

胡桃 물추출물이 Ovalbumin으로 유도된 천식동물모델에 미치는 영향

김상찬[#], 변성희^{*}

대구한의대학교 한의과대학 방제학교실, 한방생명자원연구센터

Abstract

The Effects of Juglandis Semen Extract on the Experimental Asthma induced by Ovalbumin

Sang Chan Kim[#] and Sung Hui Byun^{*}

Research Center for Biomedical Resources of Oriental Medicine & College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Daegu, Korea.

Objective :

Juglandis Semen has a function that to invigorate the lung and kidney. And It is commonly used as a supporting agent in the treatment of coughing and bronchitis. This study was performed to investigate the effect of oral administration of Juglandis Semen Extract (JSE) against the experimental asthma induced by ovalbumin.

Methods :

Asthma was induced to Balb/c mouse by i.p. injection and aerosol immunization with ovalbumin. It was observed the change of the cell number in the BAL fluid. Concentrations of IL-4, IL-5 in splenocyte were assessed by ELISA, IgG and IgE from serum were calculated by same method.

교신저자 : 변 성 희

대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

Tel : 053-770-2244, Fax : 053-768-6340, E-mail : shbyun@dhu.ac.kr

[#] 제1저자 : 김 상 찬

대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학

Tel : 053-770-2247, Fax : 053-768-6340, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

접수 : 2005/ 06/ 15 채택 : 2005/ 06/ 25

Results :

1. Number of macrophage in BAL fluid was significantly decreased in JSE group compared with control group, but not eosinophil and lymphocyte.
2. Levels of IgG and IgE in serum were significantly decreased in JSE group compared with control group, respectively.
3. Concentration of IL-4 in culture supernatant of splenocyte was significantly decreased in JSE group compared with control group, but there was no significant in IL-5.

Conclusion :

We found that the effect of JSE extract in asthma was implicated in reduction of IL-4 released from Th2 cell, and decreases of IgG and IgE from plasma cell. These findings suggest that JSE can produce anti-asthmatic effect, which may play a role in allergen-induced asthma therapy.

Key Word : Juglandis Semen, Asthma, Interleukin, Immunoglobulin

I. 서 론

오늘날 산업발달에 따른 대기오염의 증가와 밀폐된 환경에서의 활동이 많아짐으로 인하여 호흡기 질환 또한 날로 증가되고 있는 추세이다. 그 중喘息은 발작성의 호흡곤란, 천명, 기침, 나음(rales)을 특징으로 하는 증후군으로¹⁾, 원인의 대부분을 차지하는 알레르기 외에도 상기도 감염, 정서적 스트레스, 기후변화, 약물, 운동 등이 천식을 유발할 수 있다²⁾.

천식은 기도가 광범위하게 수축되어 좁아지고 기도의 수축이 수분내지 며칠 동안 지속되는 기관지폐쇄, 기관지염증을 일으키는 질환이다. 임상적으로는 기침,喘鳴, 호흡곤란등의 증후를 보이면서, 호산구(E-

osinophil)를 위시한 다양한 염증세포들이 기도내로의 침윤을 나타낸다³⁾. 또한, 천식은 알러지성 질환으로 Th1과 Th2 cell간의 imbalance로 인해 유발되며, 특히 Th2-type의 면역반응이 현저하여 발생된다⁴⁾. Interleukine(IL)-4, IL-5, IL-10등의 Th2-type cytokine들은 eosinophil과 mast cell, B cell등을 활성화시켜 천식의 진행에 연관된다⁵⁾. 역학적 연구에 의하면 미국에서 천식은 인구의 5-10%에서 발생하며, 천식의 발병율 및 사망율은 세계적으로 증가추세에 있음이 보고되고 있다⁴⁾. 천식은 병리학적으로 기도의 eosinophilic inflammation, bronchospasm과 비특이적 항원흡입에 대한 hyperreactivity로 특징지워질 수 있다⁶⁾.

천식은 한의학적으로哮喘證에 해당되

는 것으로 인식되고 있으며⁷⁾, 喘:中有聲響한 것을哮라하고 呼吸急促한 것을喘이라 하여 구분하기도 하나, 청대이후로는哮證에는喘促症이 겸하여 나타난다고 하여哮喘證을 하나의 증후로 보고 있다⁸⁾.

현재까지 천식에 대한 한의학적 연구로 이⁹⁾가 五拗湯의 진해, 항Histamin 및 기관지평활근 이완효과를, 정¹⁰⁻¹¹⁾은 加味清上補下湯과 定喘湯을 이용하여 폐기관지와 면역기능의 변화를, 박¹²⁾은 千縉導痰湯의 항알레르기 반응과 면역기능에 대한 연구를 보고하였으며, 金¹³⁾은 白花蛇舌草, 韓¹⁴⁾은 人蔘이 ovalbumin으로 유도된 천식 동물모델에서 immunoglobulin, antibody, cytokine에 미치는 영향을 보고하였다.

胡桃는 肺腎을 補益하는 약으로, 주로 咳嗽, 肺炎등에 사용되어져 왔다¹⁵⁾.胡桃에 관한 연구로 호도약침액은 지질막의 과산화물을 억제하여 tBHP로 유발된 apoptosis를 억제하며¹⁶⁾, 水銀에 의한 간독성을 완화하고¹⁷⁾, glycerol에 의한 尿濃縮障礙를 개선시키며¹⁸⁾, free radical을 소거하고¹⁹⁻²⁰⁾, 만성해수를 완화시키며²¹⁾, 알러지를 低減化시킴이 보고²²⁾되어 있다.

