

皂角刺가 천식모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향

송상진, 박양춘

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Effect of *Gleditsiae Spina* extract on immune cells and cytokines in OVA-induced asthmatic mice

Sang-Jin Song, Yang-Chun Park

Division of Respiratory System, Dep. of Internal Medicine College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

Objective : The purpose of this research is to examine the effects of *Gleditsiae Spina* (GS) extract on immune cells and cytokines in ovalbumin (OVA)-induced asthmatic mice.

Methods : In vivo, C57BL/6 mice were sensitized and handicapped by OVA for 12 weeks. During this experiment, the one group was then treated with GS extract for the later 8 weeks (3 times per week) and analyzed by ELISA, flow cytometer and RT-PCR.

Results : In vivo, there were significant decreases in eosinophils, IL-4, IL-5, IL-13, IgE in BALF (bronchoalveolar lavage fluid). However, IFN- γ in BALF of GS group increased significantly, compared with that of control group. Additionally, the population of CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺ cells in the GS group decreased.

Conclusion : The results of this study support a role for GS as an effective treatment for asthma in its experimental success in significantly decreasing inflammation and asthma reactions, and in increasing INF- γ , which helps prevent such reactions.

Key Words: *Gleditsiae Spina*, asthma, cytokine

1. 緒 論

기관지천식(이하 천식)은 임상적으로 가역적인 기도폐쇄 증상을 보이면서, 병태생리학적으로 기도 과민반응을 나타내고, 조직병리학적으로는 기도의 염증소견이 관찰되는 염증성 기도질환으로 정의하고 있다¹. 특히 병리학적으로는 항원, 비만세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 약

리작용에 의하거나, 화학매체, 사이토카인 및 유착 분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의하여 발생하는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 이해되고 있다². 따라서 천식발병에 관여하는 호산구를 비롯한 면역세포, 관련 사이토카인, 화학매체에 대한 한약물의 효능을 연구하는 것은 천식 치료에 있어 중요한 목표가 될 수 있다.

천식은 韓醫學에서 哮喘證의 범주에 속하는 질환으로 實證은 크게 外感風寒, 痰濕內盛으로 나누어 宣肺定喘, 化痰定喘하는 치법을 사용하고, 虛證은 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛로 나누어 養肺定喘, 補益心腎 納氣定喘, 瀉肺化痰 補益腎元하는 치법을 사용한다³.

· 접수 : 2005. 2. 5 · 채택 : 2005. 2. 21
· 교신저자 : 박양춘, 충북 청주시 상당구 용담동 173-9
대전대학교 청주한방병원 내과
(Tel. 043-229-3704 Fax. 043-253-8757
E-Mail : omdpyc@dju.ac.kr)

최근 천식과 관련하여 다양한 單味 및 處方을 이용한 염증반응이나 면역기능에 관한 실험이 이루어지고 있고^{4,5}, 동물 천식 모델을 이용한 연구^{6,7}와 천식환자를 대상으로 임상연구^{8,9}도 활발하게 이루어지고 있으나 皂角刺에 대한 연구는 없었다.

皂角刺(*Gleditsiae Spina*)는 性은 溫無毒하고 味는 辛하며 消腫排膿, 祛風殺蟲하여 癰疽初起, 膿成不潰, 疥癬麻風을 치료하는 효능이 있다.¹⁰ 皂角刺에 대한 기존 연구로는 이¹¹ 등의 항돌연변이 및 항산화 활성에 관한 연구, 한,¹² 강¹³ 등, 박¹⁴ 등의 항암작용에 대한 연구, 박¹⁵ 등의 항염증 작용에 대한 연구, 김¹⁶ 등의 독성에 대한 연구, 신¹⁷ 등의 비만세포 매개 아나필락시스 억제효과에 대한 연구 등이 있었으나, 천식 모델을 대상으로 관련 면역세포 및 사이토카인에 대한 영향을 관찰한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 皂角刺가 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향을 규명하고자 *in vivo* 실험으로 기관지 폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid; 이하 BALF)내의 호산구, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , IgE의 분비, 폐세포의 CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺의 비율을 측정된 결과 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

동물은 체중 18~25g의 C57BL/6(한국화학연구소) 생쥐를 사료와 물을 충분히 공급하고, 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약제

皂角刺(*Gleditsiae Spina*)는 대전대학교부속한방병원에서 구입 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 기관지 천식 생쥐 모델¹⁸

500 μ g/ml의 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin;

Grade IV)과 10%(w/v) aluminum potassium sulfate (Alum)를 PBS로 용해한 후 혼합하여 얻은 혼합물에 10N NaOH를 첨가하여 pH가 6.5가 되게 조정하고, 상온에서 1시간 동안 방치한 후 750 \times g에서 5분 동안 원심분리하였다. 분리한 OVA/Alum 침전물(pellet)에 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 μ g OVA를 0.2ml로 조정하여 복강내로 주사하여 전신감작을 시켰다. 이후 4주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민(500 μ g/ml) 100 μ l를 기관지로 직접 투여(I.T. : intra trachea)하였다. 5~12주간 분무기를 이용하여 2.5mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다.

