

곽향(藿香)의 난알부민으로 유도된 천식 마우스에서의 천식개선 효능연구

강석용^{1#}, 박용기^{1,2*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터

Effects of *Agastachis Herba* extract on OVA-induced allergic asthma in mice

Seok Yong Kang^{1#}, Yong-Ki Park^{1,2*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea
2 : Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the effects of *Agastachis Herba* water (AH-W) extract on compound 48/80-induced mast cell degranulation and histamine release in human mast cells and also anti-asthmatic effect of AH-W extract on ovalbumin (OVA)-induced asthma in mice.

Methods : Human mast cells, HMC-1 were treated with AH-W extract in the presence or absence of compound 48/80 (C48/80). Mast cell degranulation was observed by microscope, and the histamine release was measured in culture medium by ELISA. For preparation of asthmatic in vivo model, mice were sensitized (0, 7, and 14 days) with OVA and airway challenged (21, 23, 25, 27, and 29 days). AH-W extract at doses of 100 and 300 mg/kg/body weight was orally administered during OVA challenge once per a day. The levels of immunoglobulin (Ig) E, and Th1/Th2 cytokines, IFN- γ and IL-4 were measured in the sera of mice by ELISA. The histopathological change of lung tissues was observed by hematoxylin and eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff (PAS) staining.

Results : The treatment of AH-W extract significantly decreased the mast cell degranulation and histamine release in C48/80-stimulated HMC-1 cells. In addition, The administration of AH-W extract at does of 100 and 300 mg/kg significantly decreased the serum levels of OVA-specific IgE compared with those of OVA control group. In H&E and PAS staining, AH-W extract inhibited OVA-induced airway inflammation, and inflammatory cells infiltration, and also histopathological damages on lung tissues such as bronchiole epithelial desquamation, goblet cells hyperplasia, and mucin releasing.

Conclusions : These results indicate that AH-W extract may improve asthmatic symptoms through mast cell stabilization and inhibiting the lung inflammation in bronchial asthma.

Key words : *Agastachis Herba*, Asthma, OVA, airway inflammation

서론

곽향(藿香, *Agastachis Herba*)은 꿀풀과(唇形科: Labiatae)에 속한 다년생 초본인 배초향 *Agastache rugosa*(Fisch, et Meyer) O. Kuntze의 전초로 성미(性味)는 미온(微溫), 신(辛)하고, 귀경(歸經)은 비(脾), 위(胃), 폐(肺)에 입하여, 방향화탁

(芳香化濁), 개위지구(開胃止嘔), 발표해서(發表解暑)에 효능으로 습탁중저(濕濁中阻), 완비구토(腕痞嘔吐), 서습권태(暑濕倦怠), 흉민불서(胸悶不舒), 한습폐서(寒濕閉暑), 복통토사(腹痛吐瀉), 비연두통(鼻淵頭痛)에 응용하며, 정유의 80%를 이루고 있는 주성분인 methylchavicol외 anethole, anisaldehydel, α -limonene, ρ -metlioxycinnaldehyde, α -pinene, β -pinene

*Corresponding author : Yong-Ki Park, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

· Tel : +82-54-770-2661 · Fax : +82-54-770-2661 · E-mail : Yongki@dongguk.ac.kr

#First author : Seok Yong Kang, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

· Tel : +82-54-770-2647 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : seokppo2@hanmail.net

· Received : 2 March 2015 · Revised : 26 May 2015 · Accepted : 26 May 2015

등이 알려져 있으며¹⁾, 효능과 관련한 실험연구로는 대식세포에서의 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 인산화 억제로 NO와 pro-inflammatory cytokine들의 조절을 통한 항염증효과²⁾, 저밀도지방단백질수용체 결핍 동물모델에서의 VCAM-1 발현과 대식세포 침윤억제를 통한 항 아테로마 효과³⁾, 과산화수소(H₂O₂)로 산화적 손상을 유도한 섬유아세포(NIH 3T3)에서의 자유 라디칼 소거 및 DNA 손상과 지질 과산화에 대한 보호를 통한 항산화 효과⁴⁾ 등이 보고되었다.

알레르기(allergy)란 그리스어의 '변형된 것'이라는 allos를 어원으로 한 '과민반응'을 의미하며, 외부항원(allergen)에 대하여 정상적인 사람과는 다르게 비정상적으로 일어나는 과민성 면역반응으로 두드러기, 가려움증, 콧물, 기침 등이 대표적인 증상이다⁵⁾. 알레르기 반응은 외부항원에 대한 반복적인 노출에 따른 체내 대량의 항체(immunoglobulin, Ig) 생성에 의해 매개되는데, 항체에는 IgG, IgA, IgM, IgD, IgE로 이중 특히 IgE에 의해 매개되는 제1형 과민반응이 가장 일반적이며 IgE는 인체의 외부 자극물질과 쉽게 접촉되는 부위인 눈, 피부, 호흡기관, 혈관주위, 위장점막관에 분포되어 있는 비만세포(mast cell) 표면 수용체(Fcε RI)와 결합함으로써 일련의 반응을 거쳐 여러 화학매개물질을 유리시킴으로써 알레르기 질환을 유발하게 된다^{6,7)}.

오늘날 보다 더 나은 양질의 의료서비스를 제공받음으로써 삶의 질이 향상되었음에도 불구하고 알레르기 질환은 계속적으로 증가하는 추세이며, 이는 기후변화, 산업화, 배기가스, 흡연 등에 의한 환경오염과 빈번한 화학물질의 사용, 그리고 유전적 요인 등 복합적인 원인으로 인해 인체 면역계(immune system)의 혼란을 초래함으로써 인체 내 항상성(homeostasis) 유지에 실패하였기 때문이다⁸⁾. 알레르기 질환들 중 천식(asthma)은 호흡 시 여러 가지 외부자극물질에 대한 기관지의 과민반응으로 기관지를 비롯한 기도점막에 염증을 일으키고 부어오르며 기관지가 좁아지면서 천명(wheezing)을 동반한 기침(cough)과 객담(sputum), 호흡곤란(dyspnea)이 발작적으로 나타나는 질환이다⁹⁾. 천식은 여러 가지 외부항원의 자극에 따른 기도의 과민반응, 가역적인 기도폐색, 기도의 염증성 반응을 보이는 질환으로 정의하고 있다¹⁰⁾. 천식은 전 세계적으로 3억 명 가량의 환자가 보고되고 있으며, 주요 보건학적인 문제 질환으로 연간 250,000명 정도가 사망하고¹¹⁾, 천식을 포함한 하기도질환에 의한 사망은 인구 10만 명당 15.6명으로 암, 심장 질환, 뇌혈관 질환, 고의적 자해(자살), 당뇨병, 폐렴에 이은 7번째 국내 주요 사망요인으로 보고되고 있다¹²⁾.

천식에 의한 기도염증은 기도 평활근의 과다형성과 비대, 배상세포(goblet cell) 증식에 있으며 비만세포, 대식세포, 호산구 및 T-림프구 등의 염증세포 활성화와 각종 매개물질의 분비에 의해 유발된다. 또한 알레르기성 천식은 IgE항체 생성과 관련되는데 비만세포 수용체와의 IgE-Fcε RI complex형성을 통해 히스타민(histamine), 저분자 ECF-A(eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis), 고분자 NCF(neutrophil chemotactic factor)와 세포막 인지질 대사산물로서 새롭게 생성되는 prostaglandin(PG)과 leukotriene(LT)등의 화학매개물질을 세포 밖으로 방출시킴으로써 급성 과민반응 및 염증 반응을 지속시키게 된다¹³⁾. 따라서 천식 환자에서는 기도 내로 알레르기 항원이 들어오게 되면 비만세포로부터 히스타민과 류코트리엔(leukotriene) 등이 분비되면서 기관지 수축이 일

어나고, 기관지 내 염증세포 침윤과 염증물질 분비를 통해 급성 및 만성염증이 발달하게 된다^{6,7)}. 한편 다른 염증세포인 호산구(eosinophil)는 major basic protein, eosinophilic-derived neurotoxin, cationic protein, peroxidase 등의 염증성 단백질을 함유하고 있어 기도상피세포에 직접적 손상을 야기할 뿐 아니라, 기도과민성을 증가시키며 비만세포 탈과립(degranulation)을 유도함으로써 천식 발병에 중요한 역할을 한다.

