

## 靑皮가 천식유발 백서에서 VEGF에 미치는 영향

이해자

원광대학교 한의과대학 소아과교실

### Effects of *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* on the Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF) in the bronchial asthma mouse model

Lee Hai Ja

Department of pediatrics, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

**Objective:** Author evaluate the effects of *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* for the bronchial asthma using assesment on the vascular endothelial growth factor after *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* was intravenously administered Ovalbumine(OVA)-sensitized and -challenged mice.

**Material and Methods:** Twenty-four female mice, 8-10 weeks old and free of murine specific pathogens, were used. Four mice out of twenty-four were not sensitized and the rest of them were sensitized by intraperitoneal injection of OVA. Of the sensitized mice, ten mice didn't administrate *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* and the other ten mice administrated *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*. Mice were sensitized on the first and fourteen days intraperitoneal injection of 20  $\mu$ g OVA. After 21<sup>st</sup>, 22<sup>th</sup> and 23<sup>rd</sup>, the initial sensitization, the mice were challenged for 30 minutes with an aerosol of 1% OVA in saline. *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* administered 200mg/kg in the tail of the mouse, one a day, for 7 days and beginning 14 days after first sensitization. Bronchoalveolar lavage was performed 72 hours after the last challenge, and total cell numbers in the BAL fluid were count. Also, level of VEGF in the BAL fluid was measured by Enzyme immunoassays and Western blot analysis.

**Results:** Total cell numbers in BAL fluid were significantly greater than from 72 hrs after OVA inhalation compared with cell numbers in the control group. However, there was no difference of the total cell numbers between OVA-challenge groups without *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*, and OVA-challenge with *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*. Enzyme immunoassay revealed that VEGF levels in the BAL fluids were significantly increased 72 hrsafter OVA inhalation compared with levels in the control group. After administration of the *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*, the levels of the VEGF in BAL fluids 72 hrs after OVA

inhalation reduced dramatically. Western blot analysis revealed that VEGF protein levels were increased in the all mice which were challenge with OVA, without administered *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*, compared the normal mouse. However, in the groups of the administered *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*, the VEGF protein level markedly decreased.

**Conclusion:** *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* might affect the treatment of the bronchial asthma as a inhibition of the VEGF.

**Key word:** *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*, VEGF, asthma

접 수 : 2006년 3월 31일, 채택일자: 2006년 4월 22일

교신저자 : 이해자, 전북 군산시 지곡동 29-1 군산의료원 한방소아과

(Tel. 063-472-5263, E-mail: yibeads@wonkwang.ac.kr)

## I. 緒 論

喘息은 특이적인 알레르겐이나 비 특이적인 자극에 의하여 기관지 점막부종, 점액분비증가 및 기관지 평활근의 수축이나 경련이 일어나며, 이로 인해 가역적이고도 반복적으로 광범위한 기도 협착이 특이적인 증상으로 나타내는 증후군을 말한다. 병리학적인 측면에서는 기도에 호산구가 증가되고, 점액분비를 증가시키는 술잔세포(goblet cell)가 비후되어 있으며, 여러 가지 원인에 대해 기도가 과민반응을 보인다<sup>1,2)</sup>.

喘息에서 나타나는 기도염증은 활성화된 비만세포(mast cell), 호산구(eosinophil), T cell 과 같은 염증세포가 기관의 점막과 상피세포에 침착하고 이들 세포에서 다양한 종류의 cytokines와 chemokines가 분비되어 발생한다. 최근에는 이런 cytokines와 chemokines의 분자생물학적인 연구를 통하여 그 기전을 밝히고자 노력하고 있으며, 여러 가지 치료 약제를 투여함으로써 천식에 작용하는 cytokines의 역할과 새로운 천식 약제의 개발에 많은 관심을 보이고 있다<sup>3-5)</sup>.

기관지 천식의 유발인자나 원인에 대해서도 많은 보고가 있다<sup>6-9)</sup>. 병태 생리학적으로는 호산구가 기관지 천식에 매우 중요한 역할을 하

는데, 기관지 조직 내에 호산구의 침착은 많은 염증세포를 기관지 조직 내로 유도하고, 효소 PI3K를 통한 세포내 신호전달 과정 후 기도의 과민반응을 일으킨다. 최근에 이<sup>6)</sup>등은 톨루엔 디소시아나이드(Toluene diisocyanate, TDI)로 유발한 천식 쥐 모델에서 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 천식에 관여한다고 말했다. VEGF는 내피세포(endothelium)에 특이한 분화촉진인자(mitogen)로 혈관형성과 혈관신생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 혈관의 투과성을 증가시켜 혈장내 단백질이 혈관외로 쉽게 이동하여 부종과 세포의 기질에 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다. 이<sup>6)</sup>등은 대식세포, 중성구, 호산구가 기도에서 VEGF를 분비하는 데 중요한 역할을 하며, 특히 천식 환자의 경우 이런 세포와 기도의 상피세포에서 분비된 VEGF가 기도의 염증과 기도의 과민반응에 영향을 준다고 했다.

靑皮는 藜香科에 속한 常綠小喬木인 椴의 未成熟果實의 果皮를 乾燥한 것으로 疏肝破氣, 散結消痰의 효과가 있어, 疝氣, 食積, 乳腫, 乳核, 痰飲咳嗽, 胸脇胃脘疼痛 및 久瘡瘡塊를 治療하는 약제로 알려져 있다<sup>10-12)</sup>. 청피의 실험적 연구에서 가토나 쥐의 기관지 평활근에 작용하여 근 이완을 시키고<sup>13)</sup>, 교감신

경  $\beta$ 수용체와 관련되어 국소 뇌혈류량 및 혈압 증가작용, 항알러지 작용, 암세포 증식억제등의 약리작용이 있다고 알려져 있다<sup>14)</sup>. 한의학에서 오랫동안 사용된 靑皮의 성분연구에서, 靑皮에는 flavonoid glycosides계 화합물을 상당량 함유하고 있고, 그 중 methoxylated flavonoid는 기관지 평활근에 이완작용이 있는 것으로 알려져 있으나 靑皮가 천식 치료제로서의 가능성과 역할에 대해서는 밝혀진 바 없다<sup>15-20)</sup>.

