

柴胡治喘湯과 補益定喘湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 조직에 미치는 영향

송호철* · 김성훈

경희대학교 동서의학대학원 종양연구팀

Effect of Sihochicheu-tang and Boikjeungcheu-tang on Immune Cell in BALF and lung Tissue in a Rat Asthma Model

Ho Cheol Song*, Sung Hoon Kim

Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University

Asthma is an inflammatory disease of airways that is induced by Th2 cytokines and inhibited by Th1 cytokines. In this study we wanted to investigate the effect of SCT and BJT on eosinophilla and cytokines of BALF in a mouse model established airway inflammation. Asthma was induced to male c57/bl6 mice. Allergen-specific antibody responses, cytokine(IL-4, IL-5, INF-γ), and eosinophil inflammation of the airways were investigated on the BALF and splenocyte. SCT and BJT effectively induced INF-γ and inhibited IL-4, IL-5 as well as eosinophilic inflammation when SCT and BJT were administered. Total Ig E level in the BALF decreased. SCT was more effectiveness than BJT. It is considered that SCT and BJT have favorable effect on the asthma because the asthma specific series of abnormalities in respiratory system were decreased.

Key words : Asthma, Sihochicheu-tang(SCT), Boikjeungcheu-tang(BJT), BALF, eosinophil, IL-4, IL-5, INF-γ

서 론

喘息은 한의학에서 呼吸促急하며, 喉中有痰聲聲한 증상인 哮喘증의 범주에 속하는 질환으로¹⁾, 서양의학에서는 다양하게 흡입된 기관지 수축자극에 대한 기도의 반응성 증가를 특징으로 하는 기도의 만성 염증성 질환으로, 비만세포, 호산구, 식세포, T 림프구 등의 세포들과 이들로부터 유리되는 여러 cytokine에 의해서 일어 나는 것으로 알려져 있으며, 가역적인 기도협착 및 발작성의 흡기성 호흡곤란, 천명, 폐의 과흡기, 기침, 날음(rale) 등의 특징적인 증상이 나타난다^{2,3)}.

한의학에서 천식에 대한 실험연구는 정이 加味清上補下湯⁴⁾, 定喘湯⁵⁾과 박⁶⁾의 千緝導痰湯⁶⁾ 외에도 다수의 연구가 있었고, 천식 모델 흰쥐의 폐기관지세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)내 면역세포와 관련된 연구로는, 이 등⁷⁾이 小青龍湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향을, 안

⁸⁾이 ovalbumin으로 유발된 천식에 미치는 영향을, 김⁹⁾이 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향을, 조 등¹⁰⁾이 加味清金降火湯과 加味六味地黃湯이 allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향 등이 있었다.

저자는 임상에서 천식에 활용되었거나 활용가능성이 있는 처방을 검색하였고, 그중에서 柴胡治喘湯과 補益定喘湯의 알레르기 천식 및 면역에 대한 효능을 알아보기 위해 감각된 흰쥐에 ovalbumin을 흡입시켜 allergy 천식의 병태를 유발시키고, 시호치천탕과 보익정천탕을 각각 경구투여한후 흰쥐의 BALF내 호산구수, total leucocytes, IL-4, INF-γ, IL-5, IgE, 적출 폐장조직의 사진을 분석한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

雄性 6주령의 c57/bl6 생쥐를 한국생명공학연구원에서 공급

* 교신저자 : 송호철, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1 경희대 동서의학대학원

· E-mail : splow77@daum.net, · Tel : 031-201-2179

· 접수 : 2004/11/13 · 수정 : 2004/12/15 · 채택 : 2005/01/19

받았고, 실험당일까지 고품사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2 °C, 습도 50~70%, 조도 200 lux, 그리고 조명 12시간 (8시 점등, 20시 소등)를 계속 유지하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 약재는 시중에서 구입하여 사용하였으며, 柴胡治喘湯(Sihochicheu-tang)과 補益定喘湯(Boikjeungcheu-tang) 1점의 분량은 각각 다음과 같다.

Table1. Contents of Prescriptions of Sihochicheutang and Boikjeungcheu-tang

Herbal name	Species	dosage(g)
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	12
前胡	<i>Peucedani Radix</i>	8
羌活	<i>Osterici Koreani Radix</i>	8
蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	8
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	6
葛根	<i>Puerariae Radix</i>	6
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	6
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	6
薑黃	<i>Curcuma Longae Rhizoma</i>	4
細辛	<i>Asari Radix</i>	2.8
Sihochicheu-tang		
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	12
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	12
辛夷	<i>Magnoliae Flos</i>	8
白芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	8
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	6
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4
麥門冬	<i>Ophiopogonis Radix</i>	4
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	4
麥芽	<i>Hordei Germinatus Fructus</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	3
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	3
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	2
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	2
細辛	<i>Asari Radix</i>	2
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2
Boikjeungcheu-tang		

