

連翹敗毒散이 사람 기관지 상피세포의 TARC 분비에 미치는 효과

이경엽* · 김희택* · 김이화** · 남창규*** · 류주현****

Effect of Youn-Gyo-Pae-Doc-San on the Release of Thymus and Activation-Regulated Chemokine (TARC) in Human Bronchial Epithelial Cell

Kyung-yeob Lee · Hee-taek Kim · E-wha Kim · Chang-gyu Nam · Ju-hyun Ryu

Chemokines are important for the recruitment of leukocytes to sites of infection, which is essential in host defense. The thymus and activation-regulated chemokine (TARC) is a CC chemokine which potentially plays a role via a paracrine mechanism in the development of allergic respiratory diseases.

Objectives : The objective of this study is to investigate the effect of Youn-Gyo-Pae-Doc-San on the secretion of TARC of human bronchial epithelial cell

Methods : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the secretion of TARC. The cytotoxicity was measured by MTT assay.

Results : Youn-Gyo-Pae-Doc-San significantly inhibited the secretion of TARC with a dose -dependant manner. The effective dosage did not have the cytotoxicity on human bronchial epithelial cell.

Conclusions : Results of our study show that Youn-Gyo-Pae-Doc-San would play an important role in modulation of TARC in human bronchial epithelial cells.

Key words : Thymus and activation-regulated chemokine (TARC), Youn-Gyo-Pae-Doc-San, Human bronchial epithelial cells, A549

*세명대학교 한의과대학 안비인후피부과학교실 ** 세명대학교 한의과대학 경혈학교실

*** 세명대학교 한의과대학 내과학교실 **** 세명대학교 전기공학부

교신저자 : 이경엽, 미담한의원, E-mail : center@hanmail.net

본 논문은 한국산업기술재단 지역전략산업 석박사인력양성사업 연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

서론

최근 산업의 발달, 대기오염의 심화 및 아파 트와 같은 밀폐된 공간에서의 생활 등에 따른 천식, 만성 기관지염 등 호흡기 질환이 증가하고 있다. 이러한 질환에 대한 한의학적인 치료와 예방에 많은 연구¹⁻⁵⁾가 이루어지고 있으나 아직 그 성과는 미비한 실정이다.

기관지 상피세포(bronchial epithelium cells)는 호흡 경로의 인체 내부와 외부를 구분하는 기계적인 장벽의 역할을 수행하고 각종 chemokine을 분비함으로써 알러지성 염증반응과 면역반응의 초기 병리적 변화에 관여한다고 알려져 있다.

Chemokine은 화학주성을 유발하는 세포 분비물로서 종류는 CXC, CC, C 및 CX3C subfamily로 구분한다⁶⁾. CXC chemokine은 주로 neutrophil을 유도하고 활성화시키는 반면, CC chemokine은 neutrophil을 제외한 monocytes, lymphocytes, basophils, eosinophils, natural killer(NK) 세포 및 dendritic 세포를 유도하고 활성화시킨다⁷⁾. CXC chemokine으로는 IL-8, growth-regulated oncogenes(GRO- α , GRO- β , GRO- γ), neutrophil activating protein-2 (NAP-2), epithelial cell-derived neutrophil attractant-78 (ENA-78), platelet factor-4(PF-4), interferon- γ (IFN- γ)-inducible protein-10 (IP-10) 및 monokine induced by IFN- γ (MIG) 등이 있다.

알러지 반응과 염증이 CC chemokine과 관련이 있음은 이미 알려져 있다⁸⁻⁹⁾. CC chemokine에는 thymus and activation-regulated cytokine (TARC), monocyte

chemotactic protein-1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, MCP-4, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , regulated on activation normal T-cell-expressed and secreted (RANTES), eotaxin 등이 있으며¹⁰⁾, 이 중 TARC는 기관지 천식 환자의 폐 기관지 상피세포에 강하게 발현되어 Th2 cell에 의한 병리적인 병변을 유발한다고 알려져 있다. 따라서 기관지 상피세포에서 TARC 분비를 억제하는 것이 치료 및 예방을 위해 매우 중요하다고 할 수 있다¹¹⁾.

連翹敗毒散은 《東醫寶鑑》¹²⁾에 수록된 처방으로 癰疽 初發憎寒壯熱, 甚者 頭痛救急 狀似傷寒을 치료하는데 응용되어왔고, 임상에서는 감기, 편도선염, 천식, 알러지 질환 등에 활용되고 있다. 최근 連翹敗毒散에 대한 실험적 연구로 金¹³⁾은 염증상태의 面癩에 미치는 영향을, 권 등¹⁴⁻¹⁵⁾은 알러지성 접촉피부염에 미치는 영향을 보고하였으나 連翹敗毒散과 cytokine에 대한 연구는 미비하였다.

