

사람 Mast cell에서의 케모카인에 대한 白蓮治哮湯의 效果

이형철, 정희재, 이형구, 정승기
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Effect of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) on Expression of Chemokines in Human Mast Cell Line (HMC-1)

Hyung-Chul Lee, Hee-Jae Jung, Hyung-Koo Rhee, Sung-Ki Jung

Department of Internal Medicine Kang-Nam Kyunghee Oriental Medicine Hospital,
College of Oriental Medicine Kyunghee University

Background : Although the pathophysiology of asthma has been reported, its mechanism has not been fully elucidated. The mast cell is an effector cells in allergic inflammation and secretes a number of chemokines. Chemokines are important for the recruitment of leukocytes to sites of infection, which is essential in host defense. Chemokines also contribute to the pathogenesis of several disorders such as asthma, chronic bronchitis, atopic dermatitis, allergic rhinitis, and rheumatoid arthritis.

Objective : In this study, the aim was to identify the effect of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) on expression of chemokines. This was examined by RT-PCR using the human mast cell line (HMC-1)

Materials and Methods : HMC-1 cells were used, which is known to secrete and express chemokines. In order to investigate the protective effect of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯), HMC-1 cells were incubated with pretreatment of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) for 24 hrs. RT-PCR analyses of chemokine genes of cells pretreated with *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) showed that expressions of IL-8, MIP-1 β , and RANTES genes in these cells were lower and MIP-1 α showed a similar pattern compared to the calcium ionophore-treated group. In addition, cell cytotoxicity concentration measurements were performed by MTT assay method.

Results : After stimulation with 1 μ M calcium ionophore A23178 for 2 hrs, IL-8, major one of CXC chemokines, was highly expressed, and expression of MIP-1 β and RANTES (CC chemokines) increased, while expression of MIP-1 α did not change. The cell cytotoxicity of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) with treatments at various concentrations and times was not observed, respectively.

Conclusion : This study suggests that *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) has dose-dependent effects on mRNA expression of IL-8(CXC chemokines), MIP-1 β and RANTES(CC chemokines) in human mast cell line(HMC-1). So these herbal medicines may inhibit the inflammatory process of asthma. Advanced studies are required to investigate the mechanism of inhibition by herbal medicine in the asthma model. This study provides basic data on the possibility of the clinical treatment of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) for allergic disorders.

Key Words: *Baekryunchihyo-tang*, chemokines asthma, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES

1. 緒 論

氣管支喘息(이하 喘息이라함)은 發作的인 呼吸困難, 喘鳴, 기침, 羅音を 特徵으로 하는 症候群^{1,2}으로

최근의 정의는 첫째, 臨床的으로 可變的인 氣道閉塞의 症狀을 보이고 둘째, 病態生理學的으로는 氣道の 過敏性이 존재하고 셋째, 病理學的으로 氣道の 炎症性 反應을 보이는 疾患을 말한다¹.

喘息의 概念的인 免疫學的 모델은 氣道 粘膜炎의 비만세포의 IgE 抗體에 의한 疾患으로 알려져 있으며 抗原에 再露出되는 경우 비만세포 表面에서의

· 접수 : 2004. 10. 20 · 채택 : 2004. 11. 5
· 교신저자 : 이형철, 서울특별시 강남구 대치2동 994-5
강남경희한방병원 내과학교실
(Tel. 02-3457-9173, 9180 Fax. 02-3457-9160
E-mail : inhalator@hanmail.net)

抗原-抗體 反應은 細胞顆粒에 저장된 mediators의 放出과 다른 mediators의 合成과 放出을 야기한다. 즉 비만세포에 의해 야기된 알레르기성 炎症反應인 氣管支收縮과 氣道粘膜炎의 炎症反應을 유발하는 과정에서 cytokines과 chemokines이 밀접하게 관여하게 된다. 최근 백혈구의 화학적 주성(chemotactic activity)을 나타내는 cytokine들이 발견되었으며 이들을 chemokines이라 하는데 이들은 다양한 生物學的 機能에 관여하지만, 현재까지 백혈구의 기능이나 이동을 조절하는 작용과 炎症 反應에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{3,4}.

喘息은 韓醫學에서 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 症狀을 主症狀으로 하는 哮喘證의 범주에 해당되며^{2,5,7} 哮喘證에 사용되는 다양한 處方들이 喘息을 治療하는데 사용되고 있다^{5,6}.

白蓮治哮湯은 清熱 養陰潤肺 止咳平喘 效能을 가진 方劑^{7,8}로서 경희의료원 한방병원 폐계내과에서 哮喘證 및 喘息 治療에 多用하고 있는 處方이다. 臨床에서 喘息에 多用되고 있는 白蓮治哮湯의 치료 기전의 연구가 부족하므로 分子生物學的 研究方法으로 炎症反應이나 免疫反應에 공통으로 관여하는 여러 cytokines, chemokines의 증감을 관찰함으로써 세포단계에서의 조직 손상 및 치유 복원 과정을 이해하고 설명할 수 있을 것으로 생각된다^{12,13}.

