

蒼耳子가 제 I형 알레르기 喘息모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響

이 병 희, 이 상 재, 김 광 호
경희대학교 한의과대학 예방의학교실, 경희대학교 한의학연구소

The Effects of Changiga on Immune Cell & Serum OA-specific IgE in BALF in Rat Asthma Model

Byoung-Hee Lee, Sng-Jae Lee, Kwang-Ho Kim

Dept. of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University. Institute of Oriental Medicine,
Kyung-Hee University.

BACKGROUND : Changiga is a hetnal medicine which has been used of the traditional therapeutic agent of asthma. So I examine the effect of Changija on immune Cell & serum OA-specific IgE in BALF in rat asthma model.

MATERIAL and METHODS : Rats were sensitized with OA; at day 1 sensitized group and Changiga(CIG) groups were systemically immunized by subcutaneous injection of 1mg OA and 300mg of Al(OH)₃ in a total volume of 2ml. At the same time, 1ml of 0.9% saline containing 6×10⁹ B. pertussis bacilli was injected by i.p. 14 days, after the systemic immunization, rats received local immunization by inhaling 0.9% saline aerocol containing 2%(wt/vol) OA. A day after local immunization, BAL fluid was collected from the rats. A day after local immunization, rats were orally administered with Changiga extract 14 days. Lymphocyte, CD4+ T-cell CD8+ T-cell counts, CD4+/CD8+ ratio in BALF, change of serum OA-specific IgE level in the peripheral blood were measured and evaluated.

RESULT : Changiga showed a suppressive effect on a rat asthme model. Changiga decreased lymphocyte, CD4+ T-cell, CD4+/CD8+ ratio in BALF, serum OA-specific IgE level as compared with the control group, whereas Changiga decreased CD8+ T-cell in BALF with statistical nonsignificance as compared with the control group.

CONCLUSION : This study shows that Changiga have a suppressive effect on rat allergic athma model. Changiga would be useful allergic asthma treatment agent.

Key words: Changiga BAL fluid, CD4+, CD8+

I. 서 론

1963년 Gell과 Coombs에 의해 제안된 네가 지 과민반응의 유형중 제 1형 즉시형 과민반응

의 역사는 1902년 Richt와 Portier에 의해서 시작되었다. 이들은 바다의 연체동물인 말미잘의 독소를 투여한 개에 다시 독소를 투여하였을 때, 기대했던 방여(prophylaxis) 효과보다는

과민반응이 일어나는 것을 보고 이를 방어하지 못한다는 뜻으로 '아나필락시스(anaphylaxis)'라고 명명하였다. 1906년 Clemens von Pirquet는 면역(immunity)과 과민반응(hypersensitivity)은 다같이 이물과 면역체계 사이에서 일어나는 동일한 기전에 의한 면역반응이라는 것을 알아냈고, 항원에 반복 노출시 처음에 일어났던 반응과는 다르게 반응이 나타나는 현상을 '알레르기(allergy)'라고 하자고 제안하였다. 알레르기란 변화된 반응(changed reactivity)이란 의미인데, 이는 희랍어의 allos(changed)와 ergos(action)의 합성어에서 유래한다. 알레르기중 우리몸에 이로운 반응은 면역(immunity)이고, 해로운 반응(과민반응)은 알레르기 반응이라 하고, 알레르기 반응의 결과 알레르기 질환이 발생한다.¹⁾ 제1형 과민반응은 이미 생성된 항체에 감작된 조직세포와 원인 항원(혹은 알레르겐)간의 반응으로 과민반응이 시작한다. 항체에는 IgG, IgA, IgM, IgD, IgE 등과 같이 5가지 종류가 있는데 이 중 IgE에 의해 매개되는 반응이 제 1형 과민반응이다. IgE는 호염기구(basophil) 또는 비만세포(mast cell)의 표면 수용체에 대한 친화력이 매우 높아 대부분 이들 세포와 결합되어 있다. IgE에 감작된 세포는 원인 항원이 재차 유입되어 이들 세포의 표면에 있는 IgE와 결합한다. 그 결과 일련의 반응이 일어나서, 최종적으로는 이들 세포내의 여러 화학매체들이 유리되어 알레르기 질환(과민반응)이 발생하게 된다.²⁾ 이러한 과민반응으로 인한 제 1형 알레르기 질환으로는 두드러기, 아토피피부염, 약물 알레르기, 기관지천식, 알레르기성 비염, 곤충알레르기 등이 있다.³⁾ 현재의 질병군중에서 쉽게 접근하기가 곤란한 것이 바로 이러한 자가면역성 질환이라고 생각되며 이러한 자가면역성 질환을 이해하고 한의학적인 치료로 접근하기 위해서 제 1형 알레르기 질환을 대상으로 한 약물연구가 필요하다고 판단되었다.