이에 저자는 사람 기관지 상피세포(A549 cell)에 알러지 환경을 유발하고자 cytokine을 투여하여 TARC의 분비를 유도하고, 이 chemokine 분비에 連翹敗毒散이 미치는 효과를 실험적으로 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험

1. 재료

1) 세포배양 및 실험조건

사람 기관지 상피세포 A549 (a human type

II bronchial epithelial cell line)를 경희대학교 의과대학 미생물교실에서 분양 받아 사용하였다. 10% fetal bovine serum(FBS)와 항생제가 들어있는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)으로 2-3일마다 배지를 교환하였다. 이를 24 well plate에 분주한 후 각각 IL-4(10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), INF- γ (10 ng/ml) 및 IL-1 β (1 ng/ml)를 단독 투여하고, IL-4(10 ng/ml)와 TNF- α (10 ng/ml)를, TNF- α (10 ng/ml)와 INF- γ (10 ng/ml)를, INF- γ (10 ng/ml)와 IL-1 β (1 ng/ml)를 병용 투여하여 24 시간 처리한 후 TARC의 양을 측정하여

TARC 분비량이 최고인 조건을 확립하였다. 2차 실험에는 連翹敗毒散을 10 μ g/ml, 50 μ g/ml 및 100 μ g/ml의 농도로 전처리한 후 12시간 후에 IL-4(10 ng/ml)와 TNF- α (10 ng/ml)를 투여하고 48시간동안 배양하면서 12, 24 및 48시간 경과시 TARC의 양을 측정하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 連翹敗毒散의 구성은 東醫寶鑑¹²⁾에 준하였으며 약재는 세명대학교부속 한방병원에서 구입하여 정선한 것을 사용하였고, 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

連翹敗毒散 (Youn-Gyo-Pae-Doc-San : YP)

韓藥名	生藥名	用量(g)
羌 活	Notopterygii Rhizoma	4.0
獨 活	Angelicae Pubescentis Radix	4.0
柴 胡	Bupleuri Radix	4.0
前 胡	Peucedani Radix	4.0
桔 梗	Platycodi Radix	4.0
川 芎	Cnidii Rhizoma	4.0
赤茯苓	Angelicae	4.0
金銀花	Lonicerae Flos	4.0
枳 殼	Aurantii Fructus	4.0
連 翹	Forsythiae Fructus	4.0
防 風	Sileris Radix	4.0
荊 芥	Schizonepetae Herba	4.0
薄 荷	Menthae Herba	4.0
甘 草	Glycyrrhizae Radix	4.0
生 薑	Zingiberis Rhizoma	4.0
Total		60.0

2. 방법

1) 검액조제

連翹敗毒散 (2첩 분량) 120g을 증류수 700ml에 가열 추출하여 이를 여과한 다음, 이를 rotary evaporator로 감압농축 하였다. 이를 동결 건조하여 정제된 건조추출물 20g(수율 16.7%)을 얻어 사용하였다.

2) TARC 측정

TARC의 양은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 측정하였다. 측정에는 capture 항체와 detection 항체 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 별도로 구입하여 ELISA plate를 준비하였다. Nunc-ELISA plate를 각각의 cytokine capture 항체로 coating하여 4°C에서 16시간 처리하였다. Plate 바닥에 고정되지 않은 여분의 capture 항체를 씻어낸 다음 각 plate를 2% BSA-PBS로 blocking 하였다. Blocking이 끝난 다음 plate를 PBS-Tween 20 (0.05%; v/v)으로 씻어내고 검체를 100 μ l씩 가하였다. 2시간 후 각 plate들을 철저히 세척한 다음 biotin을 결합시킨 polyclonal rabbit anti-cytokine antibody를 가하였다. 30분 후 세척하였으며 streptavidin-peroxidase를 가한 다음 30분간 더 처리하였다. 다시 충분히 세척한 다음 발색 기질 tetra methyl benzidine (TMB)를 sodium citrate에 녹인 후 H₂O₂를 약간 첨가한 용액 100 μ l씩 첨가하여 발색시켰다. 그 후 발색을 2M H₂SO₄을 50 μ l 첨가하여 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 ELISA reader로 측정하였다. 재조합 TARC를 125 pg/ml부터 순차적으로 희석하여 표준용액으로 사

용하였다. 모든 기준치는 duplicate로 측정하였고 결과는 3회에 걸친 독립적인 실험치의 평균 값±표준편차로 나타내었다.

3) MTT assay

連翹敗毒散의 세포독성 유무를 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay법을 사용하였다. MTT를 각 세포배양액에 0.1 mg/ml의 농도로 처리한 후 4시간동안 37°C CO₂ incubator에서 배양한다. 이후에 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 690 nm를 대조과장으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 환산하였다.

4) 통계

약물의 효과를 판정하기 위해 각 One-way ANOVA test를 수행하였고, 사후검정으로 Dunnetts multiple comparison test를 사용하여 대조군과 비교하였다.

실험성적

1. 표준곡선 및 선형회기분석

재조합 TARC를 이용하여 chemokine 정량을 위해 흡광도에 따른 TARC 표준곡선을 작성하였다. 그 결과 TARC 농도가 각각 1.0 pg/ml, 2.0 pg/ml, 3.9 pg/ml, 7.8 pg/ml, 15.6 pg/ml, 31.3 pg/ml, 62.5 pg/ml 및 125.0 pg/ml일 경우에 흡광도는 각각 0.183, 0.212, 0.236, 0.293, 0.391, 0.587, 0.947 및 1.483이었다. 이를 선형회기분석을 수행하여 수식을 산출하였고, 이를 흡광도로부터 TARC를 정량하였다(Fig. 1).