따라서 본 연구에서는 사람 비만세포주(human mast cell line, HMC-1)에 calcium ionophore를 투여하여 비만세포에서 chemokines의 발현을 유발하고, 이러한 chemokines의 발현에 白蓮治哮湯이 미치는 影響을 알아보고자 白蓮治哮湯의 세포독성 여부를 알기 위한 MTT based cytotoxicity assay와 chemokines의 발현을 측정하기 위하여 RT-PCR 方法을 이용하였다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 藥材

경희의료원 한방병원 약재과에서 구입 정선한 후 사용하였으며, 실험에 사용된 白蓮治哮湯 1첩의 구성은 Table 1과 같다.

2) 細胞柱

사람 肥滿細胞柱(human mast cell line, HMC-1)로, mast cell leukemia 환자로부터 유래되었으며¹⁴, c-kit 수용체를 발현하며 IgE에 대한 FcεRI이 결핍된 세포주이다. 이러한 사람 비만세포는 calcium ionophore에 의해 탈과립되어 여러 매개 물질을 방출하며 여러 종류의 cytokines와 chemokines를 합성 분비하여 喘息, 아토피성 피부염 등의 알레르기 관

Table 1. Composition of Baekryunchihyo-tang(白蓮治哮湯)

Herbs	Scientific Name	Dose(g)
白蓮草	<i>Opuntia dillenii</i> Haw	8.0
沙蔘	<i>Adenophorae Radix</i>	6.0
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	6.0
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	4.0
貝母	<i>Fritillariae cirrhosae Bulbus</i>	4.0
地骨皮	<i>Lycii Radicis Cortex</i>	4.0
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	4.0
桑白皮炒	<i>Mori Cortex</i>	4.0
石膏	<i>Gypsum Fibrosum</i>	4.0
杏仁	<i>Armeniacae amarum Semen</i>	4.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
Total amount		56.0

련 연구에 있어 매우 유용한 세포주이다¹⁵.

3) 試藥

배양액은 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM), fetal bovine serum(FBS)등은 GibcoBRL (USA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Roche (Germany)에서, calcium ionophore A23137은 Sigma (USA)에서, mRNA selective PCR kit은 Takara (Japan), reverse transcriptase은 Promega (USA), RNAzol B는 Tel-Test (USA)에서 구입하였으며, 일반 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

2. 方法

1) 細胞培養 및 細胞刺戟

HMC-1 세포의 배양은 10% FBS가 포함된 IMDM 용액에 5% CO₂, 95% 습도, 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였고, 배양액은 2일 마다 교환하였다. Calcium ionophore A23137의 최종농도를 1 μM로 2 시간 처리하였다¹⁵.

2) MTT-based cytotoxicity assay

HMC-1 세포의 白蓮治哮喘 농도에 의한 세포독성을 측정하기 위하여, 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 원리를 이용한 MTT 실험을 하였다. 세포독성은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) reader로 595 nm에서 측정 후 아래의 산출식에 의해 % cell viability로 나타내었다.

$$\% \text{ cell viability} = (\text{약물처리군의 흡광도/대조군의 흡광도}) \times 100$$

MTT assay 실험 방법은 회사의 프로토콜에 따랐다. HMC-1 세포를 96 well plate (Corning, USA)에 well 당 2×10⁴ 세포수로 배양액 100 μl를 가하였다. 아무 처리도 하지 않은 경우를 정상군(Normal)으로 하였고 白蓮治哮喘을 처리한 경우를 白蓮治哮喘群 (Sample)으로 설정하였으며, 白蓮治哮喘의 최종 농도는 각각 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml가 되게 처리하였다. 또한 시간에 따른 細胞毒性을 측정하기

위하여 각 농도의 白蓮治哮喘을 12 시간, 24 시간 및 48 시간 처리한 후, 각 well에 MTT labeling reagent 용액을 50 μl를 가하고 빛에 노출되지 않게 알루미늄 호일로 덮은 후 4시간 동안 배양하였다. Solubilization solution을 50 μl 첨가한 후 24시간 배양 후 ELISA reader(Bio-Tek, USA)로 595 nm에서 측정하였다.

3) Chemokines의 발현

HMC-1 세포를 자극하기 위한 calcium ionophore A23137 1 μM 만 2시간 처리한 경우를 대조군(Control)으로 하였고, 白蓮治哮喘을 처리한 후 calcium ionophore A23137 1 μM을 2시간 처리한 경우를 白蓮治哮喘群(Sample)으로 하였으며 白蓮治哮喘의 농도는 100 μg/ml와 10 μg/ml로 하였으며, 白蓮治哮喘의 전처리 시간은 24 시간으로 하였다.

4) RNA 分離

Total RNA의 추출을 위하여 각 well에 0.5 μl의 RNAzol B를 첨가하였다. Chloroform 1/10 volume 을 가하고 15초 동안 잘 혼합한 다음 얼음에 5분간 방치하였다. 12,000 x g에서 15분 동안 원심분리하고 상층액을 같은 양의 isopropanol을 가한 후, 4°C에서 15분간 방치하였다. 12,000 x g에서 15분 동안 원심분리 한 후, total RNA를 추출하였다. RNA 농도의 측정은 260/280 흡광도로 측정하였다. 필요한 경우 DNA를 제거하기 위하여 DNase-1을 처리하였다.