蒼耳子(Xanthii Fructus) 辛溫解表藥으로서 밝혀진 주요성분으로는 xanthostrumarin, linoleic acid Vitamin C 등이 있으며 그 기원은 국화과(Compositae) 도꼬마리(Xanthium stramonium L.)의 성숙한 과실이다. 그 성미는 溫, 辛, 苦, 有少毒하며 귀경은 肺이다. 효능으로는 發汗散風, 通竅止痛, 祛風除濕하는 효능이 있어서 風寒表證, 鼻塞流涕, 頭痛, 鼻淵鼻塞, 風濕痺痛, 祛風止痒 등의 질환을 치료한다. 祛風濕 通鼻竅 하는 주치로서 蒼耳散, 復方蒼耳子湯등에 쓰인다.

제 1형 알레르기 천식 모델을 대상으로하여 진행된 실험으로는 鄭 등⁴⁾이 定喘湯의 천식에 미치는 영향에 대한 연구보고, 朴 등은⁵⁾ 千縉導痰湯이 천식에 미치는 영향을, 李 등⁶⁾은 小青龍湯이 알레르기 천식모델 흰쥐의 면역세포에 미치는 영향을, 趙 등⁷⁾은 瀉白散이 천식에 미치는 효능에 관한 연구를, 金 등⁸⁾은 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 喘息 모델 흰쥐의 免役細胞등에 미치는 影響등에 대한 연구보고가 있었다.

이에 저자는 제 1형 면역반응인 알레르기 질환에 대하여 單味로서의 蒼耳子が 미치는 영향을 알아보기 위하여 감작된 흰쥐에 ovalbumin을 흡입시켜 알레르기 천식 병태를 유발시키고 蒼耳子를 경구투여한 후 흰쥐의 BALF(Broncho Alveolar Lavage Fluid)내의 총 세포수, lymphocyte 수, CD4+ T-cell 수, CD8+ T-cell 수의 변화와 CD4+/CD8+ 비율의 변화와 혈청내에서의 IgE 양의 변화를 측정하고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 동물 및 재료

(1) 동물

체중 200±20g의 Sprague-Dawley계 흰

이병희 외 2인 : 蒼耳子가 제 I 형 알레르기 喘息모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響

쥐 (대한바이오텍, 한국)를 사용하였으며, 고형사료(구성성분: 조단백질 21.1%·조지방 3.5%·조섬유 5.0%·조회분 8.0%·칼슘 0.6%·인 0.6%)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 2주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

(2) 약재

蒼耳子(Xanthii Fructus)는 경희의료원 약재과에서 구입하여 사용하였다

2. 실험방법

(1) 실험군 설정

실험군은 한 군에 10마리씩 배정하여 정상군(Normal group), 대조군(Control group), 蒼耳子群(CIG group)으로 설정하였다. 정상군(Normal group)은 고형사료와 물만을 충분히 공급하였고, 대조군(Control group)은 정상군과 동일한 환경에서 알레르기 喘息을 유발하였고, 蒼耳子群은 대조군과 동일한 방법으로 알레르기 喘息을 유발한 후 각각 蒼耳子 煎湯液을 투여하였다.

(2) 알레르기 喘息 유발

알레르기 喘息 유발은 Bellofiore 등의 방법에 따라서 첫째 날 Ovalbumin(OA) 1mg과 Al(OH)₃ 300mg의 0.9% saline 2ml에 녹여 피하 주사하고, 6×10⁹ B. pertussis를 포함한 0.9% saline 1ml를 복막내로 주입하여 immunization을 시켰다. 전신적인 immunization 후 14일째, 동물들은 2% (w.t/vol) OA를 함유한 0.9% saline aerosol을 흡입시킴으로써 항원감작에 의한 喘息을 유발시켰다. Aerosol은 ultrasonic nebulizer(Samsung, 한국)에 의해 만들어졌고, 20분간 흡입시켰다.

(3) 검액의 준비

蒼耳子 300g을 5,000cc의 등근 플라스크에 3,000cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 煎湯하여 0.2 μ m filter로 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -80 $^{\circ}$ C deep freezer(SANYO, Japan)에서 한시간 방치한 후 freezer dryer(EYELA, Japan)로 24시간 동안 동결건조하여 蒼耳子 엑기스 39.0g을 얻어 이를 실험에 필요한 농도로 증류수에 녹여 조정하여 50ml cornical tube(Falcon, USA)에 넣어 2-4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 보관하였으며, 사용할 때 water bath에 넣어 gel상태를 완전히 녹여 사용하였다.

(4) 검액 투여

알레르기 천식을 유발한 다음 이틀째 되는 날부터 蒼耳子 추출물 78.0mg/200g 검액을 증류수로 희석하여 실험군의 흰쥐에 1일 1회 14일간 일정한 시각에 1ml씩 경구 투여하였다. 대조군은 동량의 식염수를 경구 투여하였다.

(5) 채혈

喘息유발 24시간 후인 15일째 클로로포름으로 마취시킨 다음 심장천자하여 혈액을 EDTA가 들어 있는 병에 넣고 잘 섞어 응고를 방지한 뒤 사용하였다.