2) 皂角刺 추출물 경구 투여

OVA/Alum로 전신감작 시킨 후 5주째부터 皂角刺 추출물(3.6mg/20g)을 일주일에 3회 경구로 투여하였다. 대조군은 동량의 증류수를 경구로 8주간 투여하였다.

3) 기관지폐포세척액(BALF)으로부터 세포의 분리

12주 후 기관지천식 생쥐의 눈에서 혈액을 분리하였고, 목부분을 해부하여 주사기를 기관(trachea)에 삽입시키고 끈으로 묶어 고정된 다음 10% FBS/DMEM 배양액 1ml을 3회 순환시켜 기관지폐포세척액을 얻었다. 기관지폐포세척액에 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다.

4) 호산구 분리 및 측정

BALF로부터 세포를 분리하여 cytopsin(한일과학)에서 1,000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 slide를 건조하였다. 건조된 슬라이드는 Diff-Quick 용액(Baxter Healthcare, U.S.A.)을 이용하여 염색하였다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 염색 특징 등으로 면역세포의 type을 결정하였으며, 광학현미경(Nikon, Japan) \times 400에서 관찰하여 infiltration된 호산구 수를 측정하였다.

5) ELISA analysis

생쥐에서 분리한 폐포세척액과 혈청에서 IL-4,

IL-5, IL-13, IFN- γ , IgE의 양을 측정하기 위하여 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)를 실시하였다.

6) 형광 유세포 분석

폐와 폐포세척액으로부터 분리한 세포로부터 여러 가지 세포 표면 분자들에 대한 항체를 이용한 염색을 하기 위하여 $2 \sim 5 \times 10^5$ 세포로 조정하여 염색 완충용액(1% 우 태아 혈청, 0.01% NaN₃가 포함된 인산염 완충용액, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 이후 FITC(fluorescein isothiocyanate) 또는 PE(phycoerythrin) 형광 물질이 결합된 CD3, CD4, CD8, CD69, CCR3, B220, CD11b, Gr-1 등의 항체를 시료에 가하여 4°C에서 40분간 반응시키고, 염색 완충 용액으로 2회 세척한 후 세포 표면 분자들의 발현을 유세포 형광분석기(FACS, Becton Dickinson, U.S.A.)로 분석하였다.

7) 통계처리

실험 결과의 통계처리는 unpaired Student's t-test를 사용하였고, $p < 0.05$, $p < 0.01$ 또는 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 成 績

1. 기관지폐포세척액(BALF)내 호산구수에 미치는 영향
BALF내 호산구수를 측정한 결과를 보면, 정상군은 1.0 ± 0.58 개, 대조군은 127.7 ± 26.8 개, 실험군은 31.0 ± 11.7 개로 나타나 대조군에 비하여 유의성($P < 0.001$)있게 감소하였다(Fig. 1).

2. 기관지폐포세척액(BALF)내 사이토카인 분비에 미치는 영향

1) IL-4 분비에 미치는 영향

IL-4 분비를 측정한 결과, 정상군은 4.7 ± 0.6 (pg/ml), 대조군은 27.9 ± 2.1 (pg/ml), 실험군은 15.7 ± 2.7 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성($p < 0.01$)있게 감소하였다(Fig. 2).

2) IL-5 분비에 미치는 영향

IL-5 분비를 측정한 결과, 정상군은 0.0 ± 0.0 (pg/

ml), 대조군은 8.7 ± 1.1 (pg/ml), 실험군은 5.6 ± 2.1 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였다(Fig. 3).

3) IL-13 분비에 미치는 효과

IL-13 분비를 측정한 결과, 정상군은 4.3 ± 0.9 (pg/ml), 대조군은 76.4 ± 1.3 (pg/ml), 실험군은 43.6 ± 4.8 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였다(Fig. 4).

4) IgE 분비에 미치는 효과

혈청내의 IgE 분비를 측정한 결과, 정상군은 0.0 ± 0.0 (ng/ml), 대조군은 14.3 ± 2.1 (ng/ml), 실험군은 7.9 ± 2.8 (ng/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였다(Fig. 5).

5) IFN- γ 분비에 미치는 영향

IFN- γ 분비를 측정한 결과, 정상군은 2.4 ± 0.5 (pg/ml), 대조군은 5.7 ± 0.9 (pg/ml), 실험군은 12.4 ± 2.4 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 증가하였다(Fig. 6).

3. 폐세포에 대한 형광 유세포 분석에 미치는 영향

1) CD3e⁺/CCR3⁺에 미치는 영향

폐세포에서 CD3e⁺/CCR3⁺ 세포의 비율이 정상군에서는 19.9%, 대조군에서는 34.8%이었고, 실험군에서는 24.1%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 7).

2) CD69⁺/CD3e⁺에 미치는 영향

CD69⁺/CD3e⁺ 세포의 비율이 정상군에서는 4.4%, 대조군에서는 16.3%이었고, 실험군에는 11.6%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 8).

3) IgE⁺/B220⁺에 미치는 영향

IgE⁺/B220⁺ 세포의 비율이 정상군에서는 1.2%, 대조군에서는 15.7%이었고, 실험군에서는 6.6%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 9).