3) 시약 및 기기

① 시약

본 실험에 사용된 시약으로 diethyl pyrocarbonate (DEPC), NH₄Cl, KHCO₃, Na₂ EDTA, mgcomplete adjuvant, chloroform, collagenase IV, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액 (ACK lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), dulbecco's minimum essential medium (DMEM), formaldehyde, magnesium chloride

(MgCl₂)는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사 (Logan, U.S.A) 제품을, anti-CD28 과 anti-CD3 는 Serotec 사 (Kidlington, UK)제품, RNase inhibitor, Taq polymerase는 Takara사 (Shimogyo-ku, Japan)제품. Randem primer, dNTP, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, promega사 (M-MLV RT, Madison, USA), RNAzolB는 Tel-test사 (Friendswood, USA)제품, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD19-FITC, anti-CD23-FITC, anti-IgE-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-CD44-PE, anti-CD69-FITC, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품, agarose는 Seakem사 (Cambrex, USA) 제품을 사용하였고, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

② 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A), plate shaker (Lab-Line, U.S.A) 및 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 제조

柴胡治喘湯 3점 분량 224.4g과 補益定喘湯 3점 분량 240g을 각각 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland) 로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan) 를 이용하여 柴胡治喘湯은 1점당 6g, 補益定喘湯은 1점당 5.5g의 물추출물을 얻어 실험에 사용하였다.

2) 실험군 설정

실험군은 정상군(Normal), 대조군(Control), 柴胡治喘湯 (SCT), 補益定喘湯(BJT)으로 나누어 평균 체중이 유사하게 각 군 당 5마리씩 임의배치하였다.

3) 천식유발

500 µg/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma)를 PBS로 용해한 후 혼합한다. 이 혼합물을 10 N NaOH 로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 x g 에서 5분 동안 원심분리한다. 이 OVA/Alum 침전물 (pellet)을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 µg OVA를 0.2 ml 로 조정하여 복강내로 주사하여 전신감작을 시킨다. 이후 2주째

에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500 µg/ml) 100 µl를 기도투여 (i.t.)한다. 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 5주 동안 비강 및 기도내로 흡입시키고, 7주부터 2주간은 5.0 mg/ml을 흡입시켰다.

4) 검액의 투여

OVA/Alum로 전신감작 시킨 후 1주 짜부터 SCT와 BJT 추출물 (150 mg/kg)을 각각 일주일에 5회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구투여 하였다. 또한 양성대조군으로 1일 1회 cyclosporin A (CsA, 20 mg/kg)를 4주간 복강주사 하였다.

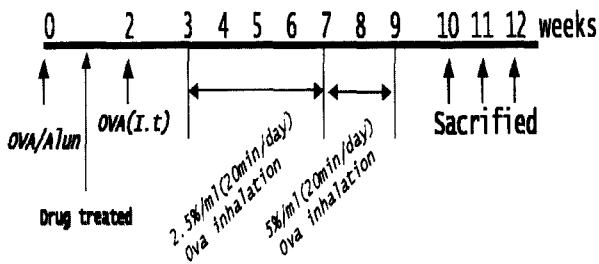


Fig. 1. Schedule of ovalbumin sensitization, challenge and drug treatment. OVA: ovalbumin, I.t: intraperitoneal

5) 천식모델 생쥐의 폐에서 호산구 분리

천식이 유발된 생쥐의 폐를 적출하여 폐조직을 잘게 절편한 후 2% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 15 ml로 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해 (digestion) 하여 폐세포를 분리하였다. 분리된 폐세포는 배지로 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들로부터 적혈구 용혈액 (buffered ammonium chloride (ACK) solution, 0.15 M NH₄Cl 8.29 g, 1.0 mM KHCO₃ 1 g, 0.1 mM Na₂ EDTA 37.2 mg)을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다.

6) 폐와 기관지 폐포세척액 (BALF)으로부터 세포의 분리

6주후 기관지천식 생쥐의 눈에서 혈액을 분리한 후 목 부분을 해부하여 폐포 세척액(BALF)으로부터 세포를 분리하기 위해 10%FBS/DMEM 배양액 1ml을 넣은 주사기를 기관지 (trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 3회 순환시켜 분리한 후 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정한다.

7) cytopspin에 의한 호산구 분석

BALF 로부터 세포를 분리한 후 cytopspin (한일과학)에서 1000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 slide를 건조하였다. 건조된 슬라이드는 Diff-Quick 용액 (Baxter Healthcare, Miami, FL)을 이용하여 염색한다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 염색특징 등으로 면역세포의 type을 결정한다. 광학현미경(Nikon, japan) 400x에서 관찰하여 infiltration된 호산구의 숫자를 측정하였다.