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

HMC-1 세포로부터 total RNA를 분리하고, 분리한 RNA에 역전사효소를 넣어 cDNA를 만든 후, 필요한 유전자 cDNA의 일부분을 증폭하기 위한 primer를 이용하여 PCR을 시행하여 cDNA의 일부를 대량으로 증폭하였다. 실험방법은 total RNA 1 μg에 oligo dT primer 또는 random hexamer를 2 μl 넣어 65°C에서 10 분간 반응시킨 후에, AMV(avian myeloblastosis virus) 역전사효소 1 μl, RNasin 1 μl, 10 mM dNTP 4 μl, 10 x buffer 4 μl, 50 mM MgCl₂ 및 탈이온수를 첨가하여 총 용량을 40 μl로

하여 42℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 형성케 하였다. Chemokines의 PCR은 PCR 자동화기계 (Perkin Elmer 9600)에서 template로 cDNA 1-4 μ l, Taq polymerase 2 unit, 2.5 mM dNTP 1 μ l, sense primer 10 pmole 1 μ l, antisense primer 10 pmole 1 μ l, 10 x buffer 3 μ l 및 탈아인수를 첨가하여 총 30 μ l로 하였다. 94℃에서 5분간 1회, 94℃에서 30초, 55-61℃에서 30초, 72℃에서 30초씩 40회 반응시키고, 72℃에서 5분간 1회 시행한 후 1-2% 한천 겔에서 전기영동하였다. 또한 필요한 경우 85℃에서 RNA만 반응하는 원리를 이용한 mRNA selective PCR kit를 사용하였고 적정온도를 결정하기 위하여 gradient PCR machine (Eppendorf, Germany)를 이용하였다. Internal standard로는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 24회 증폭하여 유전자 발현정도를 보정하였다.

각각의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였다(Table 2).

6) 統計分析

통계분석은 Statistical Package for Social Science software SAS (version 6.1.2)를 사용하였으며 데이터 분석은 Student's T test를 이용하였고 통계적인 유의성은 $P < 0.05$ 로 하였다. 모든 실험은 독립적으로 2번 이상 반복하였고 mean \pm standard errors of

means (SEM)로 나타내었다.

III. 成績

1. MTT 分析에 의한 白蓮治哮喘의 細胞毒性

HMC-1 세포에서, 시간과 농도에 따른 白蓮治哮喘의 細胞毒性을 알아보고자, 12 시간, 24 시간 및 48 시간 동안 白蓮治哮喘 최종 농도가 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 100 μ g/ml 처치한 白蓮治哮喘群과 白蓮治哮喘을 처치하지 않은 정상군에 대하여 MTT 분석을 하였다. 정상군의 cell viability는 산출식에 의해 100%로 산출되었다.

12시간동안 처치한 白蓮治哮喘 1 μ g/ml 농도에서는 정상군과 비교하여 약 86.3%, 10 μ g/ml에서 약 88.5%, 100 μ g/ml에서 약 89.3%의 cell viability를 나타내었다(Table 3, Fig.1).

24시간 처치한 白蓮治哮喘 1 μ g/ml 농도에서는 정상군과 비교하여 약 96.6%, 10 μ g/ml에서 약 95.2%, 100 μ g/ml 농도에서는 약 94.5%의 cell viability를 나타내었다(Table 3, Fig.2).

48시간 처치한 白蓮治哮喘 1 μ g/ml 농도에서는 정상군과 비교하여 약 96.3%, 10 μ g/ml에서 약 93.2%, 100 μ g/ml에서 약 93.1%의 cell viability를 나타내었으며(Table 3, Fig. 3) 白蓮治哮喘 처치 시에 시간과 농도에 따른 細胞 毒性은 나타나지 않았다.

Table 2. Primers used in RT-PCR

Target mRNA	Primer sequences(forward/reverse)	Product size(bp)
IL-8	5'-ACATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG-3'/ 5'-GTATGTTCTGGATATTTTCATGGTAC-3'	497
MIP-1 α	5'-CTGCCCTTGCTGTCCTCCTCTG-3'/ 5'-CTGCCGGCTTCGCTTGGTTA-3'	197
MIP-1 β	5'-AACCTCTTTTCCACCAATACCATG-3'/ 5'-CACACAGAATCAAATGTGTTATCCA-3'	587
RANTES	5'-CCTCCGACAGCCTCTCCACA-3'/ 5'-GTGTAAGTTCAGGTTCAAGGA-3'	350
GAPDH	5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'/ 5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'	324

Table 3. Effect of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘) on Cell Viability. HMC-I Cells were Incubated with *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘) at the Indicated Concentrations for 12 hrs , 24 hrs or 48 hrs

Concentration of <i>Baekryunchihyo-tang</i> ($\mu\text{g/ml}$)		Hours		
		12hrs	24hrs	48hrs
Control		100 \pm 0.80 ^{a)}	100 \pm 2.22	100 \pm 0.70
Sample	1 $\mu\text{g/ml}$ (%)	86.68 \pm 0.94 (86.3%)	96.67 \pm 2.41 (96.6%)	96.36 \pm 0.86 (96.3%)
	10 $\mu\text{g/ml}$ (%)	88.58 \pm 0.54 (88.5%)	95.20 \pm 0.94 (95.2%)	93.26 \pm 1.24 (93.2%)
	100 $\mu\text{g/ml}$ (%)	89.31 \pm 0.69 (89.3%)	94.59 \pm 1.17 (94.5%)	93.11 \pm 1.83 (93.1%)

^{a)} mean \pm stander errors

Control : none treated group

Sample : group treated with *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘)(1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$)

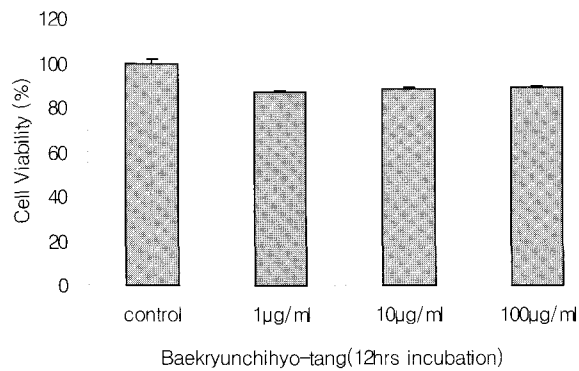


Fig. 1. Effect of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘) on cell viability.