4) CD11b⁺/Gr-1⁺에 미치는 영향

CD11b⁺/Gr-1⁺ 세포의 비율이 정상군에서는 2.6%, 대조군에서는 9.9%이었고, 실험군에서는 5.6%로 나타나 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 10).

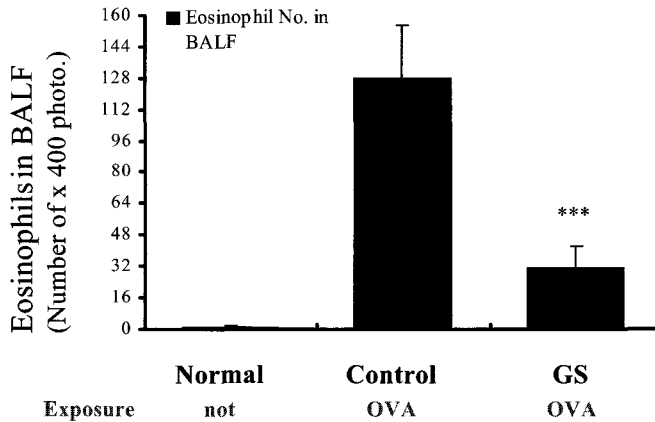


Fig. 1. Effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on eosinophils in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and the number of eosinophils was calculated.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (***) $p < 0.001$.

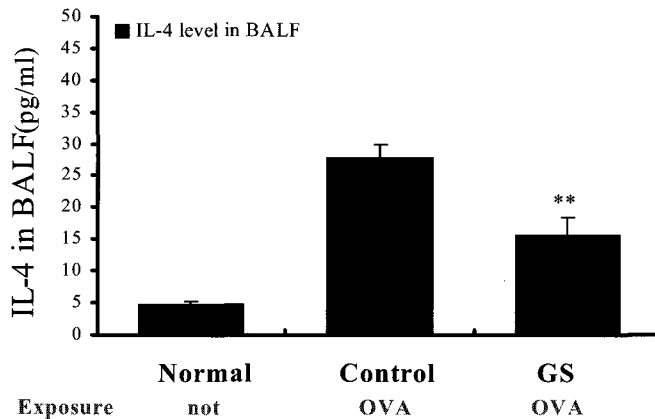


Fig. 2. Effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on IL-4 level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IL-4 level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (**) $P < 0.01$.

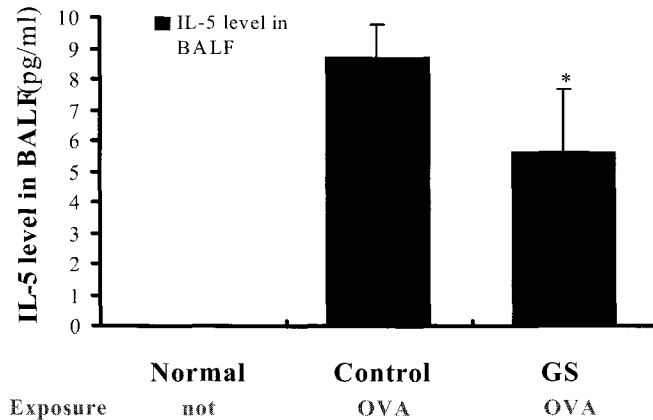


Fig. 3. Effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on IL-5 level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IL-5 level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*P<0.05).

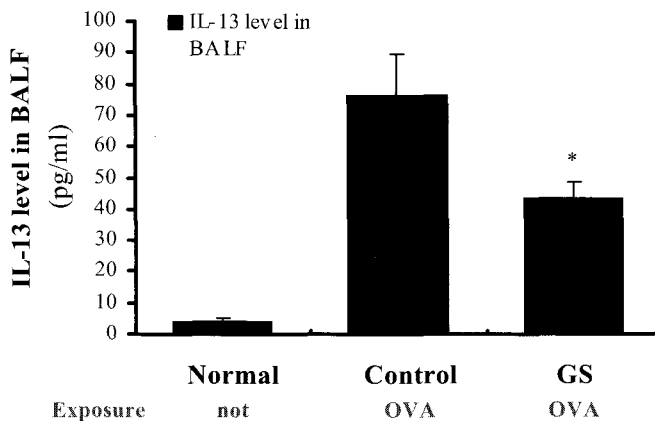


Fig. 4. Effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on IL-13 level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IL-13 level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*P<0.05).

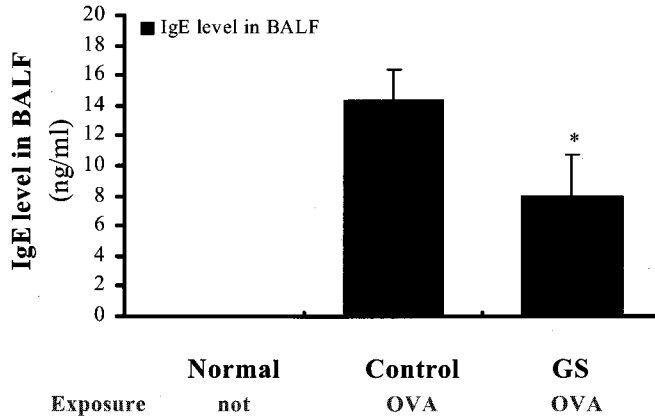


Fig. 5. Effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on IgE level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IgE level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05).