8) 유세포 분석 (flow cytometry analysis)

폐와 폐포세척액으로부터 분리한 세포로부터 다양한 세포표

면 분자들에 대한 항체를 이용하여 면역염색하기 위하여 2.5x10⁵ 세포로 조정하여 염색 완충용액 (1% 우태아 혈청, 0.01% NaN₃가 포함된 인산염 완충용액, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 이를 FITC (fluoresceinated isothiocyanate) 또는 PE(phycoerythrin) 형광물질이 결합된 CD3, CD19, CCR3, CD11b, Gr-1등의 항체를 시료에 가하여 4°C에서 40분간 반응시키고 염색 완충용액으로 2회 세척한 후 세포표면 분자들의 발현을 유세포분석기 (FACScan, BD Biosciences)로 분석하였다.

9) 기관지천식생쥐의 폐조직의 역전사-중합효소 연쇄반응

① RNA 추출

적출한 폐조직을 조직분쇄기로 폐조직(0.1g)과 RNAzolB 500 µl를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform (CHCl₃) 50 µl를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 µl의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 µl와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75°C에서 5분 동안 변성시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한다 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in germany)를 이용하여 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 µl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β-actin, IL-4, IL-5 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/µl)와 antisense primer (20 pmole/µl)를 혼합하여 1 µl를 가하고, 다시 3 µl 2.5 mM dNTPs, 3 µl 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 µl Taq polymerase (5 U/µl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 µl 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation; 95°C, 5분, denaturation; 95°C, 5분, annealing; 55°C, 1분, elongation; 72°C, 1분을 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 µl씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20분간 전기영동을

통하여 분석하였다.

10) ELISA Analysis

생쥐에서 분리한 폐포세척액에서 각 cytokine 양을 측정하기 위해 IL-4, IL-5, IgE, IFN- γ enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA)으로 생산량을 측정하였다. 각 항체 (antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4℃에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 폐포세척액과 혈청 (100배 희석)을 100 μ l씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11) 조직병리검사

폐를 떼어내어 즉시 10% 포르말린에 고정시키고 파라핀으로 포매한 후 3 μ m 두께의 block을 제작하여 hematoxyline/eosin 과 Masson/trichrome 염색을 시행한다.

결 과

1. BALF내 호산구에 미치는 영향

OVA-asthma 생쥐를 6주후 BALF를 분리하여 cytopsin 하고 호산구염색약(Red)으로 염색한 후 광학현미경 400배율에서 관찰한 결과 천식(asthma)에 원인이 되는 BALF내 호산구가 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)은 현저히 많은 호산구를 관찰할 수 있었고, 시호치천탕 투여군에서는 거의 호산구가 관찰되지 않아 확실한 치료 효과를 관찰할 수 있었다. 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 약간 호산구 수가 감소하였다.(Fig. 2)

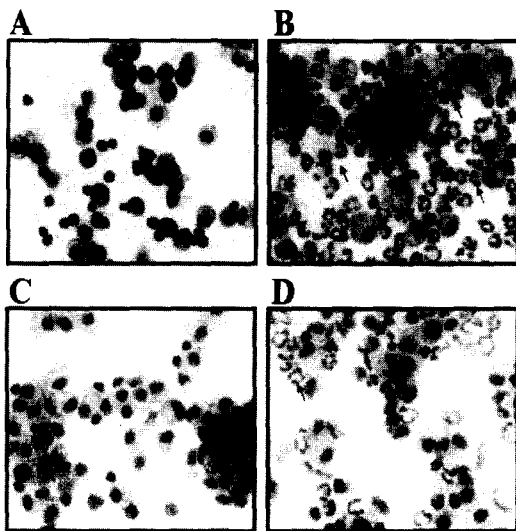


Fig. 2. Phothmicrograph(original magnification,×400) of the BALF cytopsin from a mouse. Arrow: eosinophils A: Normal - inhaled group with saline only B: Control - sensitized and challenged with ovalbumin group C: Sensitized and challenged with ovalbumin and SCT administrated group D: Sensitized and challenged with ovalbumin and BJT administrated group

2. BALF내 호산구 수에 미치는 영향

OVA-asthma 생쥐를 6주후 BALF를 분리하여 cytopsin 하고 호산구염색약(Red)으로 염색한 후 광학현미경 400배율에서 관찰하여 천식(asthma)에 원인이 되는 BALF내 호산구 수를 관찰한 결과 정상군(normal)은 호산구가 관찰되지 않았고 대조군(control)은 126개의 호산구를 관찰할 수 있었고, 시호치천탕 투여군에서는 호산구가 6개로 대조군에 비하여 21배 감소되어 현저한 천식 억제 효과를 관찰할 수 있었다. 보익정천탕 투여군은 호산구 수가 95개로 대조군에 비하여 약간 감소하였다.(Fig. 3)