HMC-I cells were incubated with *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘) at the indicated concentrations for 12 hours. Cellular viability was determined via MTT assay. Relative viability (% control) is shown as the percentage absorbance of the sample with respect to that of the control (without *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘)). Results are presented as mean \pm standard error (bars) for two independent experiments, each with a minimum of three cultures.

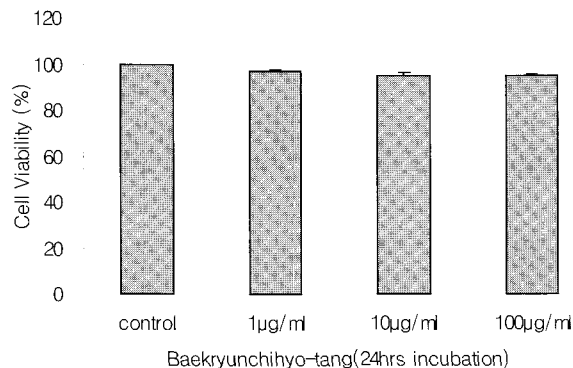


Fig. 2. Effect of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘) on cell viability.

HMC-I cells were incubated with *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘) at the indicated concentrations for 24 hours. Cellular viability was determined via MTT assay. Relative viability (% control) is shown as the percentage absorbance of the sample with respect to that of the control (without *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮喘)). Results are presented as mean \pm standard error (bars) for two independent experiments, each with a minimum of three cultures.

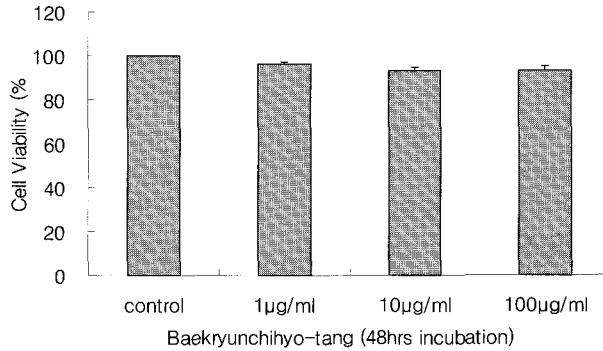


Fig. 3. Effect of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) on cell viability. HMC-1 cells were incubated with *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) at the indicated concentrations for 48 hours. Cellular viability was determined via MTT assay. Relative viability (% control) is shown as the percentage absorbance of the sample with respect to that of the control (without *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯)). Results are presented as mean \pm standard error (bars) for two independent experiments, each with a minimum of three cultures.

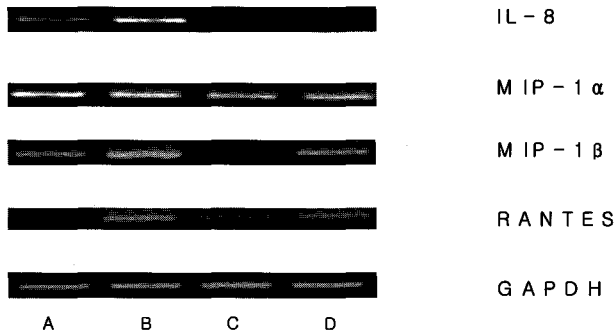


Fig. 4. Expression of chemokine genes in HMC-1 cells was analyzed by RT-PCR. Cells were pretreated with *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯) (100 µg/ml and 10µg/ml) for 24 hours. After pretreatment of *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯), cells were stimulated with 1 µM calcium ionophore A 23187 for 2 hours. Expression levels of GAPDH mRNA were used an endogenous standard for quantitation.
 A : Normal group
 B : Control group : 1 µM calcium ionophore A23187
 C : Sample 1 group : 1 µM calcium ionophore A23187 + 100 µg/ml *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯)
 D : Sample 2 group : 1 µM calcium ionophore A23187 + 10 µg/ml *Baekryunchihyo-tang*(白蓮治哮湯)

2. RT-PCR 分析을 통한 白蓮治哮湯의 chemokines 發顯 效果

白蓮治哮湯 濃度는 100 µg/ml와 10 µg/ml로 하였으며, 白蓮治哮湯의 전처치 時間은 24 時間으로 하였다. 또한 HMC-1 細胞를 刺戟하기 위한 calcium ionophore A23187은 1 µM의 最終濃度로 2時間 刺戟한 다음 分析하였다.

RT-PCR을 精量하기 위하여 각 cycle 별로 증폭하여 有效 濃도 곡선에 해당하는 cycle을 결정하였

다. 유전자 발현은 laser densitometry와 GelScan software program (Pharmacia, USA)을 이용하여 측정하였으며, GAPDH 발현에 대한 상대비교를 하였다.