(6) Broncho-alveolar lavage(BAL)과 BAL fluid(BALF) 내의 세포관찰

기관지의 염증반응을 조사하기 위해서 OA aerosol 흡입 다음날에 폐기관지세척을 시행하였다. 0.1% EDTA 2Na를 포함한 PBS(Phosphate buffered saline; Sodium Chloride 8g, Pottassium Chloride 0.2g, Disodium Hydrogen Phospate 1.15g, Pottassium Dihydrogen Phospate 0.2g, Calcium Chloride 0.0005g, Magnesium Chloride 0.0005g) 4ml를 3번 주입하여 폐 기

관지를 세척한 후에 BALF를 얻었다. 부피는 원래 부피의 대략 평균 80%로 전체 세포수는 hemocytometer를 사용해서 측정하였다. 임파구수는 BALF에 lymphoprep (1.077±0.0001 g/ml, Nycomed Pharma As, Oslo, Norway)를 첨가하여 25분 동안 550G에서 원심 분리(HERMLE, Germany)한 후 상층을 버리고, 중간에 하얗게 부유해 있는 lymphocyte를 분리한 다음 PBS에 부유시켜 220G에서 10분간 3회 원심 세척한 후, RPMI 1640 medium에 부유시키고, 광학 현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 Trypan blue exclusion으로 세포수를 측정하였다.

(7) 폐기관지세척액(BALF) 내의 CD4+ T-cell과 CD8+ T-cell 측정

RPMI 1640에 부유시킨 각 임파구 세포를 media A (pH 7.2 PBS + 5 % normal serum of host species + 2 M sodium azide)에 2×10^7 cells/ml의 농도로 세포를 재부유시키고, 시험관에 세포부유액 50 μ l씩 넣어서 시험관마다 1×10^6 개의 세포가 존재하게 하였다. 각 시험관에 FITC Anti-Rat CD4+ Monoclonal Antibody (Cedarlane, Ontario, Canada)와 PE Anti-Rat CD8+ Monoclonal Antibody (Cedarlane, Ontario, Canada)를 각각 0.5 μ g씩 가하고, Vortex mixer로 잘 섞은 다음 이 혼합액을 빛이 차단되도록 알루미늄 호일로 씌우고 4°C에서 30 분간 실험실에서 배양한 뒤, 4°C에서 PBS로 2회 세척하고, 50 μ l의 ice cold media B (pH 7.2 PBS + 0.5 % Bovine serum albumin + 2 M sodium azide)에서 cell pellet을 재 부유시킨 후 형광현미경을 이용하여 임파구에 대한 CD4+ 및 CD8+ T 세포율을 측정하였다. 세포수는 산출된 lymphocyte에 CD4+, CD8+의 비율을 곱하여 계산하였다.

(8) OA-specific IgE Ab Assay

Serum은 15일째에 심장천자를 통해 얻었다. Microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark)는 24시간 동안 4°C에서 100 μ l/well of anti-rat IgE monoclonal Ab (Zymed, CA., USA, 5 μ g/ml in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.5)로 coating한 후에 0.05% Tween 20 (PBSTW)를 함유한 PBS로 4번 세척하였고, 그 다음 1% bovine serum albumin (BSA)를 포함한 PBSTW로 실온에서 1시간동안 2-fold serial dilution 100 μ l의 standard serum이나 적절하게 희석된 sample serum과 함께 배양하였다. PBSTW로 세척한 후에, PBSTW (with 1% BSA)에 100 μ l biotinylated OA(50 μ g/ml)를 녹여 각각의 well에 가해서 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 세척 후에 100 μ l horseradish peroxidase-streptavidin(0.5 μ g/ml in PBSTW with 1% BSA, Zymed)은 각 well에 plate하였다. PBSTW로 마지막 세척을 한 후에, 0.035% H2O2를 포함한 100 μ l o-phenylenediamine solution (1.5mg/ml in citrate-phosphate buffer, pH 5.0, Zymed, CA., USA)을 각 well에 가하였다. 효소 반응은 50 μ l 4N H2SO4를 가함으로써 정지되고, 490nm에서 흡광도를 측정하였다. titer는 standard curve로 결정하였다. 1:100으로 희석된 Standard serum의 흡광도는 임의로 1U/ml로 하였다.

3. 통계분석

모든 통계분석은 윈도우용 SPSS(ver. 8.0)를 이용하여 실시하였다. 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균±표준편차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with multiple comparisons (Duncan's method)으로 분석하였고, 유의수준은 0.05로 하였다.

이병희 외 2인 :蒼耳子가 제 I 型 알레르기 喘息모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響

성 적

1. 폐기관지 세척액(BALF)내 총세포 수의 변화

폐기관지 세척액내의 total cell은 正常群(Normal group)은 $9.67 \pm 4.64 (\times 10^5/ml)$, 對照群(Control group)은 $24.29 \pm 5.16 (\times 10^5/ml)$, 蒼耳子群(CIG group)은

$20.70 \pm 6.87 (\times 10^5/ml)$ 개로 집단 간 total cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 ($F=18.275$, $p=0.0001$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 Total cell 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하지 않았다(Table I).

