

## rmIL-5로 유도된 호산구의 활성화 및 성장에서 중루의 천식반응 억제효과

신미경<sup>1#</sup>, 노성수<sup>1\*</sup>, 길기정<sup>2</sup>, 이영철<sup>3</sup>, 김진숙<sup>4</sup>, 서영배<sup>1</sup>

1: 대전대학교 한의과대학, 2: 중부대학교 이공대학 한약자원학과,  
3: 상지대학교 한의과대학, 4: 한국한의학연구원 한약제제연구부장

### Inhibitory effects of Paridis Rhizoma in the activation and proliferation of eosinophils: implications on its regulatory roles for asthma

Mi-Kyung Sin<sup>1#</sup>, Seong-Soo Roh<sup>1\*</sup>, Ki-Jeong Kil<sup>2</sup>, Young-Chul Lee<sup>3</sup>  
Jin-Suk Kim<sup>4</sup>, Young-Bae Seo<sup>1</sup>

1: Dept. of Oriental Medicine, 2: Dept. of Oriental medicine resource, college of Science & Engineering, 3: Dept. of Oriental Medicine, Sangji University, 4: Korea Institute of Oriental Medicine, Dept. of herbal research chief

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study was carried out for the purpose of knowing the effect from anti-asthma action of the abstraction from a extract of Paridis Rhizoma(EPR). In order to know what the effect of controlling an abstraction from Paridis Rhizoma. and about the expression of B cells and Ig E cells, mast cells it was necessary for it to be activated by ovalbumin.

**Methods** : In order to know what the effect was on the organization of cytokine gene expression from The increase and divorce of the B cells and allergic acting by EPR, we found it necessary to examine the BALF. At the same time, as we examined the histamine release by ELISA method, we also examined the effect of EPR.

**Results** : EPR at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , the highest concentration examined did not have any cytotoxic effects on mLFCs. In FACS analysis, number of granulocyte/lymphocyte, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> in asthma-induced lung cells were significantly decreased by EPR treatment compared to the control group. In RT-PCR analysis, mRNA expression for CCR3, eotaxin and histamine in asthma-induced lung cells, which was induced by rIL-3 plus rmIL-5 treatments, was significantly decreased by EPR treatment. In ELISA analysis, production levels of IL-4, IL-13 and histamine in asthma-induced lung cells, which were induced by rIL-3 plus rmIL-5 co-treatment, were significantly decreased by EPR treatment. EPR treatments significantly inhibited the proliferation of eosinophils prepared from asthma-induced mouse lung tissues compared to the non-EPR treated control cells. Immunohistochemical analysis revealed that EPR treatment significantly decreased the levels of eosinophil activation compared to non-treated cells.

**Conclusion** : The present data suggested that Paridis Rhizoma may have an effects on the inhibition of parameters associated with asthma responses in eosinophils, and thus implicate the possibility for the clinical application of Paridis Rhizoma.

**Key words** : OVA-induced asthma. EPR (extract of Paridis Rhizoma), eosinophil, lymphokine assay, immunocytochemistry.

\*교신저자: 노성수. 대전대학교 한의과대학 본초학교실. (Tel)042-280-2625. E-mail: ddede@dju.ac.kr

#제1저자: 신미경. 대전대학교 한의과대학 본초학교실. (Tel)042-280-2625. E-mail: icansin@freechal.com

· 접수 : 2005년 3월 10일 · 수정 : 2005년 6월 18일 · 채택 : 2005년 6월 20일

## 서론

산업사회의 발달, 환경공해 특히 대기 오염의 확산, 흡연 인구의 증가로 인한 호흡기 질환은 증가되고 있으며, 이 가운데 기관지 천식은 반복적인 호흡기 감염이나 특정 항원에 대한 노출로 인한 과민반응 즉 알러지 반응으로 인한 발작성의 호기성 호흡곤란, 천명, 폐의 과확기, 기침, 나음(rale)을 특징으로 하는 가역적 기도 폐쇄이다<sup>1)</sup>.

천식의 정의를 양방의학에서는 임상적으로 가변적인 기도폐색의 증상을 보이고, 병태생리학적으로는 기도의 과민성이 존재하며, 병리학적으로는 기도의 염증성 반응을 보이는 질환으로 정의한다<sup>2)</sup>.

한의학에서는 호흡급속하고 천명유성을 특징으로 하는 효천증<sup>3)</sup>과 유사하며, 그 증상에 대하여 왕<sup>4)</sup>은 호흡급속한 것이喘證과 유사하나 입을 벌리고 出氣가 많으며 후중에서 담성이 나는 것이라 하여 구분하였고, 청대의 오<sup>5)</sup>는 호흡이急促한 것을 '喘'이라 하고 그 위에 후중 성향이 있는 것을哮喘證, 哮吼證이라 하였다.

중루는 《神農本草經》<sup>6)</sup>에서 '蚤休'로 기재된 이래, 紫河車<sup>7)</sup>, 重台草, 三層草<sup>8)</sup> 등의 이명으로 불리어져 왔으며, 백합과(Liliaceae)에 속한 사갓나물의 根莖으로 가을에 채취하여, 수근을 제거하고 물로 씻어 색건하는데, 雲南, 四川, 廣西, 陝西, 江西 等地에서 생산된다<sup>9)</sup>.