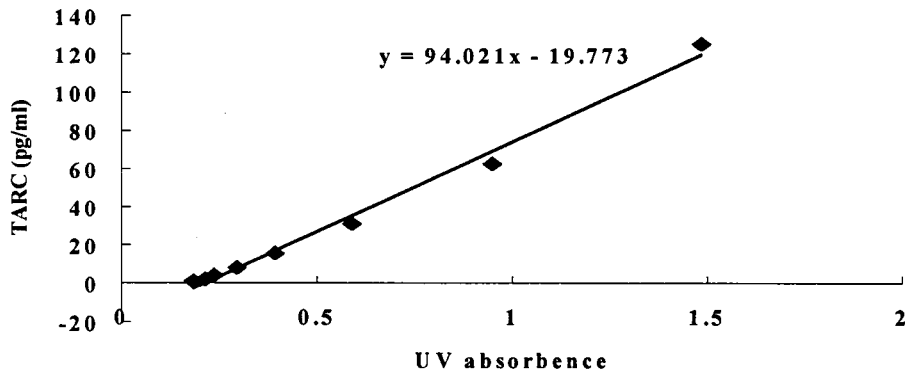


Fig. 1. Standard curve between ultra-violet (UV) absorbance at 450 nm and the concentration of thymus and activation-regulated chemokine (TARC). A simple linear regression analysis of TARC concentration on the UV absorbance was calculated and graphed. The equation of the estimated regression line is: $y = 94.021x - 19.773$. We used this formula for TARC quantification in further experiments.

2. A549세포의 cytokine에 의한 TARC 분비 측정

사람의 기관지 상피 세포에 각각 IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 를 각각 투여하는 경우와 IL-4와 TNF- α , TNF- α 와 IFN- γ , IFN- γ 와 IL-1 β 를 병용 투여할 경우 TARC의 분비량을 측정하였다. 그 결과 IL-4와 TNF- α 를 병용 투여하는 경우(1481.1 \pm 73.3 pg/ml, $p < 0.05$)와 TNF- α 와 IFN- γ 병용 투여하였을 경우(247.7 \pm 0.4 pg/ml, $p < 0.05$)에만 TARC 분비가 유의하게 증가하였다(Fig. 2).

그 외의 경우에는 아무것도 처치하지 않은 군에서 1.0 \pm 0.0 pg/ml의 분비를 보였고, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 단독 투여시와, IFN- γ 와 IL-1 β 를 병용 투여시에는 각각 1.5 \pm 0.0 pg/ml, 49.7 \pm 0.1 pg/ml, 1.4 \pm 0.0 pg/ml, 25.1 \pm 0.0

pg/ml 및 9.5 \pm 0.1 pg/ml의 분비량을 보여 큰 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 A549 세포는 여러 cytokine 중 IL-4와 TNF- α 또는 TNF- α 와 IFN- γ 가 함께 존재할 경우에만 세포내 신호전달체계가 흥분하여 TARC를 분비하는 것을 알 수 있었다. 이 중 가장 높은 TARC 분비를 보인 IL-4와 TNF- α 병용 투여를 이후 TARC 유도를 위한 조건으로 사용하였다.