이에 저자는 천식 유발 백서 모델에 靑皮를 정맥 주입한 후 기도 내에서 VEGF의 변화를 관찰함으로써 靑皮가 천식 치료에 관여하는 기전을 밝히고자 한다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

한국과학기술원(Korean Research Institute of Chemistry Technology, Daejon, Korea)으로부터 병원체에 감염되지 않고, 특이한 항원에 노출되지 않은 암컷 흰 쥐(BALB/c mice)를 구입하였고, 실험 내내 기류식 무균 실험대(laminar flow cabinet)에서 사육하였다. 이 연구에서 사용된 모든 쥐는 전북대학병원 동물사육 위원회(The Institutional Animal Care and Use Committee of the Chonbuk National University Medical School; Chonju, South Korea)에서 인정하는 기준에 따랐으며, 8-10주 된 쥐를 대상으로 하였다.

#### 1) 동물

특별한 항원에 대해서 감작되지 않은 8-10

주 된 쥐 24 마리를 대상으로 하였다. 이 중 4마리는 정상군으로써 천식을 유발하지 않았으며, 20 마리에서는 Ovalbumine(이하 OVA)를 복강내에 주입하여 천식을 유발하였다. 천식 유발은 20  $\mu$ g의 OVA(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)를 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide; Pierce Chemical Co., Rock-ford, illinois, USA) 1 mg과 혼합하여 총 200  $\mu$ l을 복강 내로 주입하였다. 처음 주입한 후 14일 후에 같은 방법으로 다시 복강 내로 OVA를 주입하여 감작시켰다. 처음 감작시킨 날로부터 21일째, 22일째, 23일째 되는 날 초음파 분무기(NE-U 12; Omron Corp., Tokyo, Japan)를 이용하여 1%(wt/vol) OVA aerosol을 30분씩을 분사시켜 세 번째 감작 시켰다. 세 번째 감작을 시킨 날로부터 72시간 후에 기관지폐 세척술(bronchoalveolar lavage, BLA)을 시행하였다(Fig. 1).

기관지폐 세척술은 sodium pentobarbitone(pentobarbital sodium, 100mg/kg body weight)을 쥐의 복강내로 과량 투여하여 희생시켰으며, 개흉을 한 후 조심스럽게 기관지삽관술을 시행하여 삽관된 관내로 소관을 삽입하였다. 그 후 phosphate buffer(이하 PBS)1 ml를 천천히 폐내에 주입한 후 다시 빼냈다. 세척술을 시행하여 얻은 액은 원심분리 후 다시 사용할 때까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 상층액을 보관하였다. 총 세포수는 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 측정하였으며, BAL액 세포는 싸이토스파인(cytospine; Shandon Scientific Ltd, Cheshire, United Kingdom)으로 준비한 후 Diff-Quik용액(Dade Diagnostics of Puerto Rico Inc, Aguada, Puerto Rico)으로 염색한 후 세포를 검사하였다. 두 검사자가 서로 독립적으로 현미경하에 검사하였으며, 무작위로 서로 다른 네 곳에서 400개의 세포를 측정하였다. 두 검사자 간의

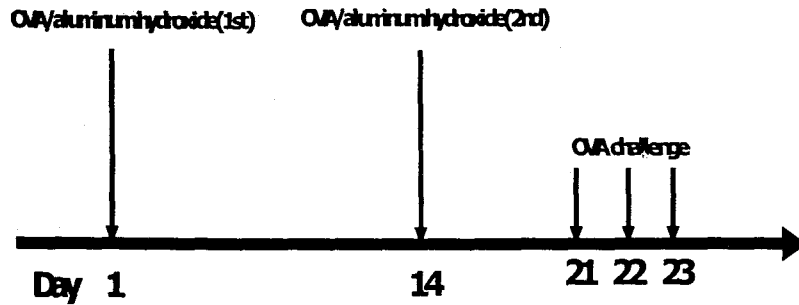


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental protocol. Mice were sensitized on days 1 and 14 by intraperitoneal injection of OVA emulsified in 1 mg aluminum hydroxide. On days 21, 22 and 23 after the initial sensitization, the mice were challenged for 30 minutes with an aerosol of 1%(wt/vol) OVA in saline using an ultrasonic nebulizer.

편차는 5% 이내였으며, 두 검사자의 평균값을 각각의 세포수로 정하였다. 2. 方法

2) 藥劑

靑皮는 군산의료원 한방병원에서 구입하였으며, 200g에 3차 증류수 1.8L을 환저플라스크에 넣고, 냉각기를 부착하여 2시간 전열기로 증탕한 후 3,000rpm에서 20분간 분리하고 진공압축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간동안 동결 건조하여 30g의 분말시료를 얻었다.

1) 藥劑의 주입방법

靑皮 분말을 증류수에 녹여 200 mg/kg을 20 마리 중 10 마리 쥐의 꼬리에 하루에 한번 정맥주사 하였다. 두 번째 OVA를 복강내에 주입한 날부터 靑皮를 7일 동안 매일 정맥주사를 하였으며, 세 번째 감작 후 72시간후에 기관지 세척술을 시행하였다(Fig. 2).

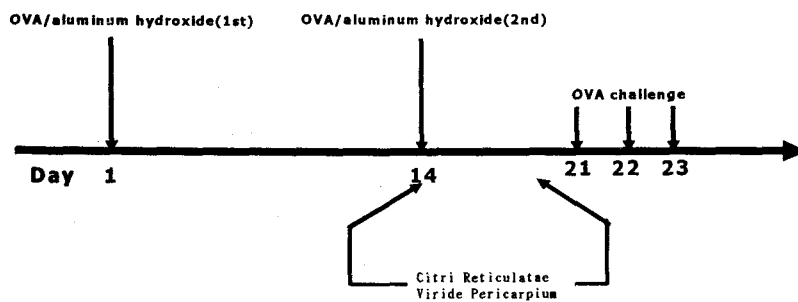


Fig. 2. *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* was administered intravenous one time per day to each treated animal from 14 days to 20 days.

