. 또한 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서도 대조군에 비해 IL-4의 농도가 유의적으로 감소하였다.

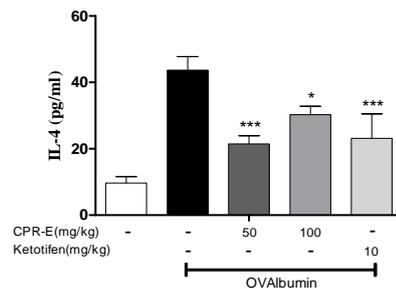


Fig 3. Effect of CPR-E on OVA-induced release of IL-4 in the sera of mice. Serum was collected from the mice treated with or without CPR-E extract at doses of 50 and 100 mg/kg during airway challenge of OVA in mice. The control group was sensitized/challenged of OVA with PBS. The IL-4 levels was analyzed in the ssera of mice by enzyme-immunoassay as described in the Materials and Methods. Results are expressed as the mean±SD (n=6 per a group). PR-E, PR-E extract-administrated group and Keto, Ketotifen 10 mg/kg-administrated group. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs. OVA-control group.

한편, 그림 4에서와 같이 혈청 내 IFN- γ 의 농도는 정상군(Normal)보다 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(OVA-Control)에서 알레르기 유발에 따라 IFN- γ 의 농도가 감소하였다. 반면, 당삼추출물을 투여한 모든 군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서도 대조군에 비해 유의적으로 IFN- γ 의 농도가 감소하였다.

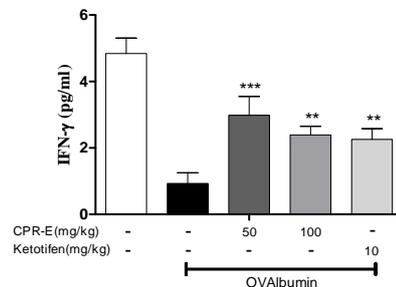


Fig 4. Effect of CPR-E on OVA-induced release of IFN- γ in the sera of mice. Serum was collected from the mice treated with or without CPR-E extract at doses of 50 and 100 mg/kg during airway challenge of OVA in mice. The control group was sensitized/challenged of OVA with PBS. The IFN- γ levels was analyzed in the ssera of mice by enzyme-immunoassay as described in the Materials and Methods. Results are expressed as the mean±SD (n=6 per a group). PR-E, PR-E extract-administrated group and Keto, Ketotifen 10 mg/kg-administrated group. ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 vs. OVA-control group.

4. 폐 조직 손상에 대한 효과

난알부민으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 길경 에탄올추출물(CPR-E)의 폐 조직 손상에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 폐 조직을 H&E 염색하였다. 그 결과, 그림 5에서와 같이 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 대조군(OVA-Control)의 폐 조직에서는 세기관지 상피세포층 손상과 더불어 기관지 및 폐포 주위로 염증세포의 침윤이 발달하는 것을 관찰하였다. 반면 당삼추출물을 50 mg/kg 투여한 군(OVA+CPR-E 50)에서는 대조군과 동일하게 폐 조직 손상과 염증 침윤이 개선되지 않았으나, 100 mg/kg 투여한 군(OVA+CPR-E 100)에서는 기관지 상피세포층의 보존과 더불어 염증세포의 침윤이 대조군에 비해 감소하였다. 또한 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서는 기관지 상피세포층은 대조군에 비해 보존되었으나, 당삼추출물을 투여한 군에 비해서 염증세포의 침윤은 감소하지 않는 것으로 나타났다.

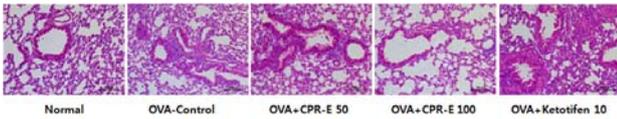


Fig 5. Effect of CPR-E on OVA-induced histopathological changes in lung tissue of mice. Lung tissues were stained with H&E (x200). Normal, Lung tissues were obtained from PBS-administrated mice; OVA-control, OVA-sensitized/challenged mice; OVA+CPR-E 50 or 100, OVA-control group administrated with CPR-E extract 50 mg/kg or 100 mg/kg; and OVA+Keto 10, OVA-control group administrated with Ketotifen 10 mg/kg.