본 연구는胡桃가 천식에 미치는 효과를 알아보기 위하여, Balb/c mouse에 ovalbumin으로 알레르기성 천식을 유발한 후 기관폐포세척액(BAL fluid)에 존재하는 eosinophil, IL-4, IL-5의 변화, 혈청중 IgG, IgE의 변화, splenocyte의 IL-4, IL-5의 분비량을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 방법

1. 실험동물의 사육

실험동물은female BALB/c mouse(오리엔트, 대구, 한국)를 사용하였으며, 실험동물은 각 군당 5마리씩 총15마리를 사용하였다. 실험동물은 5마리씩 분리하여 polycarbonate cage에 수용하고, 온도 20~25℃ 및 습도 30~35%로 조절된 항온항습 및 공기청정 시스템(동물사육시스템, 한국)에서 사육하였으며, 명암주기는 12/12시간으로 조절하였다. 사료(한란, 한국) 및 음용수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다.

2. 한약액의 제조 및 투여

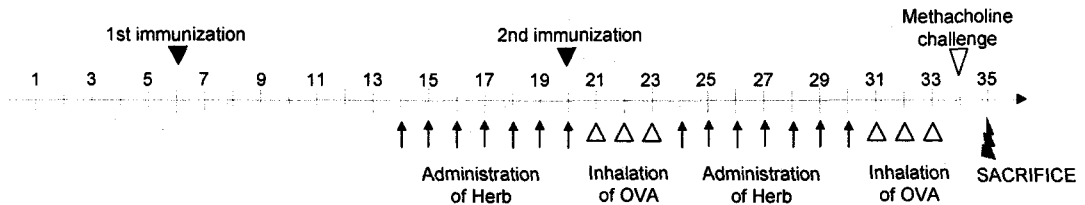
호도 500g(영남약업사, 대구, 한국)을 정제수 2500ml로 3시간 가열 추출한 후, 추출물을 여과지로 1차 여과한 다음, 여과액을 rotary evaporator로 감압농축하여 점조성 추출물을 얻었다. 이 점조성 추출물을 다시 동결건조하여 27.7g(수율 5.54%)의 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 검액의 투여는 3.3mg/20g를 1회/1일 투여량으로 하여, 철제 경구주입기(명진사, 서울)를 사용하여 경구투여하였다. 실험군은, 호도추출물 대신 생리식염수를 투여하고 아무런 처치도 하지 않은 군(이하 normal), 면역반응을 유도하고 생리식염수만 투여한 군(이하 control), 면역반응을 유도하고 호도추출액을 투여한 군(이하 JSE)으로 나누어서 진행하였다.

3. 면역반응의 유도

면역반응을 유도하기 위하여 10mg/ml-(PBS)의 ovalbumin(Sigma, USA) 5 μ l와 Alum(Imject® Alum, Pierce, USA)50 μ l, PBS 50 μ l를 IP로 immunize하였다. 1차 면

역 유도후, 면역 boosting을 위하여 14일 후 동일한 방법으로 2차 면역을 유도하였다. 2차례의 OVA를 흡입하기 전 7일부터

투약을 하였으며, 2차 OVA흡입 후, methacholine test를 시행하였다.



Scheme 1. Experimental Design.

4. Inhalation

1.0% ovalbumin in PBS를 네블라이저 (Omron, Japan)로 분무하여 30분간 ovalbumin을 흡입하게 하여 기도알러지를 유도하였다.

5. Methacholine test

기도과민반응(airway hyperreactivity; AHR)을 측정하기 위하여, methacholine(Sigma, USA)을 PBS 1ml당 10mg, 20mg으로 준비하여, 네블라이저(Omron, Japan)로 3분간 흡입시킨 후, whole body plethysmography for animal (Allmedicus, Anyang, Korea)로 30초씩 6회 반복하여 3분간 측정하였다. AHR은 Penh값으로 나타내었다.

6. 혈액의 채취

Heparinized capillary tube(Superior, Germany)를 이용하여 mice의 눈외자를 찢어 채혈한 다음, 1.5ml tube에 넣어 8,000rpm으로 10분간 centrifuge하였다. 상등액은 실험전까지 -70°C 에 보관하였다.

7. 실험동물의 희생 및 BALF채취

Mice의 꼬리와 경추부분을 당겨 경추를 탈구시킨 후, BALF를 취하였다. 즉, 목부위와 흉부의 피부를 절개하고, 기관지에 24G needle(Becton Dickinson, Korea)을 삽입하고 봉합사(원산업, 한국)로 단단히 묶은 후, 1ml syringe에 EDTA용액을 500 μl 를 넣은 후 기관지내로 삽입하여 up & down하여 폐기관지액을 얻었다. 이를 6회 반복하여 각기 다른 3개의 tube에 BALF 1ml씩 취한 후, 가장 먼저 채취한 1ml의 BALF를 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여, cytokine측정을 위한 상등액은 -70°C 에 보관하였고, pellet은 나머지 BALF와 합쳐 사용전까지 냉동보관하였다.

8. Spleen의 적출 및 splenocyte채취

BALF를 채취한 mice의 횡경막을 절개하여 spleen을 적출한 다음, 5ml의 RPMI 1640에 spleen을 넣은 다음, 이물질 제거하고 cell strainer(10 μm , Falcon, USA)를 사용하여 곱게 mash하였다. 이를 4,000rpm으로 3분간 원심분리한 후, 상등액을 제거한 pellet에 RBC lysis buffer 2ml을 넣

고 2분간 방치 후, RPMI 1640을 8ml 넣은 후 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액은 제거하였다. 각 pellet에 RPMI 1640을 10ml넣은 후, cell counting하여 최종 5×10^5 개로 24 well plate에 분주하여 배양하였다.