## 2) Methacholine을 이용한 기도 과민반응의 측정(Determination of airway responsiveness to methacholine)

세 번째 감작을 시킨 후 3일 후에 메타콜린을 분사하여 기도과민반응을 측정하였다. 쥐를 barometric plethysmographic chamber(All Medicus Co, Seoul, Korea)에 놓은 후 약 3분 동안 평균기초검사소견을 얻은 후 분사 메타콜린의 농도를 2.5 mg/ml에서 50 mg/ml로 증가시키며 다시 3분 동안의 결과를 얻었다. 각각의 얻은 결과를 manufacturers' protocol[(expiratory time/relaxation time-1) X (peak expiratory flow/peak inspiratory flow)]에 따라 계산하였다. 이 수치는 최대흡기에 대한 최대호기의 비율을 나타내며, 호기시 시간당 폐기능을 나타낸다. Penh을 메타콜린에 대한 기도과민반응의 척도로 사용하였으며, 식염수를 투여한 후 검출된 Penh을 100%로 했을 때 메타콜린 투여후 검출된 Penh의 증가에 대한 비율을 퍼센트(%)로 나타냈다.

## 3) 혈장 삼출(plasma exudation)의 측정

폐 투과성을 측정하기 위해 에반스 블루 염색약(Evans blue dye, 이하 EBD)을 0.9% 생리식염수에 녹여서 5mg/ml의 농도로 만들었다. 이렇게 만든 EBD를 쥐의 꼬리에 20mg/kg에 주입하였으며, 30분 후에 쥐를 희생시키고 흉곽을 열었다. 그 후 5 mm의 에틸레네디아민테트라아세트 에씨드(ethylenediaminetetraacetic acid)가 들어있는 생리식염수를 대동맥에 일정한 압력으로 주입하였으며, 우측 심방으로 되 돌아오는 정맥용액의 색깔이 완전히 하얗게 되면 중단하였다. 이 때, 쥐에서 폐를 제거하여 무게를 측정하였다. EBD는 약 60°C로 유지되는 2ml 포름아미드(formamide)내에 3시간동안 쥐의 폐를 담가두어 추출하였으며, 스펙트로포

토미터(spectrophotometer; Sunnyval, CA)를 이용하여 620 nm에서 빛에 흡수되는 양을 측정하였다. 추출된 EBD는 0.01-10 $\mu$ g/ml내의 범위에서 표준화 곡선으로 보정하여 양을 측정한 후 쥐의 폐 밀리그램당 EBD의 나노그램(nanogram)으로 표기하였다.

## 4) 면역세포염색(Immunocytochemistry)

세 번째 감작 후 72시간내에 폐를 제거하였다. 폐를 제거하기 전에 폐와 기도에 고정액(0.8% formalin, 4% acetic acid)을 기도를 통하여 폐와 기도내에 가득 채운 후에 기도를 묶어서 고정액이 흘러나오지 않도록 했다. 그 후 폐 조직은 다시 10% 중성 완충 포르말린에 고정하였다. 면역세포염색을 하기 위해 파라핀을 제거한 4  $\mu$ m의 조직 또는 세포원심분리를 시행한 BAL 세포를 Vector Laboratories(Burlingame, CA)로부터 구입한 R. T. U Vectastain Universal Quick kit에 배양시켰다. 이 절편을 40°C에서 Endo/Blocker(Bio-medica, Foster City, CA)내에 5분, 그리고 펩신용액(pepsin solution)내에 4분 배양한 후 실온에서 15분 동안 정상 말 혈청내에 다시 배양했다. 이 절편을 다시 4°C에서 하루 동안 affinity-purified rabbit polyclonal VEGF IgG(Santo Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 검사한 후 10분 동안 biotinylated pan-specific Ig G에 배양하였다. 이렇게 만들어진 절편을 5분 동안 streptavidin/peroxidase complex reagent에 배양하고, 그 후 12분 동안 3-amino-9-ethylcarbazole substrate kit에 배양하였다. 정상군은 항원에 노출되지 않게 키운 쥐의 폐 조직이나 BAL 세포로 구성하였으며, OVA에 감작시킨 대조군 모델과 감작 후 靑皮를 투여한 실험군을 비교하였다.

5) BAL 액에서 VEGF의 측정:

VEGF의 범위는 manufacturer's protocol (R&D system, Minneapolis, MN)에 따라 효소 면역분석(enzyme immunoassays)에 의해 정량화 하였다. 보통 쥐에서 검출할 수 있는 VEGF의 범위는 3 pg/ml 이하이다. VEGF의 범위는 웨스턴 블롯 분석(Western Blot Analysis)의 방법을 이용하여 측정하였다. BAL 액은 OVA로 천식 유발된 쥐의 기관지에서 0.8ml 생리식염수와 함께 얻은 후 1분 동안 4000 xg로 원심 분리시켰다. 이렇게 해서 얻어진 상층액은 Bradford reagent(Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 정량화 하였으며, 3 µg의 BAL 단백질을 12% Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamide gel(SDS-PAGE gel)에 놓은 후 120 V로 90분간 전기영동(electrophoresis)시켰다.

6) 통계학적 분석

통계학적인 비교는 one-way ANOVA를 이용하였으며, 대조군과 실험군 사이의 비교는 Student's t-test를 이용하였다.