이경엽 외 4인 : 連翹敗毒散이 사람 기관지 상피세포의 TARC 분비에 미치는 효과

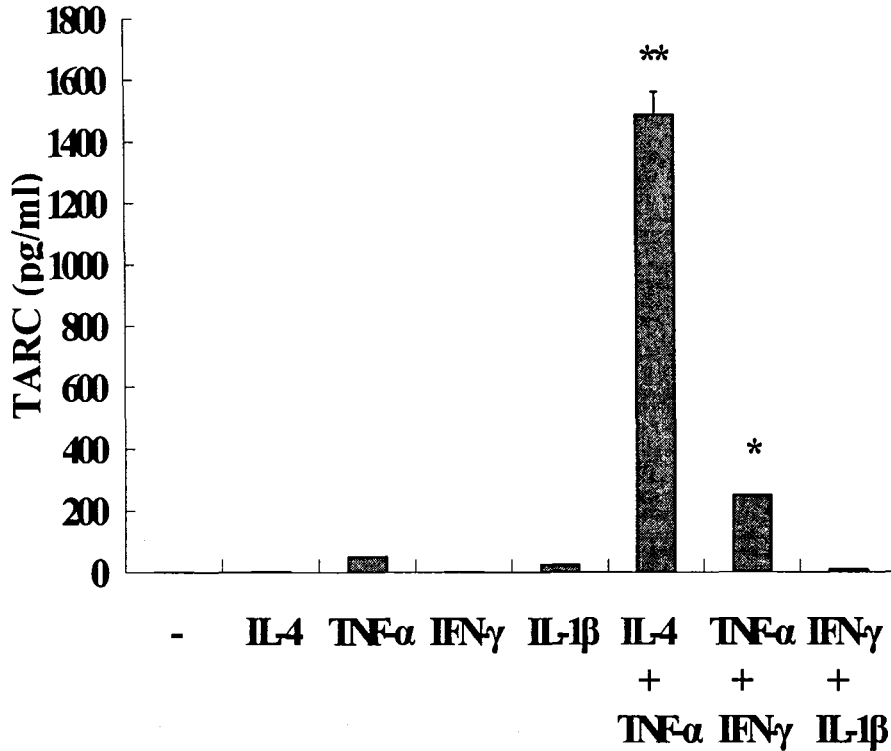


Fig. 2. TARC released into the culture media of human bronchial epithelial cell exposed to IL-4, TNF- α , IFN- γ IL-1 β , both IL-4 and TNF- α , both TNF- α and IFN- γ , or both IFN- γ and IL-1 β .

3. 시간대별 TARC 분비 양상 측정

시간대별로 TARC의 분비 양상을 측정한 결과 대조군은 0시간, 12시간, 24시간 및 48시간에서 각각 0.0 ± 0.0 pg/ml, 287.7 ± 140.6 pg/ml, 6994.0 ± 100.0 pg/ml 및 10531.7 ± 1578.3 pg/ml의 TARC 분비를 나타내었고, 連翹敗毒散 10 μ g/ml을 투여한 군에서는 시간별로 각각 0.0 ± 0.0 pg/ml, 183.1 ± 259.0 pg/ml, 7541.8 ± 721.6 pg/ml 및 11872.0 ± 736.6 pg/ml, 連翹敗毒散 50 μ g/ml

을 투여한 군에서는 시간별로 각각 0.0 ± 0.0 pg/ml, 366.2 ± 98.6 pg/ml, 5969.3 ± 888.1 pg/ml 및 10606.3 ± 466.2 pg/ml, 連翹敗毒散 100 μ g/ml을 투여한 군에서는 시간별로 각각 0.0 ± 0.0 pg/ml, 8.7 ± 12.3 pg/ml, 1381.1 ± 59.2 pg/ml 및 2232.1 ± 928.4 pg/ml의 TARC 분비를 나타내었다. 이상의 결과 중 連翹敗毒散 100 μ g/ml 투여군의 24시간 및 48시간에서 통계적으로 유의한 감소를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$, Fig. 3).

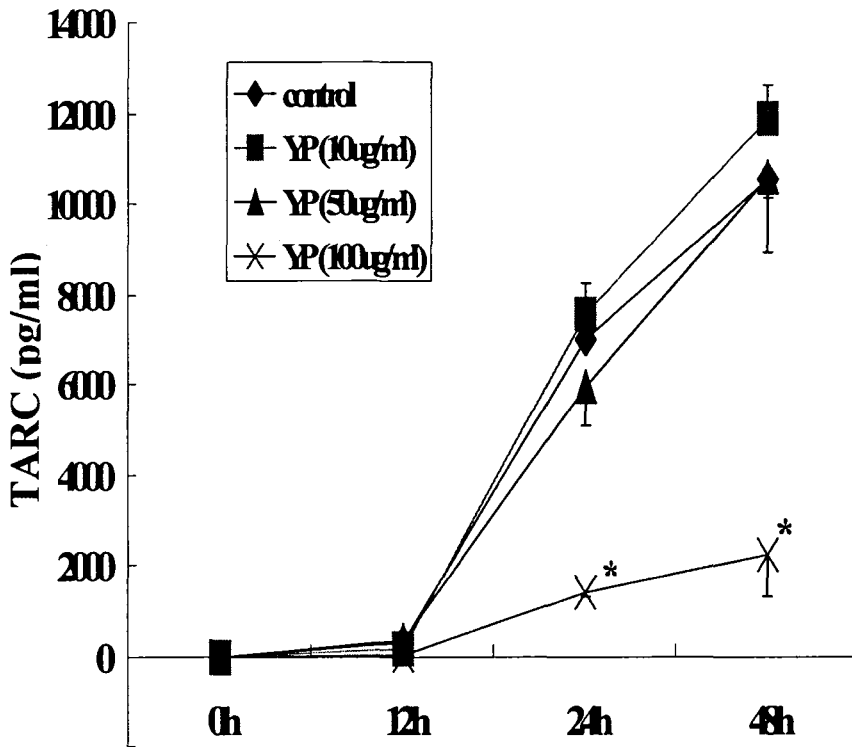


Fig. 3. Time course response of TARC secretion in human bronchial epithelial cell at 48h after cytokine and Youn-Gyo-Pae-Doc-San (YP) (10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment. Each value is the mean \pm S.E.M. (n=3).

4. 連翹敗毒散의 TARC 분비억제 효과

連翹敗毒散에 의한 TARC 분비억제를 관찰한 결과 대조군에서 6994.0 \pm 100.0 pg/ml의 TARC 분비를 보였고 連翹敗毒散을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 결과 각각 7541.8 \pm 721.6 pg/ml, 5969.3 \pm 888.1 pg/ml 및 1381.1 \pm 59.2 pg/ml의 분비 감소를 관찰할

수 있었다. 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 통계적인 유의성을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$, Fig. 4).

