

杏仁과 桔梗이 Asthma model 内の Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響

鄭旭*, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九**

* 만초한의원 원장, ** 慶熙大學校 韓醫科大學 肺系內科學教室

The Effects of Armeniacae Amarum Semen and Platycodi Radix on IL-4, IL-5 and IL-6 in Asthma Model

Wook Chung, Hee-Jae Jung, Sung-Ki Jung, Hyung-Koo Rhee

Division of Respiratory system, Dept. of Internal Medicine
College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Seoul, Korea

Background : Nowadays asthma is considered to be the inflammatory disease characterized by airway hyperresponsiveness and pulmonary eosinophilia, and mediated by Th lymphocytes expressing the Th2 cytokine pattern. In many recent studies, molecular biological methods have been used to investigate the role of cytokines in pathogenesis and new therapeutic targets of asthma.

Objective : We aimed to identify the effect of Armeniacae Amarum Semen and Platycodi Radix on the transcriptional activities of cytokine IL-4, IL-5 and IL-6 involved in asthma model.

Materials and Methods : RBL-2H3 cell lines were used. Cells were stimulated with calcium inophore for maximal gene expression. After 24 hours of Armeniacae Amarum Semen and Platycodi Radix-treatment, total cellular RNAs were collected using Trizol solution method. Then transcriptional activities of IL-4, IL-5 and IL-6 were measured by RT-PCR with electrophoresis.

Results : In IL-4 study, Armeniacae Amarum Semen treated group showed 48.4% of transcriptional activities compared to the control group and Platycodi Radix treated group showed 45.4% of transcriptional activities compared to the control group. In IL-5 study, Armeniacae Amarum Semen treated group showed 52.7% of transcriptional activities compared to the control group and Platycodi Radix treated group showed 60.2% of transcriptional activities compared to the control group. In IL-6 study, Armeniacae Amarum Semen treated group showed 42.3% of transcriptional activities compared to the control group and Platycodi Radix treated group showed 69.1% of transcriptional activities compared to the control group.

Conclusion : This study shows that Armeniacae Amarum Semen and Platycodi Radix have the inhibitory effect on the transcription of IL-4, IL-5 and IL-6 gene expression in RBL-2H3 cell lines. Advanced studies are required to investigate the mechanisms of inhibition by herbal medicine in asthma model.

Key Word : Armeniacae Amarum Semen, Platycodi Radix, asthma, IL-4, IL-5, IL-6

1. 緒論

産業社會의 發達, 環境公害 特히 大氣 汚染의 擴散, 吸煙人口의 增加로 인해 呼吸器 疾患은 날로 增加되고 있으며 이 가운데 氣管支喘息은 反復的인 呼吸器 感染이나 특정 allergen에 대한 露出로 인하여 發作性的인 好氣性 呼吸困難, 喘鳴, 肺의 過吸氣, 기침, 羅音(rale)을

特徵으로하는 可逆的, 發作的인 氣道閉塞을 同伴하는 病症이다¹⁾. 韓醫學의 으로는 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 症狀을 主 症狀을 하는 哮喘證에 該當된다^{1,2,3)}.

哮喘證에 대해서 隋시대에는 上氣 喉中有水鷄鳴이라하여 그 症狀을 記述하고 있으며 王⁴⁾은 哮喘證은 呼吸急促한 喘證과 類似하나 입을 벌리고 出氣가 많으며 喉中에서 痰聲이 나는 것이라

하여 哮喘證에서 나타나는 呼吸困難의 形態를 具體的으로 說明하였다.

杏仁과 桔梗은 化痰止咳平喘藥으로 주로 咳嗽喘息의 病症에 適用되어 왔다. 杏仁은 性味가 苦辛性溫하여 苦味는 肺經으로 들어가 肺氣를 강하게 하고, 辛味는 疏散하며 또한 宣肺除痰하므로 痰이 消하여 肺氣가 宣通하게 되어 咳喘이 스스로 平喘되므로 宣肺化痰하고 止喘平喘의 效能이 있어 咳喘症을 治療하는 要藥이 된다. 桔梗의 味는 辛散苦泄

하고 平한 性은 肺經으로 들어가 上焦를 宣通하고 肺氣를 升提하므로 升浮上行케 하여 胸膈과 咽喉를 利하게 하고 宣肺祛痰하는 良好한 效能이 있어 外邪의 犯肺로 因하여 咳嗽痰多하고 胸膈이 悶하여 咽痛失音 등 證에 寒熱을 막론하고 應用하여 治療한다⁵⁾.

氣管支 喘息에 對한 韓方的인 接近은 이미 臨床에서 多量한 處方을 통하여 뛰어난 效果가 입증되고 있다. 그러나 實驗的인 규명에 있어서 炎症反應에 대한 지표나 全般的인 免疫機能에 대한 研究는 다소 있었으나^{6,7)} 최근 北美과 유럽에서 喘息의 動物 model 이해에 폭넓게 응용되고 있는 喘息機轉에 있어서 cytokine 단계에서의 분자생물학적 model을 통한 研究는 未備한 상태이다.