염증이 있을 때 나타내는 림프구, 호산구, 중성구가 검출되지 않았고, 정상 포식세포(100%)만 검출되었다. OVA로 천식을 유발한 대조군(n=7)의 경우 림프구, 호산구, 중성구, 포식세포가 모두 검출되었으며, 정상군과 비교시 비율에 변화를 보였다. 정상군에서 100%로 검출되었던 정상 포식세포는 7 마리 모두 9-52%(평균 25%)로 감소되었으며, 호산구는 7 마리 모두 40-81%(평균 64%)로 증가되었다. 림프구는 7 마리 모두 5-21%(평균 9%)로 증가되었으며, 중성구는 7마리 중 5마리에서 1-3%(평균 2%)으로 증가되었다. 靑皮를 투여한 실험군(n=7)의 BAL 액의 경우 靑皮를 투여하지 않은 대조군(n=7)과 비교시 각각 세포(림프구, 호산구, 포식세포)의 수는 감소하였으나 통계적으로 유의성 있게 감소하지 않았다(> 0.05). 정상군과 비교시 OVA로 감작을 한 후 靑皮를 투여한 실험군의 경우 호산구는 7 마리 모두 26-80%(평균 64%)으로 증가되었고, 림프구는 7 마리 모두 2-15%(평균 9%) 증가되었으며, 포식세포는 7마리 모두 5-72%(평균 22%)로 감소되었다. 중성구는 7마리 중 4마리에서 1-17%(평균 5%) 증가되었다.

### Ⅲ. 結 果

#### 1. BAL 액 내의 세포변화:

정상군(n=1)의 BAL 액과 비교시 천식 유발 대조군에서는 BAL 액 내에 있는 총 세포의 수는 14마리 모두 72시간 후에 증가하였다(Fig. 3). 정상군의 경우 염증이 천식으로 인한 기도의 손상이 없기 때문에 BAL 액에서

#### 2. BAL 액내의 VEGF의 변화:

효소 면역분석상 정상군에 비교하여 OVA에 의한 천식 대조군에서 VEGF의 범위가 매우 증가하였다. 정상군의 경우 VEGF의 범위가 3-50 pg/ml(평균 24 pg/ml)이었는데, 천식 대조군의 경우 40-1135 pg/ml(평균 387 pg/ml)으로 증가되었다. 그러나 靑皮를 투여한 실험군에서는 60-825 pg/ml(평균 256 pg/ml)으로 정상보다는 증가되었으나, 靑皮를 투여하지 않은 대조군에 비해서 감소되었다(Fig. 4A). 효소 면역분석에서 얻어진 결과와 웨스턴 블롯

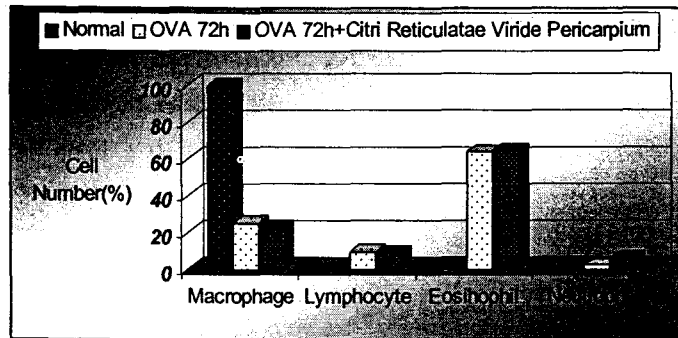


Fig. 3. Effect of *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* on total and differential cellular components of BAL fluids in the OVA-sensitized and -challenged mice. Sampling was performed at 72 h after treatment with *Citri Reticulatae Viride Pericarpium*. The numbers of each cellular component were counted. Bars represent the mean  $\pm$  SD from two independent experiments.

분석은 서로 일치하였다. 웨스턴 블롯 분석상 정상군(n=1)과 비교시 천식 유발 대조군에서 (n=7) BAL 액내에 있는 VEGF의 범위는 매우 증가하였다. 하지만, 靑皮를 주입한 실험군

의 경우 7마리 중 6마리에서 VEGF의 범위가 靑皮를 주입하지 않은 대조군과 비교시 매우 감소하였다(Fig. 4B).

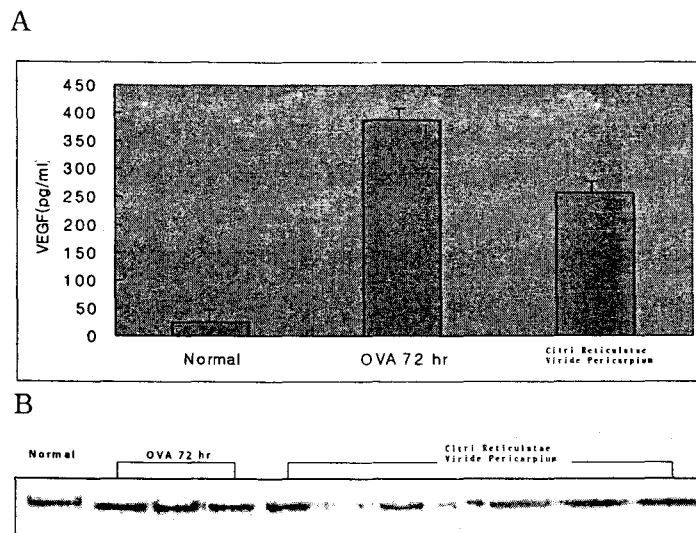


Fig. 4. Effect of *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* on VEGF secretion in BAL fluids of OVA-sensitized and -challenged mice. A, Enzyme immunoassays of VEGF. B, Western blot analysis. Data represent the mean  $\pm$  SD from two independent experiments.