자극하지 않은 정상군에서 IL-8은 약하게 발현되었고, RANTES(regulated on activation, normal T cell expressed and presumably secreted)는 거의 발현되지 않았으나 MIP-1a는 가장 강하게 발현되었고 MIP-1β도 비교적 강하게 발현되었다. Calcium

ionophore 자극한 대조군에서는 IL-8, MIP-1 β 및 RANTES 유전자의 발현은 강하게誘導되었으나 MIP-1 α 유전자는 거의 유사하였다. 白蓮治哮喘群은 대조군에 비하여 농도의존적으로 IL-8, MIP-1 β 및 RANTES 유전자의 발현은 억제되었고, 특히 IL-8은 100 μ g/ml 白蓮治哮喘과 10 μ g/ml 白蓮治哮喘 모두에서 강하게 억제되었으나, MIP-1 α 발현은 별다른 변화가 없었다(Fig. 4).

VI. 考 察

일반적으로 氣管支喘息(이하 喘息이라 함)은 여러 반응에 대한 氣管과 氣管支의 증가된 과민 반응과, 자발적이거나 治療의 結果로 氣道 폐쇄의 정도가 변하는 것이며 病理學的 특징은 氣道 平滑筋의 收縮, 浮腫과 세포 침윤에 의한 粘膜炎의 肥厚 및 非正常的인 粘液 등이다. 平滑筋 收縮은 비교적 쉽게 治療되나 浮腫과 세포침윤의 回復은 抗炎症藥物의 持續的 治療를 필요로 한다. 그러므로 때로는 喘息 治療시 단기간 회복약물 (short-term relievers)과 장기간 조절약물 (long-term controllers)로 나누기도 한다. 단기간 회복은 기관지확장제 사용이 가장 효과적이며 氣道平滑筋의 弛緩에 의한 氣道の 반경을 확장할 수 있는 β 교감신경 수용체 자극제들이다. Methylxanthine계인 theophylline과 항무스카린 제제도 사용할 수 있다. 장기간 조절은 흡입 코티코스테로이드와 같은 抗炎症藥物, cromolyn 혹은 nedocromil 같은 비만세포 脫顆粒 抑制劑를 사용한다. 이러한 단기간 회복약물과 장기간 조절약물의 차이는 불분명하기도 한다. 예를 들면 theophylline이 림파구의 기능을 抑制하고 氣道粘膜炎을 緩和하는 것과 흡입 코티코스테로이드인 budesonide가 빠르게 기관지 확장을 시키는 作用들이다. 최근 개발된 leukotriene pathway inhibitors들은 장단기 모두 효과적이다^{16,17}.

白蓮治哮喘은 경희대학교 부속한방병원 폐계내과에서 창방한 處方으로 白蓮草 8g를 君藥으로하고 臣藥으로 沙蔘, 麥門冬 6g을, 佐使藥으로 五味子, 杏

仁, 桔梗, 貝母, 地骨皮, 黃芩, 桑白皮炒, 石膏, 甘草 각4g으로 구성되어 清熱 養陰潤肺 止咳平喘 效能을 가지고 있다^{7,8}. 麥門冬과 五味子에 대해 실험보고를 살펴보면, 李⁹는 麥門冬과 五味子が IgE 합성과 관련된 IL-4, 호산구를 활성화시키는 IL-5, 비만세포에 작용하는 IL-6의 轉寫를 각각 억제하여 喘息治療에 효능을 가진다고 보고한 바 있다. 杏仁과 桔梗에 대한 실험보고를 살펴보면, 鄭¹⁰은 杏仁과 桔梗이 IL-4, IL-5, IL-6의 轉寫를 억제함으로써 喘息의 발생기전을 효과적으로 차단하여 喘息 治療效果를 나타낸다고 보고한 바 있다. 許¹¹는 甘草가 IL-4, IL-5, IL-6의 轉寫能을 억제하여 IgE의 합성을 저해하고 호산구의 활성을 저해하며 비만세포가 염증매개물질 분비를 저해하여 氣道粘膜炎의 過增殖과 이상분비물 증가를 감소시켜 喘息治療效果를 나타낸다고 보고한 바 있다.

氣管支喘息은 氣管支의 可逆性 氣道閉塞과 더불어 氣管支 過敏性을 동반하는 氣道の 慢性 炎症性疾患으로 생각되고 있고 최근의 氣管支喘息에 대한 연구는 炎症 반응이나 면역반응에 공통으로 관여하는 여러 cytokines, chemokines의 증감을 관찰함으로써 세포단계에서의 조직손상 및 치유 복원과정을 설명하고 있다^{12,13,16,18}. Griffiths-Johnson¹³등은 asthma의 동물실험 model을 보다 구체화시키는 방법의 일환으로 분자생물학적 기법을 도입하여 IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8 및 IFN- γ , MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α), GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulation factor), TNF- α 등의 chemokines들을 측정함으로써 새로운 영역을 구축하였음을 종합적으로 보고하였다.