약리작용으로는 葡萄狀球菌, 溶血性鏈球菌, 腦膜炎雙球菌, 痢疾桿菌, 傷寒桿菌, 副傷寒桿菌, 大腸桿菌, 綠膿桿菌에 대하여 각각의 차이가 있지만 항균작용을 가지고 있으며 특히 앞에서 4개의 균에 대하여 민감하게 반응한다<sup>10)</sup>. 중루의 메탄올 분획 추출물에서 복수암(EAC)에 대한 양호한 억제 작용효과가 있으며<sup>11)</sup>, 항종류 작용이 있다<sup>12)</sup>. 止咳平喘作用이 있으나 祛痰作用은 없으며<sup>13)</sup>, 七葉一枝花는 특징적으로 殺精子作用이 있다<sup>14)</sup>.

성미가 苦微寒하고 肝經血分에 들어가 비교적 강한 清熱解毒 작용이 있어 癰腫을 消腫개하고 止痛시키는 효능이 있어, 創傷腫毒을 치료하는 요약이 되고<sup>9)</sup>, 서양의학에서 급성 扁桃腺炎<sup>15)</sup>, 流行性 耳下腺炎<sup>16)</sup>, 靜脈炎<sup>17)</sup>, 蟲咬皮炎<sup>18)</sup>, 蛇咬傷<sup>19)</sup> 등에 응용되고 있다.

이와 같이 중루는 성질이 차고 清熱解毒 作用이 비교적 강하여 항균작용, 항염작용으로 염증 질환에 빈용되고 있으며, 천식은 기관지 및 기도의 염증을 특징으로 하는 질환으로, 항염증 제제가 치료제로

사용하고 있어 중루의 항염작용이 천식 치료의 유의성이 있을 것으로 생각되며, 이에 중루의 천식반응에 대한 효과를 살펴보기 위해, 천식에 주요하게 작용하고 있는 호산구에 대한 *in vitro* 실험을 시행하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

실험동물은 웅성 4주령의 C57BL/6 생쥐 15수를 한국생명공학연구원에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서 2주일 간 實驗室 環境에 적응시킨 후 實驗에 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

##### ① 시약

실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEPC), 3-4,5-dimethyl-thiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), 2,7-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구용혈액 (RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, lamide, magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>)는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을 사용하였으며, 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을, anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC (fluorescein isothiocyanate), anti-CD8-FITC, anti-CD23-PE, anti-B220-PE, propidium iodide (PI), anti-mouse IL-5R α-chain polyclonal antibody (AF553, R&D system)와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

② 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기 (대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> 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.

3) 약재

실험에 사용된 중루 (Paridis Rhizoma)는 중국 북경약재시장에서 구입한 것을 대전대학교 한의과 대학 본초학교실에서 대한 약전 기준에 부합되는 것만을 정선하여 사용하였다.

4) 중루 추출물 분리

중루 추출물(extract of Paridis Rhizoma) ; EPR)을 분리하기 위해, 중루 200 g에 증류수 2000 ml를 가하여 熱湯 抽出器에서 3 시간 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 완전 건조한 중루를 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

I. *in vitro*

1) Mouse Lung Fibroblast cells (mLFCs) 배양

생쥐의 정상 lung fibroblast세포 (mLFC)는

BALB/c 생쥐의 肺 (lung)조직을 cool D-PBS로 3 회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5 분간 원심분리하고, tube에 DMEM (containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, U.S.A)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 10<sup>4</sup> U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml))를 넣고 37℃ CO<sub>2</sub> 배양기에서 2 시간 동안 배양한다. 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가한 후 30 분간 계속 배양한다. 배양 후 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2 회 1500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1 주일 동안 배양한다. 1 주일 후 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 mLFC세포를 분리하여 DMEM-5 % FBS 배양액에 10<sup>5</sup>cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주한다.

2) 세포독성 (cytotoxicity) 측정

세포독성방법은 SRB assay법을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs 세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培養기에서 1 시간 배양한 후 중루 추출물 (최종 농도 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)을 48 시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)로 2 회 세척한다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50 µl를 가하고 1 시간 동안 4℃에 방치한다. 증류수로 5 회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조한다. SRB (0.4 %/1 % acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온 (room temperature)에서 30 분간 염색한다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5 회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5 분간 shaking하고 ELISA READER (molecular devices, U.S.A)에서 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

3) 천식모델 생쥐의 폐에서 호산구세포 분리

C57BL/5 생쥐에 500 µg/ml의 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma)를 0.2 ml (100 µg)을 복강내로 주사하여 전신감작을 시킨

후 2 주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민 (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 100 $\mu\text{l}$ 를 기도투여한다. 3 주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30 분씩 일주일에 3 회씩 6 주 동안 비강 및 기도내로 흡입시킨다. 천식이 유발된 생쥐의 폐를 적출하여 폐조직을 잘게 절편 한 후 2 % 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 collagenase IV를 가한 용액 15 ml로 37°C, shaking 배양기에서 30 분 동안 5 회 이상 조직을 분해 (digestion) 하여 폐세포를 분리한다. 분리된 폐세포는 배지로 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거한다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37°C에서 5 분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04 % trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정한다.