3. 혈장 삼출을 통한 혈관 투과성의 측정 :

9 마리의 쥐 에서 혈관 투과성을 측정하였다. 3 마리는 정상군에서 시행하였고, 6 마리는 OVA로 천식을 유발한 대조군, 이 중 3 마리만 靑皮를 투여한 실험군으로 하였다. 정상군에서 조직 그래프당 에반스 블루의 양은 21.49-33.55  $\mu\text{g/g}$ (평균 28.32  $\mu\text{g/g}$ )이었다. OVA로 천식이 유발된 대조군의 경우 31.68-62.10  $\mu\text{g/g}$ (평균 43.92  $\mu\text{g/g}$ )로 증가되었으며, 靑皮를 투여한 실험군에서는 17.57-31.35  $\mu\text{g/g}$ (평균 22.85  $\mu\text{g/g}$ )으로 정상보다 감소되었다. EBD 분석을 통해서 OVA로 감작 후 72시간후 대조군은 VEGF의 증가로 인해 혈장의 혈액의 유출이 정상보다 증가하였다. 그러나 靑皮를 투여한 실험군에서는 靑皮가 VEGF의 분비를 억제함으로써 기관지내 혈장 유출정도가 매우 감소되었다(Fig. 5).

4. 靑皮에 대한 기도과민 반응 검사

기도과민 반응은 메타콜린의 양의 증가시킴에 따라 반응하는 Penh의 증가를 퍼센트로 측정하였다. OVA에 의해 천식이 유발된 대조군은 정상군에 비해서 메타콜린 양에 반응하는 Penh 퍼센트 곡선이 좌측으로 전위되었다. 또한, 정상군에 비교시 메타콜린의 투여량이 증가할수록 Penh의 퍼센트가 매우 증가되었다. 이에 비해서 OVA에 의해 천식을 유발 시킨후 靑皮가 투여된 실험군의 경우 靑皮를 투여하지 않은 대조군과 비교시 메타콜린 양에 반응하는 Penh 퍼센트 곡선이 우측으로 전위되었다. 이런 결과를 통해 靑皮가 OVA에 유발된 기도과민성을 감소시킴을 알 수 있었다(Fig. 6).

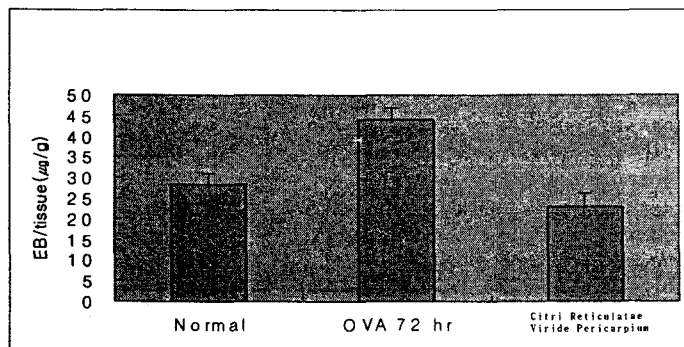


Fig. 5. Effect of Citri Reticulatae Viride Pericarpium on plasma exudation in the OVA-sensitized and -challenged mice. The EBD assay revealed that plasma extravasation was significantly increased at 72 h after OVA sensitization. However, the administration of the *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* significantly reduced the increase in plasma extravasation at 72h after OVA inhalation.



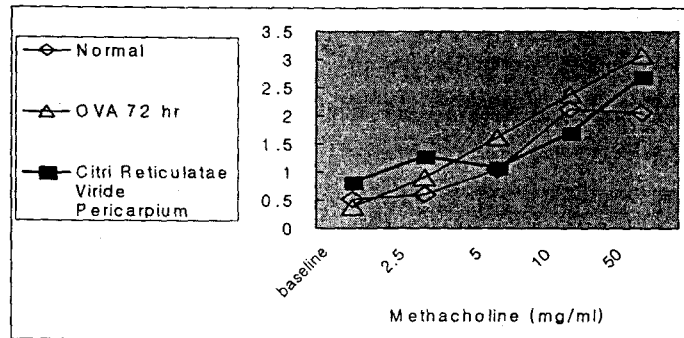


Fig. 6. Effect of OVA challenge and *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* on airway responsiveness in OVA-sensitized and -challenged mice. Mice were treated as described in Fig. 2. Airway responsiveness to aerosolized methacholine was measured in unrestrained, conscious mice. Mice were placed into the main chamber and were nebulized first with saline, then with increasing dose(2.5-50 mg/ml) of methacholine for 3 min for each nebulization. Readings of breathing parameters were taken for 3 min after each nebulization during which Penh values were determined.

#### IV. 考 察

최근 들어 천식에 기관지 미세혈관순환이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>21-22)</sup>. 기관지 염증이 있을 때, 미세혈관에서 단백질이 기관지로 빠져나오고, 이로 인해 기관지 벽의 부종과 혈관의 확장이 유발되며, 결국은 기도 직경을 좁히게 된다. 천식환자의 경우 정상인보다 기관 점막에 부종과 혈관이 확장되어 있으며, 이런 현상은 VEGF와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>7,8)</sup>.

VEGF는 내피세포성장을 유발하는 강력한 인자 중에 하나이다. 이 단백질은 혈관평활근육(vascular smooth muscle), 종양세포(tumor cell), 각질세포(keratinocyte), 섬유세포(fibroblast), 상피세포(epithelial cell), 혈관사이세포(mesangial cell) 등 다양한 인체 세포에서 생

성되며, 이 외에 대식세포(macrophage), 중성구(neutrophil), 호산구(eosinophil)에서도 분비된다. 이 단백질은 혈관형성에 중요한 역할을 하며, 혈관의 투과성을 증가시키고, 이로 인해 혈장내 단백질을 혈관의 공간으로 빠져나가게 함으로써 기관지 부종을 일으킨다. Asai 등<sup>7)</sup>은 VEGF의 양이 정상인보다는 천식환자의 가래에서 증가하였고, 천식환자에서 기도 혈관 투과성과 관련이 있다고 보고하였고, 이 등<sup>6)</sup>은 TDI로 천식 유발 쥐 모델에서 VEGF가 천식 유발에 중요한 역할을 하며, VEGF의 분비를 억제시키는 방법이 천식 치료에 좋은 방법이 될 것이라고 보고하였다. 본 연구는 OVA를 이용하여 쥐에서 천식을 유발하였으며, 효소면역분석과 웨스턴 블롯 분석을 통해서 정상 쥐에 비해서 VEGF의 양이 월등히 증가되어 천식 유발에 VEGF가 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 또한, EBD 분석을 통해 喘息에서

기도점막 VEGF의 증가는 혈관의 투과성 증가와 혈장의 유출이 증가됨을 증명할 수 있었고, 기도과민반응에서도 정상 쥐에 비해서 심한 과민반응을 보임을 알 수 있었다.