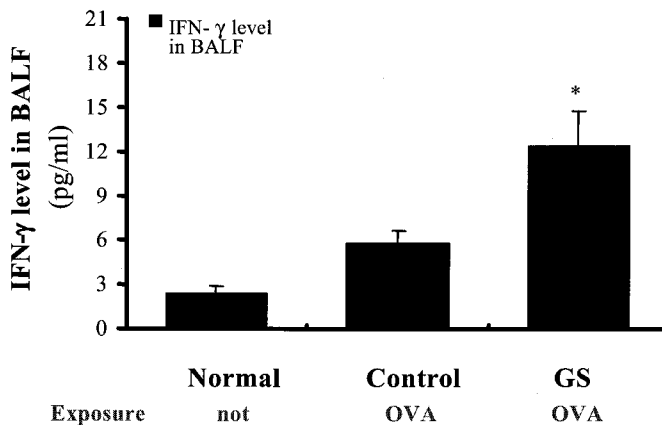


Fig. 6. Effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on IFN-γ level in BALF(bronchoalveolar lavage fluid) of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/week). At the end of the total experimental procedure, BALF was obtained from each group of mice and IFN- g level was measured using ELISA.

Normal : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

The results are expressed the mean±S.E (N=10). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05).

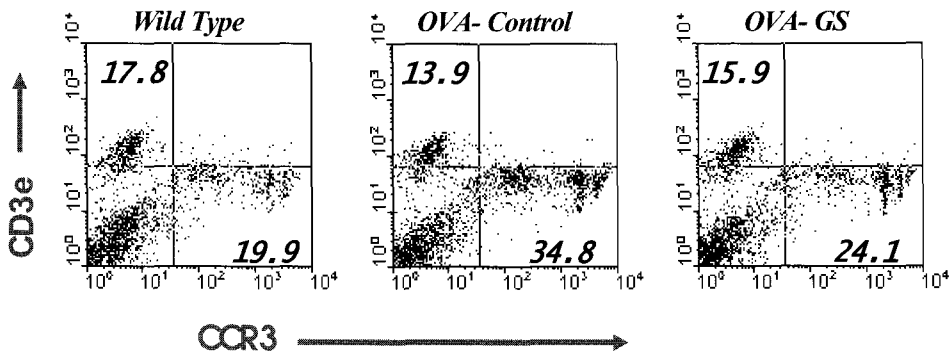


Fig. 7. Inhibitory effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on CD3e⁻/CCR3⁺ population(%) in lung cells of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

WT : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

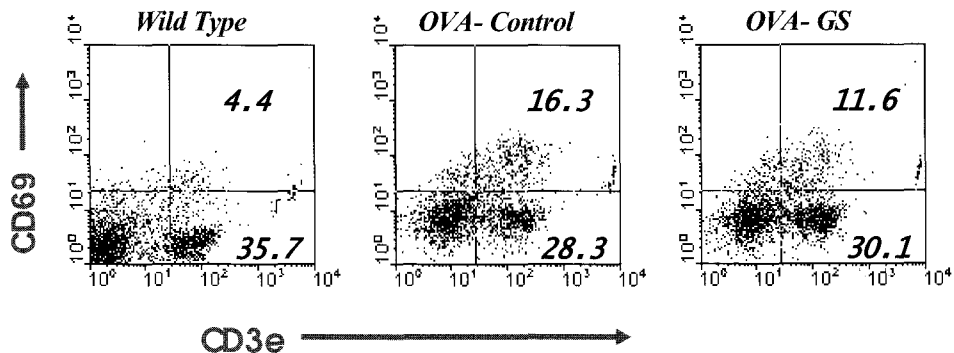


Fig. 8. Inhibitory effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on CD69⁺/CD3e⁺ population(%) in lung cells of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. Two experimental groups were treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

WT : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

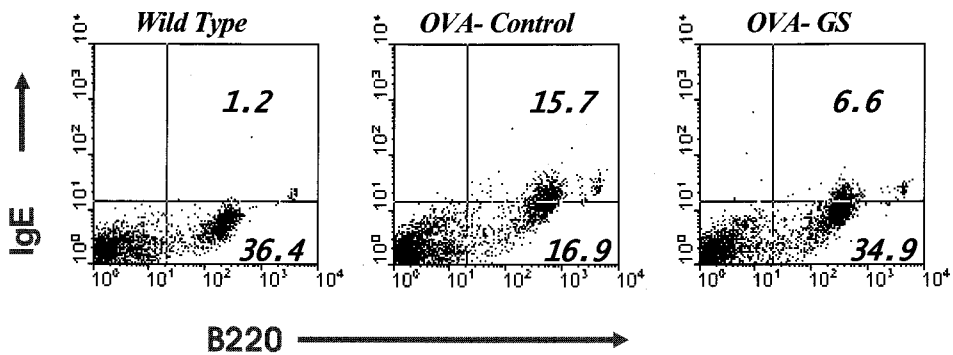


Fig. 9. Inhibitory effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on IgE⁺/B220⁺ population(%) in lung cells of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