9. 세포의 수 측정

BALF를 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액은 버리고 pellet에 RBC lysis buffer를 200 μ l 넣고 vortex 후 얼음에 2분간 방치하였다. 여기에 800 μ l의 RPMI 1640을 넣은 후, 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여, 상등액은 버리고, pellet에는 1ml의 PRMI 1640을 넣어 잘 흔들어 준 후 20 μ l를 취하고, 여기에 다시 trypan blue(Sigma, USA) 60 μ l를 더하여 cell의 개수를 측정하였다. 최종적으로 각 실험개체당 4×10^4 개의 cell을 취하여 cyto-centrifuge(Wesor, USA)에 옮겨, 550rpm으로 5분간 centrifuge한 다음, Diff-Quick staining(Sysmax, Japan)으로 염색하고 fixer(Biomedica, Canada)를 10 μ l떨어 뜨린 후 eosinophil, macrophage, lymphocyte의 수를 측정하였다.

10. Antibody 측정

1) Microtiter plate (96-well)에 ovalbumin(Sigma, USA) 5 μ g/ml PBSN을 well당 100 μ l씩 넣고 4 $^{\circ}$ C 에서 overnight하여 coating하고, PBSN (PBS+sodium azide 0.02%)으로, 3차례 세척하였다.

2) 96-well plate에 1% BSA in PBSN을 150 μ l/well을 넣은 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후, PBSN으로, 3차례 세척하였

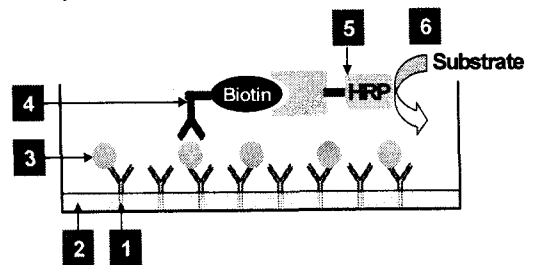
다.

3) 실험방법 6에서 준비한 sample을 dilution buffer (0.1% BSA in PBSN)로 희석한 후 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 이상 반응시킨 후, PBSN으로 3차례 세척하였다.

4) IgG, IgE의 antibody를 dilution buffer로 희석하여 well당 100 μ l를 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양한 후, PBSN으로 3차례 세척하였다.

5) 기질인 p-nitrophenyl-phosphate (pN-PP)를 carbonate buffer(pH 9.6)에 1mg/ml로 녹여 각 well당 100 μ l/well 가한 후, 15분(IgG), 12시간(IgE) 배양하고, spectrophotometer (Tecan, Austria)로 OD 값을 측정하였다. (405nm-492nm)

11. Cytokine 측정



Scheme 2. Procedure for Cytokine Measurement.

1) capture antibody를 plate에 coating하기 위하여, 96-well plate에 IL-4, IL-5 각각의 capture antibody(Parmigen, USA) 2 μ g을 1ml의 PBS에 녹여 각 well당 50 μ l씩 넣고, 실온에서 overnight하고, PBS로 3차례 세척하였다.

- 2) 1%의 BSA(Sigma, USA)를 각 well당 200 μ l씩 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하여 blocking한 후, PBS로 3차례 세척하였다.
- 3) 실험방법 8)에서 준비한 Splenocyte는 RPMI 1640에 72시간 배양한 배지를 각 well당 50 μ l씩 넣어 3시간 배양한 후, PBS tween으로 3차례 세척하였다.
- 4) IL-4, IL-5의 detection antibody(Parmigen, USA) 2 μ g을 1ml의 PBS에 녹여 각 well당 50 μ l씩 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하고, PBS tween으로 3차례 세척하였다.
- 5) Biotin에 특이성을 갖는 avidin-HRP-(Pierce, USA) 10 μ g을 DDW 10ml에 녹여 well당 100 μ l를 넣어서 30분 배양한 후 PBS tween으로 3회, 그리고 PBS로 3회씩 세척하였다.
- 6) 효소의 기질인 OPD peroxidase substrate(Sigma, USA) 2 different tablets을 20ml의 DDW에 녹여, 각 well당 100 μ l씩 넣고, 15분 후 spectrophotometer (-Tecan, Austria)로 OD값을 측정하였다. (405nm-492nm)

12. 통계처리

성적은 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's T-test를 이용하여 검정하였고, p값이 0.05미만 일 때 유의한 것으로 판정하였다.

III. 실험 성적

1. 호도추출물이 기도저항성에 미치는 영향

기도과민반응(AHR)을 측정하기 위하여, methacholine을 0mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml로 흡입시킨 후 Penh값을 측정하였으며, normal의 0mg/ml의 값에 대한 비율로 나타내었다. Normal은 0mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml시 각각 1.000 ± 0.303 , 1.301 ± 0.322 , 1.517 ± 0.245 였으며, control은 각각 1.046 ± 0.476 , 1.774 ± 0.245 , 2.137 ± 0.351 로 기도저항성이 증가하였으며, JSE는 각각 1.085 ± 0.450 , 1.483 ± 0.188 , 1.636 ± 0.164 로 기도저항성이 감소하였다. 특히 methacholine 20mg/ml에서는 control에서 normal에 비하여 유의한 증가를 나타내었고, JSE는 증가된 penh값을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 1).