이경엽 외 4인 : 連翹敗毒散이 사람 기관지 상피세포의 TARC 분비에 미치는 효과

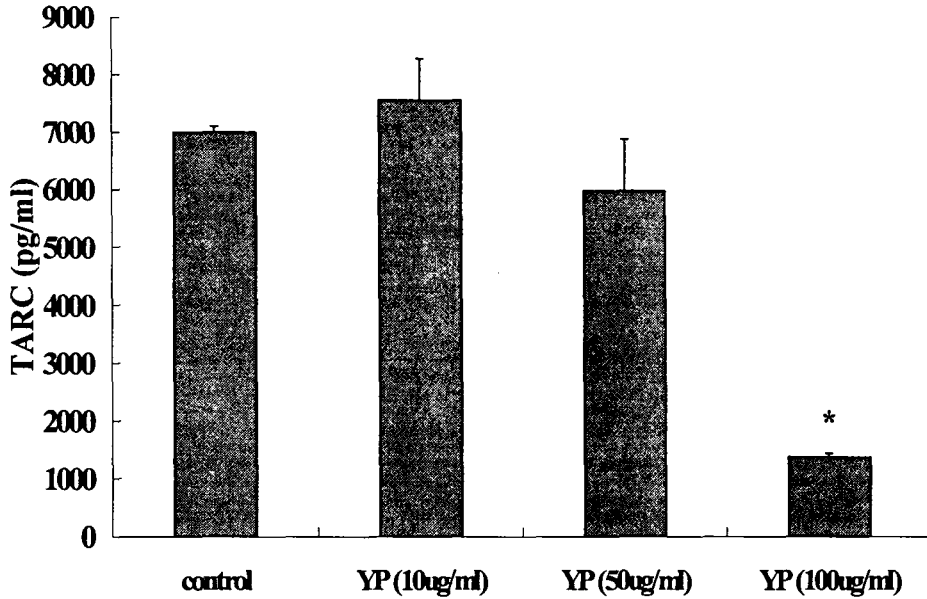


Fig. 4. Effects of Youn-Gyo-Pae-Doc-San (YP) (10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on a secretion of TARC in human bronchial epithelial cell at 24h after cytokine treatment. Each value is the mean \pm S.E.M. (n=3).

5. MTT assay 결과

連翹敗毒散의 농도가 세포내에서 독성을 일으키는지 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 대조군의 생존률을 100.0 \pm 8.8%

로 계산하였을 때 連翹敗毒散을 처리한 후의 세포 생존률은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 각각 101.1 \pm 8.2%, 98.2 \pm 9.0% 및 100.8 \pm 8.8%로 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 5).

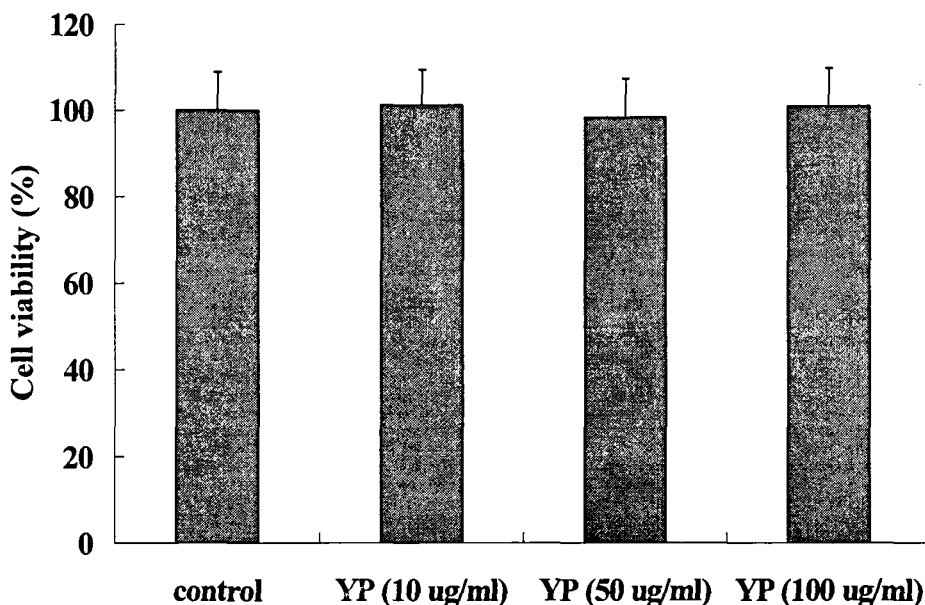


Fig. 5. Influence of Youn-Gyo-Pae-Doc-San (YP) on the viability of A549. The cell viability was determined using the MTT assay. There was no significant change in the number of living cells between control and YP groups. Each value is the mean±S.E.M. (n=3).