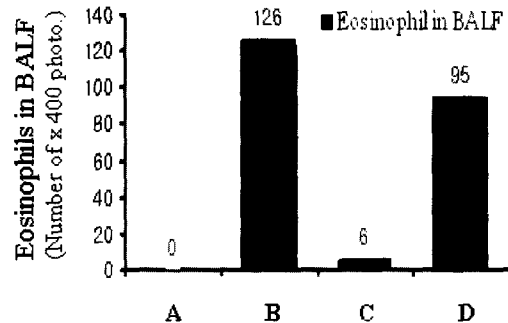


Fig. 3. Numbers of eosinophils in the BALF of asthma induced rat by ovalbumin. A: Normal - inhaled group with saline only B: Control - sensitized and challenged with ovalbumin group C: Sensitized and challenged with ovalbumin and SCT administrated group D: Sensitized and challenged with ovalbumin and BJT administrated group

3. BALF내 백혈구 세포수에 미치는 영향

BALF내의 백혈구세포를 측정한 결과 대조군이 7.64×10^5 개인데 비하여 시호치천탕과 보익정천탕 투여군은 각각 0.62×10^5 개와 1.02×10^5 개로 감소하여 OVA-asthma 생쥐에서 천식으로 인한 염증 백혈구의 침윤(infiltration)이 현저히 감소하였다.(Fig. 4)

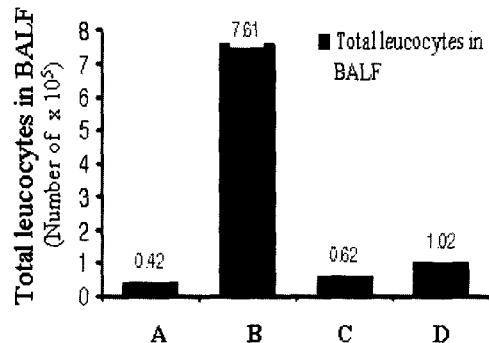


Fig. 4. Numbers of total leukocytes in the BALF of asthma induced rat by ovalbumin. A: Normal - inhaled group with saline only B: Control - sensitized and challenged with ovalbumin group C: Sensitized and challenged with ovalbumin and SCT administrated group D: Sensitized and challenged with ovalbumin and BJT administrated group

4. BALF내 IL-4의 농도에 미치는 영향

OVA-asthma 생쥐를 6주후 BALF내의 IL-4 의 농도를 관찰하여 천식(asthma)에 원인이 되는 BALF내 Th2 세포의 활성도를 간접적으로 측정된 결과 정상군(normal)의 IL-4 농도는 9.9 pg/ml이었고 대조군은 25.6 pg/ml로 증가 하였다. 시호치천탕

투여군은 11.3 pg/ml로 대조군에 비하여 2.26배 감소하였고, 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 1.75배 감소를 관찰하여, 약물투여로 효과적으로 IL-4 생산을 억제하였다.(Fig. 5)

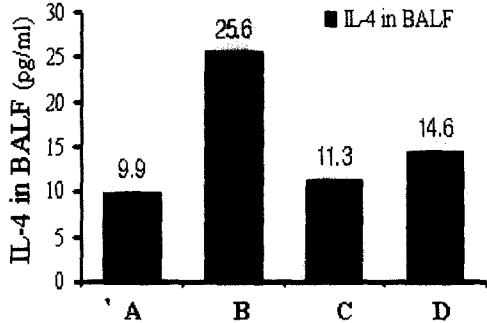


Fig. 5. Concentration of IL-4 in the BALF of asthma induced rat by ovalbumin. A: Normal - inhaled group with saline only B: Control - sensitized and challenged with ovalbumin group C: Sensitized and challenged with ovalbumin and SCT administrated group D: Sensitized and challenged with ovalbumin and BJT administrated group

5. BALF내 IFN-γ의 농도에 미치는 영향

Th2 세포에 대한 cross-regulation으로 Th1 세포에서 생산되는 cytokine을 증가시켜 조절하는 것으로 Th1 세포에 생산되는 BALF 내의 IFN-γ의 농도를 측정된 결과, 정상군(normal)의 IFN-γ 농도는 5.01 pg/ml이었고 대조군은 8.4 pg/ml로 큰 변화가 없었고, 시호치천탕 투여군은 25.4 pg/ml로 대조군에 비하여 3.02배 증가하였고, 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 1.48배 증가를 관찰하여, 약물 투여로 Th1 세포가 활성화되어 생산된 IFN-γ에 의하여 Th2 세포를 억제시킴으로서 천식을 효과적으로 억제시켰다.(Fig. 6)