WT : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

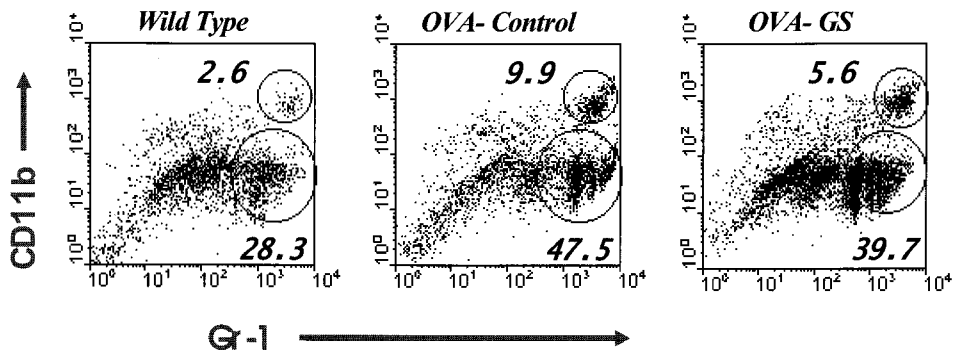


Fig. 10. Inhibitory effect of *Gleditsiae Spina*(GS) extract on CD11b⁺/Gr-1⁺ population(%) in lung cells of OVA-induced asthmatic mouse.

C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks for asthma induction. The experimental group was treated with GS extract for the later 8 weeks(3times/ week). At the end of the experiment, the mice lungs were removed and analyzed by flow cytometer.

WT : Normal C57BL/6 mice.

OVA-control : Ovalbumin inhalation(control).

OVA-GS : OVA + GS(3.6mg/20g).

IV. 考 察

기관지천식(이하 천식)은 호산구와 림프구의 침윤이 뚜렷하고, 중증도에 따라서 기도 염증 반응이 심해지며, 기도 상피세포의 탈락, 상피세포 기저막하 콜라겐 침착, 기도평활근 및 점액선 증식 등의 병리조직학적 소견을 보이는 질환으로 기존의 가역적인 기도폐색과 기관지 과민성 이외에 기도의 만성염증성질환이라는 개념으로 인식되고 있다⁴.

천식의 병인에 중요하게 관여하는 보조 T세포(T helper 세포: 이하 Th세포)는 서로 길항작용을 나타내는 Th1세포와 Th2세포로 나뉘는데 Th1세포는 주로 IFN- γ , TNF- β , IL-2를 생산하며 바이러스 같은 세포내 병원체를 공격하고, 지연형 과민반응을 일으키고, 종양에 대한 숙주반응에 관여하는데 Th1 경로가 지나치게 활성화되면 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 1형 당뇨병과 같은 자가면역질환을 발생시킨다. Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 기생충감염에 대한 방어작용에 관여하는데 Th2 경로는 기관지천식과 같은 알레르기성 질환의 기초가 되어 천식환자의 기관지 폐포세척액에서 Th2세포 기능의 활성화가 관찰되고 있다¹⁹. 즉 항원에 의한 IgE 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2세포는 naive CD4⁺ T세포가 IL-4의 영향으로 항원과 반응시 분화되고 이때 IgE 생성을 방해하는 IFN- γ 를 분비하는 Th1세포는 그 발달이 저해된다. 따라서 항진된 Th2 형의 면역 반응을 억제하는 것이 천식의 치료에 있어 중요하게 생각되고 있다²⁰.

호산구는 천식환자의 혈액, 기관지폐포액, 기도 상피 그리고 객담에 많이 존재하고 있으며 자체에서 여러 가지 사이토카인들을 분비하여 다른 세포들을 활성화시켜 천식의 병태생리에 중요하게 작용한다²¹. 기관지에 모여든 호산구는 활성화되어 있고 자사(apoptosis)가 억제된 상태로 major basic protein(MBP), eosinophil cationic protein(ECP), eosinophil derived neurotoxin(EDN), eosinophil peroxidase(EPO) 등의 세포독성단백을 분비하여 기

도 상피의 섬모운동을 억제하고 상피세포를 탈락시키며 기도 과민증을 초래한다. 또 활성화된 호산구는 지질 대사물질을 새로 형성하고 합성하는데 즉 arachidonic acid, leukotrien C₄(LTC₄), 혈소판 활성화인자(platelet activating factor, PAF) 등을 유리하여 혈관과 기도 평활근에 작용함으로써 알레르겐 흡입 유발시에 조기반응과 후기반응을 일으킨다².