Ferreira⁸⁾ 등은 T-helper(이하 Th)2 림프구에서 分泌되는 cytokine인 IL(interleukin)-1, 3, 4, 5, 6, 13, 및 TNF(tumor necrosis factor)- γ , GM-CSF(granulocyte/macrophage colony stimulating factor)의 作用機轉을 報告하였다.

따라서 喘息에 效果가 있는 韓藥材의 分子生物學的인 水準에서의 cytokine에 미치는 研究가 必要할 것으로 思慮되며 이에 著者는 RBL(rat-basophilic leukemia)-2H3 細胞柱를 利用하여 臨床的으로 喘息治療에 效能이 認定된 韓藥材인 杏仁과 桔梗이 喘息機轉에 主要한 役割로 作用하는 代表的 cytokine인 IL-4, 5, 6의 轉寫를 抑制하는 效果를 實驗的으로 研究하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 細胞柱 (cell line)
본 研究를 위하여 rat의 blood (basophil)에서 기원한 chemically induction 된 leukemia cell인 RBL-2H3(from the KCLB # 2225⁹⁾ 細胞를 使用하였다.

2) 培地
細胞 培養을 위하여 DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)에 3.7g/L sodium bicarbonate, 2.5g/L HEPES(N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) buffer, 10% fetal bovine serum(FBS) 그리고, 1% penicillin-streptomycin(10,000U/ml)을 添加하여 使用하였다.

3) 藥材
본 實驗에 使用한 藥材는 慶熙醫院 韓方病院에서 購入하여 精選한 후 使用하였다(Table 1).

4) 檢液의 調劑
杏仁 100g과 桔梗 100g을 各各 3000ml round flask에 넣고 2000ml 精製水를 加하여 冷却器를 附着하고 2시간 加熱 煎湯한 다음 濾過紙(Whatman, Whatman international Ltd. England)로 濾過한 濾液을 rotary evaporator(RE121, BUCHI, Switzerland)로 減壓 濃縮하여 各各 100ml 濃縮液을 만들었다. 濃縮液을 各各 凍結乾燥機(Freeze dryer, EYELA, Japan)로 凍結乾燥하여 各各 14g, 44g의 杏仁과 桔梗 엑기스를 얻었다.

다. 各各의 엑기스를 滅菌된 3차 蒸溜水에 1g/10ml의 濃度로 녹인 후 0.45 μ m syringe filter(Millex-GS, Millipore, Co., U.S.A)로 濾過하여 貯藏溶液을 만들고 이 貯藏溶液을 稀釋하여 使用하였다.

2. 方法

1) 細胞培養(cell culture)
100mm culture dish 또는 T-75 culture flask(TPP. switzerland)에 rat leukemia cell line RBL-2H3 세포를 seeding 한 후 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium)에 3.7g/L sodium bicarbonate, 2.5g/L HEPES buffer, 10% fetal bovine serum(FBS) 그리고, 1% penicillin-streptomycin (10000U/ml)을 添加한 培養 培地를 使用하여 培養하였다. FBS는 使用하기 前 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 heat-inactivated 시켜 使用하였다. 또한 5% CO₂와 95% 濕度 조건이 유지되는 incubator를 利用하여 37 $^{\circ}$ C에서 培養하였다. 培地는 7-10ml 씩 주 2회 交替해 주었고 주 1-2회 계대 배양을 해주었다. 세포 배양에 使用한 모든 reagent는 GIBCO BRL, Co.(U.S.A) 제품을 使用하였다.

2) 檢液 處理
배양된 cell이 100mm tissue culture dish 또는 T-75 culture flask에서 약 80-90% 정도로 群集을 보이던 0.25% Trypsin-EDTA(disodium salt, dihydrate : GIBCO BRL, Co., U.S.A)를 500 μ l 처리하여 cell을 100mm culture dish로부터 떼어 낸 후 7-10ml의 배양 배지로 trypsin-EDTA를 中和시켜 세포 현탁액(cell suspension)을 만들었다. 세포 현탁액에서 20 μ l를 취한 다음 0.4% trypan blue(in PBS buffer)에 염색한 후 hemocytometer를 利用하여 細胞數를 計算하였다.

Table 1. Armeniacaee Amarum Semen and Platycodi Radix

Herbs	Scientific Name	Dose(g)
杏仁	Armeniacaee Amarum Semen	100.0
桔梗	Platycodi Radix	100.0

약 1×10^6 개의 細胞를 새로운 100mm culture dish에 seeding 하여 附着하게 한다. 여러 cytokine의 轉寫를 통한 發顯度를 극대화시키기 위하여 A23187 calcium inophore(1uM) induction하여 PBS(phosphate buffered saline : buffer control)와 함께 투여하였다. 檢液의 濃度는 10% 한약제 投與群에서는 세포가 사멸, 培養이 되지 않아 RNA를 추출하지 못하였으며 1%와 0.1%에서는 세포 성장이나 細胞數에 큰 차이를 나타내지 않아 24시간이 경과한 후 檢液의 최종 농도를 1%로 처리하고 5% CO₂와 95% 濕度 조건이 유지되는 incubator를 이용하여 37℃에서 다시 24시간 배양한 후 total RNA를 추출하였다. 이때 약제를 처리한 實驗群에 대한 對照群으로 PBS 완충용액 (Phosphate buffered Saline, pH 7.4, without calcium magnesium)을 같은 농도로 처리해 주었다. 實驗群은 다음과 같이 분류하였다.