기도에서 혈관의 투과성과 함께 혈장의 유출은 기도 벽을 두껍게 하고, 부종을 초래하며, 결국에는 기도의 직경을 감소시켜 천식을 악화시키는 요인이 된다. 또한, 혈장의 유출은 기도 상피의 유지에 악영향을 주며, 기도 내에 혈장이 있는 경우, 기도 섬모의 기능을 떨어뜨리고, 점액의 정화를 감소시킨다. 더불어 혈장 단백질은 염증세포, 상피세포와 혼합되어서 점액의 점도를 더욱 증가시킨다.

본 실험에서 VEGF의 증가는 기도의 직경과 기도의 과민성과 매우 밀접한 관련이 있었고, OVA에 의해 유발된 천식 쥐 모델에서 VEGF가 기도 직경을 폐쇄시키고, 기도의 과민반응을 초래하는데 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

기관지 천식의 약물으로, 과거에는 기도 수축을 회복하여 천식 증상을 호전시키는 기관지 확장제가 널리 사용되었으나, 최근 기관지 점막의 알레르기 염증 반응을 치료하는 항염증 약제가 사용되고 있다. 스테로이드제는 부종과 기도의 수축과 혈관의 과 투과성으로 인한 염증을 억제시키고, 알레르기성 염증세포에 작용하여 사이토카인이나 화학매체의 유리를 억제하고, 베타 2교감신경 수용체 수를 증가시키고 활성화시켜 베타 2 항진제에 대한 반응도를 높이고, 기관지나 폐포에 있는 상피세포에서 VEGF의 분비를 억제시키는 것으로 알려져 있다. 하지만 스테로이드제를 전신적으로 장기간 사용하면 당대사이상, 식욕증가, 혈압상승, 체중증가, 월상안(moon face), 기분변화, 위궤양, 대퇴골의 무혈성 괴사, 골다공증, 백내장, 근육염 등이 나타날 수 있으며, 소아에서는 성장장

애가 나타나거나 심한 경우 면역기능이 감소될 수 있다<sup>19)</sup>. 한의학에서 천식은 呼吸急促하고 喘鳴有聲한 症狀을 주 증상으로 하는 哮喘證에 해당한다<sup>23,24)</sup>. 哮喘의 원인은 身體가 평소 부터 虛弱하거나, 肺에 痰飲이 있거나, 風寒에 外感되거나, 七情, 飲食失調, 運動勞力過度, 驚恐, 誤刺등이고<sup>23-5)</sup>, 痰結喉間 與氣相擊이라 하여 기관지 평활근의 수축으로 기관지 내강이 좁아지는 데다 점막의 부종과 진하고 끈끈한 점액이 과잉 분비되어 기관지 폐색의 증세를 일으킨다. 그 치료에서는 虛實과 寒熱을 구분하여, 發作期에는 風寒, 痰熱, 痰濕, 寒痰으로 나누어서 치료하며, 緩解期에는 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛를 補強하는 치료 방법을 사용하고 있다<sup>23)</sup>. 痰飲은 喘息의 病理的인 結果로서 症狀 유발의 요인이 되기도 하고, 이 痰飲이 제거되지 않으면 喘息은 완치될 수 없다고 하는 한의학적 관점은 현대의학에서 천식을 기도의 만성염증에 의하여 유발된 증상으로 파악하고 있는 기전과 일맥 상통한다<sup>26)</sup>.

본 연구는 천식에 대한 한약재의 효과를 연구하여 치료기전을 밝히고자 하였다.

천식에 사용되어온 韓藥劑로써 加味瀉肺散이나 解表二陳湯등 處方에 관한 연구는 있었지만 단일 藥劑로써 靑皮의 작용기전에 대해서 알려진 바가 거의 없었다. 哮喘證의 治療에 있어서 韓醫學에서는 급성 발작기에 병리적 분비물인 痰을 주로 治療하는 二陳湯을 응용하였다. 二陳湯은 半夏, 陳皮, 茯苓, 甘草로 구성되며, 半夏는 和胃止嘔, 燥濕祛痰, 散結消腫하는 効能이 있으므로 嘔吐, 咳嗽, 多痰, 胸脘痞悶等の 症狀에 사용되며, 陳皮는 理氣健脾, 燥濕化痰의 効能으로 脘腹脹滿, 惡心, 嘔吐, 氣逆喘咳, 痰壅滯滯等の 症狀에 사용되며, 茯苓은 分利濕熱, 行水の 効

能이 있고, 甘草는 補脾益氣, 清熱解毒, 潤肺止咳, 調和諸藥의 効能이 있어 脾虛, 胃弱, 瘡瘍腫毒, 咳嗽, 喘息 등에 응용된다. 解表二陳湯은 기관지 평활근 수축에 현저한 이완효과를 나타내어 기관지 수축으로 인한 기관지 喘息 및 哮喘性 기관지염에 유효한 처방으로 알려져 있다<sup>27)</sup>.

천식과 靑皮의 관계는 임상적으로 解表二陳湯 加減方 등에서 祛痰의 作用으로 사용되는 陳皮에서 찾아볼 수 있는데, 陳皮는 橘의 成熟 果皮이고, 靑皮는 橘의 未成熟 果皮로 그 구성 성분이 거의 비슷하고, 健胃의 効能은 靑皮와 陳皮가 유사하지만 靑皮는 行氣시키는 作用이 보다 強하여 實證에 應用되고 있다<sup>10-12,28)</sup>.