한편, 한의학에서 천식은 천증(喘證) 혹은 효천증(哮喘證)의 범주에 속하는 질환으로 평흡급축(呼吸急促)하고 천오유성(喘鳴有聲)하는 증후군을 의미한다. 또한 천식 발생의 주요장부는 폐(肺)로 풍한(風寒), 담(痰) 등의 원인에 의해 발생하며, 칠정(七情)이나 음식(飲食)의 실절(失節), 과로(過勞)가 원인이 되어 발생하기도 한다. 한의학에서 알레르기 천식과 관련 있는 증후로는 효천(哮喘), 담천(痰喘) 등으로 폐경풍열형(肺經風熱型), 폐비기허형(肺脾氣虛型), 비신양허형(脾腎陽虛型), 폐신음허형(肺腎陰虛型) 등 여러 유형으로 나누어 치료하는데 치료는 정허(正虛)와 사실(邪實)에 따라 허증(虛證)과 실증(實證)으로 대별하고 있으며, 허증(虛證)은 외감(外感), 담(痰), 음식(飲食), 익신(益腎)을 근간으로 하여 화담정천(化痰定喘)하는 처방을 사용하고, 실증(實證)은 거풍한(去風寒), 화담(化痰), 강기선폐(降氣宣肺), 청열소습(清熱燥濕), 온폐(溫肺) 등의 처방을 사용하고 있다¹⁴⁾. 현대의학에서 천식의 치료는 흡입 스테로이드, 류코트리엔 조절제, 크로몰린제, 지속형 경구 베타2 항진제, 항 IgE 항체(Omalizumab), 경구 스테로이드제 등의 질병조절제와 속효성 흡입 베타2 항진제(agonist), 지속성 베타2 항진제, 경구 스테로이드 등의 증상완화제를 사용하고 있으며 이들은 근본적 원인을 제거하는 것이 아닌 일시적 증상 개선제들로 목소리 변성, 심혈관 자극, 골격근 진전, 저칼슘혈증, 위장관 증상, 부정맥, 빈맥 등 다양한 부작용이 보고되고 있다¹⁵⁾. 따라서 최근 천식의 급격한 증가와 일시적 증상개선 중심이 아닌 다양한 면역조절작용을 통한 원인치료약물 발굴과 의약품개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 광향이 가지고 있는 미온한 성질과 더불어 폐의 입하는 광향의 귀경이 기준에 보고된 항염증 효과와 연관되므로 천식에서도 효과가 있을 것으로 보여 우리나라 광향과 유사약재인 광광향의 물 추출물을 제조하여 비만세포에서의 탈과립(mast cell degranulation)과 histamine 유리 억제 효과 및 난알부민(ovalbumin)에 의해 천식이 유도된 마우스(asthmatic mouse)에서의 개선효능을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 광향(Agastachis Herba; AH)은 배초향(*Agastache rugosa*)의 지상부로서 경주(한국)에서 재배한 것이며, 광광향(*Pogostemon cablin*)은 파당(인도네시아)에서 재배한 것으로서 식품의약품안전처 한약재 품질 표준화연구사업단으로부터 제공받아 사용하였다.

2) 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 6주령 BALB/c계 수컷 마우스(20 ± 2 g)로 (주)샘타코(경기도, 한국)로부터 구입하였으며, 고행사료와 물을 제한 없이 공급하면서 온도(23 ± 2°C)와 습도(55 ± 5%)를 일정하게 유지하면서 12시간 낮, 12시간 밤의 생활리듬으로 1주일 동안 순화시킨 후 모델제작에 사용하였다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물실험 윤리위원회 규정에 따라 관리하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 세포 배양용 시약으로는 Iscove's Modified Dulbecco's Media(IMDM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S)은 GenDEPOT (USA)사에서 구입하였으며, 비만세포 탈과립 평가를 위해 Compound 48/80, 3-4,5-dimethylthazol-2-yl-2,5-tetrazolium bromide(MTT) (Amresco, USA), Histamine release assay kit(Cayman Chemical, MG, USA)를 사용하였고, 동물모델 제작을 위해 ovalbumin(OVA)(Sigma-Aldrich, St Louice, CA, USA), Al(OH)₃ gel(Invivogen, San Diego, USA)을 사용하였다. 또한 효능 평가를 위해서 OVA-specific IgE Kit(BD Biosciences, San Diego, CA, USA), murine IL-4, IFN- γ ELISA Kits(Peprotech., Rocky Hill, NJ, USA), H&E 염색 시약(Seoulin Biosciences Co., Seoul, Korea), PAS 염색 시약(Muto, Kyoto, Japan) 등을 사용하였고, 실험기기로는 Nebulizer(Devilbiss, PA, USA), microplate reader(Asys, Eugendorf, Austria), microscope(LEICA, Wetzlar, Germany) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 제조

곽향과 광곽향의 물 추출물은 식품의약품안전처 한약재 품질 표준화연구 사업단으로부터 제공받았다. 추출방법은 다음과 같다. 각 한약재 200 g에 각각 정제수 2 L를 가하여 열탕추출기에서 3시간동안 가열한 후 추출물을 3겹 거즈 및 와트만(Whatman No.1) 여과지로 여과하고, 남은 약재에 다시 정제수 2 L를 가하여 동일한 조건에서 재 가열한 후 여과하였다. 이를 회전식 감압농축기를 이용하여 감압농축한 후 동결 건조함으로써 최종 추출물을 획득하였다. 이때 곽향의 수율은 11.0%, 광곽향의 수율은 12.5%였으며, 약물은 냉장보관 하면서 실험직전 1x PBS 또는 생리식염수(saline)에 녹여 사용하였다.

2) 비만세포 배양

사람의 비만세포주인 human mast cell-1(HMC-1) 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 넣은 Iscove's Modified Dulbecco's Media(IMDM) 세포 배양액으로 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 37°C 조건으로 배양하였다.

3) 비만세포에서의 독성평가

HMC-1 세포에 대한 곽향 및 광곽향 물 추출물의 독성정도를 평가하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. 즉,

HMC-1 세포(5 × 10⁴ cells/well)를 96-well culture plate에 100 μ l IMDM 배지와 함께 하룻밤 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양한 다음, 여러 농도의 곽향 및 광곽향 물 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 50 μ l 씩 넣어 4시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도한 후 반응액을 제거하고 100 μ l의 DMSO 용액 첨가하여 보라색의 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 발색정도를 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성정도는 세포만 배양한 대조군의 100% 생존도를 기준으로 상대적 생존도(cell viability; %)를 계산하였다.

4) 비만세포에서의 탈과립 평가

비만세포의 탈과립(degranulation) 현상을 관찰하기 위하여 HMC-1 세포(2 × 10⁵ cells/ml)를 6-well culture plate에 하룻밤 배양한 다음 여러 농도의 곽향 및 광곽향 물 추출물을 처리하고 60분간 배양하였다. 여기에 compound 48/80(10 μ g/ml)을 처리하여 30분 동안 배양한 다음 탈과립 현상을 광학현미경으로 관찰하였다.

즉, 현미경의 40배 배율에서 세포 형태가 원형 또는 난원형이거나 세포 윤곽이 뚜렷하고 세포질 내에 과립들로 채워진 상태를 정상세포로 보았으며, 세포질 한쪽 극이 불룩해지는 수포상 비만세포, 세포질 중간이 잘록한 주주박형 비만세포 및 세포 형태는 구형 또는 난형이지만 핵의 위치가 한쪽으로 치우쳐 있는 비만세포를 모두 변형된 비만세포로 관찰하였으며, 핵의 이동 없이 세포 윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립이 세포표면으로 표출되거나 주위에 흩어져 있는 경우를 탈과립형 비만세포로 간주하였다.

5) 비만세포에서의 히스타민 농도 측정

비만세포로부터 분비되는 히스타민의 양을 측정하기 위해 HMC-1 세포(1 × 10⁵ cells/ml)를 24-well plate에 하룻밤 배양한 후 여러 농도의 약물을 1시간 처리하였다. 여기에 compound 48/80(10 μ g/ml)을 처리하여 30분 동안 배양한 다음 세포배양액을 수거하였다. 세포배양액 내 히스타민의 양을 효소면역분석법(enzyme-immuno assay; EIA)으로 측정하였으며, 표준용액의 정량곡선을 기준으로 히스타민의 양을 계산하였다.

6) 난알부민-유도 천식 마우스 모델 제작

알레르기성 천식 동물모델을 제작하기 위해 먼저, 난알부민(ovalbumin, chicken egg albumin; OVA) 1 mg을 PBS와 수산화알루미늄 겔[Al(OH)₃ gel]을 1:1 비율로 혼합한 용액을 0.3 ml씩 실험 시작일로부터 7일 간격으로 하루에 1번 0일, 7일, 14일에 마우스에게 복강으로 주사하였다. 또한 마지막 복강 주사 7일 후인 21일부터 마우스를 50 × 15 × 50 cm 크기의 아크릴상자 안에 넣고 2mg/ml OVA용액을 뉴블라이저(nebulizer)기기를 이용하여 격일 간격으로 1일 3회(각 15분씩 3회) 21, 23, 25, 27, 29일에 분사함으로써 호흡을 통한 천식을 유발하였다(Fig. 1).

