

High through screening(HTS)를 이용한 白鼠의 脾臟細胞에서의 IL-5 분비 조절 韓藥物 Screening

박동희, 이형구, 정승기, 정희재
경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Interleukin-5 Inhibition Assay of the Oriental Materia Medica Treatment by High Through Screening on the Splenocyte of Mouse

Park Dong-hee, Rhee Hyung-koo, Jung Sung-ki, Jung Hee-jae
Division of Allergy & Respiratory System, Department of Internal Medicine,
College of Oriental Medicine, Kyunghee University

ABSTRACT

Backgrounds and Objectives: Asthma is considered to be an inflammatory disease characterized by airway hyperresponsiveness and pulmonary eosinophilia. And it is known the structure and function of IL-5, its receptor and the mechanism IL-5 triggered eosinophil accumulation and inflammation of the airways. At this point of view, we assume which oriental materia medica can the splenocyte inhibit from secreting the IL-5 in vitro.

Material and Methods: We used the splenocyte of mouse 8 weeks after its birth, and then cultivated those into the 2 experimental groups and control group for 48 hours. The culture medium of experimental groups were made of 1 μ g/ml, 10 μ g/ml oriental materia medica, representative. And the culture media of control group was given no oriental materia medica. Then, we assayed the quantity of cytokine-expression by the Sandwich ELISA. The quantities of cytokine-expression of the experimental groups were

compared with that of the control group which was standardized. These method were used for the all of oriental materia medica treated.

Results: In this study, we demonstrated that 12 oriental materia medica that inhibit the splenocyte from secreting the IL-5 in both 1 μ g/ml and 10 μ g/ml culture media. Those were Equiseti Herba, Sophorae Subprostratae Radix, Moutan Radicis Cortex, Trichosanthis Radix, Buddleiae Flos, Cyperi Rhizoma, Benincasae Semen, Armeniacae Semen, Zedoariae Rhizoma, Astragali Semen, Dolichoris Semen, Lillii Bulbus, Asparagi Radix, Atractylodes Rhizoma White, Polygonati Officinallis Rhizoma.

Conclusions: These findings indicate that some oriental materia medica, specially Antipyretics, Herbs for Resolving Phlegm, Relieving Cough and Calming Wheezing and Herbs for Tonifying and Invigorating effects inhibit the splenocyte from secreting the IL-5. And further study experimented in vivo is needed for treating IL-5-driven inflammatory disease including asthma.

Key Words: Oriental materia medica, IL-5, asthma

· 접수일 : 2006년 4월 15일 · 채택일 : 2006년 6월 15일
· 교신저자 : 정희재 서울특별시 동대문구 회기동 1 경희의료원
 부속한방병원 5내과(알레르기·호흡기내과)
 전화 : 02-958-9147 Fax : 02-958-9148
 E-mail : hanfish@khmc.or.kr

I. 緒 論

천식은 가역적인 기도폐색과 기관지 과민성, 기도의 부종, 호산구성-임파구성 염증을 특징으로 하는 복합적 임상적 증후군을 말한다¹. 천식의 특징적인 병리소견은 기관지내에 호산구의 수가 증가되어있는 것인데, 기관지에 증가되어 있는 호산구는 활성화되어 있고 세포사멸(apoptosis)이 억제된 상태이다. 활성화된 호산구는 많은 양의 염증매개체를 유리하여 혈관과 기도평활근에 작용함으로써 알레르겐 흡입 유발 시에 알레르기의 조기반응과 후기반응이 일어나게 한다².

호산구는 천식환자의 기도염증에 중요한 작용인자로 알려져 있으며, 특히 호산구에서 유리된 독성 단백질과 지질인자는 기관지상피세포 손상과 기도폐쇄에 중요한 역할을 한다^{3,4}.

기도염증이 일어나는 곳으로 호산구가 유입되는 과정은 매우 복잡하며, IL-5, GM-CSF, IL-3 등과 같은 여러 가지 cytokine과 eotaxin, RANTES, MCP-3 등과 같은 chemokine 등이 관여하는 것으로 알려져 있다⁵. 특히, IL-5는 T-cell에서 분비되는 lymphokine의 일종으로 호산구에 특이적으로 작용하여 호산구의 분화, 증식 및 활성을 증진시키는 것으로 알려져 있으며, 최근 천식 및 알레르기에 있어서 IL-5와 호산구의 관계를 관찰함으로써 치료에 접근하고자 하는 경향을 보이고 있다⁶.

이에 저자는 천식의 기도염증과 관련된 호산구의 분화 및 성숙을 유도하는 IL-5와 관련하여 억제효능을 가진 한약을 찾아보기 위하여 본초학의 분류법⁷에 따른 한약물의 효능과 IL-5 분비량 감소를 비교 관찰하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 動物 및 材料

1) 動物

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c 雌性 마우스이며 멸균 상태로 관리되어 온 것을 중앙실험동물(주)(Korea)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 퓨리나(주)(Korea)에서 구입하여 공급하였으며 음용수는 멸균 처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 음용수는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰고 사육실의 온도는 23 ±3℃, 상대습도 50 ±10 %의 환경을 유지하면서 08:00부터 20:00까지 12시간 간격으로 명암을 조절하였다.