A) Control : PBS treated group after calcium inophore induction

B) Sample 1 : Armeniacae Amarum Semen treated group after calcium inophore induction

C) Sample 2 : Platycodi Radix treated group after calcium inophore induction

3) RNA의 抽出

Total cellular RNA는 藥材處理 後에 24시간 배양한 세포에 trizol solution (Gibco BRL, Co., U.S.A)을 이용하여 분리하였다. 1ml의 trizol solution을 처리하여 cell을 용해시킨 후 cell scraper(TPP, Switzerland)로 scrap하여 cell extract를 1.5ml microtube에 모은 후 18-21G syringe homogenize 하였다. 세포 추출물은 4℃에서

12000rpm으로 10분간 원심분리를 통하여 상층액을 수거한 후, 이 상층액과 phenol : chloroform: isoamyl alcohol 이 25 : 24 : 1로 섞여 있는 용액의 상층액 200 μ l를 혼합한 다음 5-15분 정도 상온에 두었다가 맑은 상층액만을 수거하여 4℃에서 12000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. RNA층만 떼서 새로운 microtube에 옮긴 후 동량의 100% isorophannol alcohol을 혼합한 뒤 5-15분 정도 상온에 두었다가 4℃에서 12000rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 RNA pellet 에 1.5ml 75% ET-OH로 세척하고 4℃에서 12000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 5-10분간 상온에서 완전히 건조시킨 후, 100 μ l의 DEPC (diethylpyrocabonate) water에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer (Hewlett Packard, Co., U.S.A)를 사용하여 정량하였다. 분리방법은 Fig. 1과 같다.

4) Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

cDNA의 합성 및 PCR(RT-PCR)은 One Step RNA PCR kit(TaKaRa, Japan)와 각각의 시약을 조성별로 조절하여 사용하였다. One Step RNA PCR kit(TaKaRa)는 1 μ g의 RNA를 65℃에서 15분 동안 처리하여 변성시킨 후 반응용액(1 μ l 10 \times buffer, 25mM MgCl₂ 2 μ l, 1 μ l Deoxynucleotide mix, 1 μ l oligo(dt)15primer, 0.5 μ l RNase inhibitor, 0.4 μ l AMV(avain myeloblastosis virus) reverse transcriptase, 3.1 μ l DEPC water)과 혼합한 후 IL-4는 25℃에서 10분, 42℃에서 60분, 99℃에서 5분, 4℃에서 5분간, 30cycles로, IL-5는 25℃에서 10분, 42℃에서 60분, 99℃에서 5분, 4℃에서 5분간, 30cycles, IL-6는 94℃에서 30초, 58℃에서 30초,

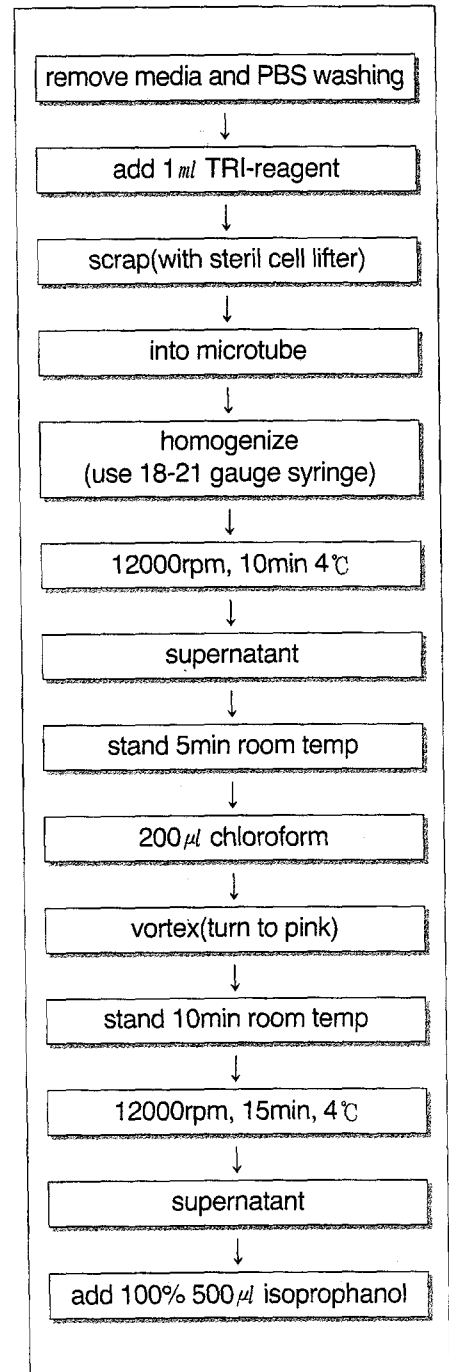


Fig 1. Schema of RNA isolation

72℃에 30초, 30cycles로, GAPDH (human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)는 25℃에서 10분, 42℃에서 60분, 99℃에서 5분, 4℃에서 5분간, RT-PCR을 수행하였다.