고찰

면역이란 생체가 자기와 비자기를 식별하여 외부로부터 침입하는 각종 미생물 동종의 조직 체내에 생긴 불필요한 산물들과 특이하게 반응하여 항체를 만들고 이것을 배제하여 개체의 정상상태와 항상성을 유지하는 현상이다. 이는 한의학에서 질병의 발생 및 전변과정을 正氣와 外邪 및 七情, 飲食, 痰飲, 瘀血 등의 발병인자 간에 소장진퇴의 과정으로 설명하고 있는 것과 연관 지어 생각할 수 있다. 즉 면역을 病邪로부터 인체를 보호하는 正氣와 밀접한 상관성을 두고, 正氣不足은 곧 면역기능 저하와 관련지어 설명할 수 있다. 또한 《黃帝內經·靈樞·營衛生成編》에서 “衛出於下焦”라 하였으니 衛氣의 근본이 되는 下焦 즉 肝腎을 보하는 것이 면역능력을 강화하게 하는 것임을 유추할 수 있다. 즉 腎陽을 强壯케하고 精血을 補益하며 筋骨을 强하게하는 약물을 투여함으로써 면역기능의 증가를 유추해볼 수 있다²¹⁾.

면역반응에 있어, 식품의 부작용은 특정 음식물이나 첨가물에 의해 알레르기 반응으로 나타나는데 특정 물질(항원)에 대한 항체를 생산함으로써 과민반응을 더욱 증가시킨다. 항원들 중 난알부민은 마우스와 랫드에 감작(sensitization) 시 혈청 내 IgE와 Th2 사이토카인이 매우 증가되는데, 천식과 아토피피부염과 유사한 알레르기성 질환을 유발한다. 난알부민에 감작되면 혈청 내 항체뿐만 아니라 호산구(eosinophils)의 조직으로의 침윤이 현저히 증가되고, 비만세포(mast cell)와 호염구(basophils)에서 Fcε RI와 매우 강력한 결합에

의하여 알레르기 면역반응을 유도하는 것으로 알려졌다. 따라서 난알부민을 항원으로 IgE와 IL-4와 같은 Th2 사이토카인의 증가는 기관지천식, 알레르기성 고초열과 아토피피부염 등 환경성 질환의 중증도와 연관되어 핵심지표로 알려져 있다^{19,22-24)}.

비만세포(mast cell)는 알레르기 반응에 관여하는 핵심 면역세포로서 신체의 거의 모든 조직에 존재하지만 주로 외부 환경과 접하는 부분, 즉 피부, 내장 및 호흡기에서 많이 발견된다^{5,25)}. 외부 항원자극에 의하여 B세포로부터 생성되는 IgE 항체가 비만세포 표면의 Fcε RI에 교차결합을 하면서 비만세포가 활성화되면 알레르기 염증반응을 일으키는 매개체를 생산, 분비하게 되는데 이러한 매개체에는 자극을 받기 전에 이미 생성되어 과립 내에 저장되어 있는 물질(prefomed mediators)과 자극을 받은 후에 새롭게 생성, 유리되는 물질(newly synthesized mediators)이 있다²⁶⁾. 이러한 매개물질들은 염증촉진작용을 하여 급만성 염증반응을 유발하게 되고, 이들은 혈관을 이완시키거나, 혈관투과도를 증가시키고, 중성구, 호산구, 호염기구 등의 과립세포들과 T세포, B세포, 수지상세포(dendritic cells), 단핵구세포 등을 유입시키거나 활성화시키게 됨으로써 염증반응에 의하여 조직이 파괴되거나 리모델링이 되기도 한다²⁷⁾. 또한 비만세포에서 분비되는 TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 등의 사이토카인은 중성구와 호산구를 응집하는 역할을 하며 염증반응 유발에 중요한 역할을 한다. 특히 IL-4는 Th2 T 세포와 자연살해세포(NK cell), 비만세포, 중성구 및 호산구로부터 분비되어 B세포의 분화와 증식, IgE 생성 등을 통해 알레르기 면역반응을 유도하는 핵심 사이토카인이다. 한편 IFN-γ는 IL-4에 대한 길항작용을 하는 Th1 사이토카인으로써 IgE 항체의 생성을 억제함으로써 IL-4와 더불어 알레르기 면역반응 조절에 중요한 역할을 한다²⁸⁾. 즉, 대부분의 알레르기 질환은 IFN-γ를 분비하는 Th1 세포와 IL-4를 분비하는 Th2 세포 사이의 항상성 유지의 실패로 IL-4의 과도한 생성을 통해 유발하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 당삼의 에탄올추출물은 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 혈청 내 히스타민과 난알부민-특이 IgE의 농도를 유의적으로 감소시키고, Th2 사이토카인인 IL-4의 분비는 억제하고, Th1 사이토카인인 IFN-γ의 분비는 증가시킴으로써 알레르기 반응 매개물질들의 분비 억제 뿐 아니라 Th1/Th2 사이토카인의 균형조절을 통해 면역기능을 회복시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 당삼 추출물이 각 종 알레르기 질환의 공통병태생리 조절을 통해 개선시킬 수 있음을 의미한다.