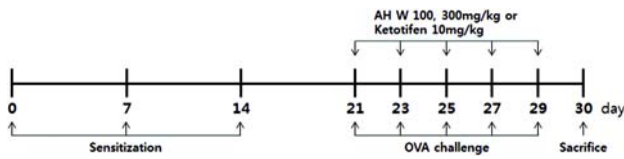


Fig. 1. Experimental protocol of OVA-induced Asthma

실험군은 설정은 다음과 같으며, 각 군당 10마리의 마우스를 사용하였다.

- ① 정상군(생리식염수, Normal) : 난알부민 용액 대신 생리식염수 0.3 ml을 실험시작 0일, 7일, 14일 3회에 걸쳐 생쥐의 복강 내 주사하였으며, 마지막 복강 내 주사 7일 후 생쥐를 50×15×50 cm 크기의 상자 안에 넣고 생리식염수를 분사하였다.
- ② 대조군(천식 유발군, OVA-Control) : 난알부민 용액 0.3 ml을 실험시작 0일, 7일, 14일 3회에 걸쳐 생쥐의 복강 내 주사하였으며, 마지막 복강주사 7일 후 천식 증상을 유발하기 위하여 생쥐를 상자 안에 넣고 0.2% 난알부민 용액을 격일간격으로 5회 분사하여 감작하였다.
- ③ 실험군(곽향 물 추출물 투여군, AH W Ex.) : 대조군과 동일한 방법으로 생쥐에게 복강 내 감작을 마친 후 아크릴 상자 내에서 감작하는 동안 매일 1회 곽향 물 추출물(100, 300 mg/kg body weight, bw)을 경구 투여하였다.
- ④ 약물대조군(대조약물 투여군, Ketotifen) : 대조군과 동일한 방법으로 생쥐에게 복강 내 감작을 마친 후 아크릴 상자 내에서 감작하는 동안 매일 1회 항 히스타민제인 Ketotifen(10 mg/kg bw)을 경구 투여하였다.

7) 천식 마우스의 혈청 내 난알부민-특이 IgE 농도 측정
 난알부민 최종 감작(OVA challenge) 후 모든 동물을 희생하고 심장에서부터 혈액을 수집하여 혈청을 분리하였으며, 혈청으로부터 난알부민-특이 IgE 항체의 농도를 측정하기 위해 ELISA 방법을 수행하였다. 먼저 96-well flat-bottom ELISA plate에 0.1 M sodium carbonate 용액으로 희석한 capture antibody(1:250)를 100 μ l씩 넣은 후 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 각 well에 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 1×PBS를 넣고 실온에서 1시간 동안 정치함으로써 blocking한 후 혈청을 100 μ l씩 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 μ l씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 IgE의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

- 8) 천식 마우스의 혈청 내 사이토카인 농도 측정
 혈청으로부터 Th2 사이토카인인 IL-4와 Th1 사이토카인인

IFN- γ 의 농도를 측정하기 위해 ELISA 방법을 수행하였다. 즉, 96-well flat-bottom ELISA plate에 혈청을 100 μ l씩 넣고 plate sealer를 덮고 빛을 차단한 상태로 실온에서 2시간 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척한 다음 detection antibody(IL-4 or IFN- γ) 100 μ l를 각 well에 넣고 plate sealer를 덮고 빛을 차단한 상태로 실온에서 2시간 반응시킨다. 그리고 다시 washing buffer로 3회 세척한 다음 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 plate sealer를 덮고 빛을 차단한 상태로 실온에서 30분간 반응시켰다. 다시 plate를 3회 세척한 다음 각 well에 기질용액인 TMB를 100 μ l씩 넣어 20분 동안 암실상태에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였다. 반응이 끝난 후 각 well에 정지액을 100 μ l씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 IL-4와 IFN- γ 의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

9) 천식 마우스 폐 조직의 병리표본 제작, 염색 및 관찰

난알부민 최종 감작(OVA challenge) 후 모든 동물을 희생시키고 심장을 통해 생리식염수로 관류함으로써 혈액을 제거하였다. 각 군으로부터 폐 조직을 수집하여 4% formaldehyde 용액에서 24시간 고정시킨 후 파라핀으로 포매함으로써 블록을 제작하고 조직절편기(microtome)을 이용하여 3 μ m 두께의 연속절편을 제작하였다.

폐 조직의 구조적 변화와 기관지에서의 점액(mucin) 분비 정도를 관찰하기 위해 Hematoxylin & Eosin(H&E)와 Periodic Acid Schiff(PAS) 염색을 실시하였다. 먼저 조직염색을 위해 폐 조직 슬라이드를 60°C에서 30분 동안 조직을 말린 다음 xylene으로 15~20분 간 탈파라핀(deparaffinization) 시키고 100%, 95%, 80%, 75% 알코올 순서대로 흡수시켰다. 이를 H&E 염색하기 위해 hematoxylin으로 5분간 염색한 후 eosin으로 3분간 염색하고 Permount 하였다. H&E 염색된 폐 조직 슬라이드에서의 기관지 상피세포층의 손상정도, 기관지와 폐포 주위 염증세포 침윤 등을 광학현미경(Leica Co.)으로 관찰하였다. 또한 PAS 염색을 위해 폐 조직 슬라이드를 1% periodic acid용액으로 10분간 산화시킨 후 Schiff 용액으로 37°C에서 30분간 염색하였다. 염색된 조직 슬라이드에서의 점액분비를 광학현미경으로 관찰하였다.

10) 통계학적 검정

모든 실험 결과는 GraphPad Prism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean \pm SD)를 이용하여 계산하였으며, 각 그룹 간 비교를 위해 *t*-test와 one-way ANOVA를 실시하고, *p*<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 비만세포에서의 효능평가

1) 세포독성

곽향 및 곽향의 물 추출물(AH-W, PH-W)의 HMC-1

세포에 대한 독성정도(cytotoxicity)를 평가하기 위해서 다양한 농도(0.1 ~ 1 mg/ml)의 각 추출물을 HMC-1 세포에 24시간 처리한 후 MTT assay를 수행하였다.

그 결과 세포만 배양한 무처리군의 세포 생존율은 103.53 ± 4.99%였으며, 곽향 추출물은 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 농도에서 각각 93.53 ± 0.75%, 97.12 ± 1.58%, 105.14 ± 1.82%, 101.12 ± 0.45%로 측정되어 1 mg/ml 농도까지 독성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 또한 광곽향 추출물은 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 농도에서 각각 90.83 ± 1.01%, 90.84 ± 0.27%, 90.72 ± 3.84%, 87.62 ± 0.53%로 0.5 mg/ml 농도까지 독성이 나타나지 않았다(Fig. 2B).

따라서 이후 실험에서는 곽향과 광곽향 추출물의 효능을 비교하기 위하여 독성이 없는 0.5 mg/ml 농도까지 사용하였다.

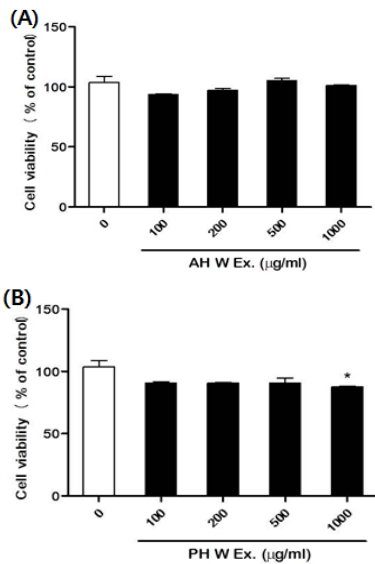


Fig. 2. Cytotoxicity of the Agastachis Herba and Pogostemonis Herba water extract in HMC-1 cells. After the cells (5×10^4 cells/well) were cultured with different concentrations of (A) Agastachis Herba water (AH W) extract and (B) Pogostemonis Herba water (PH W) extract for 24 h, cell viability was measured by MTT assay. The results show mean value of three independent experiments (SD = bars). $p < 0.05$ vs. cells only.

2) 비만세포의 탈과립 억제 효과

비만세포 활성화에 따른 탈과립 유도에 대한 곽향과 광곽향 추출물의 억제효과를 비교하기 위해 각 추출물을 처리한 후 히스타민 유리야기 물질인 compound 48/80로 탈과립을 유도한 후 현미경으로 비만세포의 탈과립 형태를 관찰하였다.

그 결과 Compound 48/80를 30분간 처리한 비만세포에서는 Compound 48/80에 의해 탈과립이 유도됨으로써 세포의 형태적 파괴와 세포 주위로 과립구들이 흩어져 있는 형태를 관찰 할 수 있었다. 반면에 곽향(AH-W)과 광곽향(PH-W) 추출물을 처리한 세포에서는 탈과립 현상이 억제됨으로써 세포의 형태가 정상 세포와 유사하게 보존되는 것을 확인하였다. 특히 곽향 추출물을 0.5 mg/ml 농도 처리하였을 때 광곽향 추출물 보다 효과적으로 비만세포의 안정화가 관찰되었다(Fig. 3).