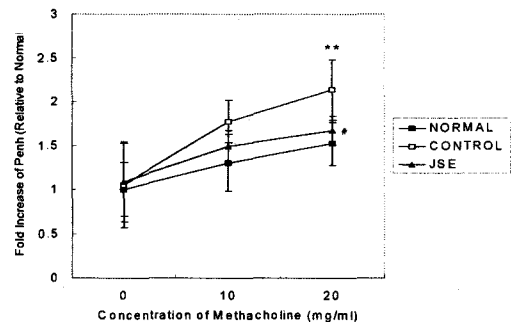


Fig. 1) Effects of JSE on antigen induced airway reponsiveness in BALB/c mice. The mice were treated as described scheme 1. One day after the last OVA inhalation by nebulizer, AHR was measured and the next day (day 35), BAL, serum and spleen were obtained and analyzed. Data

are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n=3~5 for each group) (**P<0.01 ; compare with normal, #P<0.05 ; compare with control)

2. BALF에서의 염증세포의 수적 변화에 미치는 영향

기관폐포세척액에서 염증세포의 증감을 비교하였으며, 각 염증세포는 normal에 대한 비율로 산정하였다. Macrophage는 normal 1.000 \pm 0.030, control 1.194 \pm 0.109 JSE 0.793 \pm 0.055로서, control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 증가하였으며, JSE군은 control군에 비교하여 유의성있게 감소시켰다. 그러나, eosinophil은 normal 1.000 \pm 0.225, control 5.593 \pm 1.6-32, JSE 6.298 \pm 1.424, lymphocyte는 normal 1.000 \pm 0.248, control 2.913 \pm 1.150, JSE 4.810 \pm 1.290로서 유의한 변화를 관찰하지 못하였다 (Fig. 2).

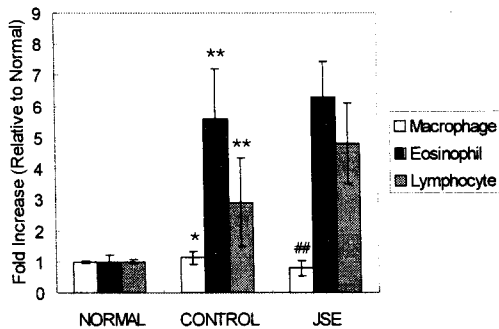


Fig. 2) Cells count in BALF of each studied groups. Mice was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments

(n=3~5 for each group) (*; compare with normal, *P<0.05, **P<0.01, #; P<0.05 compare with control)

3. 혈청 Immunoglobulin G의 변화에 미치는 영향

혈청중 IgG의 함량은 혈청을 1/2,000으로 희석한 sample로 측정하였으며, 수치는 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 \pm 0.214, control군에서는 4.728 \pm 0.465, JSE군에서는 3.048 \pm 0.365이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IgG의 수준을 증가시켰으며, JSE군은 control에 비교하여 IgG의 수준을 유의성있게 감소시켰다(Fig. 3).

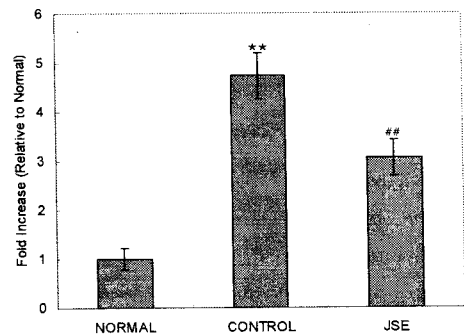


Fig. 3) Immunoglobulin G concentration in serum of each studied groups. Mice was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n=3~5 for each group) (**; P<0.01 compare with normal, ##; P<0.01 compare with control)

4. 혈청 Immunoglobulin E의 변화에 미치는 영향

혈청중 IgE의 함량은 normal군의 1/20 dilution에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군이 1/20, 1/80, 1/320, 1/1280의 희석배수에서, 각각 1.000 ± 0.176 , 0.580 ± 0.118 , 0.316 ± 0.022 , 0.219 ± 0.014 , control군에서는 각각 5.038 ± 0.520 , 4.254 ± 0.343 , 2.749 ± 0.306 , 1.476 ± 0.211 , JSE군에서는 각각 3.231 ± 0.305 , 2.195 ± 0.286 , 1.113 ± 0.033 , 0.628 ± 0.037 이었다. 모든 희석 배수에서 control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IgE의 수준을 증가시켰으며, JSE군은 control에 비교하여 IgE의 수준을 유의성있게 감소시켰다 (Fig. 4).

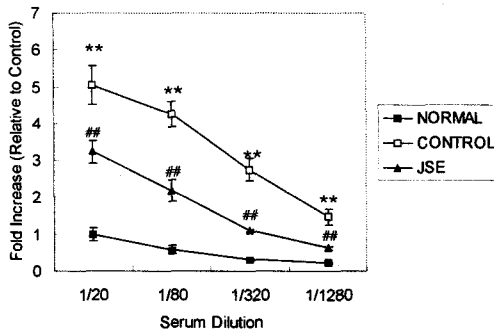


Fig. 4) Immunoglobulin E concentration in serum of each studied groups. Mice was immunized i.p. with $50 \mu\text{g}$ of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments ($n=3\sim5$ for each group) (**; $P < 0.01$ compare with normal, ##; $P < 0.01$ compare with control)

5. 비장세포의 Interleukin-4에 미치는 영향

Splenocyte를 배양한 배지에서의 IL-4의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.036 , control군에서는 1.144 ± 0.036 , JSE군에서는 1.040 ± 0.043 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 유의성있게 IL-4의 수준을 증가시켰으며, JSE군은 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성있게 감소시켰다 (Fig. 5).