Table I. Effects of Changiga on the Total Cell in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	Total cells in BALF ($\times 10^5/ml$)	Duncan Grouping
Normal	10	$9.67 \pm 4.64^{1)}$	A ²⁾
Control	10	24.29 ± 5.16	B
CIG	10	20.70 ± 6.87	B

F-value: 18.275 *

1) Mean \pm Std. Deviation

2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin.

CIG: treated with Changiga for 14 days

2. 폐기관지 세척액(BALF)내 lymphocyte 수의 변화

폐기관지 세척액내의 lymphocyte 수는 正常群(Normal group)은 $5.25 \pm 4.31 (\times 10^5/ml)$, 對照群(Control group)은 $14.41 \pm 3.26 (\times 10^5/ml)$, 蒼耳子群(CIG

group)은 $10.95 \pm 2.65 (\times 10^5/ml)$ 개로 집단 간 lymphocyte 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=17.694$, $p=0.0001$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 lymphocyte 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다(Table II).

Table II. Effects of Changiga on Lymphocytes in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	lymphocytes in BALF ($\times 10^4/ml$)	Duncan Grouping
Normal	10	5.25 \pm 4.31 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	14.41 \pm 3.26	C
CIG	10	10.95 \pm 2.65	B

F-value: 17.694 *

1) Mean \pm Std. Deviaion

2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin.

CIG: treated with Changiga for 14 days

3. 폐기관지 세척액(BALF)내 CD4+ T-cell 수의 변화

폐기관지 세척액내의 CD4+ T-cell 수는 정상群(Normal group)은 4.51 \pm 3.64 ($\times 10^5/ml$), 對照群(Control group)은 12.67 \pm 3.31 ($\times 10^5/ml$), 蒼耳子群(CIG group)은 7.90 \pm 1.65 ($\times 10^5/ml$) 개로 집단 간 CD4+ T-cell

수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 (F=18.722, p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 CD4+ T-cell 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다(Table III, Figure 1).

Table III. Effects of Changiga on CD4+ T-cell in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	CD4+ T-cell in BALF ($\times 10^4/ml$)	Duncan Grouping
Normal	10	4.51 \pm 3.64 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	12.67 \pm 3.31	C
CIG	10	7.90 \pm 1.65	B

F-value: 18.722 *

1) Mean \pm Std. Deviation

2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin. CIG: treated with Changiga for 14 days

이병희 외 2인 :蒼耳子가 제 I형 알레르기 喘息모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響

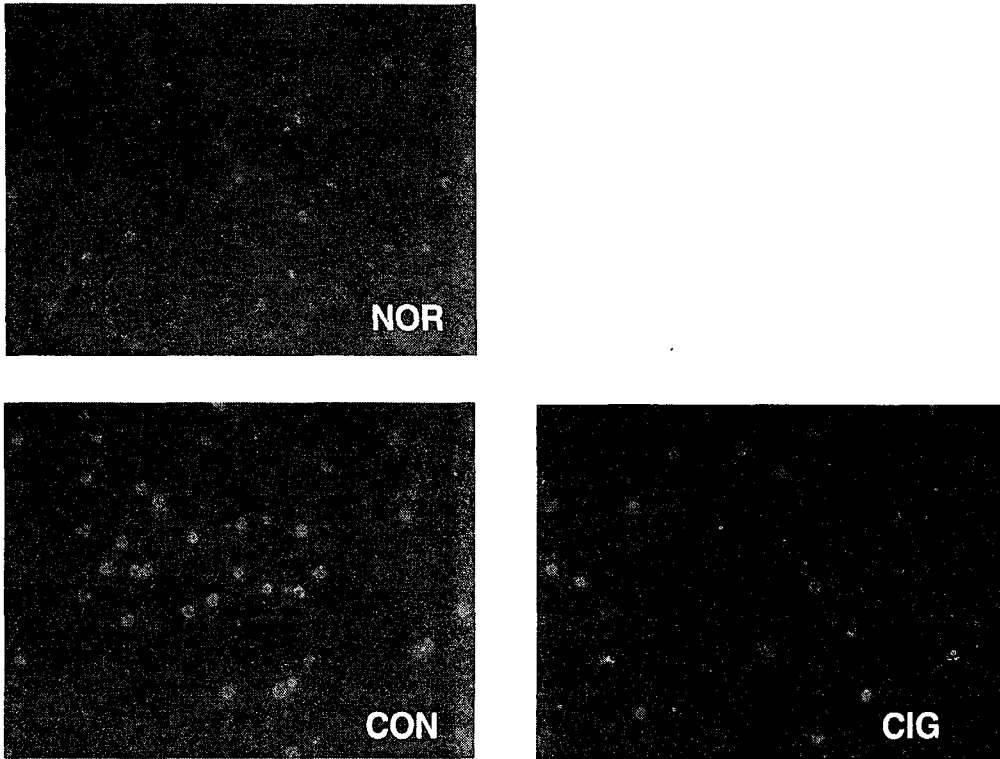


Figure 1. Effects of Changiga on CD4+ T cell in Broncho-alveolar lavage fluid of Ovalbumin induced Asthmatic Rat

Rats were sensitized with OVA; at day 1 sensitized group(CON), Changiga groups(CIG) were systemically immunized by subcutaneous injection of 1mg OA and 300mg of Al(OH)₃ in a total volume of 2ml. At the same time, 1ml of 0.9% saline containing 6×10^9 *B. pertussis* was injected by i.p. 14 days. after the systemic immunization, rats received local immunization by inhaling 0.9% saline aerosol containing 2%(w.t/vol) OA. A day after local immunization, BAL fluid was collected from the rats.