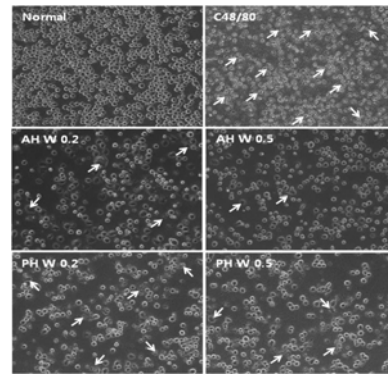


Fig. 3. Effects of Agastachis Herba and Pogostemonis Herba water extract on compound 48/80-induced degranulation of HMC-1 cells.

The cells (2×10^5 cells/ml) were incubated with different concentrations of Agastachis Herba (AH-W) and Pogostemonis Herba (PH-W) water extract in the presence or absence of compound 48/80 ($10 \mu\text{g/ml}$) for 30 min. Mast cell degranulation was observed by light microscope ($\times 40$). Normal, cells only; C48/80, compound 48/80-treated cells; and AH-W 0.2, AH-W extract 0.2 mg/ml; AH-W 0.5, AH-W extract 0.5 mg/ml; PH-W 0.2, PH-W 0.2 mg/ml; PH-W 0.5, PH-W 0.5 mg/ml-treated each cells. arrow: degranulation of cells

3) 비만세포로부터 히스타민 분비 억제 효과

비만세포 탈과립에 따른 히스타민 유리에 대한 곽향과 광곽향 추출물의 억제효과를 비교하기 위해 각 추출물을 처리한 후 compound 48/80로 탈과립을 유도하고 세포배양액으로부터 histamine의 농도를 효소면역반응법(EIA)으로 측정하였다.

그 결과, compound 48/80($10 \mu\text{g/ml}$)을 처리한 비만세포에서는 히스타민의 농도가 $370.88 \pm 27.18 \text{ nM/ml}$ 로 정상세포에 비해 유의적으로 증가되었다. 또한 곽향 추출물(AH W)을 0.2 mg/ml와 0.5 mg/ml 농도로 처리하였을 때 각각 $427.70 \pm 11.31 \text{ nM/ml}$, $121.50 \pm 7.80 \text{ nM/ml}$ 로 측정되었고, 광곽향 추출물(PH W)을 0.2 mg/ml와 0.5 mg/ml 농도로 처리하였을 때 각각 $279.82 \pm 9.93 \text{ nM/ml}$, $214.17 \pm 1.34 \text{ nM/ml}$ 로 측정되어 곽향과 광곽향 추출물 0.5 mg/ml 농도에서 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

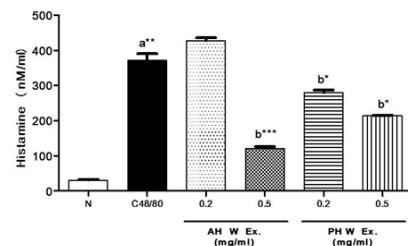


Fig. 4. Effect of Agastachis Herba and Pogostemonis Herba water extract on histamine releasing in compound 48/80-stimulated HMC-1 cells.

The cells (2×10^5 cells/ml) were incubated with Agastachis Herba (AH-W) and Pogostemonis Herba (PH-W) water extract in the presence or absence of compound 48/80 ($10 \mu\text{g/ml}$) for 30 min. The concentration of histamine was determined in culture supernatant by enzyme-immuno assay (EIA). Three independent experiments were performed, and the data shown indicate the mean \pm SD. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ vs. normal (a) or C48/80 (b) group.

2. 난알부민-유도 천식 마우스에서의 효능평가

1) 혈청 내 난알부민 특이-IgE 생성 억제 효과

난알부민(ovalbumin, OVA) 감작(sensitization / challenge)으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에 광향의 물 추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 혈청 내 난알부민-특이 IgE(OVA-specific IgE) 생성에 대한 억제 효과를 효소면역반응법(ELISA)으로 확인하였다.

그 결과, 정상군(11.43 ± 1.62 ng/ml)에 비하여 천식 유발군의 혈청에서 난알부민 특이-IgE의 농도가 유의적으로 증가하였다(108.11 ± 13.55 ng/ml). 또한 천식 유발군에 광향추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 투여하였을 때 혈청 내 난알부민 특이-IgE의 농도는 각각 74.05 ± 22.08 ng/ml, 58.34 ± 21.00 ng/ml로 측정되어 천식 유발군에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 5). 또한 대조약물로서 항히스타민제인 Ketotifen (10 mg/kg)을 투여한 군에서도 76.04 ± 15.27 ng/ml로 측정되어 천식 유발군에 비해 유의적인 감소를 나타내었다. 따라서 광향추출물은 투여 용량에 의존적으로 천식 유발군에 비해 난알부민 특이-IgE의 생성을 억제함으로써 알레르기 면역반응을 조절할 수 있는 것으로 나타났다.

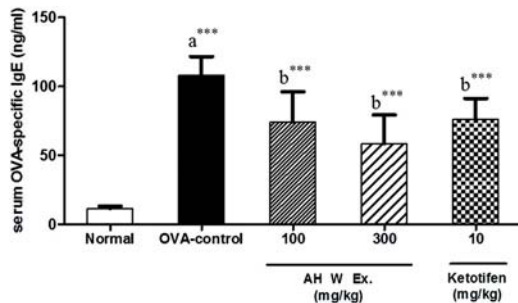


Fig. 5. Effects of Agastachis Herba water extract on OVA-specific IgE levels in the sera of OVA-induced asthma mice. Agastachis Herba (AH-W) extract was administrated orally at doses of 100 mg/kg and 300 mg/kg during OVA challenge every day. Ketotifen (10 mg/kg) was used as an anti-histamine drug. The concentration of OVA-specific IgE was measured in the sera of mice using ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD (n=10 per a group). *** P <0.001 vs. normal (a) or OVA-control (b) group.

2) 혈청 내 IL-4 분비 억제 효과

난알부민(ovalbumin, OVA) 감작(sensitization / challenge)으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에 광향의 물추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 혈청 내 알레르기성 면역반응 유도 핵심 사이토카인인 Th2 사이토카인인 IL-4 분비에 대한 억제 효과를 효소면역반응법(ELISA)으로 확인하였다.

그 결과, 정상군(90.52 ± 10.72 pg/ml)에 비하여 천식 유발군의 혈청에서 IL-4의 농도가 유의적으로 증가하였다(626.62 ± 20.66 pg/ml). 또한 천식 유발군에 광향추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 투여하였을 때 혈청 내 IL-4의 농도는 각각 570.16 ± 61.02 pg/ml, 612.15 ± 57.82 pg/ml로 천식 유발군에 비해 유의적 감소를 나타내지 않았다(Fig. 6). 그러나 대조약물인 Ketotifen(10 mg/kg)을 투여한 군에서는 542.84 ± 64.33 pg/ml로 측정됨으로써 천식 유발군에 비해 유의적인 감소를 나타내었다. 따라서 광향추출물은

천식 유발에 따른 IL-4의 증가는 감소시키지 못하는 것으로 나타났다.

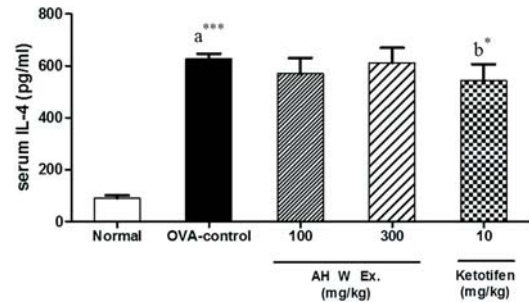


Fig. 6. Effects of Agastachis Herba water extract on IL-4 levels in the sera of OVA-induced asthma mice.

Agastachis Herba (AH-W) extract was administrated orally at doses of 100 mg/kg and 300 mg/kg during OVA challenge every day. Ketotifen (10 mg/kg) was used as an anti-histamine drug. The concentration of IL-4 was measured in the sera of mice using ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD (n=10 per a group). *** P <0.001 and * P <0.05 vs. normal (a) and OVA-control (b) group.

3) 혈청 내 IFN- γ 분비 억제 효과

난알부민(ovalbumin, OVA) 감작(sensitization / challenge)으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에 광향의 물추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 혈청 내 알레르기성 면역반응 유도 핵심 사이토카인인 Th2 사이토카인인 IFN- γ 분비에 대한 억제 효과를 효소면역반응법(ELISA)으로 확인하였다.

그 결과, 정상군(125.28 ± 26.69 pg/ml)에 비하여 천식 유발군의 혈청에서 IFN- γ 의 농도가 유의적으로 증가하였다(198.09 ± 18.63 pg/ml). 또한 천식 유발군에 광향추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 투여하였을 때 혈청 내 IFN- γ 의 농도는 각각 199.59 ± 27.15 pg/ml, 197.28 ± 34.08 pg/ml로 천식 유발군에 비해 유의적 감소를 나타내지 않았다(Fig. 7). 또한 대조약물인 Ketotifen(10 mg/kg)을 투여한 군에서는 215.93 ± 45.62 pg/ml로 측정됨으로써 천식 유발군에 비해 유의적인 감소를 나타내지 않았다. 따라서 광향추출물은 천식 유발에 따른 IFN- γ 의 증가를 감소시키지 못하는 것으로 나타났다.