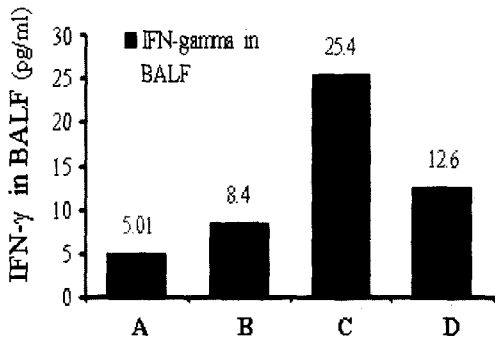


Fig. 6. Concentration of IFN-γ in the BALF of asthma induced rat by ovalbumin. A: Normal - inhaled group with saline only B: Control - sensitized and challenged with ovalbumin group C: Sensitized and challenged with ovalbumin and SCT administrated group D: Sensitized and challenged with ovalbumin and BJT administrated group

6. BALF내 IL-5의 농도에 미치는 영향

OVA-asthma 생쥐를 6주후 BALF 내의 IL-5의 농도를 관찰하여 천식(asthma)에 원인이 되는 BALF내 호산구 세포의 활성도를 간접적으로 측정된 결과로 정상군(normal)의 IL-5 농도는 0 pg/ml이었고 대조군은 7.9 pg/ml로 증가 하였다. 시호치천탕

투여군은 0 pg/ml로 정상군 처럼 IL-5가 관찰이 되지 않았고, 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 1.76배 감소되어, 시호치천탕의 약물 투여로 IL-5 생산을 현저히 억제하여 천식억제 효과가 탁월하다고 사료되었다.(Fig. 7)

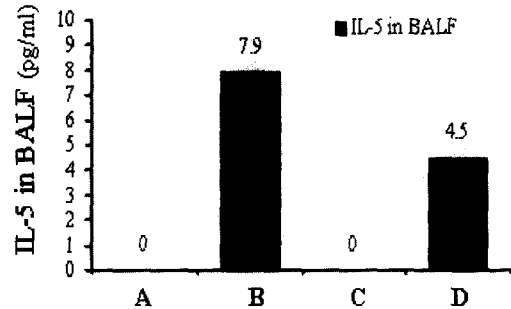


Fig. 7. Concentration of IL-5 in the BALF of asthma induced rat by ovalbumin. A: Normal - inhaled group with saline only B: Control - sensitized and challenged with ovalbumin group C: Sensitized and challenged with ovalbumin and SCT administrated group D: Sensitized and challenged with ovalbumin and BJT administrated group

7. BALF내 IgE의 농도에 미치는 영향

B 림과구 세포에서 알러지 반응에 대한 생산물로 BALF 내의 IgE 분비량을 측정된 결과 정상군(normal)의 IgE 농도는 0 pg/ml이었고, 대조군은 9.2 pg/ml로 현저한 증가를 나타내었고, 시호치천탕 투여군은 0 pg/ml로 정상군 처럼 IgE가 관찰이 되지 않았고, 보익정천탕투여군은 대조군에 비하여 1.70배 감소를 관찰하였다. 이는 시호치천탕의 약물 투여로 IgE 생산을 현저히 억제하여 천식억제 효과가 탁월하다고 사료되었다.(Fig. 8)

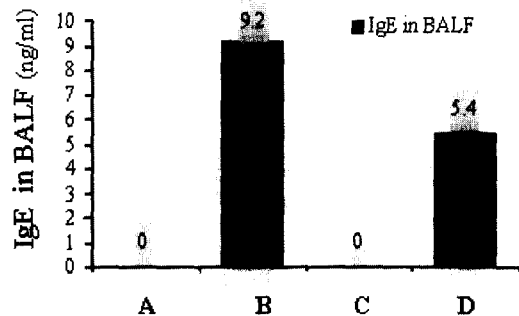


Fig. 8. Concentration of Ig E in the BALF of asthma induced rat by ovalbumin. A: Normal - inhaled group with saline only B: Control - sensitized and challenged with ovalbumin group C: Sensitized and challenged with ovalbumin and SCT administrated group D: Sensitized and challenged with ovalbumin and BJT administrated group

8. 적출 폐장 조직의 변화

OVA-asthma 생쥐를 6주후 폐장 (lung)을 적출하여 폐장 조직을 살펴본 결과 정상군(normal)은 호산구 침윤이 없었다. 대조군은 호산구 침윤으로 인하여 기도조직이 두꺼워 졌다. 시호치천탕 투여군의 정상군과 비슷하게 호산구 침윤이 거의 없었고 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 감소를 관찰하여, 시호치천탕의 약물 투여로 폐장 조직의 보호가 탁월하다고 사료되었다.(Fig. 9)