고찰

連翹敗毒散은 《東醫寶鑑》¹²⁾에 수록된 처방으로 羌活, 獨活, 柴胡, 前胡, 桔梗, 川芎, 赤茯苓, 金銀花, 枳殼, 連翹, 防風, 荊芥, 薄荷, 甘草, 生薑으로 구성되어 發憎寒壯熱, 甚者 頭痛救急狀似傷寒을 치료하는데 응용되어왔고 임상에서는 감기, 편도선염, 알러지 질환 등에 활용되고 있다.

連翹敗毒散을 구성하는 개별 약물의 본초학

적 효능을 살펴보면 羌活은 散表寒 祛風濕 利關節하는 효능이 있어 感冒風寒 風寒濕痺 癰疽瘡毒 등을 治하며, 獨活은 祛風除濕 解表止痛하는 효능이 있어 風寒濕痺 惡寒發熱 頭痛身痛 등을 治하며, 柴胡는 和解退熱 疏肝解鬱 升舉陽氣하는 효능이 있어 感冒發熱 寒熱往來 胸滿脇痛 등을 治하며, 前胡는 降氣祛痰 宣散風熱하는 효능으로 風熱咳嗽痰多 痰熱喘滿 咯痰黃稠 등을 治하며, 桔梗은 宣肺利咽 祛痰排膿하는 효능으로 咳嗽痰多 咽痛音啞 肺癰吐膿 등을

治하며, 川芎은 活血行氣 祛風止痛하는 효능으로 風濕痺痛 胸脇刺痛 등을 治하며, 赤茯苓은 行水 利濕熱하는 효능으로 小便不利 淋濁 등을 治하며, 金銀花는 清熱解毒 涼散風熱하는 효능으로 癰腫疔瘡 喉痺 風熱感冒 등을 治하며, 枳殼은 破氣 行痰 消積하는 효능으로 胸膈痰滯 胸痞 등을 治하며, 連翹는 清熱解毒 消腫散結하는 효능으로 癰疽 瘰癧 風熱感冒 등을 治하며, 防風은 解表祛風 勝濕 止痛하는 효능으로 外感風寒 頭痛 風寒濕痺 등을 治하며, 荊芥는 發表 散風 透疹 理血하는 효능으로 感冒 咽痛 瘡瘍初起 등을 治하며, 薄荷는 宣散風熱 清頭目 透疹하는 효능으로 感冒風熱 溫病初起 喉痺 등을 治하며, 甘草는 和中緩急 潤肺 解毒 調和 諸藥하는 효능으로 肺痿咳嗽 咽喉腫痛 癰疽瘡瘍 등을 治하며, 生薑은 解表散寒 溫中止嘔 化痰止咳하는 효능으로 外感風寒 寒痰咳嗽 喘咳 등을 치료한다³⁰. 이상을 종합하여 보면 連翹敗毒散은 傷寒, 傷風, 感冒 또는 癰疽諸瘡 등에 활용할 수 있는 처방으로 임상에서도 천식, 편도선염, 알러지 질환에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

천식은 만성 호흡기 질환의 일종으로 반복적인 호흡기의 감염이나 특정 항원에 대한 노출로 인하여 발생하는 가역적, 발작적 기도폐색을 동반하는 병증으로 3가지 주증상은 가역적 호흡기도 폐색, 호산구에 의한 만성 기관지염증 및 기관지 수축물질에 의한 기관지 평활근의 과반응인데²⁷ 어린이와 청소년에게 호발하는 질환 중 하나이며 세계적으로 이환률이 증가하고 있다. 서양에서도 최근 20년 동안 천식 이환률이 2배로 증가하여 최근 유병률이 10에서 20% 사이인 것으로 알려져 있다¹⁶.

천식의 병인에 관여하는 세포는 호산구, 비

만세포, 기도 상피세포 등 여러 가지가 있지만 이 중 Th 임파구는 cytokines을 분비하여 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다. Th 임파구는 cytokines의 분비 양상에 따라 Th1, Th2 임파구로 나누어진다. Th1 임파구는 주로 IL-2, IL-12, interferon- γ (INF- γ)를 생산하며 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여한다. Th2 임파구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 즉 천식과 같은 알레르기 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용 등에 관여한다²⁷⁻²⁸.

어린이와 청소년 천식 환자 중 대부분은 항원에 대한 IgE 합성이 증가하는 특징을 가지는 아토피성 피부염과 밀접한 관련이 있다는 것은 잘 알려져 있다. 결과적으로 이들 환자들에 특정한 공기 중에 포함된 항원에 대한 노출은 과민반응으로 이어져 결국 기도내 염증유발로 이어진다. 기도내 염증유발은 조직내 백혈구 침윤 반응이 특징적인 현상인데, 이로써 기도 상피세포의 손상 및 기도폐색을 일으킨다¹⁷. 이 백혈구를 혈액에서 조직내로 끌어오는 것이 chemotactic cytokine, 즉 chemokine이다.

Chemokine은 염증 반응에서 백혈구의 선택적인 점증반응을 조절하는 중요한 역할을 하는 물질로 interleukin 생산, angiogenesis 및 collagen 생산에도 영향을 끼친다고 알려져 있다¹⁸⁻¹⁹. Chemokine은 다양한 종류의 세포에서 형성되며, 특히 T세포, 대식세포, 섬유아세포, 상피세포가 CC chemokine을 분비한다고 알려져 있다²⁰.