2) 材料

본 실험에 사용된 한약재는 대만 썬텐사(Taiwan)로부터 구입한 엑스제(extract)로 1%(물 10ml 당 약재 0.1g)가 되도록 물을 넣고 24시간동안 4℃ 실온에서 추출하였다. 수집된 추출액은 3000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 filter paper (whatman, No.2, U.S.A.)를 이용하여 여과하여 -20℃에서 보관하였다(Table 1, 2, 3, 4, 5, 6).

Table 1. Herbs for Treating Exterior Syndrome

Herbs	Scientific Name
麻 黃	Ephedrae Herba
羌 活	Ostericii Radix
蒿 本	Angelicae Tenuissimae Radix
防 風	Saposhnikovia Radix
白 芷	Angelicae Dahuricae Radix
桑 葉	Mori Folium
生 薑	Zingiberis Rhizoma Crudus
細 辛	Asari Radix
辛 夷	Magnoliae Flos
紫蘇葉	Perilla Herba
荊 芥	Schizonepetae Spica
薄 荷	Menthae Herba
葛 根	Puerariae Radix
菊 花	Chrysanthemi Flos

淡豆豉	Sojae Semen Praeparatum
蔓荊子	Viticis Fructus
升 麻	Cimicifugae Rhizoma
柴 胡	Bupleuri Radix
牛蒡子	Arctii Furctus
木賊草	Equiseti Herba

Table 2. Herbs for Antipyretics

Herbs	Scientific Name
瓜 蒞 根	Trichosanthis Radix
蘆 根	Phragmitis Rhizoma
密 蒙 花	Buddleiae Flos
梔子(山)	Gardeniae Fructus
知 母	Anemarrhenae Rhizoma
苦 參 根	Sophorae Radix
白 鮮 皮	Dictamni Radicis Cortex
龍 膽 草	Gentianae Radix
黃 芩	Scutellariae Radix
黃 連	Coptidis Rhizoma
黃柏(川)	Phellodendri Cortex
牡 丹 皮	Moutan Cortex
生 地 黃	Rehmanniae Radix
金 銀 花	Lonicerae Flos
漏 蘆	Rhapontici Radix
白 頭 翁	Pulsatillae Radix
白 藜	Amphlopsis Radix
射 干	Belamcandae Rhizoma
山 豆 根	Sophorae Tonkinsis Radix
魚 腥 草	Houttuyniae Herba
連 翹	Forsythiae Fructus
白 薇	Cynanchi Atrati Radix
谷 精	Eriocauli Folium

Table 3. Herbs for Regulating the Flow of Qi

Herbs	Scientific Name
木香(老)	Aucklandiae Radix (Aged)
柿 蒂	Kaki Calyx
木香(新)	Aucklandiae Radix
荔枝核	Litchi Semen
烏 藥	Linderae Radix
枳 實	Aurantii Immaturus Fructus
陳 皮	Citri Leiocarpae Pericarpium
青 皮	Citri Rediculate Viride Pericarpium
香附子	Cyperi Rhizoma

Table 4. Herbs for Resolving Phlegm, Relieving Cough and Calming Wheezing

Herbs	Scientific Name
天南星	Arisaematis Rhizoma
旋覆花	Inulae Flos
白 前	Cynanchi Stauntonii Rhizoma et Radix
瓜 蒞 仁	Trichosanthis Semen
瓜 蒞 皮	Trichosanthis Pericarpium
桔 梗	Platycodi Radix
冬 瓜 子	Benincasae Semen
胖 大 海	Sterculiae Semen
前 胡	Peucedani Radix
枇 杷 葉	Eriobotryae Folium
款 冬 花	Farfarae Flos
百 部	Stemona Radix
蘇 子	Perillae Fructus
杏 仁	Armeniaca Amarum Semen

Table 5. Herbs for Herbs for Invigorating Blood and Dispelling Blood Stagnation

Herbs	Scientific Name
薑黃	Curcumae Longae Rhizoma
丹參	Salviae Miltiorrhizae Radix
桃仁	Persicae Semen
沒藥	Myrrha
王不留行	Vaccariae Semen
三稜	Sparganii Rhizoma
蘇木	Sappan Lignum
莪朮	Zedoariae Rhizoma
五靈脂	Trogopterorum Faeces
鬱金	Curcumae Radix
乳香	Olibanum
益母草	Leonuri Herba
川芎	Cnidii Rhizoma
牛膝(川)	Cyathula officinalis Kuan
牛膝(淮)	Achyranthes bidentata Radix
紅花	Carthami Flos

Table 6. Herbs for Tonifying and Invigorating Effects

Herbs	Scientific Name
白朮	Atractylodes Rhizoma White
黃耆	Astragali Radix
甘草	Glycyrrhizae Radix
山藥	Dioscorea Rhizoma
白扁豆	Dolichoris Semen
大棗	Jujubae Fructus
骨碎補	Drynariae Rhizoma
狗脊	Cibotii Rhizoma
補骨脂	Psoraleae Fructus
蛇床子	Cnidii Fructus
沙苑子	Astragali Semen
鎖陽	Cynomorii Herba
肉蓯蓉	Cistanchis Herba