#### 4) 폐세포 배양

24 well plate에 폐세포 ( $2 \times 10^6$  cells)를 배양하고 중류추출물 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 처리하고 1 시간 후 rIL-3 (30 U/ml)나 rmIL-5 (recombinant mouse interleukin-5, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PharMingen)로 호산구 활성화 유발을 위하여 각각의 well에 첨가하여 48 시간 배양하였다.

#### 5) 유세포 형광분석

배양 후 호산구 세포를 인산완충생리식염수 (3 % 우태아혈청, 0.1 %  $\text{NaN}_3$ )로 2 회 수세하였고, 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-mouse IgE, anti-CD3e-FITC, anti-CCR3-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-B220-PE 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD23등을 넣고 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기 (flow cytometer, Becton Dickinson, U.S.A)로 생쥐 폐세포에서 CD3e, CD4, CD8, CCR3, B220, CD23 (Fc $\epsilon$ ) 의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 CD3e/CCR3, CD23/B220, 그리고 CD4/CD8의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

#### 6) 기관지천식생쥐의 폐조직의 역전사-중합효소 연쇄반응

##### (1) RNA 추출

배양한 호산구세포에 RNAzol<sup>B</sup> 500  $\mu\text{l}$ 를 넣고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 放置한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200  $\mu\text{l}$ 의 상층액을 회수하여 2-propanol 200  $\mu\text{l}$ 와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3 분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20  $\mu\text{l}$ 의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다.

##### (2) 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3  $\mu\text{g}$ 을 75°C에서 5 분 동안 변성시키고, 이에 2.5  $\mu\text{l}$  10 mM dNTPs mix, 1  $\mu\text{l}$  random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25  $\mu\text{l}$ ), RNA inhibitor로서 1  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  100 mM DTT, 4.5  $\mu\text{l}$  5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ )를 가한 후, 1  $\mu\text{l}$ 의 M-MLV RT (200 U/ $\mu\text{l}$ )를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이 20  $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심 침강하여 37°C 항온 수조에서 60 분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5 분 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  $\mu\text{l}$ 의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는  $\beta$ -actin, IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),

cyclooxygenase-2, 그리고 NOS-II 유전자를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/ $\mu$ l)와 antisense primer (20 pmole/ $\mu$ l)를 혼합하여 1  $\mu$ l 가하고, 다시 3  $\mu$ l 2.5 mM dNTPs, 3  $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18  $\mu$ l Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30  $\mu$ l 되도록 멸균 증류수를 가하고 pre-denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5 분, denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5 분, annealing; 55 $^{\circ}$ C, 1 분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1 분을 25 cycles한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3 분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20  $\mu$ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120 V 조건에서 20 분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

## 7) ELISA analysis

생쥐 호산구 세포를 분리하여 96 well plate의 각 well에  $2 \times 10^5$  세포씩 분주하고, 중추 추출물(100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml)등을 처리였고, 약물처리 1 시간 후 rIL-3 (30 U/ml)나 rmIL-5 (recombinant mouse interleukin-5, 10  $\mu$ g/ml, PharMingen)를 48 시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5 분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 IL-4, histamine enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A) )와 IL-13는 ELISA kit (R&D system)을 48시간 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체 (antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. 각 well을 3 회 washing 완충용액으로 세척한 후 호산구 세포 배양상층액 (culture supernatant)을 100  $\mu$ l씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2 회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100  $\mu$ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100  $\mu$ l씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50  $\mu$ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA READER 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 8) 생쥐 호산구 세포 증식

생쥐 호산구세포의 증식을 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에  $2 \times 10^5$  세포씩 분주하고, 중추 추출물(100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml)등을 처리였다. 약물처리 1 시간 후 rIL-3 (30 U/ml)나

rmIL-5를 72 시간 동안 동시 배양하였다. 동시배양 40 시간 배양 후 50  $\mu$ Ci/ml의 [methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine (Amersham, U.S.A)을 첨가한 후 최종 48시간 배양하였다. 세포내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 세포만을 세포수집기 (Cell Harvester, U.S.A)를 사용하여 유리섬유여지 (Glass microfiber filter, Whatman)위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

## 9) IL-5R $\alpha$ -chain의 immunocytochemistry

생쥐 호산구 세포를 분리하여 24 well plate의 각 well에  $2 \times 10^5$  세포씩 분주하고, 중추 추출물(100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml)등을 처리였고, 약물처리 1 시간 후 rIL-3 (30 U/ml)나 rmIL-5를 24 시간 동안 동시 배양하였다. 배양 종료 후 호산구 세포를 인산 완충생리식염수 (3 % 우태아혈청, 0.1 % NaN<sub>3</sub>)로 2 회 수세하였고, 4 $^{\circ}$ C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-mouse IL-5R  $\alpha$ -chain polyclonal antibody (AF553, R&D system)을 넣고 얼음에서 30 분간 반응시켰다. 1700 rpm에서 5 분간 수세한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-goat IgG등을 넣고 다시 30 분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3 회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 cytospin (한일과학)에서 1000 rpm에서 5 분간 원심분리한 후 slide를 건조하였다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 형광염색특징 등으로 면역세포의 type을 결정한다. 형광광학현미경(Nikon, japan) 400 $\times$ 에서 관찰하여 IL-5R positive한 활성화 호산구를 측정하였다.