喘息은 氣道 粘膜炎의 비만세포의 IgE 抗體에 의한疾患으로 알려져 있으며 抗原에 再露出되는 경우 비만세포의 表面에서의 抗原-抗體 反應은 세포과립에 저장된 mediators의 방출과 다른 mediators의 합성과 방출을 야기한다. 氣管支 收縮과 같은 초기 반응을 매개하는 物質로는 histamine, tryptase와 여러 종류의 neutral proteases, leukotrienes C4와 D4, 및

prostaglandins, platelet-activating factor (PAF) 등이 있으며, 이러한 물질들은 氣道를 통하여 擴散되어 筋肉을 收縮하고 vascular leakage를 유발한다. 다른 mediators들은 2-8시간 후에 발생하는 지속되는 氣道收縮, 氣道粘膜의 cellular infiltration 및 mucus hypersecretion과 같은 후기 반응과 관련되어 있다¹⁷. T 세포 클론은 분비하는 cytokines에 의해 두 종류의 T helper 림프구 (TH1과 TH2)로 나눌 수 있으며 TH1은 IFN- γ , IL-2, TNF- β 를 생산하며 macrophages, cytotoxic T cells (CTL) 및 NK 세포를 활성화하여 cell-mediated immunity를 일으키며, TH2는 IL-4, IL-5와 IL-6를 생산하고 B 세포 증식과 분화를 야기하여 체액성 면역(humoral immunity)에 관여한다. 또한 TH2는 IL-10을 생산하여 TH1에 의한 cytokines의 생산을 억제하며, 반대로 TH1에 의해 생성된 IFN- γ 은 TH2 세포의 증식을 억제한다¹⁹. T세포와 비만세포에서 방출되는 granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), tumor necrosis factor (TNF), tissue growth factor (TGF), interleukin 4 와 5 등으로, 또한 eosinophil을 활성화하고 유인하며 B 림프구에 의한 IgE 생산을 자극한다. 이러한 cytokine은 eosinophil cationic protein (ECP), major basic protein (MBP), protease 및 PAF 등을 생산하여 후기 반응과 관련이 있다고 알려져 있다¹⁷.

비만세포는 즉시형 과민반응의 炎症 作用에 있어서 중요한 作用을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 다른 炎症과 生理學的 過程의 조절에 중요하게 관여하고 作用할 것이라는 많은 보고가 있다^{20,21}. 다양한 해부학적 장소에 존재하는 비만세포와 脫顆粒의 變化들은 先天的, 特異的, 病理學的 免疫反應에 관여하며, 遲延 過敏反應 (delayed hypersensitivity reactions), fibrosis, autoimmune pathology, neoplasia, inflammation in the rheumatoid synovium 및 inflammtory bowel diseases 등의 다양한 疾患에 관련되어 있다²¹.

사람 비만세포는 TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-8 등의 cytokines를 분비하고 여러 chemokines를 발현한다²². 또한 HMC-1 사람 비만세포주는 I-309,

MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β 및 RANTES 등의 chemokines를 발현한다²³.

최근 백혈구의 화학 주성 (chemotactic activity) 을 보여주는 구조적으로 cytokines과 관련된 물질들이 발견되었으며 이러한 화학주성 cytokines를 chemokines이라 명명하였으며 炎症反應에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 이들은 그 외에도 cancer, developmental, neuronal, antibacterial, pyrogenic, angiogenesis, wound healing, hematopoietic regulation, immune cell effector function 등의 다양한 生物學的 機能에 관여하며 다양한 疾患의 過程에도 중요한 역할을 하고 있다^{3,4}.

CXC chemokines는 주로 호중구(neutrophil)를 誘導하고 活性化시키는 반면 CC chemokines는 neutrophil을 제외한 monocytes, lymphocytes, basophils, eosinophils, neutral killer (NK) 세포 및 dendritic 세포를 誘導하고 活性化시킨다^{24,25}.

IL-8은 대표적인 CXC chemokine이며, 여러 cytokines (IL-1, GM-CSF, TNF- α), bacterial products (lipopolysaccharide LPS), viral products (double-strand RNA), plant products (concanavalin A) 등에 의해서 誘導 될 수 있다. 호중구(neutrophil)는 다형핵 백혈구이자 염증세포의 하나로서 화학주성 자극(chemotactic stimuli)에 빠른 반응성을 보여 대식세포가 갖는 식균작용을 수행하며 대식세포에 의해 일차적으로 생성된 cytokine에 자극되어 急性 炎症反應을 유발시키는 주된 세포인데²⁴, IL-8은 호중구의 탈과립을 야기하고²⁶ 호중구의 화학 주성²⁷ 과 간주성(haptotactic migration)²⁸을 자극한다. 즉 IL-8은 호중구를 탈과립화시키며 호중구로 하여금 혈액으로부터 주위의 조직으로 이동시켜 혈관생성 (angiogenesis)에 관여하는데 세균감염시 기도 상피 세포 표면에 IL-8의 발현을 유도하여 호중구를 氣道로 이동, 炎症을 일으켜 氣道 過敏性 誘發에 중요한 역할을 한다^{26,28,29}. 또한 IL-8은 호중구에서 PAF의 합성을 유발하고 leukotriene B4 (LTB4)와 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE)의 방출과

arachidonate-5-lipoxygenase를 활성화하고³⁰ 喘息, chronic bronchitis, allergic rhinitis, rheumatic arthritis, contact dermatitis 등의 질환에서 체액과 조직에서 발견되어진다.