한편, 천식과 같은 호흡기 질환에서 기도의 염증은 호산구, 비만세포, 림프구 뿐 아니라 대식세포, 호중구, 기도 상피세포 등의 다양한 염증세포가 관여하고 있으며, 실제 천식에서는 알레르기 염증반응에 의한 기도 구조의 변형(airway remodeling)으로 폐 기능의 지속적인 이상소견이 초래되는 것으로 보고되고 있다²⁹⁾. 본 연구에서 당삼의 에탄올추출물은 알레르기 면역반응이 유도된 마우스의 폐 조직에서 난알부민 감작으로 인한 기관지 상피세포의 손상과 폐 조직의 구조적 손상을 줄여주었으며, 각 종 알레르기성 염증세포들의 폐 조직으로의 침윤을 억제함으로써 폐 조직에서의 염증반응을 막아주는 것으로 나타났다. 이는 당삼 추출물이 알레르기 면역반응에 따른 여러 매개물질의 생성과 분비를 막고, 면역조절

사이토카인들의 항상성을 유지시킴으로써 알레르기 과민반응으로부터 폐 조직을 보호할 수 있음을 의미한다.

결론적으로 본 연구결과에서 당삼의 에탄올추출물은 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 혈청 내 히스타민과 난알부민 특이 IgE의 분비를 감소시켰으며, IL-4의 감소와 IFN- γ 의 증가를 통해 Th1/Th2 면역반응의 항상성을 회복시켰고, 폐 조직에서의 염증세포 침윤 억제를 통해 염증반응을 막아주는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 당삼 추출물이 IgE-매개의 알레르기 면역반응을 잘 조절할 수 있다고 보아지며, 기관지 천식, 알레르기 비염, 아토피 등 알레르기 면역반응의 공통 병태생리를 갖는 각종 알레르기 질환의 치료제 개발 소재로써 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

결론

본 연구는 난알부민 감작으로 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 당삼 70% 에탄올추출물의 조절효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 당삼추출물은 난알부민 유도 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 혈청 내 히스타민과 난알부민-특이 IgE의 분비를 유의적으로 감소시켰다.
2. 당삼추출물은 난알부민 유도 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 혈청 내 Th2 사이토카인인 IL-4의 분비를 유의적으로 감소시키고, Th1 사이토카인인 IFN- γ 의 분비를 유의적으로 증가시켰다.
3. 당삼추출물은 난알부민 유도 알레르기 면역반응이 유도된 마우스에서 폐 조직의 기관지 상피층 손상을 막고, 염증세포 침윤을 억제시킴으로써 폐 조직 손상을 억제하였다.

본 연구결과로부터 당삼의 70% 에탄올추출물은 알레르기 면역반응 유도 매개물질들의 분비를 감소시키고, 면역조절 사이토카인의 항상성을 회복시킴으로써 각종 알레르기 질환 치료에 효과적일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(한약재 품질 표준화 연구사업)을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Jung JK, Park YK. Dose range finding study of KOB03, a new polyherbal medicine for the treatment of allergic rhinitis, by oral administration for four

- weeks in Sprague-Dawley rats. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(3) : 101-6.
2. Park YC, Lim JD, Park YK, Yoon MS, Lee SD. Review : Clinical application and efficacy of herbal medicines by modulating cytokines in atopic dermatitis-induced animal model. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(4) : 33-44.
3. Korean Journal of Asthma, Allergy and Clinical Immunology, Asthma and Allergy disease. Seoul : Koonja publisher. 2002 ; 66 : 431-3.
4. seoul National University College of Medicine, Immunology. Seoul : Seoul National University publisher. 1987 : 188-97.
5. Ahn KM. Role of mast cell in allergic inflammation and innate immunity. *Korean J Pediatrics*. 2004 ; 47(11) : 1137-41.
6. Kim SH, Kim SA, Park MK, Kim SH, Park YD, Na HJ, Kim HM, Shin MK, Ahn KS. Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulation histamine and TNF- α . *International Immunopharmacology*. 2004 ; 4 : 279-87.
7. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Reviews Immunology*. 2002 ; 2 : 773-86.
8. Choi KJ. Effect of Saururus chinensis (Lour.) Baill Aquacupuncture on Allergy in Mice. Dongeui university. 2004 : 1-23.
9. Hong WS. JungkyoHuangjenaegyongsomun. seoul : Dongyang medicine Institute publisher. 1981 : 24, 39, 119.
10. The whole country a college of Orental medicine The joint textbook publish commission compilatioin, herbology. seoul : yonglimsa. 2006. 578-9.
11. Ryu HY, Ahn SM, Kim JS, Sohn HY. Evaluation of In-vitro Anticoagulation Activity of 33 Different Medicinal Herbs. *Journal of Life Science*. 2010 ; 20(6) : 922-8.
12. Chen HT, Tsai YL, Chen YS, Jong GP, Chen WK, Wang HL, Tsai FJ, Tsai CH, Lai TY, Tzang BS, Huang CY, Lu CY. Dangshen (Codonopsis pilosula) activates IGF-I and FGF-2 pathways to induce proliferation and migration effects in RSC96 Schwann cells. *Am J Chin Med*. 2010 ; 38(2) : 359-72.
13. He K, Li X, Chen X, Ye X, Huang J, Jin Y, Li P, Deng Y, Jin Q, Shi Q, Shu H. Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 137(3) : 1135-42.
14. Sun YX. Immunological adjuvant effect of a water-soluble polysaccharide, CPP, from the roots of Codonopsis pilosula on the immune responses to ovalbumin in mice. *Chem Biodivers*. 2009 ; 6(6) : 890-6.