淫羊藿	Epimedii Herba
益智仁	Alpinia Oxyphyllae Fructus
菟絲子	Cuscutae Semen
巴戟天	Morindae Radix
當歸(尾)	Angelicae Gingantis Radix
黨參	Codonopsis Pilosulae Radix
白芍藥	Paeoniae Radix Alba
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparat
阿膠	Asini Gelatinum
枸杞子	Lycii Fructus
麥門冬	Liriope Tuberosa
百合	Lilii Bulbus
石斛	Dendrobii Herba
女貞子	Ligustri Lucidi Fructus
玉竹	Polygonati Odorati Rhizoma
天門冬	Asparagi Radix

3) 試藥

본 실험에서는 anti-CD3e (clone:145-2C11), IL-5 ELISA set (Bethyl Laboratories, Inc, U.S.A.), URiSCAN (영동제약(주), Korea) 등이 사용되었다.

본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% FBS (JRH BIOSCIENCES, U.S.A.), 1% penicillin/streptomycin (BD Bioscience, U.S.A.) 10mM HEPES (JRH BIOSCIENCES, U.S.A.), 2g sodium bicarbonate (JRH BIOSCIENCES, U.S.A.)가 포함된 RPMI-1640 (BD Bioscience, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 方法

1) 脾臟淋巴球 준비

적출한 BALB/c 마우스의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer (BD Biosciences, U.S.A.)로 걸러낸 후 균질화된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 5ml Pharm Lyse (BD Bioscience, U.S.A.)를 넣고 5분간 반응시켰다. 세포가 부유되

어 있는 tube에 5ml의 media를 첨가한 후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하고 남은 cell pellet에 다시 5ml의 media를 첨가한 후 1/100 으로 희석하여 현미경으로 세포수를 측정하였다.

2) 脾臟淋巴球 배양 및 한약재 투여

2-1)의 방법을 이용하여 비장 임파구를 분리한 후 1×10^6 cells/ml의 농도로 1 ml씩 24-well plate에 seeding하되, 이전의 연구^{8,9}에서 단미엑스제의 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 두 가지 농도에서 세포독성이 나타나지 않아 1-2)의 방법으로 추출된 각 한약재

를 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 두 가지 농도로 희석한 배지를 사용하였다. 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3e (clone:145-2C11, BD Bioscience, U.S.A.)가 coating된 plate에 이상의 혼합물을 48시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator (Nuair, U.S.A.)에서 배양한 후 상층액을 얻어서 -20°C에 보관하여 실험에 이용하였다.

단, 매 seeding 時 1개 well에는 한약재를 넣지 않은 배지를 사용하여 대조군으로서 이용하였다.

3) Sandwich ELISA를 이용한 Cytokine 분비량 측정

2-2)를 통해 얻은 상층액에서 IL-5 분비량을 측

Table 7. IL-5 Inhibition Assay of Herbs for Treating Exterior Syndrome from Stimulated Splenocytes of BALB/c Mouse

Herbs		Scientific Name	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
		Con	100.0	100.0
發散風寒藥	麻 黃	Ephedrae Herba	372.6	103.5
	羌 活	Ostericii Radix	499.6	542.6
	蒿 本	Angelicae Tenuissimae Radix	197.7	143.0
	防 風	Saposhnikovia Radix	243.5	856.7
	白 芷	Angelicae Dahuricae Radix	84.7	111.0
	桑 葉	Mori Folium	109.1	290.2
	生 薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	295.0	200.8
	細 辛	Asari Radix	107.3	122.2
	辛 夷	Magnoliae Flos	89.7	540.6
	紫蘇葉	Perilla Herba	160.3	349.5
荆 芥	Schizonepetae Spica	128.0	169.3	
發散風熱藥	薄 荷	Menthae Herba	94.8	101.7
	葛 根	Puerariae Radix	160.2	244.9
	菊 花	Chrysanthemi Flos	227.7	1547.0
	淡豆豉	Sojae Semen Praeparatum	248.7	82.8
	蔓荊子	Viticis Fructus	190.7	317.9
	升 麻	Cimicifugae Rhizoma	197.6	358.0
	柴 胡	Bupleuri Radix	96.7	140.8
	牛蒡子	Arctii Furctus	141.4	145.2
	木 賊	Equiseti Herba	79.5	81.7

con : only medium

정하기 위하여 OptEIA Mouse IL-5 Set (BD Biosciences, U.S.A)의 protocol을 이용하되 capture antibody (anti-mouse IL-5)를 coating buffer (0.1M Carbonate, pH 9.5)로 희석하여 96-well plate에 100 μ l 씩 분주한 후 4°C에서 overnight하여 coating 하였다. Coating한 plate를 wash buffer (PBS/Tween-20 0.05%)로 3번 washing 한 후 assay diluent (BD Biosciences, U.S.A)를 200 μ l /well 씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 다시 wash buffer로 3번 washing하고 Standard와 Sample을 100 μ l 씩 분주한 후 실온에서 2시간 반응시켰다. Wash buffer로 5번 washing 하고 Working Detector (Detection antibody + Avidin-HRP) 100 μ l 씩 각 well에 첨가하였다. 실온에서 1시간 반응 후 wash buffer로 10번 washing 한 후 substrate solution (TMB Substrate Reagent: Pharmingen, BD Biosciences, U.S.A) set 을 각 well 마다 100 μ l 씩 첨가하였다. 실온의 어두운 곳에서 30분 동안 반응 한 후 2N H₂SO₄를 50 μ l 첨가 한 후 30분 안에 microplate reader (Molecular Devices, U.S.A)로 450nm/570nm에서 읽었다. 측정된 값은 각각의 대조군을 기준(100)으로 표준화하였다.