천식은 韓醫學에서 呼吸急促, 喉中有聲하는 哮喘證의 範疇에 해당하는데, 그 原因에 대하여는 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 過敏性反應 등으로 정리하고 있다³. 哮喘證의 치료에 있어 實證은 外感風寒, 痰濕內盛으로 나누어 宣肺定喘, 化痰定喘하는 治법을 사용하고, 虛證은 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛로 나누어 養肺定喘, 補益心腎 納氣定喘, 瀉肺化痰 補益腎元하는 治법을 사용한다³.

皂角刺(*Gleditsiae Spina*; 이하 GS)는 콩과(Leguminosae)에 속한 낙엽교목인 皂角刺나무(*Gleditsia sinensis* LAM)의 가시를 건조한 것으로, 性은 溫無毒하고 味는 辛하며 肝胃經에 들어가 消腫排膿, 祛風殺蟲하여 癰疽初起, 膿成不潰, 疥癬麻風을 치료하는 효능이 있으며¹⁰, flavonoid가 주성분으로 생쥐의 sarcoma 180, 위장관암, 유방암 및 자궁경부암에 항암효과가 있다고 하였다²².

皂角刺에 대한 기존 연구로 이¹¹ 등은 皂角刺가 항돌연변이 활성측정에서 농도의존적으로 돌연변이 억제를 나타냈다고 하였고, 한¹²은 皂角刺가 K562 암세포에 대한 mitomycin의 세포독성을 증가시킨다고 하였고, 강¹³ 등은 皂角刺가 생쥐의 흉선세포와 비장세포의 증식을 촉진한다고 하였고, 박¹⁴ 등은 皂角刺가 sarcoma 180 세포를 접종한 생쥐에서 T세포와 NK세포를 증가시켜 항암작용을 한다고 하였고, 박¹⁵ 등은 皂角刺가 실험동물의 혈관투과성항진을 억제하고, carrageenin에 의한 부종을 억제하고, croton oil을 이용한 육아조직 형성을 억제하고, adjuvant 관절염을 억제한다고 하였고, 김¹⁶ 등은 皂角刺 투여가 흰쥐의 혈액학적 검사, 혈청 생화학적 검사, 장기 중량, 장기 병리조직학적 검사에서 독성을 나타내지 않았다고 하였고, 신¹⁷ 등은 皂角刺가

비만세포에서의 histamine 분비를 억제하는 효과가 있어 전신과 국소의 아나필락시스를 억제한다고 하였으나, 천식 모델을 대상으로 관련 면역세포 및 사이토카인에 대한 영향을 관찰한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 皂角刺가 천식유발 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향을 규명하고자 *in vivo* 실험으로 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid; 이하 BALF)내의 호산구, 관련 사이토카인의 분비, 폐세포의 표식항체를 이용한 유세포 분석에 미치는 영향을 측정하였다.

In vivo 실험에서 BALF내 호산구의 수의 변화에서 대조군은 정상군에 비해 분비량이 증가하였던 반면, 대조군에 비하여 실험군에서 유의성($P < 0.001$) 있게 감소하였다(Fig. 1). 중증뿐만 아니라 경한 증상을 가진 천식환자의 BALF에서도 호산구가 증가되어 있으며²³, 천식 후기반응이 있는 환자의 6시간 후 BALF와 조직에서 호산구가 주로 관찰되는데²⁴, 皂角刺로 인해서 호산구수가 감소되었다는 것은 皂角刺가 기관지의 염증세포 침윤을 감소시키는 효과가 있음을 보여준다고 생각할 수 있다.

ELISA 분석결과를 살펴보면, 혈청내 및 BALF내에서 IL-4, IL-5, IL-13, IgE는 대조군에서 정상군에 비해 분비량이 증가하였고 皂角刺를 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.01 \sim 0.05$) 있게 감소하였다(Fig. 2~5). BALF내 IFN- γ 는 대조군에서 정상군에 비해 약간의 분비량이 증가하였고 실험군에서 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 6).

IL-4는 B 세포의 성장과 분화에 작용하여 IgE 분비를 항진시키고 vascular cell adhesion molecule (VCAM)을 발현시켜 내피세포를 통한 호산구의 유입을 조장한다²⁵. IL-5는 IL-4의 B 세포 분화 및 성장작용을 상승시키고, 호산구의 분화, 활성화, 생존연장에서 중요한 역할을 한다²⁶. IL-13은 B 세포와 단핵구의 작용을 조절하는 Th2 림프구에 의해 주로 생산되는 사이토카인으로서 IL-4와 25%의 구조적 동질성이 있다. IL-13의 기능은 B 세포의 증식, 세

포표면의 integrin, MHC class II 항원 및 CD23의 증가, IL-6의 분비증가, 항체의 class switching으로 IgE와 IgG₄의 생산작용이 있다. 또한 IL-13은 혈관 내피세포의 VCAM-1 발현을 선택적으로 유도시킬 수 있다²⁷. IgE 항체는 제1형 과민반응의 중심역할을 한다. 항원에 노출되어 생산된 IgE 항체는 비만세포 표면에 결합하게 되고 같은 항원에 재노출하게 되면 비만세포 표면에서 부착된 IgE 항체와 항원이 결합하여 비만세포로부터 여러 화학매체들을 분비하게 된다²⁸. IFN- γ 는 세포매개 Th1 면역 반응의 유도에서 결정적 매개인자로 작용하고 B세포의 분화와 증식을 억제하는데 Th1과 Th2 분비의 주요 조절 인자이다. IL-4에 대해 길항작용을 하여 IL-4에 의한 IgE 생성을 억제한다²⁹.