CC chemokine의 일종인 MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 등은 폐섬유증의 진행에 관여한다³¹. RANTES와 MIP-1 α 는 B 세포에서 IgE 생산을 야기하며³², schistosome egg antigen-induced allergic inflammation에 중요한 역할을 하며^{33,34}, eosinophil, monocyte, 림파구의 화학주성에 관여한다^{35,36}. 또한 LPS 투여시 astrocytes와 microglia에서 MIP-1 α , MIP-1 β 와 RANTES를 발현한다³⁷.

氣管支喘息 治療에 多用하고 있는 白蓮治哮喘에 대한 실험적 연구가 아직 보고된 바 없어 저자는 白蓮治哮喘이 氣管支 喘息을 일으키는데 관여하는 여러 가지 chemokines에 대해서 어떤 작용을 하는지 관찰하고자 사람 肥滿細胞柱를 이용하여 氣道內 炎症을 誘發할 수 있는 CXC chemokines에 속하는 IL-8과 CC chemokines에 속하는 RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β 의 發顯에 미치는 影響을 觀察하였다.

실험방법으로는 mast cell leukemia 환자로부터 유래하여 chemokines를 분비한다고 알려진 사람 肥滿細胞柱(human mastocytoma, HMC-1)에 calcium ionophore A23187 1 μ M로 2시간 처치하여 肥滿細胞에서 chemokines의 발현을 유발하고, 여기에 白蓮治哮喘 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도 순으로 처치하여 白蓮治哮喘이 chemokines의 mRNA 발현에 미치는 效果를 연구하였다. 그리고 白蓮治哮喘 자체의 세포독성 여부를 알기 위하여 12시간, 24시간, 48시간 동안 白蓮治哮喘 최종농도가 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 처치한 白蓮治哮喘群과 白蓮治哮喘을 처치하지 않은 정상군을 MTT 방법으로 분석하였다. Chemokines의 발현을 측정하기 위하여 RT-PCR 방법을 이용하였는데, RT-PCR을 정량화하기 위하여 각 cycle별로 증폭하여 유효농도 곡선에 해당하는 cycle을 결정하였다. 유전자 발현은 laser densitometry와 GelScan software program (Pharmacia, USA)을 이용하여 측정하였으며, GAPDH 발현에 대한 상

대비교를 하였다.

白蓮治哮喘이 Chemokines의 발현에 미치는 영향을 살펴보면 아무 刺戟을 하지 않은 正常群에서 IL-8은 弱하게 發顯되었고, RANTES는 거의 發顯되지 않았다. 반면에 MIP-1 α 는 가장 强하게 發顯되었고 MIP-1 β 도 비교적 强하게 發顯되었다. Calcium ionophore A23187(1 μ M)에 2시간 刺戟한 對照群은 IL-8, MIP-1 β 및 RANTES 遺傳子의 發顯은 强하게 誘導되었으나 MIP-1 α 遺傳子는 거의 類似하였다. 白蓮治哮喘을 전처치한 白蓮治哮喘群은 calcium ionophore만 刺戟한 對照群에 比하여 濃度依存的으로 IL-8, MIP-1 β 및 RANTES 遺傳子의 發顯은 抑制되었으나 MIP-1 α 發顯은 별다른 變化가 없었다(Fig. 4). 또한 濃度和 時間에 따른 地黃平喘湯의 細胞毒性은 나타나지 않았다(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

실험 결과 白蓮治哮喘의 作用기전은 喘息 및 알러지 炎症과 밀접한 관련이 있는 CXC chemokines인 IL-8과 CC chemokines인 MIP-1 β 및 RANTES를 抑制하는 데 있음을 알 수 있다. 그리고 사람 비만 세포주에서 시간과 농도에 따른 白蓮治哮喘의 細胞毒性은 나타나지 않았다. 따라서 喘息疾患에 사용되는 白蓮治哮喘은 氣道內 炎症反應을 誘發할 수 있는 chemokines의 發顯을 抑制하는 기전으로 喘息을 治療할 수 있다고 추정할 수 있다. 이는 白蓮治哮喘의 臨床的 效能에 대하여 chemokines이 관여할 것이라는 것을 分子生物學的方法으로 證명한 것으로 추후 個別藥物에 대해서 지속적인 研究가 필요하며 喘息 治療 韓方製劑에 대한 객관적인 檢證은 물론 새로운 治療 方法을 모색하는데도 도움을 줄 것으로 생각된다.

V. 結 論

사람 비만세포주 (HMC-1)에서 calcium ionophore에 의한 chemokines의 발현 유도 시에 白蓮治哮喘을 처치한 후, RT-PCR을 이용하여 chemokines의 발현도를 測定하였으며 부가적으로 白蓮治哮喘의 細胞毒性을 MTT 方法을 시행하여 다음과 같은 結

果를 얻었다.

1. Calcium ionophore A23187 (1 μ M) 2시간 자극한 대조군은 자극하지 않은 정상군에 비해 IL-8, MIP-1 β 및 RANTES의 mRNA 발현 증가를 볼 수 있었으나 MIP-1 α 의 발현은 거의 변화가 없었다.
2. 白蓮治哮喘群은 calcium ionophore만 투여한 대조군에 비해 IL-8, MIP-1 β 및 RANTES의 mRNA 발현이 濃度 依存的으로 抑制되었다.
3. 사람 肥滿細胞柱에서 시간과 농도에 따른 白蓮治哮喘의 細胞毒性은 나타나지 않았다.