또한 각 조성별로 첨가한 혼합액은 5

×RT buffer 6μl, 10mM dNTP(2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate) 0.5 μl, Random primer 1 μl, 100mM DTT(dithiothreitol) 1 μl, MMLV (mononey murine leukemia virus) 1 μl, RNasin 0.1 μl, RNA template 1 μl, DEPC water 19.4 μl을 첨가하여 사용하였고 그 온도조건은 95℃에서 3분동안 1cycle, 95℃ 30초, 63℃ 30초, 72℃ 30초에서 30cycles, 72℃에서 3분 1cycle로 수행하였다. 정량을 위한 internal control gene으로는 GAPDH를 이용하였다. PCR에 사용된 primer는 다음 Table 2와 같다.

5) RT-PCR product의 電氣泳動 1.5% sigma agarose gel에 10μl의 RT-PCR product를 電氣泳動하여 分析하였다. 電氣泳動은 100V에서 40분 동안 수행하였으며 1×TAE(400mM tris-acetate and 10mM EDTA) buffer를 사

용하였다. Gel은 ET-BR(ethidium bromide) 용액으로 20분간 염색을 한 후 다시 수돗물에 15-20분간 탈 염색을 하였다. 자외선을 통하여 電氣泳動 結果를 觀察한 後 GEL-DOC(photodoc system, Bio-Rad, U.S.A)을 사용하여 確認하고 定量分析한 後 사진으로 제작하였다.

III. 成 積

1. IL-4 轉寫에 對한 杏仁과 桔梗의 效果

杏仁과 桔梗이 IL-4의 轉寫에 미치는 影響을 알아보기 爲하여 對照群과 韓藥材 投與群으로 나누어 24시간 동안 calcium inophore induction 시킨 후 다시 24시간 동안 檢液處理 후 RNA를 抽出하였다. 各各의 RNA를 IL-4 primer로 RT-PCR을 실시하여 1.5% sigma agarose gel에 10μl의 RT-PCR

product를 電氣泳動하여 GEL-DOC으로 定量分析하였으며 모든 分析은 house keeping gene 인 GAPDH의 양과 比較하여 測定하였다.

그 結果 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯도가 48.4%로 51.6%의 轉寫抑制效果를 나타내었고 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯도가 45.4%로 54.6%의 轉寫抑制效果를 나타내었다(Table 3, Fig. 2, Fig. 3).

2. IL-5 轉寫에 對한 杏仁과 桔梗의 效果

杏仁과 桔梗이 IL-5의 轉寫에 미치는 影響을 알아보기 爲하여 對照群과 韓藥

Table 2. Sequences of Primers Used for Quantitative RT-PCR

Primers	Sequences
IL-4 : bp	
IL-4-sens	ACC TTG CTG TCA CCC TGT TC
IL-4-anti-sens	TTG TGA GCG TGG ACT CAT TC
IL-5 : bp	
IL-5-sens	TAA CCA ACT GGG ACG ATA TG
IL-5-anti-sens	CTC TGT TGA CGA GCA ATG AG
IL-6 : 345 bp	
IL-6-sens	AAA TCA ACA CCA CCA ACG
IL-6-anti-sens	TGA ACT CCT TTG ACC ATA CAG
GAPDH : 300 bp	
GAPDH-N	CTG ACT TCA ACA GCG ACA
GAPDH-C	ACA TGA CAA GGT GCG GCG

Table 3. The Effect of Armeniaceae Amarum Semen and Platycodi Radix against the IL-4 Gene Expression

Expression(%)	control	Sample 1	Sample 2
IL-4/GAPDH	100	48.4	45.4

Control : PBS treated group after calcium inophore induction
 Sample 1 : Armeniaceae Amarum Semen treated group after calcium inophore induction
 Sample 2 : Platycodi Radix treated group after calcium inophore induction

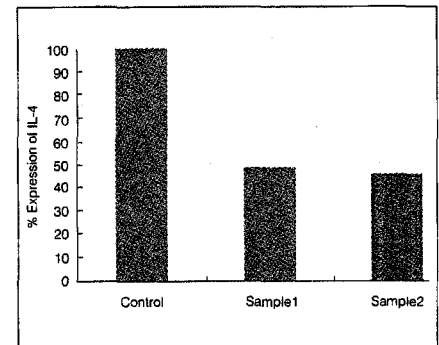


Fig 2. The effect of Armeniaceae Amarum Semen and Platycodi Radix against the IL-4 gene expression

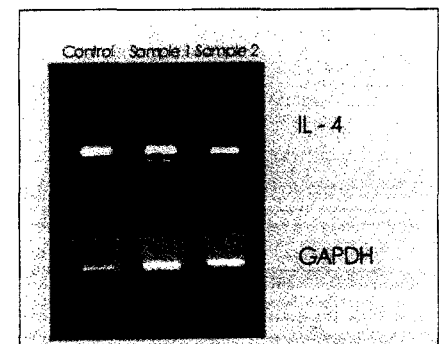


Fig 3. Quantitative RT-PCR analysis of IL-4 mRNA expression in Armeniaceae Amarum Semen treated group and Platycodi Radix treated group