III. 結 果

1. 解表藥(Herbs for Treating Exterior Syndrome)

解表藥의 경우 1 μ g/ml의 농도에서는 木賊草, 白芷, 辛夷, 薄荷, 柴胡에서 IL-5 분비량 감소를 나타내었으며, 특히 木賊草에서 가장 많은 분비량 감소를 관찰하였다. 10 μ g/ml에서는 木賊草와 淡豆豉에서 IL-5 분비량 감소를 나타내었으며, 木賊草에서 가장 많은 분비량 감소를 관찰하였고, 木賊草는 1 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도 모두에서 IL-5의 분비량 감소가 관찰되었다(Table 7).

2. 清熱藥 (Herbs for Antipyretics)

清熱藥에서는 1 μ g/ml 농도일 때 白薇, 山豆根 瓜蒌根, 牡丹皮, 白薇, 密蒙花 에서 IL-5 분비량 감소를 관찰하였고, 白薇에서 가장 많은 감소를 관찰할 수 있었다. 10 μ g/ml 농도에서는 山豆根, 白鮮皮, 牡丹皮, 瓜蒌根, 射干, 密蒙花에서 IL-5의 분비량 감소가 나타났고 山豆根에서 가장 많은 감소를 관찰하였다. 山豆根, 牡丹皮, 密蒙花는 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 분비량 감소를 관찰할 수 있었다(Table 8).

3. 理氣藥 (Herbs for Regulating the Flow of Qi)

理氣藥은 1 μ g/ml 농도일 때 香附子和 木香(新)에서 IL-5의 분비량 감소가 있었고, 10 μ g/ml 농도에서는 香附子만 IL-5 분비량 감소가 관찰되었다. 香附子は 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 모두에서 분비량 감소가 관찰되었다(Table 9).

Table 9. IL-5 Inhibition Assay of Herbs for Regulating the Flow of Qi from Stimulated Splenocytes of BALB/c Mouse

Herbs	Scientific Name	1 μ g/ml	10 μ g/ml
	Con	100.0	100.0
木香(老)	Aucklandiae Radix (Aged)	141.2	130.2
柿 蒂	Kaki Calyx	890.0	162.0
木香(新)	Aucklandiae Radix	95.1	237.8
荔枝核	Litchi Semen	167.0	253.5
烏 藥	Linderae Radix	181.9	192.9
枳 實	Aurantii Immaturus Fructus	128.3	107.6
陳 皮	Citri Leiocarpae Pericarpium	149.9	157.7
青 皮	Citri Reticulate Viride Pericarpium	439.3	429.9
香附子	Cyperi Rhizoma	80.4	91.9

con : only medium

4. 化痰止咳平喘藥 (Herbs for Resolving Phlegm, Relieving Cough and Calming Wheezing)

化痰止咳平喘藥은 1 μ g/ml 농도 때는 冬瓜子, 杏

仁, 枇杷葉에서 IL-5 분비량이 감소하였고, 10 μ g/ml 농도 때는 旋覆花, 冬瓜子, 百部, 杏仁에서 IL-5 분비량 감소를 관찰하였다. 冬瓜子와 杏仁은 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 IL-5분비량 감소를 관찰하였다(Table 10.).

活血祛瘀藥의 경우 1 μ g/ml 때는 丹蔘, 沒藥, 莪朮에서 IL-5의 분비량이 감소하였고, 10 μ g/ml 때는 薑黃, 鬱金, 莪朮에서 IL-5 분비량이 감소하였다. 莪朮은 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 IL-5 분비량이 감소하는 것을 관찰하였다(Table 11.).

5. 活血祛瘀藥 (Herbs for Herbs for Invigorating Blood and Dispelling Blood Stagnation)

Table8. IL-5 Inhibition Assay of Herbs for Antipyretics from Stimulated Splenocytes of BALB/c Mouse

Herbs		Scientific Name	1 μ g/ml	10 μ g/ml
		Con	100.0	100.0
清熱瀉火藥	瓜蒌根	Trichosanthis Radix	83.3	73.8
	蘆根	Phragmitis Rhizoma	222.7	114.5
	密蒙花	Buddleiae Flos	95.8	87.0
	梔子(山)	Gardeniae Fructus	126.4	129.4
	知母	Anemarrhenae Rhizoma	122.3	109.3
清熱燥濕藥	苦參	Sophorae Radix	145.7	176.2
	白鮮皮	Dictamni Radicis Cortex	295.9	70.1
	龍膽草	Gentianae Radix	148.2	135.7
	黃芩	Scutellariae Radix	149.9	153.7
	黃連	Coptidis Rhizoma	137.7	106.6
	黃柏(川)	Phellodendri Cortex	490.5	351.7
清熱涼血藥	牡丹皮	Moutan Cortex	85.1	71.3
	生地黃	Rehmanniae Radix	337.0	875.3
清熱解毒藥	金銀花	Lonicerae Flos	175.0	131.2
	漏蘆	Rhapontici Radix	129.9	173.6
	白頭翁	Pulsatillae Radix	356.1	136.7
	白薇	Amphlopsis Radix	88.8	111.1
	射干	Belamcandae Rhizoma	110.4	86.5
	山豆根	Sophorae Tonkinsis Radix	77.7	67.8
	魚腥草	Houttuyniae Herba	101.0	257.4
	連翹	Forsythiae Fructus	283.0	700.3
	清虛熱藥	白薇	Cynanchi Atrati Radix	63.2
谷精		Eriocauli Folium	126.2	142.4