CIG group treated with Changiga for 14 days.

4. 폐기관지 세척액(BALF)내 CD8+ T-cell 수의 변화

폐기관지 세척액내의 CD8+ T-cell 수는 정상群(Normal group)은 9.13 ± 4.90 ($\times 10^3$ /ml), 對照群(Control group)은 14.00 ± 4.06 ($\times 10^3$ /ml)개, 蒼耳子群(CIG group)은 13.08 ± 3.23 ($\times 10^3$ /ml) 개로 집단

간 CD8+ T-cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 인정되었으며($F=3.950$, $p=0.031$, ANOVA test)(Table IV, Figure 2) 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 Total cell 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하지 않았다.

Table IV. Effects of Changiga on CD8+ T-cell in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	CD8+ T-cell in BALF ($\times 10^3/ml$)	Duncan Grouping
Normal	10	9.13 \pm 4.90 ¹⁾	A
Control	10	14.00 \pm 4.06	B
CIG	10	13.08 \pm 3.23	B

F-value: 3.950 *

1) Mean \pm Std. Deviation

* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin.

CIG: treated with Changiga for 14 days

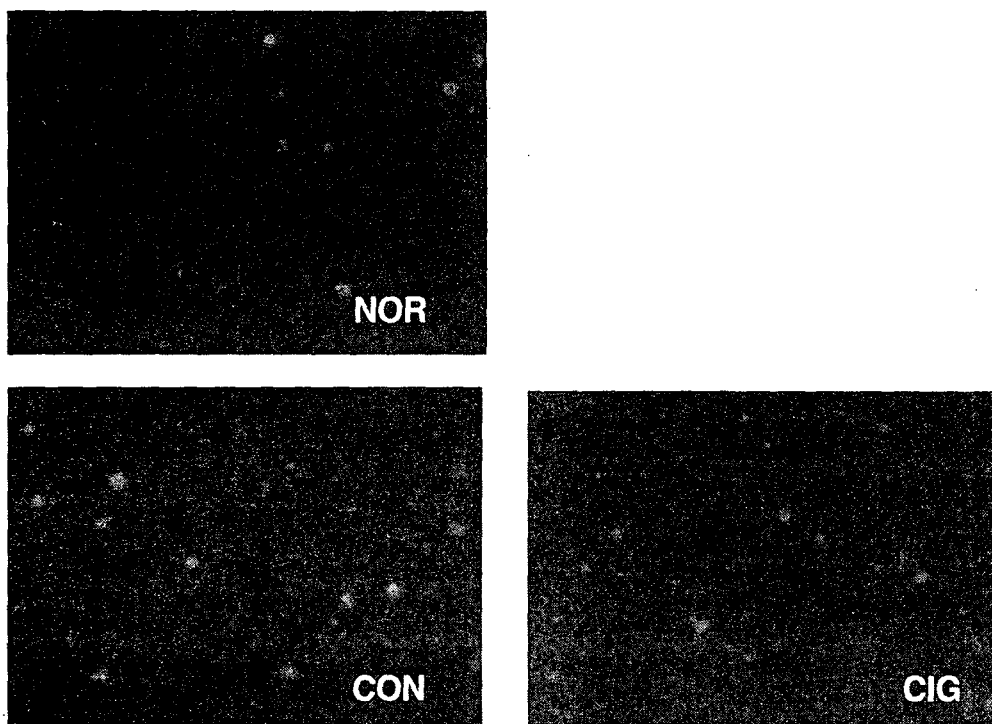


Figure 2. Effects of Changiga on CD8+ T cell in Broncho-alveolar lavage fluid of Ovalbumin induced Asthmatic Rat

Rats were sensitized with OVA; at day 1 sensitized group(CON), Changiga groups(CIG) were systemically immunized by subcutaneous injection of 1mg OA and 300mg of Al(OH)₃ in a total volume of 2ml. At the same time, 1ml of 0.9% saline containing 6×10^9 *B. pertussis* was injected by i.p. 14 days. after the systemic immunization, rats received local immunization by inhaling 0.9% saline aerosol containing 2%(w.t/vol) OA. A day after local immunization, BAL fluid was collected from the rats.

CIG group treated with Changiga for 14 days.

이병희 외 2인 :蒼耳子가 제 I 형 알레르기 喘息모델 환자의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響

5. 폐기관지 세척액내 CD4+/CD8+ 비율의 변화

폐기관지 세척액내의 CD4+/CD8+ 의 비율은 正常群(Normal group)은 4.02±3.05, 對照群(Control group)은 10.72±1.96, 蒼耳子群(CIG group)은 6.82±2.78 으로 집단 간 CD4+/CD8+ 의 비율은 통계적으로 有意한 차

이가 있었으며(F=16.214, p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 CD4+/CD8+ 의 비율이 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다(Table V).