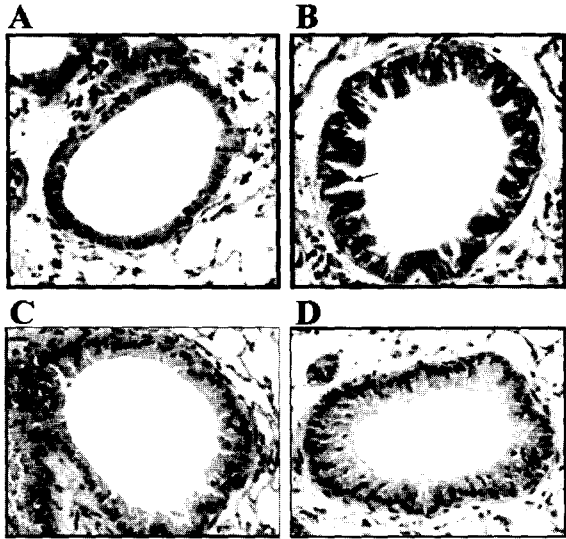


Fig. 9. Histological profiles of the lung tissue. A: Normal - inhaled group with saline only B: Control - sensitized and challenged with ovalbumin group C: Sensitized and challenged with ovalbumin and SCT administrated group D: Sensitized and challenged with ovalbumin and BJT administrated group A-D: H-E stain

고찰

기관지 천식은 알레르기 항원이나 그 외의 어떤 원인에 의해 기관지가 자극되면, 기관지 과민성에 의해 평활근의 수축, 점막의 부종 및 점액의 분비가 증가됨으로써 기도가 갑자기 좁아지게 되는 질환이다. 이때 기도가 좁아지는 정도에 따라 천명, 호흡곤란, 기침 및 흉부 압박감 등 다양한 증상이 나타나게 된다. 천식의 기도과민반응(airway hyperresponsiveness, AHR)은 물리적, 화학적 및 약물학적 자극에 대한 기도의 수축반응이 정상보다 증가되어 있는 것을 의미한다¹¹⁾.

천식을 일으키는 원인으로는 알러젠의 흡입, 호흡기 감염, 일상의 스트레스에 대한 심인성 생리반응, 공기오염, 기후, 약물, 운동 등이 있으며 천식발작의 원인이 대부분 알레르기 성으로 받아들여지고 있다¹²⁾.

한의학에서 천식의 치료는 實證과 虛實으로 변증하여 실증은 病勢가 急迫하고 호흡은 深長하며 有餘가 있고, 脈數하고 有力하고 치료는 祛風散寒, 宣肺平喘 또는 燥濕化痰, 降氣定喘한다. 허증은 病勢가 緩慢하고 숨이 차 호흡이 계속되지 못하며 움직이면 호흡곤란이 가중되고 언어에 힘이 없고, 脈微弱 또는 유력하다. 肺虛는 養肺定喘, 肺腎虛損은 潤肺補腎, 脾肺虛는 補脾益氣, 補肺平喘한다¹²⁾.

저자는 천식에 효과적인 처방의 연구 개발 필요성을 느껴 현재 임상에서 사용중이거나 사용가능한 처방을 검색하였다. 그 중에서 시호치천탕은 시호가 군약으로 전호, 강활, 소엽, 계지, 갈근, 황금, 마황, 천궁, 강황, 세신으로 구성되어 있으며, 祛風散寒, 宣肺平喘의 효능이 있어 실증에 적합한 처방이다.

보익정천탕은 보중익기탕 가미방으로 금은화, 황기, 신이, 백지, 인삼, 백출, 맥문동, 치자, 맥아, 감초, 당귀, 진피, 시호, 승

마, 세신, 천궁으로 구성되어 있으며, 益氣健脾의 주된 효능에 清熱宣肺의 목적이 부가된 처방으로 허증이나 실증 치료후 마무리 치료에 적합한 처방이다. 이 처방들은 加味小柴胡湯과 加味補中益氣湯이라고 이영준 원장님이 비염 치료에 사용한 것을 본인이 천식치료에 활용하였던 것으로 위와 같이 작명하였다.

천식의 면역학적인 특징을 보면 Th2 반응의 우세로 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13과 같은 cytokine을 분비하여 호산구의 유도과 비만세포의 활성화, B 림프구에서 IgE 생성에 관여함으로써 기관지 천식을 악화시킨다. 그래서 Th2 반응을 하향 조절하여 기도내의 호산구 증가증 및 전신적인 Ig E의 생성을 억제하는 것이 양방에서 치료의 주요 연구 대상이 되고 있다¹¹⁾.