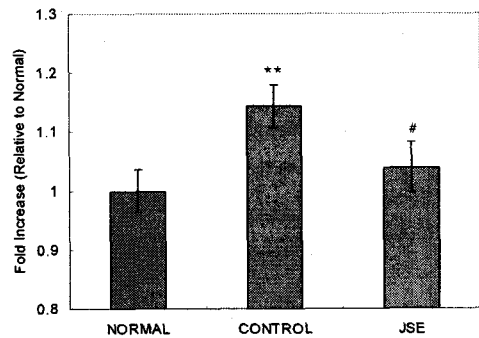


Fig. 5) Interleukin-4 concentration in culture supernatant of splenocyte each studied groups. Mice was immunized i.p. with $50 \mu\text{g}$ of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments ($n=3\sim5$ for each group) (**; $P < 0.01$ compare with normal, #; $P < 0.05$ compare with control)

6. 비장세포의 Interleukin-5에 미치는 영향

Splenocyte를 배양한 배지에서의 IL-5의 함량은 normal군에 대한 비율로 산정하였다. 실험결과 normal군은 1.000 ± 0.092 control군에서는 1.164 ± 0.078 , JSE군에서는 1.128 ± 0.043 이었다. Control군은 normal군에 비교하여 IL-5의 수준을 증가시켰으며, JSE군은 control에 비교하여 IL-5의 수준을 감소시키는 경향을 나타내었으나, 유의성있는 결과를 도출하지 못하였다.(Fig. 6)

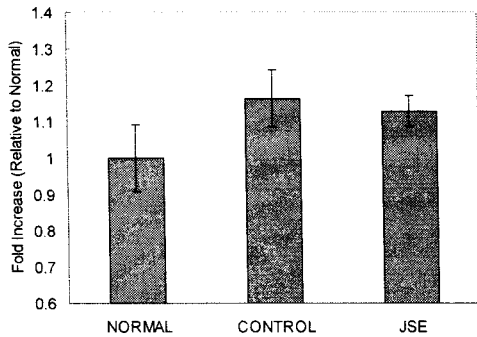


Fig. 6) Interleukin-5 concentration in culture supernatant of splenocyte each studied groups. Mice was immunized i.p. with 50 μ g of OVA at days 8 and 20, and challenged via the airway with OVA (0.1% ovalbumin in PBS) on days 21, 22, 23, 31, 32 and 33. Data are presented as the mean \pm SD of three separate experiments (n=3~5 for each group)

IV. 고찰

喘息을 일으키는 원인으로는 알러젠의

흡입, 호흡기감염, 일상의 스트레스에 대한 심인성 생리반응, 공기오염, 기후, 약물, 운동 등이 있으며, 이 중 喘息發作의 원인이 대부분 알레르기(allergy)성으로 받아들여지고 있다, 특징적인 증상으로는 발작성의 호기성호흡곤란, 천명, 과호흡, 기침, 나음(rales)을 들 수 있다²⁾.

韓醫學에서 喘息은 哮喘證에 該當되는 데²³⁾, 哮와 喘은 구분할 수 있어 喉中有聲響한 것을 哮라 하고 呼吸急促한 것을 喘이라 말하나⁸⁾, 근래에는 哮證에는 반드시 喘促症이 兼하여 나타난다고 하여 哮喘證을 하나의 證候로 보고 있다²⁴⁾.

哮喘證의 原因으로 朱²⁵⁾는 寒冷說, 心因說을 主張하였고, 楊等²⁶⁻²⁹⁾은 痰因說을 主張하였고, 沈等³⁰⁻³¹⁾은 痰火內鬱의 誘因으로 飲食物의 偏食을 主張하였고, 張³²⁾은 素因說을 주장하였다. 葉³³⁾은 一種의 感染說을 主張하였고, 近來에는 臟器의 機能不調를 原因으로 보기도 한다⁸⁾.

哮喘證의 辨證은 우선 虛實을 가려, 實證은 주로 風寒, 痰濁 등의 病邪로 因하며 治療는 祛邪에 중점을 두고, 虛證은 주로 肺虛, 腎虧등으로 因하므로 治療는 扶正에 중점을 두고 있다³⁴⁾.

본 연구에서는 허증성 병변에 적용될 수 있는 호도가 천식에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.胡桃는 肺腎을 補益하는 약으로, 주로 咳嗽, 肺炎등에 사용되어져 왔다¹⁵⁾.胡桃에 관한 연구로 호도차침액은 지질막의 과산화를 억제하여 tBHP로 유발된 apoptosis를 억제하며¹⁶⁾, 水銀에 의한 간독성을 완화하고¹⁷⁾, glycerol에 의한 尿濃縮障礙를 개선시키며¹⁸⁾, free radical을 소거하고¹⁹⁻²⁰⁾, 만성해수를 완화시키며²¹⁾, 알러지를 低減化시킴이 보고²²⁾되어 있다.

실험적 천식동물모델에서 호도의 효과를 평가하기 위하여, Balb/c mouse에 ovalbumin으로 알레르기성 천식을 유발한 후 BAL fluid에 존재하는 염증세포, 혈청 중 IgG, IgE, splenocyte의 IL-4, IL-5의 양을 관찰하였다.