參考文獻

1. 한용철. 臨床呼吸器學. 서울:일조각; 1998, p.208.
2. 李珩九 鄭昇杞. 東醫肺系內科學, 서울:아트동방; 1999, pp.162-202.
3. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97-179.
4. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 90;1997, pp.909-28.
5. 허승철, 박광은, 정승기, 이형구. 哮喘證에 대한 淸上補下湯의 臨床的 觀察. The 8th INTL Congress of oriental medicine, 1995.
6. 趙英敏, 趙一賢, 李京機, 車恩秀, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 哮喘證에 대한 臨床的 觀察. 第19回 全國 韓醫學 學術大會 發表論文集. 1997, pp.141-51.
7. 金一赫. 藥品植物學各論. 서울:한국학습교재사; 1984, pp.24-7, 266.
8. 安德均. 韓國本草圖鑑. 서울:敎學社; 1998, p.497.
9. 李同生, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 麥門冬과 五味子가 Asthma model 內的 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 慶熙醫學. 2000;16(2):69-80.
10. 鄭旭, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九. 杏仁과 桔梗이 Asthma model 內的 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 大韓韓方內科學會誌. 2000;21(1): 31-8.
11. Heo Tae-Seok, Jung Hee-Jae, Jung Sung-Ki, Rhee Hyung-Koo. The Effects of Sabaack-San and Glycyrrhizae Radix on IL-4, IL-5 and IL-6 in Asthma Model. *Journal of Oriental Medicine* Vol5, No1, December 20. 2000.
12. Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M. Cytokines and asthma. *J. of investigational allergology and clinical immunology*. 1997;7(5): 270-3.
13. Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Josw PT, Williams TJ. Animal models of asthma, role of chemokines. *Methods in enzymology*. 1997;288: 241-66.
14. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia Res*. 1988;12:345-55.
15. 이희문, 조정제, 윤주천, 하윤문. 사람 비만세포주 (HMC-1)에서 케모카인 및 그 수용체의 誘導 및 발현. *대한면역학회지*. 1992;1(4):335-42,9.
16. 강홍모. 기관지 천식의 최신치료. *경희의학*. 1996;12(3·4):286-95.
17. Boushey HA. Bronchodilator and other agents used in asthma. In: Katzung BG ed, *Basic & clinical pharmacology*. 7th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998, pp.325-42.
18. Ferreira MB, Palma Carlos AG. Cytokines and asthma. *J. of investigational allergology and clinical immunology*, 1998;8(3):141-8.
19. Barbuto JAM, Akporiaye ET, Hersh EM. Immunopharmacology. In: Thomson A ed, *The cytokine handbook*. 3rd ed. San Diego:Academic Press; 1998, pp.916-44.
20. Galli SJ. New approaches for the analysis of mast cell maturation, heterogeneity and function. *Federation Proc*. 1987;46:1906-14.
21. Metcalff D, Baram D, Mekori YA. Mast cells.

- Physiol Rev. 1997;77(4):1033-79.
22. Moller A, Pippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Walker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarnitzki BM. Human mast cells produce IL-9. *J Immunol.* 1993;151:3261-6.
 23. Selvan RS, Butterfield JH, Krangel MS. Expression of multiple cytokine genes by a human mast cell leukemia. *J Biol Chem.* 1994;269:13893-8.
 24. 김광혁 외 25인. 세포·분자 면역학. 서울:정문각; 1998, pp.297-330.
 25. 김대식 외 11인. 면역생물학. 서울:라이프사이언스; 2000, pp.380-2, 472-6.
 26. Masure S, Proost P, Van Damme J, Opdenakke G. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem.* 1991;198:391-8.
 27. Van Damme J, Van Beeumen J, Opdenakker G, Billiau A. A novel, NH2-terminal sequence-characterized human monokine possessing neutrophil chemotactic, skin-reactive, and granulocytosis-promoting activity. *J Exp Med.* 1988;176:1364-476.
 28. Rot A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J Immunol.* 1993;23:303-6.
 29. Inoue H. Interleukin-8 and airway inflammation. *Nihon Kogyoku Gakkai Zasshi.* 1999;37(9):673-9.
 30. Schroder JM. The monocyte-derived neutrophil activating peptide(NAP /interleukin-8 stimulates human neutrophilarachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *JExp Med.* 1989;170:847-63.
 31. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1 alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 1999;117:159-165.
 32. Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Fujimoto M, Lindley I, Furusho K.: RANTES and macrophage inflammatory protein 1a selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells *J Exp Med.* 1996; 183:2397-402.
 33. Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel RG, Strieter RM, Kunkel SL. CC chemokine- induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol.* 1996;60:573-8.
 34. Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, Kunkel SL. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by CC family chemokines in allergic airway inflammation. *J Immunol.* 1997;158:4398-4404.
 35. Bacon KB, Schall TJ. Chemokines as mediators of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996;109:97-109.
 36. Braciak TA, Bacon K, Xing Z, Torry DJ, Graham FL, Schall TJ, Richards CD, Croitoru K, Gualdie J. Overexpression of RANTES using a recombinant adenovirus vector induces the tissue-directed recruitment of monocytes to the lung. *J Immunol.* 1996;157:5076-84.
 37. Sun D, Hu X, Liu X, Whitaker JN, Walker WS. Expression of chemokine genes in rat glial cells: the effect of myelin basic protein-reactive encephalitogenic T cells. *J Neurosci Res.* 1997; 48:192-200.