靑皮는 각종 氣滯로 인해 氣滯則血滯가 發生되거나, 正氣가 損傷되어 氣虛則 血瘀가 誘發되는 곳에 疏肝破氣시켜 氣滯를 풀어주고 미세 기관지 혈액의 흐름을 원활히 해준다. 靑皮는 辛味로 散하고, 味苦하여 降하며, 性溫으로 血脈을 소통시키기 때문에 疏肝破氣, 消積和滯하는 作用이 있어 대부분 氣滯로 인한 증상에 사용되거나 임상상 活血之制와 배합하여 氣滯血瘀나 血瘀脇痛等에 응용되고 있다. 최근 虛血性 腦疾患等에서 腦에 충분한 양의 血液을 공급받지 못하는 腦血管疾患에서 靑皮에 관한 연구가 진행 중이다<sup>29,30)</sup>. 또한 최근 중국에서 靑皮의 약리작용에 관한 연구에서 동물 실험을 통해 靑皮가 痰을 배출하기 쉽게 하여 분비물의 배출용량을 늘리고, 靑皮 주사액이 기관지 경련성 수축에 유효한 효과가 있다고 하여 靑皮의 祛痰平喘 作用을 밝혀내고 있다<sup>31)</sup>.

지금까지의 실험 연구들은 靑皮가 기관지 평활근에 작용하여 기관지 평활근을 이완시킨다는 보고에 국한되어 있다. Acetylcholine의

중간유효량(ED<sub>50</sub>)으로 수축을 유발시킨 후, 靑皮를 투여할 때 靑皮의 농도가 증가함에 따라 유의한 기관지평활근의 이완효과가 나타난 보고가 있지만, 그 기전에 대해서는 밝혀지지 않고 있다<sup>13)</sup>.

본 실험을 통해서 靑皮의 천식 치료 효과는 VEGF의 분비를 억제시키는 것과 관련이 있음을 알게 되었다. 이런 결과는 최초로 천식의 유발에 중요한 원인인 VEGF에 靑皮가 직접 관련되어 있음을 증명한 것이다. 호소 면역분석과 웨스턴 블롯 분석을 통해서 천식 대조군에서 VEGF의 양이 정성적으로 정량적으로 감소함을 증명하였고, 또한 EBD 분석을 통해서 기도내로 혈장의 유출이 현저하게 감소됨을 알 수 있었다. 또한 기도과민 검사를 시행했을 때, 靑皮를 투여하지 않은 대조군에 비해서 과민도가 감소하였는데, 이는 靑皮가 천식의 치료제로써 기도의 직경을 증가시킴을 알 수 있었다.

이 실험이 통상적으로 상용되고 있는 VEGF 억제제와 한 가지 차이점을 보였다. VEGF 억제제는 BAL 세포 검사상 염증세포의 수를 감소시키는 것으로 보고되고 있다. 이<sup>6)</sup> 등도 VEGF억제제를 투여시 호산구가 현저하게 감소되었다고 보고하였다. 그러나 이번 실험에서 靑皮는 염증세포에는 전혀 영향을 주지 않고, VEGF에만 관여하였다. 본 연구에서 靑皮를 투여한 실험군과, 靑皮를 투여 하지 않은 대조군에서 천식을 유발하는 세포들 수에 차이를 보이지 않았다. 따라서 靑皮는 호산구보다는 기관지 상피세포에 작용하여 VEGF의 분비를 억제함을 예측할 수 있었다<sup>12-4,32-3)</sup>.

이런 소견은 VEGF 분비의 기전에서 靑皮가 기존의 VEGF 억제제와는 다른 신호전달체계를 통해 VEGF의 분비를 감소시킬 가능성이 있으며, 따라서 세포내에서 靑皮의 역할을 규명하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 靑皮를 구강으로 투여하지 않고, 정맥투여를 하였다. 따라서 200mg/kg의 용량이 VEGF의 분비를 효과적으로 억제하였지만 구강투여를 한다면 용량을 더욱 증가시켜야 할 것으로 생각되며, 기존 한약의 흡수방법이 구강투여인 점등을 미루어 효과적인 구강투여 용량에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 향후 단일 약제로써 靑皮에 대한 독성검사가 추가로 필요할 것으로 생각된다.

저자는 본 연구에서 천식 유발 백서를 통해서 靑皮가 VEGF의 분비를 억제시켜서 천식 치료에 효과가 있음을 처음으로 밝혔으며, 천식 치료제로써 靑皮의 역할은 VEGF의 분비를 억제시켜서 기도의 부종을 감소시킴으로써 기관지 내경을 확장시켜 증상을 호전시킴을 알 수 있었다.

결론적으로 靑皮는 기관지의 과민반응과 염증반응에 관여하는 혈관내피성장요인의 작용을 억제시킴으로써 천식 치료에 효과가 있음을 알 수 있었다.

## V. 結 論

청피가 천식 치료에 관여하는 기전을 밝히고자 OVA에 의한 천식 유발 대조군과 청피를 정맥 주입한 실험군에서 기도 내에서 VEGF의 변화를 관찰함으로써 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 효소 면역분석상 정상군과 비교하여 OVA에 의한 천식 대조군에서 VEGF의 범위가 매우 증가하였다. 웨스턴 블롯 분석상 정상군과 비교시 OVA로 감각 후 靑皮를 투여하지 않은 대조군, 청피를 투여한 실

험군 모두에서 기관지 세척액내에 혈관내피성장요인이 증가하였다. 그러나 청피를 투여한 실험군은 대조군에 비해 VEGF가 현저하게 감소하였다.