材 投與群으로 나누어 24시간동안 다시 24시간 동안 檢液處理 후 RNA를 calcium inophore induction 시킨 후 抽出하였다. 各各의 RNA를 IL-5

Table 4. The Effect of Armeniacaee Amarum Semen and Platycodi Radix against the IL-6 Gene Expression

Expression(%) IL-5/GAPDH	control	Sample 1	Sample 2
	100	52.7	60.2

Control : PBS treated group after calcium inophore induction
 Sample 1 : Armeniacaee Amarum Semen treated group after calcium inophore induction
 Sample 2 : Platycodi Radix treated group after calcium inophore induction

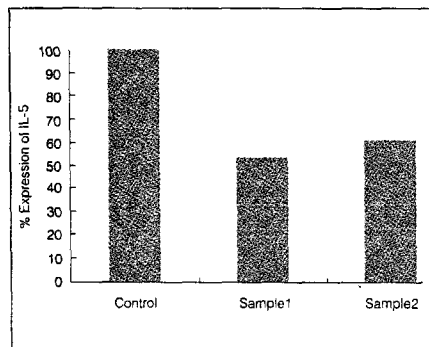


Fig 4. The effect of Armeniacaee Amarum Semen and Platycodi Radix against the IL-5 gene expression

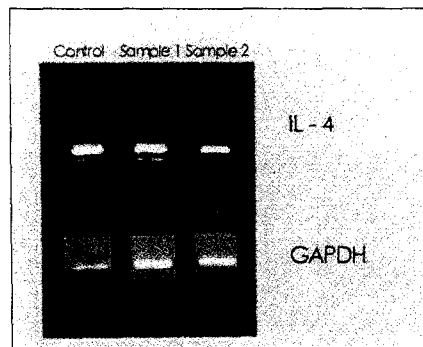


Fig 5. Quantitative RT-PCR analysis of IL-5 mRNA expressions in Armeniacaee Amarum Semen treated group and Platycodi Radix treated group

Table 5. The Effect of Armeniacaee Amarum Semen and Platycodi Radix against the IL-6 Gene Expression

Expression(%) IL-6/GAPDH	control	Sample 1	Sample 2
	100	42.3	69.1

Control : PBS treated group after calcium inophore induction
 Sample 1 : Armeniacaee Amarum Semen treated group after calcium inophore induction
 Sample 2 : Platycodi Radix treated group after calcium inophore induction

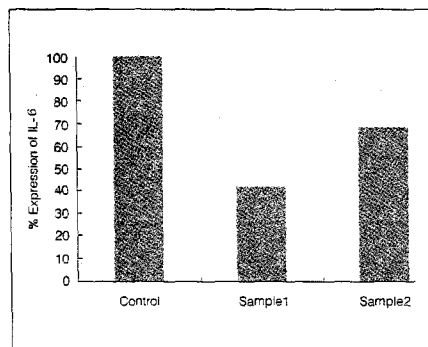


Fig 6. The effect of Armeniacaee Amarum Semen and Platycodi Radix against the IL-6 gene expression

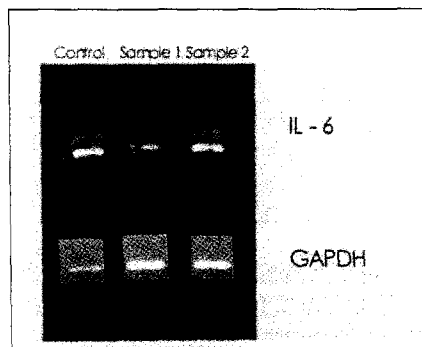


Fig 7. Quantitative RT-PCR analysis of IL-6 mRNA expression in Armeniacaee Amarum Semen treated group and Platycodi Radix treated group

primer로 RT-PCR을 실시하여 1.5% sigma agarose gel에 10µl의 RT-PCR product를 電氣泳動하여 GEL-DOC으로 定量分析하였으며 모든 分析은 house keeping gene 인 GAPDH의 양과 比較하여 測定하였다.

그 결과 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯도가 52.7%로 47.3%의 轉寫抑制效果를 나타내었고 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯도가 60.2%로 39.8%의 轉寫抑制效果를 나타내었다(Table 4, Fig. 4, Fig. 5).

3. IL-6 轉寫에 對한 杏仁과 桔梗의 效果

杏仁과 桔梗이 IL-6의 轉寫에 미치는 影響을 알아보기 위하여 對照群과 韓藥材 投與群으로 나누어 24시간동안 calcium inophore induction 시킨 후 다시 24시간 동안 檢液處理 후 RNA를 抽出하였다. 各各의 RNA를 IL-6 primer로 RT-PCR을 실시하여 1.5% sigma agarose gel에 10µl의 RT-PCR product를 電氣泳動하여 GEL-DOC으로 定量分析하였으며 모든 分析은 house keeping gene 인 GAPDH의 양과 比較하여 測定하였다.

그 결과 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯도가 42.3%로 57.7%의 轉寫抑制效果를 나타내었으며 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯도가 69.1%로 30.9%의 轉寫抑制效果를 나타내었다(Table 5, Fig. 6, Fig. 7).