## 10) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean $\pm$ standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

# 결 과

## 1. 세포 독성(cytotoxicity) 측정

Lung fibroblasts cells에 대한 세포 독성 실험에

서 대조군의 세포 생존율은 100±5.3 %로 나타났고, EPR을 처리한 실험군에서는 1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서 각각 98±6.2 %, 94±5.5 %, 92±4.0 %, 87±6.3 %로 나타나 fibroblast cells에 대한 세포독성은 나타나지 않았다(Table 1).

Table 1. cytotoxicity effects of EPR on mouse lung fibroblast cells(mLFCs).

Drugs	Dose (µg/ml)	Percent of control data (%)	
		mLFCs	
Control	0	100 ± 5.3	
	1	98 ± 6.2	
Paridis Rhizoma (EPR)	10	94 ± 5.5	
	50	92 ± 4.0	
	100	87 ± 6.3	
	200	83 ± 4.6 *	
	400	75 ± 6.8 **	

Mouse lung fibroblast cells (mLFCs) were pretreated with various concentrations extracts of Paridis rhizoma (EPR). The results are expressed the mean ± S.E (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 95% and 99% or higher(\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

2. 유세포 형광분석(FACS analysis)

정상군에 비해 rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군의 granulocytes, CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수가 증가되었고, rIL-3/rmIL-5와 EPR을 함께 처리한 실험군의 granulocytes, CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수가 감소되었다(Fig. 1).

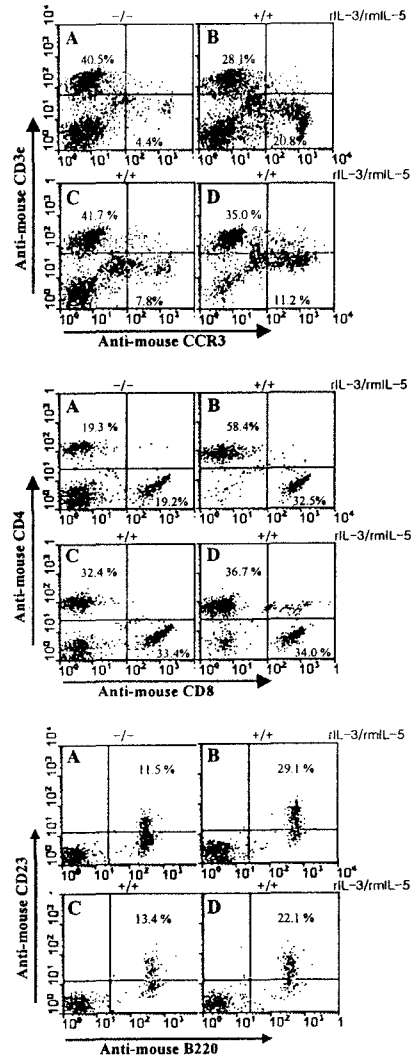
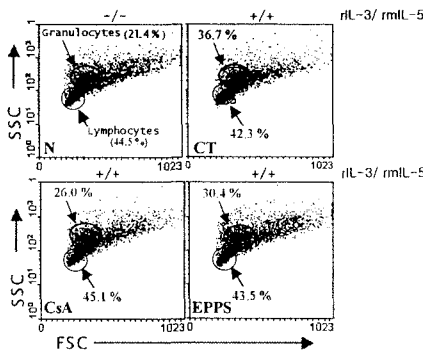


Fig. 1. Inhibitory effect of EPR on granulocytes, CD3e<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> lymphocytes population (%) in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5. C57BL/6 mouse were exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lungs were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1 µg/ml). Eosinophils were activated by rIL-3/rmIL-5 co-treatment. The lung cells were treated with extract of Paridis rhizoma (EPR), incubated for 48 hr at 37°C, and analyzed by flow cytometer. A : Normal C57BL/6 mice. B : OVA-induced asthma lung cells. C : Cyclosporin A (10 µg/ml) D : OVA inhalation and EPR (100 µg/ml)

### 3. RT-PCR 분석

IL-13, CCR3, eotaxin의 그룹별 HT값을 측정한 결과, rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군에서의 HT값이 증가되었으며, rIL-3/rmIL-5와 EPR 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml을 각각 함께 처리한 실험군의 HT값은 감소되었다(Fig. 2).