Table V. Effects of Changiga on CD4+/CD8+ cell ratio in Broncho-alveolar Lavage Fluid of Ovalbumin induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	CD4+/CD8+ ratio in BALF	Duncan Grouping
Normal	10	4.02±3.05 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	10.72±1.96	C
CIG	10	6.82±2.78	B

F-value: 16.214 *

1) Mean±Std. Deviation

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Control: Group sensitized with ovalbumin.

CIG: treated with Changiga for 14 days

6. 혈청내 IgE 量的 변화

혈청내 IgE 量을 측정된 결과 正常群(Normal group)은 1.41±0.78 (U/ml), 對照群(Control group)은 2.85±1.28 (U/ml), 蒼耳子群(CIG group)은 2.16±0.87 (U/ml)로 집단 간 혈청내 IgE 量은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며

(F=5.230, p=0.012, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 혈청내 IgE 量이 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다(Table VI).

Table VI. Effects of Changiga on IgE Level in Serum of Ovalbumin induced Asthmatic Rat

Group	No. of animal	OA-specific IgE levels (U/ml)	Duncan Grouping
Normal	10	1.41±0.78 ¹⁾	A ²⁾
Control	10	2.85±1.28	B
CIG	10	2.16±0.87	B

F-value: 5.230 *

1) Mean±Std. Deviation

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test Control: Group sensitized with ovalbumin. CIG: treated with Changiga for 14 days

고 찰

알레르기는 두드러기(담마진)와 소아습진에서 생명을 위태롭게 하는 전신성과민성숙에 이르기까지 다양한 질환을 포함하는데 그 이유는 이들 질병이 공통적으로 체액면역에 의해서 발생하기 때문이다. 체액면역은 장내 기생충감염시 기생충을 격퇴하기 위한 반응이다. 그런데 왜 면역시스템이 목적이외의 것들(알러지반응을 유발하는 항원)을 장내기생충항원과 동일시하고 동일반응을 보이는지 그 이유를 현대 의학은 아직 밝히지 못하고 있다.¹⁾

제1형 과민반응은 기본적으로 의문으로 가득 찬 복합체이지만 발병기전에 대해서는 비교적 상세히 밝혀졌다. 항원에 노출되고 일주일쯤 경과하면 민감한 사람의 면역시스템은 항체를 생성하는데 항체의 종류는 IgE이다. IgE 항체를 생산하는 과정은 장내 기생충 감염시 IgE 항체를 만드는 과정과 근본적으로 동일하다. 항원이 점막을 통해 흡수되면 수지상 세포와 B세포에 섭취된다. 두 세포는 항원을 토박내어 토막항원을 2형 조직항원에 결합후 세포막에 제시한다. 수지상세포는 림프조직으로 이동하여 토막항원과 친화력이 강한 CD4 T-cell을 Th2세포로 활성화하고 활성화 Th2세포는 토막항원을 제시한 B세포와 결합후 B세포에 IL-4를 분비하여 IgE 항체를 생산 분비하는 형질세포로 활성화한다. 형질세포에서 분비한 IgE 항체는 점막에분포한 비만세포의 막에 결합한다. 비만세포는 IgE의 Fc 부분과 결합하는 고친화성 수용기를 갖고 있기 때문이다. 일단 위의 과정을 거쳐 특정 알러지항원에 대한 IgE 항체가 점막에 분포한 비만세포에 결합되면 이 사람을 감각된 사람(아토피성 사람, atopic person)이라고 부른다. 여기서 특정이란 알러지 항원의 종류를 의미하고 감각(atopy)이란 재차 동일 항원에 노출시 알러지 반응(atopic reaction)이 발생할 준비가 완료되었음을 의미한다. 이 시점의 감각된 점막은

외형상 감각이전의 점막과 차이가 없다. 그러나 감각후 동일 항원에 노출되어 항원이 점막에 흡수되면 즉각(수초내지 수분 이내)차이를 보인다. 감각된 점막은 충혈, 부종, 분비증가, 평활근 수축등에 의한 알러지반응의 임상증상을 보인다. 점막을 통해 흡수된 항원이 이미 비만세포에 결합한 IgE 항체와 결합하고 결합신호에 의해 비만세포가 히스타민 등 혈관활성물질을 분비하기 때문이다.¹⁾

이에 본 실험은 한 군에 10마리씩 배정하여 정상군(Normal group), 대조군(Control group), 蒼耳子群(CIG group)으로 설정하였다. 정상군(Normal group)은 고향사료와 물만을 충분히 공급하였고, 대조군(Control group)은 정상군과 동일한 환경에서 알레르기 喘息을 유발하였고, 蒼耳子群은 대조군과 동일한 방법으로 알레르기 喘息을 유발한 후 각각 蒼耳子煎湯液을 투여하는 방법으로 실험을 진행하였다. Ovalbumin(OA) 1mg과 Al(OH)₃ 300mg의 0.9% saline 2ml에 녹여 피하 주사하고, 6×10⁹ B. pertussis bacilli를 포함한 0.9% saline 1ml를 복막내로 주입하여 immunization을 시킨후 14일째, 동물들에게 2% (w.t/vol) OA를 함유한 0.9% saline aerosol을 흡입시킴으로써 항원감작에 의한 喘息을 유발시켰다. 대조군에게만 蒼耳子를 동결건조해서 얻은 엑기스를 증류수에 녹여 경구투여하였고, 대조군에 있어서도 동일한 스트레스 환경을 만들어주기 위해서 동량의 식염수를 투여 하였다.