IV. 考 察

産業社會의 發達, 環境公害 特히 大氣 汚染의 擴散, 吸煙人口의 增加로 인해 呼吸器 疾患은 날로 增加되고 있으며 이 가운데 氣管支 喘息은 反復的인 呼吸器

感染이나 특정 allergen에 대한 露出로 인하여 發作性的 好氣性 呼吸困難, 喘鳴, 肺의 過吸氣, 기침, 羅音(rale)을 特徵으로하는 可逆的, 發作的 氣道閉塞을 同伴하는 病症으로 정의된다¹⁾. 韓醫學的으로는 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 症狀을 主症狀을 하는 哮喘證에 該當된다¹⁴⁾.

氣管支 喘息의 病因에 關여하는 細胞는 eosinophil, mast cell, airway epithelial cell 등 여러 가지가 있지만 이 중 Th 림프구는 cytokine을 분비하여 氣道의 炎症反應을 調節하는 重要한 역할을 하고 있다. Th 림프구는 cytokine의 分泌樣相에 따라 Th1, Th2 림프구로 나뉘어진다. Th1 림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN- γ 를 생산하며 遲延形 過敏反應(delayed type hypersensitivity), 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 腫瘍에 대한 숙주반응에 關여한다. Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10등을 생산하며 即時形 過敏反應, 氣管支 喘息과 같은 알레르기성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용 등에 關여한다. Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 拮抗作用을 나타내어 Th1 림프구와 Th2 림프구의 기능이 억제되는 현상이 관찰되며, 알레르기성 氣管支 喘息 환자의 기관지 폐포세척액(BALF, bronchoalveolar lavage fluid)에서는 Th2 림프구의 기능이 活性化됨이 관찰되고 있다^{9,10)}.

IL-4는 B 세포 활성화와 isotype switching, 특히, IgE 항체의 발생에 있어서 重要한 역할을 한다. 기능성 IL-4 유전자가 결핍된 mice는 IgE를 생산할 수 없다. 면역반응 초기단계에서 IL-4의 출현은 반응의 성질에 重要한 영향을 준다. IL-4는 T 세포에 의한 IL-4의 보다 많은 생산을 도와주며, 항체 형성을 증진시키고, 지연형 과민성 반응을 억제하는 IFN- γ 의 생산을 억제한다¹¹⁾.

IL-5는 호산구증가증을 초래하는 主要한 cytokine이다. IL-5는 또한 성숙한 호산구를 활성화시키고, 그들의 수명을 연장하며, 염증부위에서의 축적에 기여한다¹²⁾. IL-5가 결핍된 mice에서는 알려진 침범에 대한 반응에서 어떠한 폐호산구 증가증(pulmonary eosinophilia)도 나타나지 않았다¹³⁾.

기관지 천식의 염증반응에 있어 IL-6는 폐포 대식세포에서 주로 생성되며, 혈중 단핵구와 비만세포에서도 생성되는 것으로 알려져 있으며 기관지 내피세포에서 유착분자(adhesion molecule)을 발현을 증진(up-regulate)시켜 기도 점막의 과식식과 이상분비물 증가에 關여한다¹⁴⁾.

氣管支 喘息, 喘息性氣管支炎, 肺氣腫과 心臟性喘息등 많은 病證을 包括하는 哮喘證은 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 症狀을 主症狀으로 한다¹⁾.

鄭²⁾은 哮喘의 原因을 飢寒, 冷한 飲料나 或은 鹹, 酸, 甘味를 지나치게 嗜食하게 되면 積痰蘊熱하여 發生하게되며, 濕氣, 病邪를 初期에 모두 表散시키지 못하여 餘邪가 肺絡에 潛伏해 있다가 外邪가 닿으므로 發生하게 되며, 새제, 內在된 素因을 가지고 있는 사람이 寒冷疲勞등 어떤 誘因을 만나서 發生하게 되며, 濕氣, 某種의 냄새 飲食에 대한 過敏性反應으로도 발생되며, 다섯째, 臟器的인 原因으로 주로 肺, 腎의 呼吸機能低下로 發生하게 된다고 정리하였다.

哮喘證은 우선 發作이 일어나기 전에는 正氣扶養을 위주로 하고 이미 發作하였을 때는 攻邪를 위주로 하여야 하며, 虛實과 寒熱을 감별하여 實證에는 祛邪에 중점을, 虛證에는 扶養正氣에 중점을 두어야 하며, 冷哮에는 溫肺散寒, 化痰平喘의 治法을, 熱哮에는 宣肺降逆, 清熱化痰의 治法을 사용하여야 한다. 哮

喘證의 治療에 吐法을 사용할 때 涼劑와 熱劑의 사용을 禁하고 風寒을 피하고 厚味를 節制하여야 한다¹⁵⁾.