따라서 皂角刺가 천식의 주요 면역반응 경로인 Th2 경로의 항진에 관여하는 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13의 분비를 억제하고 이에 길항작용을 갖는 IFN- γ 를 증가시켜 IgE의 분비량을 감소시킴으로써 천식의 염증반응에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

천식을 유발시킨 생쥐에 皂角刺를 경구투여(3.6 mg/20g)한 후 폐세포를 유세포분석하여 CD3e⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3e⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺의 비율에 미치는 영향을 측정한 결과 모든 항목이 실험군에서 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 7~10).

케모카인은 화학주성을 갖는 사이토카인을 말하는데, eotaxin같은 케모카인에 노출된 백혈구들은 케모카인 수용체를 발현하게 된다. CCR3는 주로 호산구에서 발하는 케모카인 수용체로 호산구가 혈관 내피세포와 결합한 후 조직내로 침투하도록 한다³⁰. 따라서 CCR3의 발현을 조절함으로써 천식에 효과를 나타내는 치료제의 가능성이 모색되고 있는데³¹ 실험군에서 CCR3의 비율이 대조군에 비하여 감소하는 것은 皂角刺가 호산구의 활성화를 억제하여 호산구의 기도조직내 유입을 감소시킴으로써 천식에 대한 효과를 나타낼 수 있다는 가능성을 보여준다고 생각된다.

CD3는 T세포 표면분자이고 CD69는 활성화된 B세포 및 T세포 및 대식세포, 세포독성 세포에 존재하는 표면분자로 T세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 분비되므로 천식환자의 기도에서 호산구침윤의 표지로 사용될 수 있다³². 실험군에서 CD69의 비율이 대조군에 비하여 감소하는 것은 皂角刺가 호산구의 기도내 침윤을 억제하는 작용이 있음을 시사하는 것으로 생각할 수 있다.

항원에 의하여 생성된 IgE가 결합되는 표적세포에 존재하는 Fc 수용체의 하나인 FcεRⅡ/CD23은 homotypic adhesion, B세포의 autostimulation, T세포에의 항원전달 등의 기능을 가지고 있으며 항CD23 항체에 의해서 IgE 항체 생성이 억제된다는 보고들을 볼 때 전반적인 B세포의 성장의 조절 및 IgE 항체 생성의 조절에 관여할 것으로 생각되고 있다³³.

세포유착분자는 세포간, 세포-기질간 상호작용을 증대하는 세포표면수용체로서 염증반응 및 면역학적 반응, 상처치유, 응고, 세포성장 및 분화 등에 관여하는데 Gr-1은 과립구의 표지자이고 CD11b는 순환 호산구의 표면에 발현하여 내피에 발현되어 있는 ICAM-1(intercellular adhesion molecule 1)와 유착하고, 이후 PAF, LTB4, eotaxin, RANTES 등의 화학주성인자 등에 의해 경내피이동이 일어나 결체조직 즉 표적장기로 유입된다³⁴. 따라서 폐세포에서 CD11b⁺/Gr-1⁺ 비율의 감소는 皂角刺가 호산구의 내피세포유착을 통한 경내피이동을 억제하여 천식을 감소시키는 효능을 가질 수 있는 근거로 사료된다.

이상을 종합하면 皂角刺는 호산구를 비롯한 면역세포의 활성화와 조직내 침윤을 억제하고, Th2 경로의 면역반응을 조장하는 IL-4, IL-5, IL-13의 분비를 감소시키며 이에 길항하는 IFN-γ의 분비를 증가시켜 IgE와 histamine의 분비를 억제하는 효과를 나타내 천식의 치료에 많은 활용이 가능할 것으로 생각된다.

V. 結 論

皂角刺가 알레르기 천식 모델 생쥐의 면역세포 및 사이토카인에 미치는 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BALF내에서 호산구수를 측정한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.001)있게 감소하였다.
2. BALF내에서 IL-4의 분비를 측정한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.01)있게 감소하였다.
3. BALF내에서 IL-5의 분비를 측정한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.05)있게 감소하였다.
4. BALF내에서 IL-13의 분비를 측정한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.05)있게 감소하였다.
5. BALF내에서 IgE의 분비를 측정한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.05)있게 감소하였다.
6. BALF내에서 IFN-γ의 생성을 측정한 결과 실험군에서 대조군에 비하여 유의성(p<0.05)있게 증가하였다.
7. 천식을 유발시킨 생쥐에 皂角刺를 투여하여 폐세포의 CD3ε⁺/CCR3⁺, CD69⁺/CD3ε⁺, IgE⁺/B220⁺, CD11b⁺/Gr-1⁺의 비율을 측정한 결과 모든 항목에서 대조군에 비하여 감소하였다.