con : only medium

Table 10. IL-5 Inhibition Assay of Herbs for Resolving Phlegm, Relieving Cough and Calming Wheezing from Stimulated Splenocytes of BALB/c Mouse

Herbs		Scientific Name	1 μ g/ml	10 μ g/ml
		Con	100.0	100.0
溫化寒痰藥	天南星	Arisaematis Rhizoma	550.1	456.6
	旋覆花	Inulae Flos	112.7	60.3
	白前	Cynanchi Stauntoni Rhizoma et Radix	99.9	194.8
清化熱痰藥	瓜蒌仁	Trichosanthis Semen	104.8	128.8
	瓜蒌皮	Trichosanthis Pericarpium	691.7	99.8
	桔梗	Platycodi Radix	335.7	301.8
	冬瓜子	Benincasae Semen	71.0	66.7
	胖大海	Sterculiae Semen	174.4	126.7
	前胡	Peucedani Radix	120.5	129.5
	枇杷葉	Eriobotryae Folium	85.9	207.7
	止咳平喘藥	款冬花	Farfarae Flos	212.3
百部		Stemonaе Radix	184.7	86.5
蘇子		Perillae Fructus	114.5	124.9
杏仁		Armeniacaе Amarum Semen	85.6	89.2

con : only medium

Table 11. IL-5 Inhibition Assay of Herbs for Invigorating Blood and Dispelling Blood Stagnation from Stimulated Splenocytes of BALB/c Mouse

Herbs	Scientific Name	1 μ g/ml	10 μ g/ml
		Con	100.0 100.0
薑黃	Curcumae Longae Rhizoma	107.3	83.4
丹參	Salviae Miltiorrhizae Radix	72.9	146.8
桃仁	Persicae Semen	294.8	300.9
沒藥	Myrrha	79.6	192.2
不留行	Vaccariae Semen	126.6	117.1
三稜	Sparganii Rhizoma	356.7	326.0
蘇木	Sappan Lignum	211.0	149.3
莪朮	Zedoariae Rhizoma	87.2	93.7

五靈脂	Trogopterorum Faeces	943.1	240.2
鬱金	Curcumae Tuber	119.2	89.3
乳香	Olibanum	156.5	159.5
益母草	Leonuri Herba	132.9	139.9
川芎	Cnidii Rhizoma(Ligustici Rhizoma)	125.5	137.7
牛膝(川)	Cyathula officinalis Kuan	127.6	125.4
牛膝(淮)	Achyranthes bidentata Radix	119.6	127.9
紅花	Carthami Flos	419.8	413.2

con : only medium

6. 補益藥 (Herbs for Tonifying and Invigorating Effects)

補益藥의 경우 1 μ g/ml 농도 때는 沙苑子, 白扁豆, 百合, 天門冬, 白芍藥, 白朮, 石斛, 玉竹에서 IL-5의 분비량이 감소하였고, 10 μ g/ml 농도 때는

白扁豆, 沙苑子, 百合, 熟地黄, 白朮, 玉竹, 天門冬에서 IL-5의 분비량이 감소하였다. 沙苑子, 白扁豆, 百合, 天門冬, 白朮, 玉竹은 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 IL-5의 분비량이 감소하는 것을 관찰하였다(Table 12.).

IV. 考 察

면역반응 기전에 관해서, 최근에는 Th1과 Th2의 균형에 의해 그 기전을 설명하고 있으며, Th2 가설은 천식 및 알레르기에 있어 중요한 이론으로

Table 12. IL-5 Inhibition Assay of Herbs for Tonifying and Invigorating effects from Stimulated Splenocytes of BALB/c Mouse