많은 염증질환은 호산구증다증(eosinophilia)와 관련성이 많다. 예를 들면, 천식(asthma), 알러지성비염(allergic rhinitis), 아토피성 피부질환(atopic skin disease), idiopathic hypereosinophilic syndrome(HES) 그리고, 염증성 장질환(inflammatory bowel disease) 등이다³⁵⁾. 호산구는 천식 기도내에서 흔히 관찰되며, 호산구성 기도 염증은 천식의 가장 특징적인 소견중의 하나로서 호산구의 기도내 유입기전에 대한 연구는 천식의 병리상태를 밝히고 그에 대한 치료를 고안하는데 중요하다고 할 수 있다³⁶⁾. 임상적으로도 급성 천식환아의 조직검사에서 기도주위에 호산구의 침윤을 특징적으로 관찰할 수 있다³⁷⁾. 즉, 호산구는 천식의 후기 반응시 기도 내로 유입되어 세포막으로부터 PAF, PGF₂ α , LTC₄, LTD₄ 등을 생성하여 이들에 의해 강력하게 기관지를 수축시키고, 혈관투과성을 증가시켜 피하조직부종등을 유발시켜 이에 의해 이차적인 기도수축을 유발시키며, 또한 이들의 화학주성능에 의해 호산구 자신과 다른 염증반응세포를 유입시켜 천식반응을 지속시키면서, MBP, ECP등의 세포독성단백을 분비시켜 기도점막을 손상시키고 점막박탈등을 초래함으로써 기도과민성을 증가시킨다^{38,39)}.

본 실험의 methacholine test (20mg/ml)에서 control군은 기도저항성이 뚜렷이 나타나, 천식 모델이 잘 유발되었음을 나타

내었고, JSE군에서는 유의하게 기도저항을 감소시켰다. 그러나, 기관폐포세척액(BAL fluid)에서 eosinophil의 수는, control군에서 normal군에 비교하여 유의성 있게 증가하였다. 그러나, JSE군은 control군에 비교하여 유의성있는 변화를 나타내지는 못하였다.

병원체들이 상피장벽을 통과하여 국소 감염을 일으키면 숙주는 자신의 방어체계를 병원체가 성장하는 부위로 이동시킨다. 이들 중의 한 기전은 mast cell에 의해 이루어진다. mast cell은 국소혈관들의 투과성을 급속히 높이는 작용을 하는 histamine을 포함하는 혼합된 화학매개물질들이 있는 독특한 세포질과립들을 갖는 큰 세포이다. mast cell의 Fc ϵ R I, Fc γ RIII receptor는 IgE와 IgG에 각각 결합하여 지질 염증매개 물질 및 granule을 분비하게 된다⁴⁰⁾. IgG는 serum에서 가장 풍부한 Immunoglobulin으로 잘 알려져 있다. 이러한 IgG의 역할은 먼저, IgE가 기관지 mast cell에 부착하여 degranulation을 유발할 때, mast cell의 sensitization과 activation을 일으켜서 IgE와 같이 mast cell에 작용한다. 또, IgE가 결핍된 mice에게는 IgE대신 IgG를 생산하여 airway hyperresponsiveness를 일으킨다. 그리고, IgG는 eosinophil의 Fc γ R II에 부착하여 eosinophil의 degranulation을 유발하기도 한다⁴¹⁻⁴²⁾. 실제로, 천식에 이완된 어린이에게는 그렇지 않은 어린이들에 비하여 IgG와 IgE의 level이 유의하게 상승되어 있음이⁴³⁾ 보고되고 있다. 그러므로 IgG는 알레젠에 대하여서는 IgE만큼 천식에 연관되어 있는 것으로 보고되고 있다⁴⁴⁾.

본 실험에서의 혈청 중 IgG의 함량은

control군이 normal군에 비교하여 유의성 있게 IgG의 수준을 증가시켰으며, JSE군은 control에 비교하여 IgG의 수준을 유의성 있게 감소시켰다.

또한, IgE는 plasma cell에서 분비되는 것으로, IgE는 조직내에서 FcεR I 이라는 고친화성 표면수용체를 매개로 mast cell에 강하게 결합한다. 항원이 IgE에 결합하면 이들 수용체들이 교차결합하게 되고, 이는 mast cell의 granule로부터 화학적 매개 물질들의 분비를 유발하게 되어 제1형 과민반응의 발생에 이르게 된다. 또 basophils 및 활성화된 호산구에도 FcεR I이 발현되는데, IgE는 여기에도 결합하여 제1형 과민반응을 일으키는데 관여할 수 있다⁴⁰⁾. 또한 IgE는 hay fever, asthma, hives(발진), anaphylactic shock등의 증후와 관계되는 즉각적인 과민반응을 매개한다고 알려져 있다^{45,46)}.

본 실험에서의 혈청중 IgE의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성 있게 IgE의 수준을 증가시켰으며, JSE군은 control군에 비교하여 유의성 있게 IgE의 수준을 감소시켰다.

천식에서 기도내의 dendritic cell은 naive T cell을 Th2로 generation에 하는데 중추적인 역할을 한다⁴⁷⁾. 수지상세포(dendritic cells)는 가장 강력한 항원제시세포(antigen presenting cell)로서 1차적인 세포성 면역반응을 유발할 수 있는 유일한 세포이며 골수에서 기원해서 미성숙한 형태로 혈류를 거쳐 체내 모든 기관에 이동해 간다⁴⁸⁾. 수지상세포는 각 조직에서 주변의 항원(antigen)을 채집해서 림프기관으로 가서 T 림프구에 항원을 제시하는 역할을 한다^{47,49,50)}. 분화된 Th2 세포는 항

원제시세포와 만나 알러젠의 peptide를 공여받게 되면 IL-4, IL-5, IL-13등의 cytokine을 분비하여 알레르기 염증을 발생시키는데 있어 중심적인 역할을 담당한다⁵¹⁾.