폐기관지 세척액(BALF)내 총세포 수의 변화에 있어서 폐기관지 세척액내의 total cell은 正常群(Normal group)은 9.67±4.64 (×10⁵/ml), 對照群(Control group)은 24.29±5.16 (×10⁵/ml), 蒼耳子群(CIG group)은 20.70±6.87 (×10⁵/ml) 개로 집단 간 Total cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으나 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group

에서의 Total cell 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하지 않았다.

폐기관지 세척액내의 lymphocyte 수는 正常群(Normal group)은 5.25 ± 4.31 ($\times 10^5/ml$), 對照群(Control group)은 14.41 ± 3.26 ($\times 10^5/ml$), 蒼耳子群(CIG group)은 10.95 ± 2.65 ($\times 10^5/ml$) 개로 집단 간 lymphocyte 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 lymphocyte 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았으며 폐기관지 세척액내 CD4+ T-cell 수는 正常群(Normal group)은 4.51 ± 3.64 ($\times 10^5/ml$), 對照群(Control group)은 12.67 ± 3.31 ($\times 10^5/ml$), 蒼耳子群(CIG group)은 7.90 ± 1.65 ($\times 10^5/ml$) 개로 집단 간 CD4+ T-cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 CD4+ T-cell 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다. 이로부터 蒼耳子の 투여로 인하여 과민한 면역반응을 조절하는 효과가 있다고 말할 수 있다. 폐기관지 세척액내의 CD8+ T-cell 수는 正常群(Normal group)은 9.13 ± 4.90 ($\times 10^3/ml$), 對照群(Control group)은 14.00 ± 4.06 ($\times 10^3/ml$)개, 蒼耳子群(CIG group)은 13.08 ± 3.23 ($\times 10^3/ml$) 개로 집단 간 CD8+ T-cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 인정되었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 Total cell 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하지 않았다.

단백항원에 대한 체액성면역과 세포매개성 면역반응이 일어나려면 항원이 Th cell(대부분이 CD4+ T cell)에 인지되어야 하고 CD4+ 세포는 APC 세포의 표면에 부착되어 있는 미생물이나 수용성 단백질항원 펩티드를 인지하고,

CD8+ T cell(대부분의 CTL)은 유핵세포로 이루어진 표적세포 표면의 분자에 결합되어 있는 바이러스 항원과 같이 내재적으로 합성된 단백질항원 펩티드를 인지한다. 바이러스 단백질이나 ovalbumin과 같은 단백을 수용성 형태로 첨가하였을 경우 항원이 세포의 내부로 들어가서 class II 분자에만 연관되어 제공되므로 항원특이 CD4+ T cell에 인지되나 CD8+ T cell에는 인지되지 못한다.¹⁰⁾

폐기관지 세척액내의 CD4+/CD8+의 비율은 正常群(Normal group)은 4.02 ± 3.05 , 對照群(Control group)은 10.72 ± 1.96 , 蒼耳子群(CIG group)은 6.82 ± 2.78 으로 집단 간 CD4+/CD8+의 비율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 CD4+/CD8+의 비율이 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다. CD4+/CD8+ 비율의 저하는 생체면역의 억제상태를, CD4+/CD8+ 비율의 상승은 과민반응을 나타내며¹¹⁾ 여기에 대하여 蒼耳子が 과민반응을 억제시키는 효과가 있음을 보여준다.

혈청내 IgE 量を 측정된 결과 正常群(Normal group)은 1.41 ± 0.78 (U/ml), 對照群(Control group)은 2.85 ± 1.28 (U/ml), 蒼耳子群(CIG group)은 2.16 ± 0.87 (U/ml)로 집단 간 혈청내 IgE 量은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 혈청내 IgE 量이 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다. IgE는 비만세포나 호염기구의 화학물질 방출에 의해 이루어지므로 이러한 IgE의 감소를 볼 때 창이가자 알레르기 질환에 효과가 있음을 알 수 있다.

이상을 볼 때 창이자는 제 1형 알레르기를 유발한 흰쥐에서 제 1형 과민반응에 대한 유의성 있는 효과를 나타내었다고 볼 수 있다. T cell 계통중에서 항진된 CD4+ T cell을 억제

하고 또한 혈청내의 IgE 량을 감소시켜 항 알레르기 효과를 내는 것으로 사료된다.