이에 저자는 시호치천탕과 보익정천탕의 알레르기 천식 모델 쥐의 BALF 내에서의 면역관련 기능의 변화에 대한 효능을 알아보기 위해 감작된 흰쥐에 ovalbumin을 흡입시켜 알러지 천식 병태를 유발시켰다. 생쥐에서 난알부민(ovalbumin)을 복강내나 피하로 주사하면 감작(sensitization)이 되어서 2-4주후 난황을 기도내로 흡입하여 유발시켰을때, 조기 및 후기 기관지 수축반응이 일어나고 기도 과민성이 생기며, 기도내 호산구가 침착하고 Th2 cytokine이 기도내 증가하는 등 사람에서 유사한 기관지 천식 모형이 만들어진다¹³⁾.

호산구는 천식이 기도내 염증반응에 의한 기도과민성 질환으로 알려지면서 이러한 염증반응을 일으키는 세포에 관한 연구가 지속적으로 활발히 진행되어, 기도내 염증반응은 주로 호산구에 의해 일어난다는 것이 밝혀짐으로서 호산구는 종래의 유익한 세포에서 세포독성 염증세포로 인식이 완전히 전환되었다^{14,15)}.

모든 천식 환자에서 중증도와 관계없이 기도 점막에 호산구를 포함한 염증반응이 관찰되며, T helper(TH; CD4⁺) 세포의 분획 증가 등이 있다. 호산구의 생성, 성장과 성숙, 그리고 동원을 자극하는 중요한 cytokines으로는 IL-3, IL-5 등이 있으며, 이 중에서 IL-5는 호산구의 발생과 분화 및 생존 증가에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이런 cytokines은 림프구에서 생성되므로 림프구가 사람의 천식에서 복합적인 염증반응의 중요한 역할을 한다¹⁶⁾.

본 실험에서 OVA-asthma 생쥐의 6주후 BALF내에서 대조군은 126개의 호산구를 관찰할 수 있었고, 시호치천탕 투여군에서는 호산구가 6개로 대조군에 비하여 21배 감소되어 확실한 천식 억제 효과를 관찰할 수 있었다. 보익정천탕 투여군은 호산구 수가 95개로 대조군에 비하여 약간 감소하였다. 또한 BALF 내의 총 백혈구세포는 대조군이 7.64x10⁵ 개인데 시호치천탕과 보익정천탕 투여군은 각각 0.62x10⁵ 개와 1.02x10⁵ 개로 감소하여 OVA-asthma 생쥐에서 천식으로 인한 염증 백혈구의 침윤(infiltration)이 현저히 감소하였다.

또한 BALF 내의 IL-5의 농도로서 호산구 세포의 활성도를 간접적으로 살펴본 결과 대조군이 7.9 pg/ml로 증가함에 비해 시호치천탕 투여군은 0 pg/ml로 정상군 처럼 IL-5가 관찰이 되지 않았고, 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 1.76배 감소를 관찰하여, 시호치천탕의 약물 투여로 현저한 IL-5 생산을 억제하여 천식억제 효과가 탁월하다고 생각된다.

T 림프구의 helper T cell인 CD4⁺ T cell에도 서로 다른 Th1과 Th2의 아형이 존재하며 분류기준은 CD4⁺ T cell이 활성화 되었을 때 분비하는 lymphokine에 따라 달라지며 Th1은 주로 IL-2, INF- γ 등의 cytokine을 분비하고 지연형 과민반응을 매개하며 Th2는 IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 등의 cytokine을 분비하여 체액성 면역반응을 유도한다. Th1, Th2 림프구는 상호길항작용을 통해 균형을 유지하며 IL-4는 Th1 세포의 반응을 억제하고 IFN- γ 는 Th2 세포의 반응을 억제한다. 알러지성 천식환자의 폐포세척액 내에서는 Th2 림프구의 기능이 활성화 됨이 관찰된다^{17,18,19}.

또한 IL-4는 B세포 활성화와 isotype switching, 특히 IgE 항체의 발생에 있어서 중요한 역할을 한다. 기능성 IL-4 유전자가 결핍된 생쥐는 IgE를 생산할 수 없다. 면역반응 초기단계에서 IL-4의 출현은 반응의 성질에 중요한 영향을 준다. IL-4는 T세포에 의한 IL-4의 보다 많은 생산을 도와주며, 항체 형성을 증진시키고, 지연형 과민성 반응을 억제하는 IFN- γ 의 생산을 억제한다²⁰.

본 실험에서는 BALF내의 IFN- γ 의 농도는 시호치천탕 투여군은 25.4 pg/ml로 대조군에 비하여 3.02배 증가하였고, 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 1.48배 증가하여, Th2 세포의 반응이 억제되어 일반적으로 알러지성 천식환자에게서 보이는 폐포세척액의 Th2 림프구의 기능활성화가 억제 되었다. 또 BALF내 IL-4 농도는 시호치천탕 투여군은 11.3 pg/ml로 대조군에 비하여 2.26배 감소하였고, 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 1.75배 감소하여, 약물 투여로 Th2 세포가 억제되어 IL-4 생산을 억제하였다.