15. Wang ZT, Du Q, Xu GJ, Wang RJ, Fu DZ, Ng TB. Investigations on the protective action of *Condonopsis pilosula* (Dangshen) extract on experimentally-induced gastric ulcer in rats. *Gen Pharmacol*. 1997 ; 28(3) : 469-73.
16. Xu C, Liu Y, Yuan G, Guan M. The contribution of side chains to antitumor activity of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula*. *Int J Biol Macromol*. 2012 ; 50(4) : 891-4.
17. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med*. 2001 ; 194(10) : 1541-7.
18. Yanase Y, Hiragun T, Uchida K, Ishii K, Oomizu S, Suzuki H, Mihara S, Iwamoto K, Matuo H, Onishi N, Kameyoshi Y, Hide M. Peritoneal injection of fucoidan suppresses the increase of plasma IgE induced by OVA-sensitization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 ; 387(3) : 435-9.
19. Oh SW, Pae CI, Lee DK, Jones F, Chiang GK, Kim HO, Moon SH, Cao B, Ogbu C, Jeong KW, Kozu G, Nakanishi H, Kahn M, Chi EY, Henderson WR Jr. Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol*. 2002 ; 168(4) : 1992-2000.
20. Sun YX. Immunological adjuvant effect of a water-soluble polysaccharide, CPP, from the roots of *Codonopsis pilosula* on the immune responses to ovalbumin in mice. *Chem Biodivers*. 2009 ; 6(6) : 890-6.
21. Kim HJ, Hwang SY, Mok JY, Hwang BS, Jeong SI, Jang SI. Gagam-Gongjin-dan Extract Attenuates Immune Responses to Ovalbumin in Balb/c Mice. *Kor J Herbology*. 2009 ; 24(4) : 127-35.
22. Yanase Y, Hiragun T, Uchida K, Ishii K, Oomizu S, Suzuki H, Mihara S, Iwamoto K, Matsuo H, Onishi N, Kameyoshi Y, Hide M. Peritoneal injection of fucoidan suppresses the increase of plasma IgE induced by OVA-sensitization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 ; 387(3) : 435-9.
23. Kimura M, Sasada T, Kanai M, Kawai Y, Yoshida Y, Hayashi E, Iwata S, Takabayashi A. Preventive effect of a traditional herbal medicine, Hochuekki-to, on immunosuppression induced by surgical stress. *Surg Today*. 2008 ; 38(4) : 316-22.
24. Kralovec JA, Power MR, Liu F, Maydanski E, Ewart HS, Watson LV, Barrow CJ, Lin TJ. An aqueous *Chlorella* extract inhibits IL-5 production by mast cells in vitro and reduces ovalbumin-induced eosinophil infiltration in the airway in mice in vivo. *Int Immunopharmacol*. 2005 ; 5(4) : 689-98.
25. Weber A, Knop J, Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br J Dermatol*. 2003 ; 148(2) : 224-8.
26. Schwartz LB, Huff TF. Biology of mast cells. In : Middleton E, editor. *Allergy : Principles and practice*. 5th ed. Mosby St. Louis. 1998 : 261-76.
27. Kim YH. The role of mast cells in innate and adaptive immunity. *J Life Sci*. 2008 ; 18(6) : 891-6.
28. Jung HY. *Molecular biology of cytokines*. worldscience publishing company. 2002 : 117-24.
29. Koh YY. Pathophysiology of asthma. *Pediatr Allergy Respir Dis*. 2000 ; 10(4) : 255-62.