결론

蒼耳子가 제 1형 알러지 모델 흰쥐의 BALF 내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향을 알아보기 위하여 감작된 흰쥐에 ovalbumin을 흡입시켜 알레르기 천식 병태를 유발시키고蒼耳子 정제액을 경구투여한후 흰쥐의 BALF(broncho alveolar lavage fluid)내 총 세포수, lymphocyte 수, CD4+ T-cell 수, CD8+ T-cell 수, CD4+/CD8+ 비율의 변화를 측정하고 혈청 IgE 양의 변화를 측정하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 폐기관지 세척액(BALF)내 총세포 수의 변화는 집단 간 Total cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으나 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 Total cell 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하지 않았다.

2. 폐기관지 세척액내의 집단 간 lymphocyte 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 lymphocyte 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다.

3. 폐기관지 세척액내의 CD4+ T-cell 수는 집단 간 CD4+ T-cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 CD4+ T-cell 수가 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다.

4. 폐기관지 세척액내의 CD8+ T-cell 수는 집단 간 CD8+ T-cell 수는 통계적으로 有意한 차이가 인정되었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 Total cell 수가

對照群에 비하여 통계적으로 有意하지 않았다.

5. 폐기관지 세척액내의 CD4+ /CD8+ 의 비율은 집단 간 CD4+ /CD8+ 의 비율은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 CD4+ /CD8+ 의 비율이 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다

6. 혈청내 IgE 량을 측정한 결과 집단 간 혈청내 IgE 량은 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 CIG group에서의 혈청내 IgE 량이 對照群에 비하여 통계적으로 有意하게 낮았다.

참고문헌

- 1) 김우경 : 알레르기 질환면역, 인제대학교 의과대학 내과, 2001
- 2) 김윤근 : 알레르기성 호흡기계 질환의 병태생리:기관지천식을 중심으로, 서울대학교 의과대학 내과, 2001.
- 3) 강석영 : 임상알레르기학, 서울, 여문각, pp1-52, 1984.
- 4) 鄭昇杞, 李珩九 : 定喘湯이 喘息에 미치는 影響에 관한 實驗的 研究, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1984
- 5) 朴光恩, 鄭昇杞, 李珩九 : 千緡導痰湯이 천식에 미치는 影響에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1993
- 6) 李俊雨, 李珩九 : 小青龍湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 影響, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2001
- 7) 趙一賢, 鄭昇杞 : 瀉白散이 喘息에 미치는 效能에 關한 分子生物學的 研究, 경희대학교 대학원 석사학위논문, 2001.

이병희 외 2인 : 蒼耳子가 제 I 형 알레르기 喘息모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響

- 8) 金珍珠 李珩九 : 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響, 경희대학교 한의과대학 박사학위논문, 2001
- 9) 이대일 : 제1형과민반응(알러지, 천식, 과민성속), 고려대학교 의과대학 병리학, 1999.
- 10) 서울대학교의과대학 편 : 면역학, 서울대학교 출판부, 1997
- 11) 강기홍, 채병윤 : 升麻葛根湯加味方이 제 1형 알레르기 모델 흰쥐의 BALF內 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 경희대학교 한의과대학 박사학위논문
- 12) 김세종 : 면역학, 서울, 고려의학, 58-59, 147-161, 260-265, 1994
- 13) 정규만 : 알레르기과 한방, 서울, 第一路, 15-17, 183-228, 270-275, 1990
- 14) 김우호 : 면역, 춘천, 강원대학교 출판국, 97-105, 1993
- 15) 타다 토오미 : 면역의 의미론, 서울, 한울, 143-155, 1998
- 16) 中島 泉 : 신 면역학입문, 서울, 지구문화사, 250-258, 1999
- 17) ROITT-BROSTOFF-MALE : IMMUNOLOGY, Mosby, 302-318, 1998
- 18) Mark Peakman-Vergani : Basic and Clinical Immunology, Churchill Livingstone, 131-146, 1997
- 19) N. Ohnuma. : Hyposensitization Attenuates Airway Inflammation and Antigen-Induced Proliferative Response by Lymphocytes in a Rat Model of Bronchial Asthma, Respiration 1998;65:469-475
- 20) Bellofiore S, Di Maria GU, Martin JG : Changes in upper and lower airway resistance after inhalation of antigen in sensitized rats, Am Rev Respir Dis 1987;136:363-368
- 21) Kaminuma O : Cloned Th cells confer eosinophilic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. Int Arch Allergy Immunol. 1999 Feb-Apr; 118(2-4):136-9.
- 22) Uhlig T : Effects of long-term oral treatment with leflunomide on allergic sensitization, lymphocyte activation, and airway inflammation in a rat model of asthma, Clin Exp Allergy, 1998 Jun;28(6):758-64.
- 23) Stampfli MR : Adenoviral infection inhibits allergic airways inflammation in mice, Clin Exp Allergy, 1998 Dec;28(12):1581-90.
- 24) B. B. Vargaftig : What can we learn from murine models of asthma?, Clinical and Experimental Allergy, Vol 29, 9-13, 1999