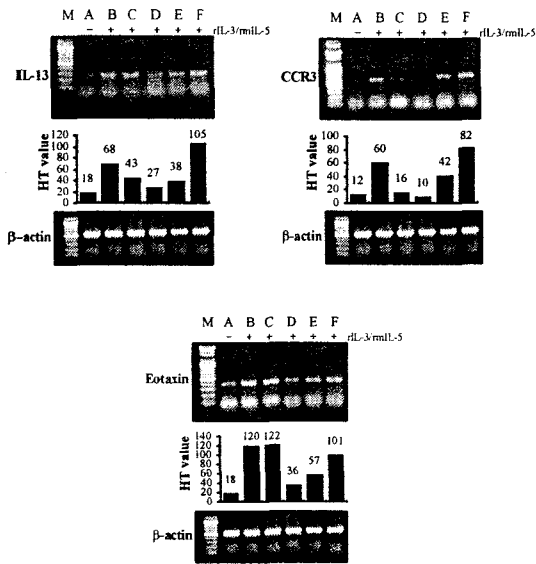
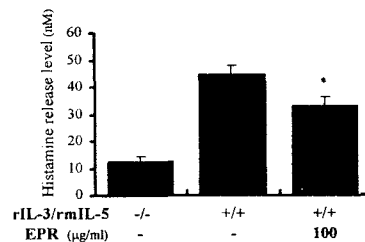
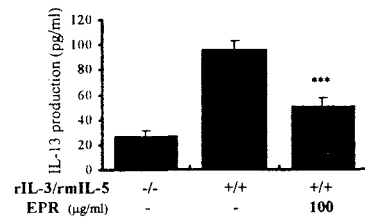
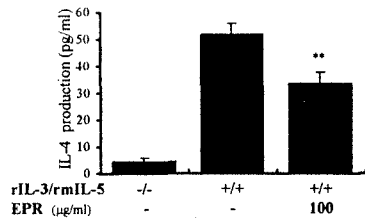


Fig. 2. Effect of EPR on IL-13, CCR3 and eotaxin mRNA gene expression in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5. C57BL/6 mice were exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lungs were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1 µg/ml). Eosinophils were activated by rIL-3/rmIL-5 co-treatment. The lung cells were treated with extract of *Paridis rhizoma* (EPR), incubated for 6 hr at 37°C, and analyzed by RT-PCR.

- A : Normal C57BL/6 mice.
  - B : rIL-3/rmIL-5 + OVA-induced asthma lung cells (Control).
  - C : rIL-3/rmIL-5 + Cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml).
  - D : rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and EPR (100 µg/ml).
  - E : rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and EPR (10 µg/ml).
  - F : rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and EPR (1 µg/ml).
- Internal loading control : β-actin and DNA 100 bp marker (M).

### 4. ELISA analysis

IL-4, IL-13, histamine 발현량을 살펴본 결과, 정상군에 비해 rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군에서 발현량이 증가되었고, rIL-3/rmIL-5와 EPR를 100 µg/ml 농도로 함께 처리한 실험군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3).



### 5. Eosinophil proliferation assay

rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군에서 eosinophil proliferation은 18847±1527인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4676±972으로 감소되었다. rIL-3/rmIL-5와 EPR를 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 농도로 함께 처리한 실험군에서의 eosinophil proliferation은 7389±183, 8205±1722, 9468±1356으로 나타나 호산구 증식이 유의성 있게 억제되었다 (Table 2).

Table 2. Effect of EPR on the eosinophil proliferation from murine OVA-induced asthma mouse lung eosinophil cells.

Group	Drug ( $\mu\text{g/ml}$ )	rmIL-5 + rIL-3	Eosinophil proliferation (cpm)
Eosinophil cells	-	-	968 $\pm$ 91
Control	-	+	18847 $\pm$ 1527
Cyclosporin A (CsA)	10	+	4676 $\pm$ 972 ***
(EPR)	100	+	7389 $\pm$ 183 ***
	10	+	8205 $\pm$ 1722 ***
	1	+	9468 $\pm$ 1356 ***

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA three times a week for 6 weeks for asthma induction. Lung eosinophil cells were isolated OVA-induced asthma mouse lung tissue. The experimental groups were treated with different concentrations of extract of *Paridis rhizoma* (EPR) for at 72 hrs and CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ). At the end of the experiment, eosinophil proliferation was measured by  $^3\text{H}$ -up-date and  $\beta$ -counter. The results are expressed the mean  $\pm$  S.E.M. (N=6). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's paired test, and differences were considered significant when the degree of confidence in significance was 99.9% or higher (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

## 6. IL-5R $\alpha$ -chain의 Immunocytochemistry

rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군(B)에서 호산구의 활성화도가 높을 것을 볼 수 있으며, rIL-3/rmIL-5와 EPR를 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 함께 처리한 실험군(D)에서 호산구의 활성이 저하되었음을 볼 수 있다(Fig. 4).

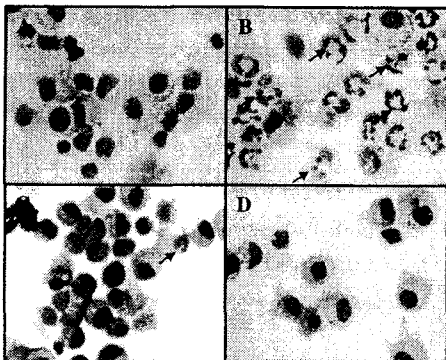


Fig. 4. Effect of EPR on immunohistological eosinophils in asthma-induced lung cells treated with rIL-3 plus rmIL-5.