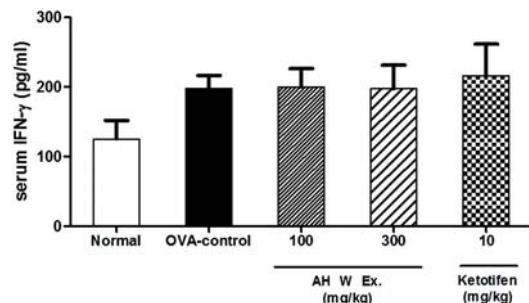


Fig. 7. Effects of Agastachis Herba water extract on IFN- γ levels in the sera of OVA-induced asthma mice.

Agastachis Herba (AH-W) extract was administrated orally at doses of 100 mg/kg and 300 mg/kg during OVA challenge every day. Ketotifen (10 mg/kg) was used as an anti-histamine drug. The concentration of IFN- γ was measured in the sera of mice using ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD (n=10 per a group).

4) 폐 조직에서의 염증 억제 효과

난알부민(ovalbumin, OVA) 감작(sensitization / challenge)으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에 곽향의 물 추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 폐 조직에서의 염증반응과 구조적 손상을 H&E 염색으로 확인하였다.

그 결과, 정상군은 세기관지 주변으로 염증세포의 침윤이나 수적 증가가 관찰되지 않았으며, 세기관지 내부 상피세포층 손상과 비후로 인한 기도 면적이 좁아지는 병리 구조적 변화가 나타나지 않았다. 반면, 천식 유발군에서는 세기관지 주변으로 염증세포 침윤과 수적 증가를 관찰할 수 있었고 세기관지 내부 상피세포층 손상과 세기관지 비후에 의한 기도 면적 좁힘현상이 관찰되었다(Fig. 8).

또한 곽향추출물을 투여한 군에서는 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량 모두 천식 유발군에 비해 세기관지 주변의 염증세포 감소 및 침윤 억제, 상피세포층 손상 억제 및 세기관지 내부의 비후가 감소되는 것을 확인하였다. 한편, 대조약물인 Ketotifen (10 mg/kg) 투여군에서도 곽향추출물과 유사하게 폐 조직 손상이 개선되는 것을 확인하였다. 따라서 곽향추출물은 천식 유발에 따른 폐 조직의 염증과 기관지 손상을 막아줌으로써 천식 개선 효능이 있는 것으로 나타났다.

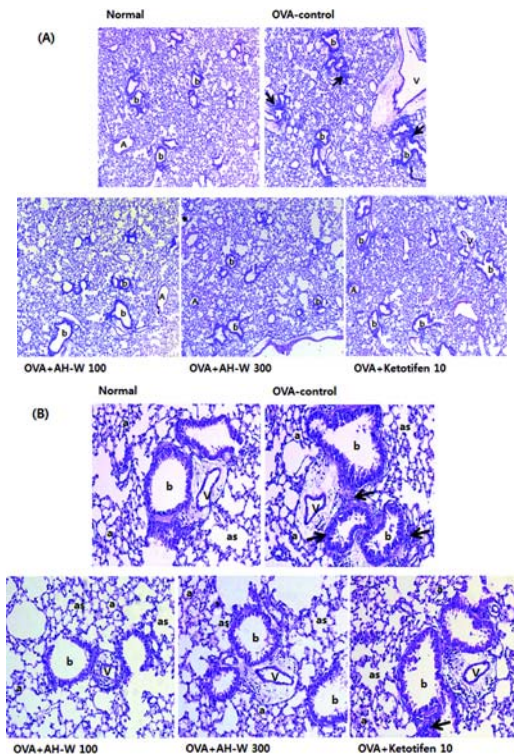


Fig. 8. Effects of Agastachis Herba water extract on the histopathological changes in lung tissues of OVA-induced asthma mice. Agastachis Herba (AH-W) extract was administrated orally at doses of 100 mg/kg and 300 mg/kg during OVA challenge every day. Ketotifen (10 mg/kg) was used as a anti-histamine drug. Lung tissues were stained with H&E (A) x50 and (B) x200. Arrow: infiltration of inflammatory cells, A: artery, a: aveolar, as: aveolar sac, b: bronchiole, and V: vein.

5) 폐 조직에서의 점액분비 억제효과

난알부민(ovalbumin, OVA) 감작(sensitization / challenge)

으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에 곽향의 물 추출물을 100 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 폐 조직에서의 점액(mucin) 분비 억제효과를 PAS 염색으로 확인하였다.

그 결과, 정상군의 폐 조직에서는 세기관지 내부 상피세포층 손상과 더불어 술잔세포 증식에 의한 점액 분비가 관찰되지 않는 반면, 천식 유발군에서는 세기관지 내부 상피세포층 손상과 함께 술잔세포(goblet cell) 증식에 따른 점액분비 증가로 PAS에 의해 붉게 염색되는 부분이 관찰되었으며, 세기관지 좁힘 현상도 관찰되었다(Fig. 9).

그러나 천식 유발군에 곽향 추출물을 100 mg/kg과 300 mg/kg 용량을 투여하였을 때 세기관지 내부 상피세포층에서의 PAS 염색이 현저히 저하됨으로써 점액 분비가 줄어든 것을 알 수 있었다. 한편 대조약물인 Ketotifen(10 mg/kg) 투여군에서는 곽향 추출물 투여군에 비해 점액 분비 억제 효과가 나타나지 않았다.

따라서 곽향 추출물은 천식 유발에 따른 폐 조직 내 세기관지 상피세포층 손상과 이에 따른 점액증가를 억제함으로써 기도 확장을 통해 천식 개선 효능이 있는 것으로 나타났다.

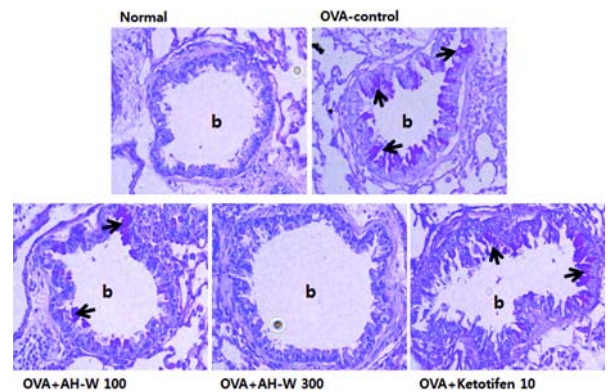


Fig. 9. Effects of Agastachis Herba water extract on the histopathological changes in lung tissues of OVA-induced asthma mice. Agastachis Herba (AH-W) extract was administrated orally at doses of 100 mg/kg and 300 mg/kg during OVA challenge every day. Ketotifen (10 mg/kg) was used as a anti-histamine drug. Lung tissues were stained with PAS (x200). PAS-positive mucin was stained with red in the epithelium. Arrow: mucin-positive, and b: bronchiole.

고찰

곽향은 《名醫別錄》에 "藿香 微溫 療風水 毒腫 去惡藥 止藪亂心痛"으로 처음 기록되었으며¹⁶⁾, 위액 분비를 촉진시켜 소화작용의 증강시키는 건위(健胃)작용과 위장신경을 진정시키는 제토(制吐)작용 및 혈관이완, 혈관확장 및 항진균작용이 있어 소화불량, 설사, 발열, 도통, 식욕부진, 복부팽만에 활용되고 있으며, 당뇨, 혈압 조절에도 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 위장의 기능 뿐 아니라 성질이 따뜻하고 방향성(芳香性)을 가지고 있어 기(氣)의 순환을 촉진함으로써 면역력을 높이며 호흡기 질환을 예방할 수 있는 것으로도 보고 있다.