IL-5의 분비는 allergic asthma를 유발하는 allergen이 폐로 흡입되면, mast cell과 Th2 cell이 기관지에서 활성화되게 되고, 항원에 의하여 활성화된 Th2 cell은 IL-4, IL-5 그리고 IL-13을 분비하게 되고, mast cell은 TNF-α를 분비한다. IL-4와, IL-13, TNF-α는 기도에 있는 epithelial cell, smooth muscle cell, fibroblast를 자극하여 eotaxin의 분비를 상승적으로 촉진시킨다. eotaxin과 IL-5는 폐조직에서 혈관으로 흡수되어 체내를 순행하면서, 골수에서 eosinophil의 성장 및 분화를 활성화하여, 다시 병소인 폐, 기관지에 eosinophil을 증가시켜 기도의 염증 및 천식을 유발한다^{35,52-54)}.

또 IL-4는 IgE항체의 생성 및 미감작 CD4+ T helper cell을 Th2세포로 발생시키는 주요자극제이다⁵⁵⁾. T 림프구에서 유래된 다른 종류의 cytokine들은 각각 특정 Ig동형으로의 전환을 유도한다. 이 중 IL-4는 시험된 종(species)에서는 모두 IgE에 대한 중요한 전환인자이다. 즉 IL-4는 B cell을 plasma cell로의 발달을 이끌어 IgE, IgG등의 생성을 유발시킨다⁵³⁾. 이렇게 생성된 IgE는 mast cell에 작용하여 granule방출을 유도함으로써 과민반응을 일으킨다⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

실험동물의 spleen에서 얻은 splenocyte를 배양한 배지에서의 IL-4의 함량은 control군이 normal군에 비교하여 유의성 있게 IL-4의 수준을 증가시켰으며, JSE군은

control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성 있게 감소시켰다. 그러나, IL-5에서는 유의한 결과를 얻지 못하였다.

V. 결 론

호도가 천식에 미치는 효과를 알아보기 위하여, Balb/c mouse에 ovalbumin으로 알레르기성 천식을 유발한 후 BAL fluid에 존재하는 염증세포의 수, 혈청중 IgG, IgE, splenocyte의 IL-4, IL-5의 양을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BAL fluid에서 JSE의 macrophage의 수는 control에 비교하여 유의성있게 감소하였다.
2. Splenocyte를 배양한 배지에서 JSE군이 control에 비교하여 IL-4의 수준을 유의성있게 감소시켰다. 그러나, IL-5에서는 유의한 변화를 나타내지 못하였다.
3. Serum에서 JSE군은 control군에 비교하여 IgG 및 IgE의 수준을 유의성있게 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때 호도는 Th2 cell이 매개되는 천식에 유효하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgment

This work was supported by grant number (R12-2003-002-03002-0) from the basic research program of the Ministry of Commerce, Industry and Energy.

參 考 文 獻

1. 李珩九, 鄭昇杞. 東醫肺系內科學. 9. 서울: 민瑞出版社. 1999: 187-202, 426, 460-461, 468.
2. 전국의과대학교수역. 오늘의 진단 및 치료. 1. 서울:한우리. 1999:287-297.
3. 공중보건편집위원회. 예방의학과 공중보건, pp129-145. 계축문화사, 서울, 1992.
4. Chiang DJ, Ye YL, Chen WL, Lee Y-L, Hsu NY, Chiang BL. Ribavirin or CpG DNA sequence-modulated dendritic cells decrease the IgE level and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 168(5):575-80. 2003.
5. Corrigan CJ, Haczku A, Gemou-Engesaeth V, Doi S, Kikuchi Y, Takatsu K, Durham SR, Kay AB. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin 5. *Am Rev Respir Dis.* 147:540 - 547. 1993.
6. National Asthma Education and Prevention Program. Expert panel report 2: guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 1997. Publication No. 97 - 4051.
7. 安徽中醫學院編. 中醫臨床手冊. 1. 서울: 成輔社. 1983:115-116.
8. 上海中醫學院編. 中醫內科學. 1. 香港:商務印書館香港分館. 1975: 17-23.
9. 李珩九. 五拗湯이 咳嗽 喘息에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1982.
10. 鄭昇杞. 定喘湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 경희대학교 대학