Herbs		Scientific Name	1 μ g/ml	10 μ g/ml
		Con	100.0	100.0
補氣藥	白 朮	Atractylodes Rhizoma White	90.0	93.1
	黃 耆	Astragali Radix	111.6	102.1
	甘 草	Glycyrrhizae Radix	277.9	453.1
	山 藥	Dioscorea Rhizoma	234.5	462.5
	白扁豆	Dolichoris Semen	58.5	47.7
	大 棗	Jujubae Fructus	268.9	452.5
補陽藥	骨碎補	Drynariae Rhizoma	186.9	160.9
	狗 脊	Cibotii Rhizoma	219.6	136.4
	補骨脂	Psoraleae Fructus	129.9	140.5
	蛇床子	Cnidii Fructus	298.7	221.9
	沙苑子	Astragali Semen	55.9	53.0
	鎖 陽	Cynomorii Herba	296.3	288.8
	肉苁蓉	Cistanchis Herba	284.4	298.2
	淫羊藿	Epimedii Herba	123.9	425.8
	益智仁	Alpinia Oxyphyllae Fructus	155.8	166.6
	菟絲子	Cuscutae Semen	181.7	184.0
	巴戟天	Morindae Radix	487.9	321.0
	補血藥	當歸(尾)	Angelicae Gigantis Radix	237.0
黨 參		Codonopsis Pilosulae Radix	299.0	232.7
白芍藥		Paeoniae Radix Alba	87.2	278.3
熟地黄		Rehmanniae Radix Preparat	248.9	68.4
阿 膠		Asini Gelatinum	215.4	115.9
補陰藥	枸杞子	Lycii Fructus	224.6	144.3
	麥門冬	Liriopsis Tuber	250.7	422.0
	百 合	Lilii Bulbus	71.6	65.0
	石 斛	Dendrobii Herba	94.6	104.0
	女貞子	Ligustri Lucidi Fructus	106.0	142.3
	玉 竹	Polygonati Odorati Rhizoma	95.0	96.0
	天門冬	Asparagi Radix	82.7	96.2

con : only medium

자리 잡고 있는데⁸, 천식의 병인에 관여하는 세포는 호산구 뿐만 아니라, 비만세포, 기도상피벽세포 등 여러 가지가 있지만 이 중에서 Th 림프구는 세포활성체(cytokine)를 분비하여 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다^{9,10}. Th 림프구는 세포활성체의 분비양상에 따라 Th1과 Th2 림프구로 분류하는데, Th1 림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN- γ 를 생산하며 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스 및 세균에 대항하고 종양에 대한 숙주 반응에 중요한 역할을 한다. 한편 Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 천식을 포함한 알레르기성 질환, 기생충 감염에 대한 방어 작용 등에 관여하며, Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 길항작용을 하는데, 천식과 같은 알레르기성 질환에 있어서는 Th2 반응 기전의 상대적인 증가가 Th1 반응 기전의 상대적인 감소와 함께 일어나면서 천식이 발생하게 된다¹¹.

천식의 특징적인 병리소견은 기관지내에 호산구의 수가 증가되어있는 것인데, 기관지에 증가되어 있는 호산구는 활성화되어 있고 세포사멸(apoptosis)이 억제된 상태이다. 활성화된 호산구는 많은 양의 염증매개체를 유리하여 혈관과 기도평활근에 작용함으로써 알레르겐 흡입 유발 시에 알레르기의 조기반응과 후기반응이 일어나게 한다¹².

기존의 천식 관련 연구들에서, 비만세포나 호산구는 기도에서 천식성 변화를 일으키는 데 중요한 작동세포였다. 그러나 최근의 천식 연구에서는, 염증을 일으키는 세포간의 상호작용과 함께 기도 자체의 세포들인 상피세포, 신경세포, 그리고 평활근 뿐만 아니라, T 림프구, 호산구, 호염기구, 비만세포, 중성구, 혈소판 그리고 대식세포 등의 역할들을 제시하면서 또한 세포활성체들(cytokines)의 중요성이 대두되었다^{13,14}.

IL-5는 T-cell에서 분비되는 lymphokine의 일종으로 호산구에 특이적으로 작용하여 호산구의 분화, 증식 및 활성을 증진시키는 것으로 알려져 있는데, 최근의 천식 관련 연구들을 보면, 활성화된

T 림프구, IL-5 생산과 호산구 활성화는 천식 반응에 있어서 특히 더 중요하게 다루고 있으며^{15,16,17}, 치료기전에 관하여서도 다방면의 연구가 지속되고 있는 실정이다^{18,19,20}.

김²¹은 천식성 및 비천식성 만성 기침환자 모두 기도내 호산구수와 IL-5치가 증가되어 있음을 관찰하였고, IL-5와 eotaxin이 국소 호산구성 염증에 같이 관여하나 기도내 호산구 유입과 탈과립 과정에 eotaxin이 더 중요한 역할을 한다고 하였다. 최²²는 호산구성 기관지염과 천식 환자의 객담 중 IL-5 측정치의 유의한 차이를 볼 수 없고 오히려 유사하여 두질환의 유사한 기도 호산구증가증을 설명할 수 있다고 하였고, 오히려 천식환자의 기도과민성은 IL-13과 관련이 있다고 보고 하였다.

IL-5와 관련된 이전의 한약 실험논문들을 살펴보면 원²³은 회화나무(*Sophora japonica*, 槐花)의 iso-flavonoid 제제들이 IL-5 억제제이고, 이로 호산구 활성화를 억제하였을 뿐 아니라 생존을 억제시켜 세포사멸을 촉진한다고 하였다.

본 연구에서는 IL-5가 세포활성체로서 호산구 조절을 통해 천식 발병 기전에 중요한 역할을 담당하는 것을 기본 이론으로, 각 한약재의 IL-5 분비량의 변화를 통해서 호산구와 관련된 면역 및 알레르기질환을 치료하는 약물들을 찾아보고자 하였다. 이에 저자는 본초학의 분류에 따른 각 약재 집단군과 IL-5 분비량의 변화 간의 관계를 연구함과 동시에 각각 약물에 대한 IL-5에 미치는 영향을 분석하였다.