광곽향(廣藿香, Pogostemonis Herba)은 《黃州植物誌》에 처음 수록되었고, 중국의 광둥성(廣東省)에서 재배된다고 하여 광곽향이라고 하며, 흔히 파초리(patchouli)라고도 부르는데 꿀풀과(脣形科: Labiatae)에 속하는 *Pogostemon cablin* Bentham

의 전초이며, 중국에서 흔히 유통되고 있고 우리나라에서는 광향과 유사한 성미와 효능으로 혼용하여 사용하고 있다. 성미(性味)는 미온(微溫), 신(辛)하고, 귀경(歸經)은 비(脾), 위(胃), 폐(肺)에 입하여, 흉완만민(胸腕滿悶), 오한발열(惡寒發熱), 식욕부진(食慾不振), 습탁내저(濕濁內阻), 습온초기(濕溫初期), 두통완비(頭痛腕痞), 구토설사(嘔吐泄瀉), 인비위습(因脾胃濕), 객란토사(霍亂吐瀉), 감모서습(感冒暑濕)과 습온병(濕溫病)에 사용하며, 약 1.5%의 정유를 함유하는데 전체 정유 중 52~57%를 이루고 있는 주성분인 patchouli alcohol을 비롯하여, eugenol, cinnamic aldehydel pagostol, patchoulipyrindin epiguaipyridine 등의 성분이 알려져 있다.^{1,17)} 또한 광광향 효능에 대한 실험 연구로는 xylene 외 각종 물질에 의해 부종이 유발된 마우스에서의 TNF- α , IL-1 β 등의 염증성 사이토카인과 호중구(neutrophil)의 억제를 통한 항염증 효과¹⁸⁾, trinitrobenzene sulfonic acid으로 유발한 대장염에서의 NF- κ B의존 염증성 사이토카인 억제를 통한 대장보호효과¹⁹⁾, acetic acid와 formalin으로 통증이 유발된 마우스에서의 TNF- α , COX-2 억제와 SOD, GPX 증가를 통한 진통·소염 효과²⁰⁾, 허혈/재관류 손상에 흰쥐 모델에서의 혈청 내 NO와 TNF- α 의 감소를 통한 뇌 염증억제 효과²¹⁾ 등이 다양하게 보고되어있다.

1977년판 중화인민공화국약전(中華人民共和國藥典)에 배초향(*A. rugosa*)과 광광향(*P. cablin*)을 동시에 수록하다가, 1985년판에는 배초향을 삭제하고 광광향만 수록하였다. 일본약국방외생약규격(日本藥局方外生藥規格)에서도 광광향만 수록하였다. 또한 중국의 자료를 보면 광광향이 원래 광향이었으나 1848년 식물명실도고(植物名實圖考)가 나온 이후로 배초향이 광향이 되고 광광향은 광광향으로 이름을 바꾼 것으로 알려져 있다. 그에 반해 한국에서는 광향과 광광향을 구분하여 대한약전 제8개정판에 광광향을, 대한약전외한약(생약)규격집에 광향을 수록되어있고 광광향이 우위를 차지하는 것이지만 배초향이 원래 본초학에서 사용해온 광향인 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 광광향은 대한약전, 중화인민공화국약전, 일본약국방외생약규격에 수재되어 있고, 본래는 인도원산인 파초리를 광동에서 재배하여 향신료로 사용하였으나 광향의 대용으로 사용하기 시작하여 지금은 완전히 대체된 상태이고, 현재 중화인민공화국약전에는 광향이 수재되어 있지 않다.²²⁾ 이에 본 연구에서는 국내에서 혼용되어 널리 사용되고 있는 광향과 광광향이 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리억제에 대하여 각각 어떠한 효능을 나타내는지 평가하였다.

비만세포는 알레르기 반응 동안 다양한 생리적 변화를 유발하는 핵심 면역세포로서 compound 48/80, IgE, protein kinase C(PKC) activator인 phorbol 12-myristate 12-acetate(PMA), anti-DNP-IgE, calcium ionophore(A23187) 등에 의한 여러 수용체들의 활성화될 수 있다.²³⁾ 이 중 compound 48/80은 N-methyl-p-methoxyphenyl ethylamine과 formaldehyde를 축합하여 합성한 아미노산중합체로서 강력한 비만세포 탈과립 유도물질이며, 적절한 양의 처리는 비면역학적 자극을 통해 아나필락시스 기전을 연구하는데 매우 유용한 것으로 알려져 있다.^{24,25)} Compound 48/80과 같은 물질에 의해 자극을 받은 비만세포는 활성화되는 동안 세포막 내로의 칼슘이온(Ca²⁺) 유입을 통해 탈과립을 유발하게 되는데 이러한 칼슘이온 유입에 따른 세포막 투과성의 증가는 비만세포로부터 화학매개물질 분비를 위한 필수요소이다.²⁶⁾ 비만세포 내 커다란

과립형태로 저장되어있는 화학매개물질들 중 하나인 히스타민은 아직 생리학적 중요성이 완전히 밝혀지지 않았으나 주로 모세혈관의 이완과 투과성 증가, 내장에 분포하는 근육의 수축, 위산 분비 촉진, 심장 박동 수의 증가, 이물질에 의한 상처나 외부 감염에 대한 신체의 방어반응인 염증, 알레르기, 아나필락시스 등 알레르기 면역반응에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 본 실험에서 광향 추출물은 사람의 비만세포에서의 compound 48/80에 의한 탈과립을 효과적으로 억제함으로써 세포막 안정화를 통해 히스타민 분비를 유익적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 유사 약제인 광광향 추출물에서도 관찰되었으나, 동일 처리 농도에서 비교하였을 때 광향이 광광향 보다 효과적인 것으로 나타났으며 이는 국산에서 재배되는 광향의 항알레르기 활성이 광광향보다 더 우수함을 의미한다. 따라서 난알부민 감작으로 유도된 천식 마우스에서의 효능평가는 효과가 더 우수한 광향만을 선정하여 실험을 진행하였다.

천식은 전 세계적으로 3억 명 가량 이환되어 있는 주요 보건학적 문제로 기도과민증과 가역적인 기도폐쇄의 특징을 보이는 만성기도염증질환이다.²⁸⁾ 전 세계적으로 많은 나라에서 유병률이 증가하고 있으며 국내에서도 소아 및 청소년층에서 빠른 증가가 관찰되고 있다. The Global Initiative for Asthma(GINA) program 보고²⁹⁾에 따르면 우리나라의 경우 임상적으로 진단된 천식 환자의 비율은 3.9%에 이르고, 기관지 천식을 포함한 만성하부호흡기계 질환으로 사망한 환자 수는 1992년에서 2002년 사이에 인구 10만 명 당 12.9명에서 22.6명으로 약 2배가량 증가한 것으로 보고되고 있다.³⁰⁾ 따라서 기관지 천식의 유병률이 증가하고 질환의 사회경제적 중요성이 인식되면서 기관지 천식 치료에 대한 여러 국제적 또는 국가적 진료지침 발표 및 새로운 치료법개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 아직은 국내 천식환자들의 조절되는 기대에 못 미치고 있는 실정이다.

천식은 기관지내 비만세포에서 유리되는 다양한 화학매개물질들에 의해 기도평활근 수축이 주로 일어나는 초기 천식반응과 호산구를 비롯한 여러 염증세포들의 침윤과 이들에 의해 유리되는 염증성 물질들에 의한 기도부종, 점액질 과분비 등의 증상이 나타나는 후기 천식반응(late asthmatic response: LAR)으로 구분되며, 이를 거쳐 세포의 기질 변형(extracellular matrix remodeling), 상피층 탈락(epithelial desquamation), 술잔세포 증식(goblet cell hyperplasia), 기관지 근육층의 비대(prominent smooth muscle), 혈관 변형(vascular remodeling), 기저막하 콜라겐 침착 및 탄력섬유분해(elastolysis) 등의 만성 증상으로 기도의 구조적 변형을 일으키게 된다.¹³⁾ 이렇게 천식은 복잡한 병태생리를 지닌 복합원인질환으로 특정 원인에만 작용하는 기존 단일성분 의약품으로는 효과적인 치료를 기대하기 어렵기 때문에 최근에는 약효는 물론 복용 편리성, 안전성을 동시에 고려한 신약 개발의 필요성이 대두되고 있다. 이에 기존 천식 치료제의 단점을 극복하고 근본적인 치료를 위한 대안으로 다양한 성분과 기전을 보유하고 있는 천연물에 대한 관심이 증가하고 있으며, 국내 제약회사들을 중심으로 국산 한약재를 이용한 새로운 치료제 개발 연구가 이루어지고 있다. 특히 한방임상에서 오랜 사용 경험이 있는 한약재들의 천연복합성분에 의한 다면적 약리작용으로 천식의 다양한 발생기전을 차단함으로써 천식의 효과적 제어 뿐 아니라

장기 복용에도 안전하여 천식 환자들에게 많은 도움이 될 것으로 기대하고 있다.

한의학에서 천식은 천증(喘證) 또는 효천증(哮喘證)의 범주에 속하는데, 본허표실(本虛表實)한 증상으로 주로 폐(肺), 비(脾), 신(腎)과 같은 장부(臟腑)가 관련된다고 보고 있다. 또한 육음(六陰) 중 풍한(風寒), 풍열(風熱)과 같은 외인(外因)과 음식상(飮食傷), 정지손상(情志損傷), 노욕과도(勞欲過度), 구병(久病)과 부내외인(不內外因)으로 인한 오자(誤刺), 추상(墜傷) 등의 요인이 주된 원인이 된다고 본다³¹⁾. 이에 따라 천식을 각각 허(虛)·실(實)로 구분하여 허증(虛證)은 보폐(補肺), 익심신(益心腎)을 기본으로 상폐(傷肺), 화담(化痰), 정천(定喘)의 치법을 가하고, 실증(實證)은 거풍한(祛風寒), 조습(燥濕), 청열(淸熱), 온폐(溫肺), 화담(化痰), 강기선폐(降氣宣肺), 정천(定喘)으로 치료한다³²⁾.