杏仁과 桔梗은 化痰止咳平喘藥으로 주로 咳嗽喘息의 病症에 適用되어 왔다. 杏仁은 性味가 苦辛性溫하여 苦味는 肺經으로 들어가 肺氣를 강하게 하고, 辛味는 疏散하며 또한 宣肺除痰하므로 痰이 消하여 肺氣가 宣通하게 되어 哮喘이 스스로 平喘되므로 宣肺化痰하고 止喘平喘의 效能이 있어 哮喘症을 治療하는 要藥이 된다. 桔梗의 味는 辛散苦泄하고 平한 性은 肺經으로 들어가 上焦를 宣通하고 肺氣를 升提하므로 升浮上行케 하여 胸膈과 咽喉를 利하게 하고 宣肺祛痰하는 良好한 效能이 있어 外邪의 犯肺로 因하여 咳嗽痰多하고 胸膈이 悶하여 咽痛失音 등 證에 寒熱을 막론하고 應用하여 治療한다¹⁶⁾.

氣管支 喘息에 대한 既存의 韓醫學 研究는 文獻的, 實驗的, 臨床的 研究方法을 통해 報告되어 왔다. 文獻的인 研究로 鄭³⁾은 哮喘의 原因과 治法, 吉村⁴⁾은 알레르기성 喘息을 東西醫學的 比較·考察하여 정리하였고, 鄭⁵⁾은 알레르기 疾患의 韓方療法에 關하여 정리하였으며, 金⁷⁾등은 水喘, 火喘 및 心臟性 喘息의 治法, 處方에 關하여 정리하였다. 實驗的 研究로 李¹⁸⁾는 五拗湯, 鄭¹⁹⁾은 定喘湯의 喘息 및 抗알레르기 效果에 對하여 報告하였으며, 권^{6,7)} 등은 韓藥物이 알레르기 喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響에 關하여 報告하였다. 臨床 研究로는 趙²⁰⁾은 哮喘證의 臨床 研究, 許²¹⁾ 등은 哮喘證에 對한 清上補下湯의 臨床的 效果에 對하여 報告한 바 있다.

최근 喘息의 發生 機轉과 그 治療 過程에 對한 研究로 分子生物學的 實驗 技法을 도입하였고, 이러한 研究方法은

炎症 反應이나 免疫 反應에 공통으로 관여하는 여러 cytokine, chemokine의 增減을 관찰함으로써 細胞 단계에서의 組織 損傷 및 治愈 復原 過程을 이해하고 설명하고 있다.

많은 研究에서 이러한 細胞 단계의 反應에서 어떠한 cytokine이나 chemokine이 관여하고 역할하고 있는지를 계속적으로 보고하고 있으며, 각종 治療 製劑를 투여함으로써 그러한 mechanism에 變化를 초래하는 機轉들을 구체적으로 제시하고 있다.

이에 著者は RBL(rat-basophilic leukemia)-2H3 細胞柱를 利用하여 臨床적으로 喘息治療에 效能이 認定된 韓藥材인 杏仁과 桔梗이 喘息機轉에 主要한 役割로 作用하는 代表的 cytokine인 IL-4, 5, 6의 轉寫를 抑制하는 效果에 대하여 研究하였다.

杏仁과 桔梗의 濃度에 따른 cytokine IL-4, IL-5, IL-6의 轉寫度에 미치는 影響에 대하여 알아보기 위하여 對照群과 實驗群의 최종 濃도를 0.1%, 1%, 10% 되게 처리하고 5% CO₂와 95% air의 humidified 조건이 유지되는 Incubator를 利用하여 37℃에서 다시 24시간 배양하였다.

결과 10% 韓藥材 投與群에서는 細胞가 死滅하므로 인하여 배양에 실패하여 RNA를 추출하지 못하였다. 이는 10%의 濃度에서 藥材의 毒性으로 인해 細胞가 死滅하였거나 培地環境의 變化로 咽하여 死滅하였을 것으로 推定되었다. 1%와 0.1%에서는 細胞性狀이나 細胞數에 큰 差異를 나타내지 않아 1%의 濃度에서 보다 높은 效果를 나타낼 것으로 判斷하여 1% 濃度를 選擇하여 實驗을 하였다.

杏仁과 桔梗이 IL-4, IL-5 및 IL-6의 轉寫에 미치는 影響을 알아보기 위하여

對照群과 韓藥材 投與群으로 나누어 24시간동안 calcium inophore induction 시킨 후 다시 24시간 동안 檢液處理 후 RNA를 抽出하였다. 各各의 RNA를 IL-4, IL-5, IL-6 primer로 RT-PCR을 실시하여 1.5% sigma agarose gel에 10 μ l의 RT-PCR product를 電氣泳動하여 GEL-DOC으로 定量分析 하였으며 모든 分析은 house keeping gene인 GAPDH의 양과 比較하여 測定하였다.

그 결과 IL-4의 轉寫에 있어 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 48.4%로 51.6%의 轉寫抑制效果를 나타내었고 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 45.4%로 54.6%의 轉寫抑制效果를 나타내었다(Table III, Fig. 2, Fig. 3).

IL-5의 轉寫에 있어 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 52.7%로 47.3%의 轉寫抑制效果를 나타내었고 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 60.2%로 39.8%의 轉寫抑制效果를 나타내었다(Table IV, Fig. 4, Fig. 5).

IL-6의 轉寫에 있어 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 42.3%로 57.7%의 轉寫抑制效果를 나타내었고 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 69.1%로 30.9%의 轉寫抑制效果를 나타내었다(Table V, Fig. 6, Fig. 7).