解表藥은, 본 실험에서 1 μ g/ml의 농도에서는 木賊草, 白芷, 辛夷, 薄荷, 柴胡의 순으로 IL-5 분비량 감소를 나타내었고, 10 μ g/ml에서는 木賊草와 淡豆豉의 순으로 IL-5 분비량 감소를 나타내었는데, 특히 木賊草는 1 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도 모두에서 가장 많은 IL-5의 분비량 감소를 보였다.

清熱藥은, 본 실험에서 1 μ g/ml농도일 때 白薇, 山豆根, 瓜蒌根, 牡丹皮, 白薇, 密蒙花 순으로 IL-5 분비량이 감소하였고, 10 μ g/ml의 농도에서는 山豆

根, 白鮮皮, 牡丹皮, 瓜蒌根, 射干, 密蒙花 순으로 IL-5의 분비량 감소가 나타났는데 山豆根, 牡丹皮, 瓜蒌根, 密蒙花는 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 분비량 감소가 관찰되었다. 牡丹皮의 효능 연구 중 문²⁴은 牡丹皮가 eotaxin의 발현억제를 통해 호산구 결집억제를 보고하여, 호산구 유발 천식환자에서 중요한 인자인 IL-5와 eotaxin 모두를 억제하는 것으로 보여 천식 치료제로서의 많은 가능성을 시사하고 있다.

理氣藥은, 본 실험에서 1 μ g/ml 농도에서는 香附子和 木香(新)에서 IL-5의 분비량이 감소하였고, 10 μ g/ml 농도에서는 香附子만 IL-5 분비량 감소를 관찰하여, 香附子만 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 모두에서 IL-5 분비량을 감소시켰다.

化痰止咳平喘藥은, 1 μ g/ml의 농도에서 冬瓜子, 杏仁, 枇杷葉 순으로 IL-5 분비량이 감소하였고, 10 μ g/ml의 농도에서는 旋覆花, 冬瓜子, 百部, 杏仁 순으로 IL-5 분비량이 감소하는 것을 관찰하였다. 특히 冬瓜子和 杏仁은 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 IL-5분비량이 감소하였다. 정²⁵의 보고에서는 杏仁과 桔梗 모두에서 IL-5의 轉寫抑制效果를 보고하였으나, 이번 실험에서는 杏仁에서만 억제효과가 나타나 약간의 차이가 있었다.

活血祛瘀藥은, 1 μ g/ml 농도에서 丹蔘, 沒藥, 莪朮 순으로 IL-5의 분비량이 감소하였고, 10 μ g/ml의 경우에는 薑黃, 鬱金, 莪朮의 순으로 IL-5 분비량이 감소하였다. 특히 莪朮은 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 IL-5 분비량이 감소하였다.

補益藥은, 본 실험에서 1 μ g/ml 농도에서 沙苑子, 白扁豆, 百合, 天門冬, 白芍藥, 白朮, 石斛, 玉竹의 순으로 IL-5의 분비량이 감소하였고, 10 μ g/ml 농도에서는 白扁豆, 沙苑子, 百合, 熟地黃, 白朮, 玉竹, 天門冬의 순으로 IL-5의 분비량이 감소하는 것을 관찰하였다. 특히 沙苑子, 白扁豆, 百合, 天門冬, 白朮, 玉竹은 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 IL-5의 분비량이 감소하였다. 이²⁶의 보고에서는 麥門冬이 50.6% IL-5 轉寫抑制效果가 나타났으나, 이번

실험에서는 효과가 없는 것으로 나타나 상이한 결과를 보였다.

이상의 실험결과에서 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 IL-5의 분비량이 감소한 것을 관찰한 약물은 농도와 관계없이 일정한 효능이 나타난다고 볼 수 있으므로, 다른 약물에 비해 천식과 관련된 IL-5 분비 억제에 유효한 효과가 있을 것으로 생각된다. 각 분류별로 약물을 살펴보면 解表藥의 木賊草, 清熱藥의 山豆根, 牡丹皮, 天花粉, 密蒙花, 理氣藥의 香附子, 化痰止咳平喘藥의 冬瓜子和 杏仁, 活血祛瘀藥의 莪朮, 그리고 補益藥의 沙苑子, 白扁豆, 百合, 天門冬, 白朮, 玉竹으로 총 15종 이었다.

전체약물을 중심으로 살펴보면 清熱藥, 化痰止咳平喘藥, 補益藥에 속한 약물에서 IL-5 분비량을 감소시킨 약물이 많았는데, 이는 임상에서 천식치료에 응용되는 치료처방의 구성과도 유사성을 찾아 볼 수 있다.

그러나 약물 중 농도에 따라 IL-5의 분비량의 감소 또는 증가 등으로 변화된 이유와 약물중 1 μ g/ml, 10 μ g/ml의 농도 중 어느 한쪽에서만 IL-5의 분비량 감소가 관찰된 경우 어느 쪽이 더 분비량 감소효과가 있는지에 대한 연구는 지속적으로 이루어져야 할 것이며, 임상시 사용될 수 있는 치료적 정용량과 관련해서도 연구가 필요할 것 같다.