천식의 주요 원인은 IgE에 의하여 매개되는 즉시형 과민반응(IgE-mediated acute reaction)으로 외부항원(allergen)과 면역세포 간 반응을 통해 초기 수분 내 일어나는 즉시형 기도 과민성 반응(AHR)과 4~8시간 이후에 일어나는 지연형 후기 반응으로 나눌 수 있다. 초기반응은 지속적인 항원 노출로 인하여 B 세포로부터 생성된 IgE가 비만세포 표면의 Fcε 수용체와 결합함으로써 IgE-Fcε RI complex를 형성함으로써 탈과립 유도를 통해 세포 내 화학매개물질(histamine, tryptase, bradykinin, heparin 등)을 분비하게 되어 혈관확장, 기관지 평활근 수축, 점액 분비 증가, 콧물 생성 등의 증상을 동반하게 된다^{6,7)}. 알레르기 질환 진단을 위해 우선적으로 측정하는 것이 혈청 내 총 IgE의 농도이며, 직접적 원인을 확인하는 방법으로 혈청 알레르겐 특이 IgE를 측정하는 것이다. 본 실험에서도 곽향의 알레르기 면역반응 조절 효능을 평가하기 위해 혈청 내 난알부민(알레르겐)-특이 IgE의 농도를 측정하였으며, 곽향 추출물이 난알부민 감작과 유발로 증가된 난알부민-특이 IgE의 생성을 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다. 이는 곽향이 기관지 천식에서 알레르기 면역반응 유발 핵심 인자인 알레르겐-특이 IgE의 합성과 분비를 막아줌으로써 체내 항상성 조절 회복을 통해 천식을 근본적으로 치료할 수 있음을 의미한다.

한편, 천식에서의 지연형 후기 반응은 비만세포와 호산구 등에서 새로운 염증물질인 prostaglandin D₂, leukotriene, TNF-α 등이 새로 합성·분비됨으로써 기관지 내 염증세포들(호중구, 림프구, 호산구, 호염구 등)의 침윤과 침윤된 염증세포들로부터 염증물질의 합성과 분비를 촉진함으로써 만성염증적 증상 발달에 기여하게 된다^{6,33,34)}. 다양한 염증세포들 중 T-림프구는 천식 염증에 있어 중요한 역할을 하는데 이들로부터 분비되는 사이토카인 종류에 따라 Th1과 Th2 type으로 나뉘게 된다³⁵⁾. 즉, Th1 세포는 IL-2, IL-12, IFN-γ를 분비하고, Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13를 분비하며³⁶⁾, 이들 T 세포 조절 사이토카인들은 인체 내 면역반응의 항상성을 유지시킴으로써 천식 발생을 막게 되는데³⁷⁾, 만약 Th1과 Th2 세포간의 항상성 유지에 실패하게 되면 천식이 발병하는 것으로 보고 있다. 천식 환자의 기관지에서 Th2 세포가 분비하는 사이토카인의 양이 정상인 보다 많은 것으로 알려져 있으며, 천식에서의 염증반응이 Th2 세포로부터 이루어진다고 보고 있다³⁸⁾. 특히 Th2에서 분비되는 IL-4는 CD4⁺ T 세포의 Th2 세포로의 분화를 유도하고 B

세포 분화를 촉진함으로써 IgG의 IgE로의 class switching을 통해 알레르기성 면역반응을 유도하며, 후기 면역반응에서 호산구와 중성구 등의 염증세포를 조직 내로 유입시키며, 독성 효소나 사이토카인 분비를 통하여 조직을 손상시키고, 점액이나 단백질, 세포들의 증가에 따른 기관지 협착, 기저막 비후, 부종 및 기관지 평활근 비대, 기도과민성, 술잔세포의 증식 등을 유발하는 것으로 알려져 있다^{6,39,40)}. 한편 Th1 세포로부터 분비되는 대표적인 사이토카인인 IFN-γ는 Th2 세포들의 분화를 억제하며, IL-4에 의한 IgE 생성을 방해함으로써 알레르기 반응을 줄이는 것으로 알려져 있다⁴¹⁾. 또한 기도에 영향을 미쳐 천식 발생에 관여하는 것으로 생각되기도 한다⁴²⁾. 본 실험에서 곽향 추출물은 혈청 내 IL-4와 IFN-γ의 분비에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며 이는 향후 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage; BAL fluid)에서의 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13 및 Th1 사이토카인인 IFN-γ 분비에 대한 효능평가가 필요할 것으로 보인다. 그 이유는 난알부민 감작을 진행할 때 마우스의 호흡과정에서 알레르겐이 호흡기를 통하여 기관지 혹은 폐에 흡입되었기 때문이며, 혈청 내의 사이토카인 보다 기관지폐포세척액에서의 염증세포 및 사이토카인들이 천식에 더 직접적인 악영향을 미치기 때문에 천식 개선 효능을 평가하는 데에 있어서 혈청보다는 기관지폐포세척액이 더 중요하다고 할 수 있기 때문이다.

천식과 같은 호흡기 질환에서는 기도 염증과 더불어 호산구, 비만세포, T 세포 뿐 아니라 대식세포, 호중구, 기도 상피세포(airway epithelial cell) 등 다양한 염증세포들이 침윤과 수적 증가가 천식에서의 염증반응에 기여하며, 기도수축, 점액질 분비, 염증세포들의 침윤, 조직의 섬유화, 탄력성 감소 등의 구조적 변형으로 폐 기능의 지속적인 이상소견이 초래되는 것으로 보고되고 있다^{13,43)}. 본 실험에서 곽향추출물은 난알부민 감작과 유발로 천식이 유도한 마우스의 폐 조직에서 천식 발생에 따른 세기관지 주변으로의 염증세포 침윤과 수적 증가를 감소시키고, 세기관지 점막의 상피세포층 손상에 따른 비후와 기도면적의 좁아짐 등을 개선시키는 것으로 나타났다. 한편, 1992년 Huber와 Koessler에 의해 처음 보고된 기도개형(airway remodeling)은 천식으로 사망한 환자의 기도 벽과 기관지 평활근이 심하게 두꺼워져있음을 확인⁴⁴⁾함으로써 증명되었으며 특히 기도 점막 상피세포에서의 염증물질이나 TGF-β 등의 성장인자 분비로 인한 상피세포 탈락, 술잔세포 증가, 점액선 증가, 점막 섬유화, 평활근 비후, 신생혈관 증가, myofibroblast 증식, 기저막 콜라겐 침착 등 다양한 병리적 증상이 나타날 수 있고 이로 인해 비가역적 기도폐쇄 및 심각한 폐 기능 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 또한 인체의 기도에 존재하는 점액은 섬모세포와의 협동작용을 통해 호흡기로 유입되는 유해 물질의 제거에 있어 중요한 역할을 하지만, 뮤신의 양과 질의 이상은 기도 생리의 이상 뿐 아니라 인체의 방어 작용에 영향을 주어 병리현상을 유발하게 된다. 즉 천식 뿐 아니라 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등 기도 질환에서 관찰되는 점액(객담)의 과다 분비는 이러한 질환의 예후를 악화시키는 주요 요인으로 알려져 있다. 본 실험에서 곽향추출물은 난알부민 감작과 유발에 의한 기도 내 염증반응(염증세포 수)과 기도재형성의 대표적 지표인 기도상피 술잔세포의 과다형성 및 기저막 하부의 섬유화 정도를 현저히 억제시킴을 확인할 수 있었다.

이는 광향이 기관지 천식에 의한 기도의 생리적 이상(염증)을 개선시킴으로써 폐 기능 장애로부터 기관지를 보호할 수 있음을 의미한다.