C57BL/6 mice were exposed to OVA three times a week for 6 weeks. The mouse lungs were dissected out, chopped and dissociated with collagenase (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Eosinophils were activated by rIL-3/rmIL-5 co-treatment. The lung cells were treated with extract of *Paridis rhizoma* (EPR), and incubated for 72 hr at 37°C, and analyzed by immunohistology.

A : Normal C57BL/6 mice.

B : rIL-3/rmIL-5 + OVA-induced asthma lung cells (Control).

C : rIL-3/rmIL-5 + Cyclosporin A (CsA, 10  $\mu\text{g/ml}$ ).

D : rIL-3/rmIL-5 + OVA inhalation and EPR (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

## 고찰

천식의 병리학적 소견<sup>20)</sup>은 첫째로 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민반응이 있어야 한다. 둘째로 광범위한 기도 폐색의 증상이 나타나면서 이 기도 폐색은 치료에 의해, 혹은 자연히 소실되는 특징이 있다. 이것을 가역적인 기도폐색이라고 한다. 셋째로 첫째와 둘째의 조건을 충족시키면서, 기도의 염증성 반응을 보이는 질환을 천식이라고 한다.

1986년 Mosmann<sup>21)</sup> 등은 설치류의 T-림프구 클론에서 IL-2와 IFN- $\gamma$ 를 생성하는 Th1 세포와 IL-5, IL-6 및 IL-10 등을 생성하는 Th2 세포가 존재함을 보고하였다.

Th 2 세포는 eotaxin, RANTES, MIP-1a와 MCP-3과 같은  $\beta$ -chemokine들을 생성하여, 호산구를 기도 내로 주유하며, IL-5, IL-3 및 GM-CSF를 분비하여 호산구의 분화, 성숙, 활성화 및 생존을 증가에 관계한다. 기도의 침윤된 호산구 내에서는 MBP, ECP, eosinophil-derived neurotoxin 등이 분비되어 기도 손상을 유발한다<sup>22)</sup>.

중루 추출물을 lung fibroblast cells에 분주하고 배양한 후, 세포독성을 측정된 결과 농도 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 87%이상의 세포 생존율을 보였다. 이는 중루가 세포독성을 나타내지 않음을 나타낸다(Table 1).

FACS 분석을 통한 granulocytes 분포양상을 보면, 정상군에 비해 rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군은 유의성 있게 증가되었다. 이에 비해 EPR를 부여



한 실험군은 유의성있게 granulocytes의 숫자가 감소되었다. 이는 중추가 기관지 및 기도에서 발생하는 만성염증 유발시키는 세포의 활동을 억제하는 작용이 있음을 나타낸다(Fig. 1).

CD3분자는 T 림프구 항원수용체에 항원이 결합된 신호를 세포안으로 전달하는 기능을 맡아보고 있는데 이 CD3는 Th1 세포와 Th2 세포 모두에 존재한다<sup>23)</sup>.

CCR3는 케모카인과 반응하는 세포표면표식인자(수용체)로서 호산구, 호염기구, Th2 세포의 세포 표식인자이다<sup>24)</sup>. 뿐만 아니라 CCR3는 호산구에서 가장 높게 발현이 되고, 호염기구, Th2 세포, 천식 환자의 기도 상피 세포에서 보이며, 호산구의 활성화와 탈과립화에 관여하는 것으로 보여진다<sup>25)</sup>. 천식 유발 생쥐의 기관지 폐포 세척액에서 FACS 분석 결과 CD3<sup>-</sup>/CCR3<sup>+</sup>는 대조군에서 20.8%이었으나 EPR 투여군에서는 11.2%로 유의성 있게 감소된 것을 볼 수가 있다(Fig. 1). 이는 과민성 알러지 반응에 주요하게 관여하는 Th2 세포의 분포양상이 EPR 투여군에서 유의성있게 감소되었음을 의미한다.

과민성 알러지 피부염 환자의 생검에서 호산구와 CD4<sup>+</sup> T 세포의 침윤이 특징적이고 이들 T 세포에서 Th2 세포 유형의 싸이토카인이 분비된다고 하며 천식에서는 BALF에는 CD3<sup>+</sup> 세포, CD4<sup>+</sup> 세포, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>의 비율이 증가한다<sup>26)</sup>.

CD4<sup>+</sup> T 세포는 여러 종류의 싸이토카인을 생산하여 B 세포가 효율적으로 항체를 생산하도록 도와주고 면역반응의 행동세포를 활성화시키는 역할을 하므로 CD4<sup>+</sup> T 세포의 비율은 일반적으로 면역력의 지표로도 광범위하게 응용되고 있다<sup>27)</sup>.