최근 많은 종류의 chemokine 및 그 수용체들이 계속해서 밝혀짐에 따라 이들이 수행하는 기능들의 영역도 확대되어 화학주성 이외에 조

혈 기능의 조절²¹⁾, 혈관 신생의 조절²²⁾, 창상 치유²³⁾ 등이 입증되었으며, 특히 사람 면역 바이러스의 병인에도 관여하고 있음이 밝혀졌다²⁴⁻²⁵⁾. 이 중 TARC는 흉선과 림프절에서 백혈구가 활성화되면서 분비되는 CC Chemokine이다. TARC는 CC chemokine receptor 4(CCR4) 수용체에 선택적으로 발현하는 활성화된 T세포와 선택적인 면역반응을 하게 된다. Antigen-presenting cell (APC)들이 TARC를 분비함으로써 Th2 면역 반응에 중요한 역할을 수행한다. TARC의 Th2 T cell subset에서의 화학면역효과 때문에 Th2의 반응이 필요한 면역관련 질병 모델 예방법으로 활용될 것으로 생각되고 있다²⁶⁾.

최근 천식의 발생 기전과 그 치료 과정에 대한 연구로 분자생물학적 실험 기법을 사용하는데, 이러한 연구방법은 염증 반응이나 면역 반응에 공통으로 관여하는 여러 cytokines, chemokines의 증감을 관찰함으로써 세포 단계에서의 조직 손상 및 치유 복원 과정을 이해하고 설명하고 있다²⁹⁾. 최근 많은 연구에서 이런 세포 단계의 반응에 어떤 cytokines이나 chemokines이 관여하고 있는지를 보고하고 있고, 각종 치료 제제를 투여하여 이런 기전에 변화를 초래하는 기전들을 밝혀내고 있지만 아직까지 한약 제제를 이용하여 이런 분자생물학적 접근을 시도한 경우가 많지 않았고 또한 連翹敗毒散에 대한 연구 보고는 없었다.

이에 저자는 사람 기관지 상피세포(A549 cell)를 배양하고 여기에 cytokine으로 TARC 분비를 유발하였고 連翹敗毒散을 처치하여 TARC의 양을 ELISA법을 이용하여 측정하였으며, 실험에 사용한 連翹敗毒散 농도에 따른 세포 독성 유무를 관찰하고자 MTT assay를

수행하여 세포생존율을 측정하였다.

사람의 기관지 상피 세포에 각각 IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β 를 각각 투여하는 경우와 IL-4와 TNF- α , TNF- α 와 IFN- γ , IFN- γ 와 IL-1 β 를 병용 투여할 경우 TARC의 분비량을 측정하였다. 그 결과 IL-4와 TNF- α 를 병용 투여하는 경우와 TNF- α 와 IFN- γ 병용 투여하였을 경우에만 TARC 분비가 유의하게 증가하였다(Fig. 2). 그 외의 경우에는 TARC 분비량에 큰 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 A549 세포는 여러 cytokine 중 IL-4와 TNF- α 또는 TNF- α 와 IFN- γ 가 함께 존재할 경우에만 세포내 신호전달체계가 흥분하여 TARC를 분비하는 것을 알 수 있었다.

시간대별 TARC 분비 양상을 측정하기 위해 連翹敗毒散을 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 0시간, 12시간, 24시간 및 48시간 측정한 결과 대조군에 비해 連翹敗毒散 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군의 24시간 및 48시간에서 통계적으로 유의한 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

連翹敗毒散에 의한 TARC 분비 억제를 관찰한 결과 대조군에서 8034.6 \pm 901.2 pg/ml의 TARC 분비를 보였고, 連翹敗毒散을 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 IL-4와 TNF- α 로 유발된 TARC 분비를 농도의존적으로 감소시켰으며 특히 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 통계적인 유의성을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

連翹敗毒散의 농도가 세포내에서 독성을 일으키는지 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정한 결과 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다(Fig. 5).

본 실험결과로 미루어 보아 連翹敗毒散은

기관지 상피세포에서 발현하는 TARC의 분비를 억제하여 여러 원인으로 유발된 기관지 과민반응 혹은 염증반응 상태를 호전시킨다는 것을 알 수 있었다. 이는 기관지염 및 천식환자에 대한 連翹敗毒散의 임상활용 및 농도 선택에 기초자료로 활용이 가능할 것으로 사려된다.

결론

連翹敗毒散을 사람 기관지 상피세포에 천식 및 다양한 질환의 병인과 관련되어 있다고 알려져 있는 TARC의 분비에 대한 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 사람의 기관지 상피 세포주에 각각 IL-4, TNF- α , IFN- γ IL-1 β 를 각각 투여하는 경우와 IL-4와 TNF- α , TNF- α 와 IFN- γ , IFN- γ 와 IL-1 β 를 병용 투여할 경우 TARC의 분비량을 측정된 결과 IL-4와 TNF- α 를 병용 투여하였을 경우 TARC의 분비량이 유의하게 증가하였다.