또한 B 림프구 세포에서 알러지 반응에 대한 생산물인 BALF내의 IgE 분비량은 시호치천탕 투여군은 0 pg/ml로 정상군처럼 IgE가 관찰이 되지 않았고, 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 1.70배 감소를 관찰하였다. 이러한 IgE 생산량의 감소는 IL-4의 생산억제와도 관련이 있다.

폐장 조직을 살펴본 결과도 시호치천탕 투여군은 정상군과 비슷하게 호산구 침윤이 거의 없었고 보익정천탕 투여군은 대조군에 비하여 감소를 관찰하여, 시호치천탕의 약물 투여로 폐장 조직의 보호가 탁월하다고 사료되었다.

결 론

시호치천탕과 보익정천탕의 알러지 천식 및 면역에 대한 효능을 알아보기 위해 ovalbumin으로 알레르기 천식을 유발한 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 조직에 미치는 영향을 살펴본 결과 시호치천탕과 보익정천탕은 BALF내 호산구수와 total leucocytes는 현저한 감소를 보였고, 천식을 유발하는 Th2 계열의 IL-4, IL-5는 감소하였고, 천식을 억제하는 Th1 계열의 INF- γ 는 증가하였다. B세포의 알러지 반응에 대한 생산물인 IgE도 감소하였다. 시호치천탕은 호산구의 폐장 세포로의 침윤 억제도 대조군에 비해 1.73배 나타내어 효과가 현저했으며, 적출 폐장조직의 사진에서도 시호정천탕 투여군은 호산구 침윤을 거의 찾아 볼수가 없었다. 이와 같은 결과로 볼때 시호치천탕과 보익정천탕은 면역기능 조절로 알러지성 천식을 효과적으로 억제하며, 시호치천탕의 효과가 더 우수하였다.

참고문헌

1. 이형구, 정승기: 동의폐계내과학, 서울, 민서출판사, 187-202, 426, 1999.
2. 해리슨내과학편찬위원회편: 해리슨 내과학(I), 서울:정담, 1258-64, 1997.
3. 전국의과대학교수역: 오늘의 진단과 치료. 서울, 한우리. 287-97, 1999.
4. 정승기: 가미청상보하탕이 천식에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 대한한의학회지, 12(1), 118-138, 1991.
5. 정승기: 정천탕이 천식에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1985.
6. 박광은: 千繡도담탕이 천식에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 경희대학교 대학원, 1993.
7. 이준우, 정희재, 정승기, 이형구: 소청룡탕이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포에 미치는 영향, 경희의학, 17(2), 242-48, 2001.
8. 안태호, 황희정, 김대준, 박지현, 최해운, 김종대: 정천화담강기탕이 Ovalbumin으로 유발된 천식에 미치는 영향. 방제학회지, 8(1), 191-211, 2000.
9. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구: 맥문동탕과 정천화담강기탕이 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 한의학회지. 23(1), :37-49, 2002.
10. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구: 가미청금강화탕 및 가미육미지황탕이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향, 대한한의학회지, 24(3), 1-10, 2003.
11. Horner AA, Van Uden JH, Zubeldia JM, Broide D, Raz E: DNA -based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease, Immunological review 179, 102-18, 2001.
12. 전국한의과대학 폐계내과학교실: 동의폐계내과학, 서울, 한출판사, 192-9, 2002.
13. Brusselle GG, Kips JC, Bluethman H, Pauwels R.: Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice, Am J Respir Cell Mol Bol 12, 254-9, 1995.
14. Frigas E, Gleich GJ: The eosinophil and pathology of asthma, J Allergy Clin Immunol 77, 527-37, 1990.
15. Gleich GJ: The eosinophil and asthma, Current understanding 85, 422-35, 1990.
16. Boris L, Rosenwasser LJ: Update on Cytokines. J Allergy Clin Immunol. 97, 719-733, 1996.
17. 이동생, 정희재, 정승기, 이형구: 맥문동과 오미자가 Asthma model내의 Cytokine IL-4,IL-5,IL-6에 미치는 영향, 경희의학, 16(2), 69-80, 2000.
18. Hae Tae-Seok, Jung Hee-Jae, Jung Sung-Ki, Rhe Hyung-Koo: The Effect of Sabaek-San and Glycyrrhizae Radix on IL-4, IL-5 and IL-6 in Asthma Model, Journal of Oriental Medicine, 5(1), 19-20, 2000.

19. 김형민: 면역과 알레르기, 서울, 신일상사, 179-203, 1998.
20. Seder RA, Paul WE: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells, *Annu Rev Immunol.*, 12, 635-73, 1994.