FACS 분석에서 CD4<sup>+</sup>는 대조군에서 58.4%로 현저하게 증가되었고, EPR 투여군에서는 36.7%로 유의성있게 감소되어 알러지 반응을 촉진시키는 CD4의 감소를 보였다(Fig. 1).

CD23은 성숙된 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 수지상 세포등에서 발현되며, Ig E에 대해 낮은 친화력을 가지고 있고, Ig E 합성을 조절하며, CD19, CD21, CD81에 대한 co-receptor를 위한 리간드이다<sup>28)</sup>.

B220는 사람에게 존재하지 않으나, 생쥐의 B 세포의 표지분자<sup>29)</sup>이고 아토피질환의 발생에서 중요한 역할을 하는 IgE 항체는 B 림프구에 의해 생성된다<sup>30)</sup>. CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수의 변화가 정상군에 비해 대조군에서 29.1%로 현저하게 증가되었으나, EPR을 처리한 실험군에서의 세포수는 22.1%로 유의성

있게 감소되었다(Fig. 1). 이는 알러지 반응에 주요하게 작용하는 B 세포의 활성화가 억제되었음을 의미한다.

RT-PCR 분석을 살펴보면, IL-13은 Th2에서 분비되는 사이토카인으로 Th1 세포를 억제하며, IgE의 생성을 유도하여 알레르기 염증 반응의 병인에 관여한다고 하였다<sup>30)</sup>.

RT-PCR 분석에서, IL-13의 HT값을 비교 분석한 결과 대조군에 비해 EPR 투여군에서 HT값이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2). 이는 EPR이 기관지 천식 염증에 관여하는 호산구, 대식세포, Th 2 세포의 발현양상이 감소됨을 의미하여 면역세포의 증식과 천식 억제 작용이 있음을 나타낸다.

CCR3의 RT-PCR 분석은 각각 EPR 추출 농도별로 HT 값이 감소함을 볼 수가 있다(Fig. 2). 이는 호산구, Th 2 세포의 활성화가 억제되었음을 알 수가 있다.

Eotaxin의 RT-PCR 분석은 각각 EPR 추출 농도별로 HT 값이 감소함을 볼 수가 있다(Fig. 2). 이는 호산구의 활성화가 감소됨을 볼 수가 있는데, eotaxin은 CCR3를 수용체로 하며 호산구를 target cell로 하는 케모카인이기 때문이다.

ELISA 분석을 살펴보면, BALF 내 IL-4, IL-13가 rIL-3, rmIL-5를 처리한 대조군에서는 증가되는 것이 관찰되었고, EPR을 투여한 실험군에서는 모두 유의성있게 감소되었다(Fig. 3). 이는 EPR가 알러지 반응을 억제한다고 볼 수가 있다.

Histamine은 표적세포의 수용체에 결합함으로써 효과를 미치는데, 내피세포가 혈관 평활근세포 이완제인 프로스타사이클린(prostacyclin, PGI<sub>2</sub>)을 합성하게 하여 이들이 혈관 확장을 일으킨다<sup>28)</sup>. 히스타민의 이러한 작용에 의해 즉시형 과민반응의 구진과 발적 확장이 일어나게 된다. 히스타민 생성에 미치는 영향을 살펴보면 본 실험에서 대조군에 비하여 EPR가 처리된 경우 히스타민 생성량이 감소되었다(Fig. 3) 이 결과는 EPR가 알러지 반응에 주된 인자로 알려진 히스타민의 생성 억제에 유의한 작용이 있음을 보여준다.

호산구 증식 억제 실험을 분석해 보면, 대조군의 eosinophil proliferation은 18847±1527인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은 4676±972이로 감소되었다. EPR를 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 농도로 각각 처리한 실험군에서의 eosinophil proliferation은 7709±549, 16839±1403, 16385±1723으로 나타났다(Table 2). 이는 EPR가 호산구 증식에 유의성 있게

억제 작용을 하고 있음을 알 수가 있다.

IL-5R  $\alpha$ -chain의 Immunocytochemistry에서 rIL-3/rmIL-5와 EPR를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 함께 처리한 실험군의 호산구의 활성이 저하되었음을 볼 수 있다(Fig. 4).