2. EBD 분석을 통해서 OVA에 의한 천식 대조군은 VEGF의 증가로 인해 혈장의 혈관의 유출이 정상보다 증가하였다. 그러나 靑皮를 투여한 실험군에서는 靑皮가 VEGF의 분비를 억제함으로써 기관지내 혈장 유출정도가 현저하게 감소되었다.
3. OVA에 의해 천식이 유발된 대조군은 정상군에 비해서 메타콜린 양에 반응하는 Penh 퍼센트 곡선이 좌측으로 전위되었으며, 靑皮가 투여된 실험군의 경우 대조군에 비해 메타콜린 양에 반응하는 Penh 퍼센트 곡선이 우측으로 전위되었다. 이런 결과를 통해 靑皮가 OVA에 유발된 기도과민성을 감소시킴을 알 수 있었다.
4. BAL 액상 靑皮를 투여하지 않은 대조군과 靑皮를 투여한 실험군 사이에 기관지 천식의 유발에 중요한 역할을 하는 호산구 세포의 수에 차이가 없었다.

이러한 결과는 靑皮가 호산구 세포의 감소로 인한 VEGF의 감소를 유발하지 않으며, 오히려 기관지 상피세포 또는 호산구에서 VEGF의 생성 감소나 분비의 감소를 유발하여 VEGF의 작용을 억제시킴으로써 천식 치료에 효과가 있을 것으로 생각된다.

## 參考文獻

1. 대한 천식 및 알레르기 학회. 천식과 알

- 레르기 질환. 서울:군자출판사. 2002:244-54.
2. 해리슨 내과학 편찬위원회. Harrison's 내과학. 서울:도서출판 정담. 1997:1258-64.
  3. 강세용, 심재정, 조재연. 천식 환자에서 증상의 정도에 따른 IL-4 유전자 다형에 관한 연구. 결핵 및 호흡기 질환. 1998; 46(3):529-35.
  4. 이숙영, 윤형규, 신 윤. 기관지 천식에서 기관지세포세척액내 IL-10과 기도염증 정도의 연관성. 결핵 및 호흡기 질환. 1999; 46(1):44-52.
  5. Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM. Alcinada cytokines and asthma. J of investigational allergology and clinical immunology. 1997;7(5):270-3.
  6. Lee YC, Kwak YG, Song CH. Contribution of vascular endothelial growth factor to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. J Immunol. 2002;1(168):3595-600.
  7. Asai K, Kanazawa H, Kamoi H, Shiraishi S, Hirata K, Yoshikawa J. Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. Clin Exp Allergy. 2003;33:595-99.
  8. Kanazawa H, Asai K, Hirata K, Yoshikawa J Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Med. 2003;1(114):354-8.
  9. Boulay ME, Boulet LP. Airway response to low-dose allergen exposure in allergic nonasthmatic and asthmatic subjects: eosinophils, fibronectin, and vascular endothelial growth factor. Chest. 2003;123:430.
  10. 신민교. 임상본초학. 서울:도서출판 영림사. 2002:470-2.
  11. 김택제, 이재성, 이경미. 진피와 靑皮중 Flavonoid Glycosides의 분리와 정량. J. of korean society of Analytical Science. 1999;4(2):191-5.
  12. 신문풍 출판 공사. 중약대사전. 대북: 1986:351-2.
  13. 이윤석. 각종 평활근에 미치는 靑皮의 효과. 원광대학교 대학원. 1998:11-2.
  14. 김남순. 청피의 실험적 연구. 원광대학교 대학원. 1998:22-3.
  15. 이원석, 정현우. 靑皮 활성분획이 일과성 뇌허혈 병태모델의 뇌혈류역학에 미치는 실험적 효과. 동의생리병리학회지 2001;15(6):899-904.
  16. 정현우, 오찬호, 은재순. 靑皮가 마우스의 면역세포에 미치는 영향. 대한동의 병리학회. 1998;12(2):55-62.
  17. Baik, S. Study on components and the biological activity of flavonoid from Pericarpium Citri Nobilis. Graduate School of Wonkwang Univ. 1999:18.
  18. Kinoshita T, Sameshita M, Sankawa U. Isolation of a sampathomimetic substance from chines medical drugs originated from Citrus species. Shoyakugaku Zasshi. 1979;33:146.
  19. Chun Y, Sankawa U. Screening of antiallergic effect in traditional medicinal drugs and active constituents

- of Aurantii Fructus Immaturus. *Shoyakugaku Zasshi*. 1989;43(4):314.
20. Satoh Y, Tashiro S, Satoh M, Fujimoto Y, Xu X-Y, Ikekawa T. Studies on the bioactive constituents of Auratii Fructus Immaturus. *Yakugaku Zasshi*. 1996;116(3):244.
21. Demoly P, Maly FE, Mautino G, Grad S, Gougat C, Sahla H, Godard P, Bousquet J. VEGF levels in asthmatic airways do not correlate with plasma extravasation. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29:1390-94.
22. Asai K, Kanazawa H, Otani K, Shiraishi S, Hirata K, Yoshikawa J. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin levels in induced sputum from asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:571-5.
23. 이형구, 정승기. 동의폐계내과학. 서울. 민서출판사. 1991;187-195.
24. 허준. 동의보감. 서울: 남산당. 1981:480-1.
25. 上海中醫學院. 中醫內科學. 香港: 商務印書館. 1983:181-4.
26. 黃金城. 滌痰, 逐瘀, 固本治療哮喘的經驗. *대한한방소아과학회지*. 2001;15(1):39-45.
27. 김승수, 정희재, 정승기, 이형구. 해표이진탕이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*. 1999;19(2):59-73.
28. 백순옥. 靑皮로부터 분리한 Flavonoid의 성분과 생리활성에 관한 연구. *원광대학교 대학원*. 1999:79-80.
29. 노영호, 정현우, 이원석. 靑皮활성분획이 허혈성 뇌손상에 미치는 실험적 연구. *동의생리병리학회지*. 2002;16(5):893-8.
30. 이금수, 정현우, 이원석. 靑皮가 뇌혈류 역학에 미치는 실험적 연구. *동의생리병리학회지*. 2002;16(1):104-10.
31. 國家中醫藥管理局 中華本草編委會. 中華本草. 上海: 上海科學技術出版社. 1998:1007-11.
32. Lee YC, Lee HK. Vascular endothelial growth factor in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 ;107:1106.
33. Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:1034-8.