임상에서 사용되는 천식관련 치료약은 한의학 이론에 의하여 구성된 약물로 많은 임상 효과가 보고되고 있지만, 실험적으로 밝혀진 이러한 약물을 이용한 임상시험이 진행된다면 더욱 더 효과 있는 천식 치료처방이 만들어 질것으로 생각된다.

본 연구는 한약재들의 IL-5 분비량의 억제 효능 검정을 통해 천식 치료제로서의 가능성 여부를 살펴보았다. 향후 IL-5 분비량의 감소를 관찰한 약재들의 기전에 관한 연구 및 처방으로서 IL-5 분비 억제 효과에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

白鼠의 비장세포에서 여러 가지 한약재들이 효능별로 IL-5의 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 비장세포 배양하여 한약재를 투여한 뒤 48시간 후 상층액을 거두어 sandwich ELISA를 이용한 IL-5 저해효과를 알아보는 in vitro 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 1 μ g/ml과 10 μ g/ml 농도 모두에서 IL-5의 분비량 감소를 보인 약물은 木賊草, 山豆根, 牡丹皮, 瓜蒌根, 密蒙花, 香附子, 冬瓜子, 杏仁, 莪朮, 沙苑子, 白扁豆, 百合, 天門冬, 白朮, 玉竹으로 총 15종 이었다.
2. 1 μ g/ml 농도에서는 沙苑子, 白扁豆, 白薇가 30% 이상 IL-5 분비량을 감소시켰다.
3. 10 μ g/ml 농도에서는 白扁豆, 沙苑子, 旋覆花, 百合, 冬瓜子, 山豆根, 熟地黃이 30% 이상 IL-5 분비량을 감소시켰다.
4. 清熱藥, 化痰止咳平喘藥, 補益藥에 속한 약물에서 IL-5분비량 감소를 보인 약물이 많았다.

參 考 文 獻

1. Margaret J Leckie, et al. Effects of an Interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *The Lancet* 356.Dec.23/30,2000.
2. Busse WW, et al. *Allergy principles & practice*. 5th ed. St. Louise: Mosby.1998:838-58.
3. 대한 천식 및 알레르기 학회. 천식과 알레르기. 서울:군자출판사:2002, p.237-56, p.279-85.
4. A.P.Sampson. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*. 2002;3(sup.1):22-7.
5. 김미경. 천식과 호산구. *알레르기*. 1996;16(1): 8-14.
6. Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150:S42-S49.
7. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:영림사:1999, p.121, 160, 347, 409, 447, 531.
8. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 금은화가 천식 유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2005;26(1): 129-42.
9. 문성훈, 정희재, 정승기, 이형구. 목단피가 천식 유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2005;26(1): 199-212.
10. 최성민. 알레르기 질환의 치료로서 CpG DNA. *Korean J. Pediatr*. 2005;48(3):251-9.
11. Mossmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
12. Holgate ST. Asthma and allergy-disorders of civilization? *Q.J.Med*. 1998;91:171-84.
13. Chris Corrigan, Sabian rak. *Allergy*. London: Mosby:2004, p.26.
14. 한용철. 임상호흡기학. 서울:일조각:2002,p.208.
15. 全國韓醫科大學 肺系內科學教室 編著. 東醫肺系內科學. 서울:도서출판 국진. 2004:192-3.
16. 대한 천식 및 알레르기 학회. 천식과 알레르기. 서울:군자출판사:2002, p.237-56, p.279-85.
17. 대한결핵 및 호흡기학회. 호흡기학. 서울:군자출판사:2004, p.325-6. 333
18. Heaton T, Mallon D, Venaille T, Holt P. Staphylococcal enterotoxin induced IL-5 stimulation as a cofactor in the pathogenesis of atopic disease: the hygiene hypothesis in reverse? *Allergy*. 2003 Mar;58(3):252-6.
19. Kotsimbos AT, Hamid Q. IL-5 and IL-5

- receptor in asthma. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92 Suppl 2:75-91.
20. Tanaka H, et al. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. Am J Respir Mol Biol. 2004 Jul;31(1):62-8.
21. Hamelmann E, Gelfand EW. Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness. Int Arch Allergy Immunol. 1999 Sep;120(1):8-16.
22. Blumchen K, Kallinich T, Hamelmann E. Interleukin-5: a novel target for asthma therapy. Expert Opin Biol Ther. 2001 May;1(3):433-53.
23. InWauwe JV. Interleukin-5 as a potential target for asthma treatment. Drug News Perspect. 2000 May;13(4):197-205.
24. Margaret J Leckie, et al. Effects of an Interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. The Lancet 2000;356:2144-8.
25. 김성근, Hirohito Kita, 유진호, 고영률. 기도내 호산구성 염증에서 IL-5와 Eotaxin의 역할. 천식 및 알레르기. 2004;24(1):127-136.
26. 최준호, 박성우, 장안수, 이준혁, 김도진, 박중숙, 박춘식, 장희경, 안미현, 민지원. 호산구성 기관지염과 천식의 객담내 IL-5과 IL-13:기도 과민성과의 연관. 천식 및 알레르기. 2005; 25(3),sep:210-216.
27. 원희철, 김영수, 정상현, 이성호, 류재천, 김미경. IL-5에 의한 호산구 활성화 및 생존에 미치는 Sophoricoside의 억제능. 천식 및 알레르기. 2003;23(3):459-66.