## 결론

생쥐에 OVA를 spray하여 천식을 유발시킨 뒤, 세포를 분리 배양하여 실험을 진행하고 성적을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. Lung fibroblasts cells에 대한 세포 독성 실험에서 대조군의 세포 생존율은  $100 \pm 5.3\%$ 로 나타났고, EPR을 처리한 실험군에서는 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $98 \pm 6.2\%$ ,  $94 \pm 5.5\%$ ,  $92 \pm 4.0\%$ ,  $87 \pm 6.3\%$ 로 나타나 fibroblast cells에 대한 세포독성은 나타나지 않았다.
2. FACS 분석 결과, 정상군에서의 granulocytes, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수에 비해, rmIL-5/rIL-3을 처리한 대조군에서 granulocytes, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수가 증가되었다. 반면에 rmIL-5/rIL-3와 EPR을 함께 처리한 실험군의 granulocytes, CD3e<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup> 세포수가 감소되었다.
3. RT-PCR 분석결과, rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군에서의 IL-13, CCR3, eotaxin 유전자 발현량이 정상군에 비해 증가되었으며, rIL-3/rmIL-5와 EPR을 함께 처리한 실험군의 IL-13, CCR3, eotaxin 유전자 발현량은 감소되었다.
4. ELISA 분석에서, IL-4, IL-13, histamine 발현량이 정상군에 비해, 정상군에 비해 대조군에서 되었고, EPR을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 함께 처리한 실험군에서 증가되었다.
5. 대조군에서 eosinophil proliferation은  $18847 \pm 1527$  인 반면, 양성 대조군인 CsA 처리군은  $4676 \pm 972$  으로 감소되었다. EPR을 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 실험군에서의 eosinophil proliferation은  $7389 \pm 183$ ,  $8205 \pm 1722$ ,  $9468 \pm 1356$  으로 나타나 현저하게 억제되었다.
6. IL-5R  $\alpha$ -chain의 Immunocytochemistry에서 rIL-3/rmIL-5를 처리한 대조군(B)에서 호산구의 활성도가 높을 것을 볼 수 있으며, rIL-3/rmIL-5와 EPR를 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 함께 처리한 실험군(D)에서 호산구의 활성이 저하되었다.

이상의 결과로 보아 중루가 호산구의 분화, 성숙, 활성화에 억제 작용을 가지고 있으며, 이러한 작용으로 천식에 유효한 효과가 있을 것으로 생각되며 임상 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 서울:아트동방. 1999:105-12.
2. 韓容錫. 臨床呼吸器學. 서울:일조각. 1994:208-9.
3. 許浚著, 東醫寶鑑國譯委員會譯. 東醫寶鑑. 서울:法人文化社. 1999:1247-64.
4. 王肯堂. 六科準繩. 서울:柳林社. 1975:143.
5. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울:大星文化社. 1991:390-1.
6. 孫星衍 輯. 神農本草經. 太原:山西科學技術出版社. 1991:60.
7. 蘇頌 撰·尙志鈞 輯校. 本草圖經. 合肥市:安徽科學技術出版社. 1994:160-1.
8. 李時珍. 本草綱目精華本. 北京:人民衛生科學出版社. 1998:64-6.
9. 全國韓醫科大學共同教材編纂委員會 編著. 本草學. 서울:永林社. 2004:268.
10. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典, 第1版. 上海:上海科學技術出版社. 1977:1748.
11. Matsuda H, Pongpiriyadacha Y, Morikawa T, Kishi A, Kataoka S, Yoshikawa M. Protective effects of steroid saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* on ethanol or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats; Bioorg Med Chem Lett. 2003 Mar 24;13(6):1101-6.
12. 石小楓 等. 中藥材. 北京:人民衛生科學出版社. 1981:33.
13. 郭曉壓 等. 有毒中藥大辭典. 天津:天津科技翻譯出版公司. 1992:415.
14. 曹霖 等. 中藥藥. 北京:人民衛生科學出版社. 1988:451.
15. 楊克劍 等. 中藥材. 北京:人民衛生科學出版社. 1993:11:40.

16. 中華本草編委會. 中華本草8卷. 上海:上海科學技術出版社. 1999:130.
17. 李軍. 新中醫. 2판. 北京:化學工業出版社. 1987:17.
18. 遵義醫學院附屬醫院 選. 新醫藥學資料. 11판. 北京:人民衛生科學出版社. 1971:15.
19. 黃農. 廣西醫學. 北京:人民衛生科學出版社. 1990:191.
20. 전국외과대학교수역. 오늘의 진단 및 치료. 서울:한우리. 1999:287-95.
21. Mosmann TR., Cherwinski H., Bond MW., Gieldin MA., Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones., *J Immunol* 136: 1986:2348-57.
22. 대한 喘息 및 알레르기학회, 喘息과 알레르기 질환. 서울:군자 출판사. 2002:31-44, 59-67, 237-326.
23. 박수영, 조영주. 내인성 喘息 및 외인성 喘息환자의 CD8양성 細胞에서 interleukin4 및 interferon gamma 생산. 喘息 및 알레르기. 2001;21(1):66-7.
24. Kasakura S. A role for T helper type 1 and type 2 cytokine in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori, Symp.* 1998: 46(9): 915-21.
25. Corrigan CJ., Hartnell A., Kay AB., T-lymphocyte activation in acute severe asthma, *Lancet*:1988:1129-32.
26. 김세종. 면역학. 서울:고려의학. 1994:3, 8, 25-6, 28, 31-2.
27. Nicolas W. Lukacs. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma, *Nature review*, 2001:1: 108-16.
28. Charles A. Janeway 著, 김태규외 10인 譯. 면역생물학. 제5판. 서울:라이프사이언스. 2002:698, 703, 714.
29. Bousquet J et. al. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* 1990:323:1033-9.
30. Mehlhop PD., Van De Pijn M., Goldberg AB., Brewer JP., Kurup VP., Martin TR., Oett gen HC., Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of Ig E in a mouse model of asthma, *Immunology.* 1997:1344-9.