따라서, 杏仁과 桔梗이 喘息에 미치는 影響은 IL-4, IL-5, IL-6의 轉寫를 抑制하므로써 B 세포에서의 IgE의 合成을 阻害하고, 호산구를 활성화시키는 cytokine인 IL-5의 轉寫를 抑制하여 遲延型 喘息反應에 주된 役割을 하는 호산구의 活性을 阻害하여 炎症性 浸潤 및 肺組織의 纖維化, 非可逆的인 損傷등을 減少시키며, 비만세포에 作用하는 IL-6를 抑制하므로써 염증매개물질의 分泌를 阻害하므로써 氣道粘膜炎의 過增殖과

異狀分泌物 增加를 減少시켜 喘息의 發生機轉을 效果적으로 遮斷하여 喘息의 治療效果를 나타내는 것으로 생각된다.

위 實驗結果는 1회에 걸친 실험으로 추후 반복실험을 통하여 再現性을 確認하는 것이 必要하리라 생각되며, 앞으로 喘息 治療에 臨床적으로 有用한 韓醫學處方에 대한 RT-PCR analysis를 利用한 cytokine, chemokine의 作用 變化에 미치는 影響을 實驗적으로 규명함으로써 기존의 韓醫學 理論에 근거한 治療方法에 대한 客觀的인 檢證은 물론 새로운 喘息 治療方法의 모색 또한 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

RBL(rat basophilic leukemia)-2H3 細胞柱를 利用하여 杏仁과 桔梗이 喘息의 病態生理에 관여하는 cytokine 中 IL-4, IL-5, IL-6의 轉寫에 미치는 效果를 관찰한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. IL-4의 轉寫에 있어 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 48.4%로 51.6%의 轉寫抑制效果를 나타내었다.
2. IL-4의 轉寫에 있어 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 45.4%로 54.6%의 轉寫抑制效果를 나타내었다.
3. IL-5의 轉寫에 있어 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 52.7%로 47.3%의 轉寫抑制效果를 나타내었다.
4. IL-5의 轉寫에 있어 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가 60.2%로 39.8%의 轉寫抑制效果를 나타내었다.
5. IL-6의 轉寫에 있어 杏仁 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯度가

42.3%로 57.7%의 轉寫抑制效果를 나타내었다.

6. IL-6의 轉寫에 있어 桔梗 投與群에서는 對照群에 比하여 發顯도가 69.1%로 30.9%의 轉寫抑制效果를 나타내었다.

VI. 參考文獻

1. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울 : 아트동방 ; 1999, pp.162-202
2. 鄭昇杞. 알레르기疾患의 韓方療法(喘息을 中心으로). 大韓韓醫學會誌. 1990 ; 11(2) : 11-15
3. 鄭昇杞, 李珩九. 哮喘의 原因 및 治法에 關한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1986 ; 7(1) : 60-67
4. 王肯堂. 六科准繩. 서울 : 柳林社 ; 1975, p.143
6. 권순호. 五拗湯이 알레르기 喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 1999
7. 권혁성, 정희재, 정승기, 이형구. 淸上補下湯이 알레르기 喘息의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 1999
8. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. *J. of investigational allergology and clinical immunology* 1998 ; 8(3) : 141-148
9. 권오정, 김호중, 김정희 외10명. 결핵균 독성 여부에 따른 기도 상피세포의 Chemokine 발현에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환. 1997 ; 44(4)
10. 정승원, 이미애, 하대유. 사이토카인이 TH1세포의 Mitogens에 대한 증식반응에 미치는 영향. *Korean J Immunol* 1997 ; 19 : 73~81
11. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994 ; 12 : 635-673
12. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992 ; 79 : 3101-3109
13. Hogan SP, et al. Inhibition of aeroallergen-induced pulmonary eosinophilic infiltrate and lung damage in IL-5 deficient mice. *Austrian Society for Immunology* 1994 ; Meeting Abstract Book
14. Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 1995 ; 155 : 297
15. 吉村永星, 黃義玉, 鄭昇杞, 李珩九. 알레르기성 喘息에 關한 文獻의 考察(東西醫學의 比較考察). 大韓韓醫學會誌. 1990 ; 11(1) : 39-70
16. 李尙仁. 本草學. 서울 : 修書院 ; 1981, pp.237-238, 484-485, 540-541
17. 김영태, 권혁성, 정승기, 이형구. 水喘, 火喘 및 心臟性 喘息의 治法, 處方에 關한 東西醫學의 文獻考察. 大韓韓醫學會誌. 1995 ; 16(1) : 172-183
18. 李珩九. 五拗湯이 咳嗽 喘息에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 1982
19. 鄭昇杞. 定喘湯이 喘息에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究. 慶熙大學校 大學院. 1985.
20. 조영민, 조일현, 이경기, 차은수, 정희재, 정승기, 이형구. 哮喘證에 對한 臨床的 觀察. 第 19回 全國 韓醫學 學術大會 發表 論文集. 1997 : 141-151
21. 허승철, 박광은, 정승기, 이형구. 哮喘證에 對한 淸上補下湯의 臨床的 觀察. The 8th INT Congress of oriental medicine. 1995