2. 시간대별 TARC 분비 양상을 측정된 결과 대조군에 비해 連翹敗毒散 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여군의 24시간 및 48시간에서 유의하게 감소하였다.

3. 連翹敗毒散에 의한 TARC 분비억제를 관찰한 결과 대조군에 비해 連翹敗毒散 투여군이 농도 의존적으로 TARC 분비를 감소시켰다.

4. MTT assay법을 이용한 세포독성 측정에서 대조군과 連翹敗毒散 투여군이 서로 차이를

나타내지 않아 실험에 사용한 농도에서 세포독성이 없었다.

본 실험 결과로 미루어 보아 連翹敗毒散은 기관지 상피세포에서 발현하는 TARC의 분비를 억제하여 여러 원인으로 유발된 기관지 과민반응 혹은 염증반응 상태를 호전시킨다는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과로 보아 連翹敗毒散은 천식 등 기관지의 과민반응 및 염증반응으로 인한 질환에 TARC chemokine 억제를 통해 예방 및 치료 효과를 나타낼 수 있으며, 향후 임상활용 및 농도 선택에 기초자료로 활용이 가능할 것으로 사려된다.

참고문헌

1. 황우석, 최준용, 이재성, 주창엽, 정희재, 이형구, 정승기. 청상보하탕의 기관지천식 환자에 대한 스테로이드 절약효과. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):1-10.
2. 정승기, 허태석, 황우석, 주창엽, 김영우, 정희재. 소청룡탕이 기관지천식 환자의 혈청 IL-4, IL-5, IFN- γ 변화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(2):70-77.
3. 김정호, 신동윤, 김혜원, 송정모. 천식 환자의 사상 처방 투여의 3례에 대한 임상보고-소음인, 소양인, 태음인. 사상의학회지. 2002;14(1):112-117.
4. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동탕과 정천화담강기탕이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(1):37-49.

5. 이성환, 김창환, 이윤호. 천식의 침구치료에 관한 문헌적 고찰. 대한침구학회지. 2000;17(3):36-44.
6. Rollins BJ. Chemokines. Blood. 1997;90:909-28.
7. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today. 1999;20:245-57.
8. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med. 1998;338:436-45.
9. Strieter RM, Standiford TJ, Huggnagle GB, Colletti LM, Lukas NW, Kunkel SL. "The good, the bad, and the ugly"-the role of chemokines in models of human disease. J Immunol. 1996;156:3583-86.
10. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. Adv Immunol. 1994;55:97-179.
11. Sekiya T, Miyamasu M, Imanishi M, Yamada H, Nakajima T, Yamaguchi M, Fujisawa T, Pawankar R, Sano Y, Ohta K, Ishii A, Morita Y, Yamamoto K, Matsushima K, Yoshie O, Hirai K. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. J Immunol. 2000;165(4):2205-13.
12. 許浚. 東醫寶鑑 - 雜病篇 卷之五~八. 서울:대성문화사. 1990;375.
13. 김성범, 김경준. 연교패독산가미방이 염증상태의 면포에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2002;15(1):50-62.
14. 권오성, 김진택, 박인식, 안상현, 이해풍, 김호현, 강운호. 연교패독산가미방이 알러지성 접촉피부염에 미치는 영향. 동국대 논문집. 1999;8(1):77-91.
15. 김호현, 김동환. 연교패독산가미방이 알러지성 접촉피부염에 미치는 영향 2 - 알러지성 접촉피부염 유발로 손상된 생쥐 상피세포 완화를 중심으로. 세명대학교 한의학연구소 논문집. 2001;3:67-80.
16. No authors listed. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet. 1998;351(9111):1225-32.
17. Teran LM, Carroll MP, Frew AJ, Redington AE, Davies DE, Lindley I, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Leukocyte recruitment after local endobronchial allergen challenge in asthma. Relationship to procedure and to airway interleukin-8 release. Am J Respir Crit Care Med. 1996;154(2 Pt 1):469-76.
18. Mantovani A. The chemokine system:redundancy for robust outputs. Immunol Today. 1999;20:245-57.
19. Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine

- production. *J Immunol.* 1997;158:4129-36.
20. Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine.* 1991;3:165-83.
21. Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin HG. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer.* 1999;82:765-70.
22. Tachibana K, Hirota S, Lizasa H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature.* 1998;393:591-4.
23. DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1 α as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest.* 1998;101:1693-8.
24. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5:A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science.* 1996;272:1955-8.
25. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 1996;85:1135-48.
26. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol.* 1999;11(1):81-8.
27. 김광혁 외 25인. 세포·분자 면역학. 서울:정문각. 1998;297-370.
28. 권오정 외 12명. 결핵균 독성 여부에 따른 기도 상피세포의 chemokine 발현에 관한 연구. 결핵 및 호흡기질환. 1997;44(4).
29. Carlos AG, Carlos ML, Conceicao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. *J. of investigational allergology and clinical immunology* 1997;7(5):270-273.
30. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울:永林社. 2000;127, 129, 131, 137, 143, 150, 198, 200, 260, 303, 409, 459-460, 541.