- 원. 1985.
11. 鄭昇杞. 加味清上補下湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 대한한의학회지. 1991;12(1):118-138.
 12. 朴光恩. 千縉導痰湯이 喘息에 미치는 영향에 관한 實驗的 研究. 경희대학교 대학원. 1993.
 13. 김상찬, 변성희. 백화사설초가 ovalbumin으로 유도된 천식동물모델에서 eosinophil의 수, IgE 및 IL-4에 미치는 영향. 대한 본초학회지, 20/2, 35-42, 2005.
 14. 한상엽, 변성희, 권영규, 신상우, 서성일, 권택규, 김상찬. 인삼추출물이 ovalbumin으로 유도된 천식의 cytokine에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 19/2, 398-406, 2005.
 15. Kee Chang Huang. The PHARMACOLOGY of CHINESE HERBS (2), CRC, 277-278. 1999.
 16. 박인범, 안창범, 장경전, 송춘호, 윤현민, 김철홍. 신세뇨관 상피세포에서 산화로 유발된 apoptosis에 대한 호도약침액의 방어효과, 대한침구학회지, 21-/3, 2004, 1-12.
 17. 이경태, 송춘호. 호도약침이 수은(Hg)에 의한 간조직 손상에 미치는 영향. 대한침구학회지, 16/3, 221-230, 1999.
 18. 이병훈, 서정철, 윤현민, 송춘호, 안창범, 장경전. 호도약침이 Glycerol에 의한 급성신부전 유발시 노농축능 장애에 대한 영향. 대한침구학회지, 18/3, 114-122, 2001.
 19. 김철홍, 윤현민, 장경전, 송춘호, 안창범. 호도약침액의 유리기 소거와 항산화 효과에 대한 실험적 연구. 대한침구학회지, 20/4, 209-219, 2003.
 20. Youn Hyoun-min, Heo Jea-yeong and Ahn Chang-beohm. Effect of Juglandis sinensis Dode extract on chemical hypoxia-induced cell injury in human glioma cells. K.A.M.S., 20/2, 173-183, 2003.
 21. 노정두, 육태한, 송범룡, 최석우, 설현, 소용룡. 호도약침액의 만성해수의 현증완화에 미치는 영향. 대한침구학회지, 20/5, 236-243, 2003.
 22. 백승일, 이용태, 장경전. 폐수, 격수의 호도약침 자극이 알레르기 반응에 미치는 영향. 대한침구학회지, 20/4, 180-191, 2003.
 23. 馬康慈. 中醫師臨床手冊. 1. 臺北:衆文圖書公司. 1976:235-240.
 24. 北京中醫院編. 漢醫學臨床病理. 1. 서울:成輔社. 1983:180-186,291.
 25. 朱櫛. 普濟方(4). 1. 北京:人民衛生出版社. 1982:1900.
 26. 楊禮壽. 醫林撮要. 1. 서울:黑潮社. 1968:182.
 27. 朱震亨, 方廣. 丹溪心法附餘. 2. 서울:大星文化社. 1989:339-340.
 28. 龔延賢. 增補萬病回春(上). 1. 서울:一中社. 1991:127-128.
 29. 李梴. 原本編註醫學入門(下). 1. 서울:南山堂. 1985:1563-1564.
 30. 沈金鰲. 沈氏尊生書(上). 1. 臺北:自由出版社. 1979:59.
 31. 王肯堂. 六科准繩(準繩). 1. 서울:大星文化社. 1992:152.
 32. 張介賓. 景岳全書. 2. 北京:中國中醫藥出版社. 1996:238.
 33. 葉天士. 臨證指南醫案. 1. 上海:上海科

- 學技術出版社. 1993: 298-300.
34. 具本泓, 朴鎬湜, 尹泰汝, 金東圭, 崔治求. 東醫內科學. 3. 서울:書苑堂. 1992 :41-47.
 35. Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 59(8):793--805. 2004.
 36. 김창근, 유진호, 고영률, Hirohito Kita. 기도 내 호산구성 염증에서 IL-5와 Eotaxin의 역할. 천식 및 알레르기학회지, 24(1), 127-136, 2004.
 37. 김지혜, 오재원, 이하백. 급성 천식 환자에서의 혈청 eosinophil cationic protein치의 변화에 대한 연구. 알레르기, 16(2), 219-229, 1996.
 38. 김미경. Biology of eosinophil, 대한천식및 알레르기학회 추계학술대회 초록집, 409-417, 1997.
 39. Garlisi CG, Kung TT, Wang P, Minnicozzi M, Umland SP, Chapman RW, Stelts D, Crawley Y, Falcone A, Myers JG, Jones H, Billah MM, Kreutner W, Egan RW. Effects of chronic anti-interleukin-5 monoclonal antibody treatment in a murine model of pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20(2):248-55. 1999.
 40. Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik. *Immunobiology*. Gerald. New York. pp.3-74, 473, 481. 2001.
 41. G. J. Gleich, H. Kita: Bronchial asthma: Lessons from murine models. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 94: 2101-2. 1997
 42. ROB C. AALBERSE: Specific IgE and IgG Responses in Atopic versus Nonatopic Subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 162:S124-7. 2000
 43. Rizzo, M. C., A. K. Arruda, M. D. Chapman, E. Fernandez-Caldas, D. Baggio, T. A. E. Platts-Mills and C. K. Naspitz. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. *Ann. Allergy*. 71. 152-158. 1993.
 44. Kaneko M, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H. Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. *J Clin Invest*. 95(6):2813-2821. 1995.
 45. S.I. Mayr, R.I. Zuberi, F.-T. Liu. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 36:821-827. 2003
 46. Douglas S. Robinson. T-cell cytokines: what we have learned from human studies. *PAEDIATRIC RESPIRATORY REVIEWS*. 5(Suppl A):S-53-8. 2004
 47. van Rijt LS, Vos N, Willart M, Kleijman A, Coyle AJ, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 114(1):166-73. 2004.
 48. Steinman RM: The dendritic cell sy-

- stem and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol* 9: 271, 1991
49. Hart DM: Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90: 3245, 1997
50. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245, 1998
51. 조상현, 장윤석. CpG-ODNs를 이용한 천식의 새로운 면역조절요법. 천식 및 알레르기. 22(1). 43-53. 2002.
52. Sara M. Rankin, Dolores M. Conroy and Timothy J. Williams. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Molecular Medicine Today*. 6(1). 20-27. 2000.
53. 최인선. 동물 천식모형에서 선택적 면역 조절 요법. 천식 및 알레르기. 22(4). 663-668. 2002.
54. Walker C, Virchow JC Jr, Bruijnzeel PL, Blaser K. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *J. Immunol*. 146(6):1829-1835. 1-991.
55. 강재성 외. 세포분자면역학(4판). 범문사. 서울. pp198. 258. 2002.
56. Paul M. O'Byrne, Mark D. Inman and Ellinor Adelroth: Reassessing the Th2 cytokine basis of asthma. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 25(5):244-8. 2004
57. Douglas S. Robinson: New Therapies for Asthma: Where Next? *Pediatric Pulmonology*. 36:369-375. 2003