參考文獻

1. 최병휘. 천식의 병인. 대한결핵 및 호흡기학회. 호흡기학. 서울: 군자출판사; 2004, p.317-47.
2. 홍천수, 김규인. 기관지천식-병인 및 역학. 대한천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울: 군자출판사; 2002, p.244-5.
3. 전국한의과대학폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 한문화사; 2002, p.329-31.

4. 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 사람 비만세포 주에서의 케모카인에 대한 지황평천탕의 효과. 대한한방내과학회지 2002;23(3):375-85.
5. Ko E, Rho S, Cho C, Choi H, Ko S, Lee Y et al. So-Cheong-Ryong-Tang, traditional Korean medicine. suppresses Th2 lineage development. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(5):739-43.
6. 김승수, 정희재, 정승기, 이형구. 神秘湯 및 加味神秘湯이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한의학회지 2002;23(2):198-210.
7. 염종훈, 정희재, 정승기, 이형구. 定喘湯과 定喘湯加減方이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지 2003;24(1):169-80.
8. 정승기, 정희재, 이재성, 이견영, 정승연, 이형구 등. 加味清上補下湯역기스제의 기관지천식환자의 증증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지 2004;25(2):110-8.
9. 최준용, 이재성, 정승연, 이견영, 이경기, 정희재 등. 虛實辨證과 加味清上補下湯의 임상효과. 대한한방내과학회지 2004;25(3):379-87.
10. 全國韓醫科大學本草學敎授 공편. 本草學. 서울: 永林社; 1991, p.482-3.
11. 이신규, 신정인, 서윤교, 정지천. 조각자의 항돌연변이 및 항산화 활성에 관한 연구. 대한한방내과학회지 2001;22(2):215-22.
12. 한중현. 조각자가 암세포에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소논문집 1997;5(2):499.
13. 강성용, 조정화, 한중현, 조남근. 조각자의 간암세포주(Hep G2)에 대한 세포독성, Apoptosis 및 NO에 대한 실험. 대한한방내과학회지 1997; 18(1):48-61.
14. 박용기, 강병수, 안상현, 박인식, 김진택. 조각자의 항암작용에 대한 실험적 연구-Sarcoma 180 cell이 접종된 생쥐 비장의 세포성 면역활성에 조각자 추출물이 미치는 영향에 관한 면역조직 화학적 연구. 대한본초학회지 1997;12(1):53-66.
15. 박은희, 신미자. 조각자 물추출물의 항염증 작용. 약학회지 1993;37(2):124-8.
16. 김충희, 하대식, 류재두, 허정호, 정명호, 최영태 등. 랫드에서 조각자(주엽) 나무 추출물인 Gleditschia-saponin의 경구 2주 반복투여 독성 시험. *J Toxicol Pub Health* 2002;18(3):285-92.
17. Shin TY, Kim DK. Inhibitory effect of mast cell-dependent anaphylaxis by Gleditsia sinensis. *Arch Pharm Res.* 2000;23(4):401-6.
18. Dohi M, Tsukamoto S, Nagahori T, Shinagawa K, Saitoh K, Tanaka Y et al. Noninvasive system for evaluating the allergen-specific airway response in a murine model of asthma. *Lab Invest.* 1999;79(12):1559-71.
19. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003;8(3):223-46.
20. Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res.* 2001;2(2):66-70.
21. 이양근. 호산구와 천식, 결핵 및 호흡기질환 1999;46(1):5-16.
22. 김형균, 김형민, 송봉근, 이연정, 정현택 편역. 한약의 약리. 서울: 고려의학; 2000, p.411.
23. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(2):403-9.
24. Makino S, Fukuda T. Eosinophils and allergy in asthma. *Allergy Proc.* 1995;16(1):13-21.
25. Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res.* 2001;2(2):66-70.

26. Mattes J, Foster PS. Regulation of eosinophil migration and Th2 cell function by IL-5 and eotaxin. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003 2(2):169-74.
27. 이광훈. 알레르기 염증반응에서 유착분자. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울: 군자출판사; 2002, p.59-60.
28. Platts-Mills TA. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(8 Pt 2):S1-5.
29. Liu X, Xing Z. A study on rIL-4 and IFN-gamma regulating IgE synthesis in bronchial asthma patients. *Chin Med J(Engl)*. 1997;110(10):760-3.
30. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000;95(10):3032-43.
31. Gangur V, Birmingham NP, Thanavorakul S, Joseph S. CCR3 and CXCR3 as drug targets for allergy: principles and potential. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2004;2(1):53-62.
32. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology*. 1993;80(2):281-6.
33. Nakamura T, Kloetzer WS, Brams P, Hariharan K, Chamat S, Cao X et al. In vitro IgE inhibition in B cells by anti-CD23 monoclonal antibodies is functionally dependent on the immunoglobulin Fc domain. *Int J Immunopharmacol*. 2000;22(2):131-41.
34. Spoelstra FM, Hovenga H, Noordhoek JA, Postma DS, Kauffman HF. Changes in CD11b and L-selectin expression on eosinophils are mediated by human lung fibroblasts in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(3):769-77.