결론적으로 광향의 추출물은 compound 48/80에 의해 유도된 비만세포 탈과립을 억제함으로써 세포막 안정화를 통해 히스타민 분비를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 광향 추출물은 난알부민 감작과 유발로 천식이 유도된 마우스에서 혈청 내 난알부민 특이-IgE의 생성을 감소시키고, 폐 조직에서의 염증과 세기관지 손상, 비후 및 점액분비 증가를 억제시킴으로써 폐를 보호하는 것으로 나타났다. 광향과 유사약재인 광곽향 역시 동물모델에서 천식 개선의 효능을 확인하지는 못하였지만 비만세포 탈과립 억제를 통한 세포막 안정화와 히스타민 분비를 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 이는 과거 광향과 광곽향이 혼용되어 사용하였듯이 두 약재 간의 효능이 상이하지 않고 유사하다고 할 수 있으며, 다만 약성의 강(強), 약(弱) 차이라고 할 수 있다. 본 논문에서는 광향과 광곽향의 항알레르기 효능을 비교평가 하였으며 두 약재가 널리 이용되는 처방에 따른 효능에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료되며, 이러한 근거를 바탕으로 각 처방에 보다 더 약성이 우수한 약재를 사용한다면 치료 효율성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 사람의 비만세포인 HMC-1 세포와 난알부민(ovalbumin) 유도 기관지 천식 마우스에서 광향과 광곽향 추출물의 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 광향과 광곽향 추출물은 HMC-1 세포에서 compound 48/80에 의한 탈과립 현상을 억제함으로써 히스타민 분비를 유의적으로 감소시켰다.
2. 광향추출물은 난알부민-유도 천식 마우스의 혈청 내 난알부민-특이 IgE의 생성을 유의적으로 억제시켰다.
3. 광향추출물은 난알부민-유도 천식 마우스의 혈청 내 Th2 사이토카인인 IL-4와 Th1 사이토카인인 IFN- γ 분비 조절에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.
4. 광향추출물은 난알부민-유도 천식 마우스의 폐 조직에서의 염증세포 침윤과 수적 증가 및 세기관지 점막의 상피세포층 손상과 술잔세포 증가에 따른 점액 분비 증가를 효과적으로 감소시켰다.

따라서 광향추출물은 비만세포에서의 탈과립과 히스타민 분비 억제 및 폐 조직에서의 염증 손상을 억제함으로써 천식을 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 식품의약품안전청 한약재품질표준화연

구사업의 연구비 지원(12172한약표989-2202)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. The whole country a college of oriental medicine publish commission compilation, Herbology, Seoul : younglimsa, 2007 : 335-6.
2. Na C. Anti-inflammatory Effect of *Agastache rugosa* Extract on LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. Graduate School Wonkwang Univ, 2008.
3. Hong JH, Choi JH, Oh SR, Lee HK, Park JH, Lee KY, Kim JJ, Jeong TS, Oh GT. Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. FEBS Lett, 2001 ; 495(3) : 142-7.
4. Hong SC, Jeong JB, Park GH, Kim JS, Seo EW, Jeong HJ. Anti-oxidant Effect of *Agastache rugosa* on Oxidative Damage Induced by H₂O₂ in NIH 3T3 Cell. Korean J Plant Res, 2009 ; 22(6) : 498-505.
5. Kim Y. Research on allergy-causing materials of Allergy Diseases. Graduate School Chosun Univ, 2008.
6. Ahn KM. Role of mast cell in allergic inflammation and innate immunity. Korean J Pediatrics, 2004 ; 47 : 11-5.
7. Poole JA, Rosenwasser LJ. The role of immunoglobulin E and immune inflammation: implications in allergic rhinitis. Curr Allergy Asthma Rep, 2005 ; 5 : 252-8.
8. Kang SY, Oh TW, Kim JW, Park YK. Effect of the water extract of *Peucedani Japonici Radix* on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. Kor J Herbol, 2013 ; 28(6) : 1-7.
9. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. Eur Respir J, 2008 ; 31(1) : 143-78.
10. Bukantz SC. Clemens von Pirquet and the concept of allergie. J Allergy Clin Immunol, 2002 ; 109 : 724-6.
11. The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. Korean asthma management guideline for adults, 2011
12. National Statistical Office. Ratio of death. Retrieved Mar. 24, 2014, from http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=1012.
13. Koh YY. Pathophysiology of asthma. Pediatr Allergy Respir Dis, 2000 ; 10(4) : 255-62.
14. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools Internal medicine of lung system, internal

- medicine of lung system of Oriental medicine, Seoul : Hanmoonhwa publisher, 2002 : 178-99.
15. Kang SY, Hong SU, Park YK, Effects of KOB, a polyherbal medicine for allergic rhinitis and its main herbe, Astragali Radix on allergic responses in OVA-induced Allergic rhinitis mice, Kor J Herbol, 2012 ; 27(4) : 1-7.
 16. Shin MK, Kang HS, Comparison of volatile flavor compounds from different source of kwakhyang, Kor J Herbol, 1996 ; 11(1) : 1-11.
 17. Kim IR, Bibliographical study on the source of gwackhyang, Kor J Herbol, 2006 ; 21(4) : 43-9.
 18. Li CW, Wu XL, Zhao XN, Su ZQ, Chen HM, Wang XF, Zhang XJ, Zeng HF, Chen JN, Li YC, Su ZR, Anti-inflammatory property of the ethanol extract of the root and rhizome of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, ScientificWorldJournal, 2013 ; 2013 : 434151.
 19. Park SY, Neupane GP, Lee SO, Lee JS, Kim MY, Kim SY, Park BC, Park YJ, Kim JA, Protective effects of *Pogostemon cablin* Bentham water extract on inflammatory cytokine expression in TNBS-induced colitis in rats, Arch Pharm Res, 2014 ; 37(2) : 253-62.
 20. Lu TC, Liao JC, Huang TH, Lin YC, Liu CY, Chiu YJ, Peng WH, Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Methanol Extract from *Pogostemon cablin*, Evid Based Complement Alternat Med, 2011 ; 2011 : 671741.
 21. Xie YC, Tang F, Protective effect of *Pogostemon cablin* on membrane fluidity of intestinal epithelia cell in ischemia/reperfusion rats after ischemia/reperfusion, Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2009 ; 29(7) : 639-41.
 22. KFDA, Studies on the korean pharmacopeia of crude drug, KFDA, 2002 : 80.
 23. Metcalfe DD, Kaliner M, Donlon MA, The mast cell, Critl Rev Immunol, 1981 ; 3 : 23-74.
 24. Ennis M, Pearce FL, Weston PM, Some stidues on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine, Brit J Pharmacol, 1980 ; 70 : 329-34.
 25. Hong SH, Kim MS, Lee JY, Hwang CY, Baek SH, Han DS, Jung WY, Seo SB, Kajiuchi T, Kim HM, Novel findings in inhibition of mast cell-dependent immediate tyoe cutaneous reactions by Gahmi - Shini - San, Clinica Chimica Acta, 2001 ; 309 : 85-90.
 26. Levi-Schaffer F, Slovik D, Ametti L, Pickholtz D, Touitou E, Activation and inhibition of mast cells degranulation affect their morphometric parameters, Life Sci, 2000 ; 66 : 283-90.
 27. Park HS, Choi GS, Cho JS, Kim YY, Epidemiology and current status of allergic rhinitis, asthma, and associated allergic diseases in Korea: ARIA Asia-Pacific workshop report, Asian Pac J Allergy Immunol, 2009 ; 27(2-3) : 167-71.
 28. Sugita M, Kuribayashi K, Nakagomi T, Miyata S, Matsuyama T, Kitada O, Allergic bronchial asthma: airway inflammation and hyperresponsiveness, Intern, Med, 2003 ; 42 : 636-43.
 29. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R; Global Initiative for Asthma (GINA) Program, The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report., Allergy, 2004 ; 59(5) : 469-78.
 30. Komai M, Tanaka H, Masuda T, Nagao K, Ishizaki M, Sawada M, Nagai H, Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma, Br J Pharmacol, 2003 ; 138(5) : 912-20.
 31. Mun MG, Kim YK, Kwon JN, The Investigation between Oriental and Western Medicine on Cause for Asthma, Korean J Orient Med Res, 2000 ; 12 : 85-105.
 32. Kim CS, Choi HY, Kim JD, Effects of Kumsooyukkun - jeon on Asthma Induced by Ovalbumin in mice, J Korean Oriental Med, 2002 ; 23(3) : 104-18.
 33. 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 , Int Immunopharmacol, 2004 ; 4(2) : 279-87.
 34. Kawakami T, Galli SJ, Regulation of mast cell and basophil function and survival by IgE, Nat Rev Immunol, 2002 ; 2(10) : 773-86.
 35. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL, Two types of murine helper T cell clone. I, Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, J Immunol, 1986 ; 136(7) : 2348-57.
 36. Schwartz RS, A new element in the mechanism of asthma, N Engl J Med 2002 ; 346 : 857-8.
 37. Kang SY, Jung JK, Lee SK, Lee SH, Park YK, Effects of the ethanol extract of Codonopsis Pilosulae Radix on ovalbumin-induced allergic responses in mice, Kor J Herbol, 2013 ; 28(2) : 9-15.
 38. 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.
 39. Jung JK, Park YK, Effects of Saposhnikoviae Radix on allergic responses in OVA-induced Allergic rhinitis mice, Kor J Herbol, 2012 ; 27(5) : 85-91.

40. Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, Bluethmann H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy*. 1994 ; 24(1) : 73-80.
41. Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Immunol*. 1993 ; 151(1) : 518-25.
42. 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 Herbol*. 2012 ; 27(4) : 33-44.
43. Kim KH. Airway Remodeling. *Tuberc Respir Dis*. 2006 ; 60(6) : 608-24.
44. Huber HL, Koessier KK. The pathology of fatal asthma. *Arch Inter Med*. 1922 ; 30 : 689-760.