

加味地黃湯이 천식모델 생쥐의 CD4, CD8 세포에 미치는 영향

김운길 · 박양춘*

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Effect of *Kamijihwang-tang* on CD4, CD8 Cells in OVA-induced Asthmatic Mice

Woon Gil Kim, Yang Chun Park*

Division of Respiratory System, Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

The purpose of this research is to examine the effects of *Kamijihwang-tang* (KJHT) on CD4+ T cells and CD8+ T cells in ovalbumin (OVA)-induced asthmatic mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of KJHT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporine A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lung, peripheral lymph node (PLN), and spleen were removed and CD4+ T cells and CD8+ T cells for analyzed by flow cytometer. Number of CD4+ T cells in lung, PLN, spleen of the KJHT group (400 mg/kg) were significantly decreased compared with that of control group. Number of CD8+ T cells in lung, PLN, spleen of the KJHT group (200 mg/kg) were significantly decreased compared with that of control group. The results of this study suggest that KJHT alleviated asthmatic hyperactivity through CD4+ and CD8+ T cells. Further study of relative cytokines is expected.

Key words : Kamijihwang-tang (加味地黃湯, Jiaweidihuang-tang), asthma, CD4+ T cells, CD8+ T cells

서론

기관지천식에서 T세포는 염증세포를 기도내로 끌어 모으고 활성화시켜 기관지천식 병인에 중요한 역할을 한다. CD4+인 보조T세포(이하 Th세포)는 사이토카인 분비양상에 따라 Th1세포와 Th2세포로 나누는데 Th2세포는 IL-3, IL-4, IL-5 등의 사이토카인들을 분비하여 기관지천식 연구의 초점이 되어왔다^{1,2)}. CD8+ 세포는 세포독성T세포(이하 Tc세포)로 Th세포와 마찬가지로 사이토카인 분비 양상에 따라 IL-2, IFN- γ 를 분비하는 T cytotoxic 1(Tc1) 세포와 IL-4, IL-5 등을 분비하는 T cytotoxic 2(Tc2) 세포로 분류하게 되었고³⁾, 이후 기관지천식과 같은 알레르기성 기도염증에서 CD8+ T세포의 역할에 대한 관심이 높아졌다. 따라서 CD4+ T세포와 CD8+ T세포에 대한 한약물의 효과를 연구하는 것은 기관지천식의 치료에 있어 중요한 목표가

될 수 있다.

천식은 韓醫學에서 哮喘證의 범주에 속하는 질환으로 外感風寒, 痰濕內盛으로 인한 實證과; 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛로 인한 虛證으로 나누어 각각 宣肺定喘, 化痰定喘하거나 養肺定喘, 補益心腎 納氣定喘, 瀉肺化痰 補益腎元하는 처방을 사용하는데⁴⁾ 加味地黃湯은 六味地黃湯⁵⁾에 麻黃, 杏仁, 甘草, 阜角子, 黃芩, 款冬花, 桑白皮, 牛膽南星 4g과 沙蔘, 山楂肉, 生薑 6g을 가한 처방으로 기관지천식을 비롯한 虛證의 호흡기질환에 다용하는 처방이다. 최근 천식과 관련하여 다양한 單味 및 處方을 이용한 염증반응이나 면역기능에 관한 실험이 이루어지고 있고⁶⁻⁸⁾, 동물 천식 모델을 이용한 연구⁹⁻¹¹⁾와 천식환자를 대상으로 임상연구¹²⁻¹⁵⁾도 활발하게 이루어지고 있으나 加味地黃湯에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 加味地黃湯이 면역세포에 미치는 영향을 규명하고자 기관지천식 생쥐모델을 대상으로 폐, 말초림프절, 비장 조직의 CD4+세포와 CD8+세포의 수의 변화를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 박양춘, 청주시상당구용담동 대전대학교청주한방병원 1내과

· E-mail : omdpyc@dju.ac.kr, · Tel : 043-229-3704

· 접수 : 2007/03/02 · 채택 : 2007/03/15

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

동물은 체중 18-25g의 C57BL/6(샘타코, Korea) 생쥐로, 실험 당일까지 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상; 삼양사, Korea)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2°C, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00-19:00), 조도 150-300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 加味地黃湯(Kamijihwang-tang, KJHT)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Herb Composition of Kamijihwang-tang(KJHT)

구성약물	생약명	용량(g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	12
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	6
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	6
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	4
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	4
白茯苓	<i>Poria</i>	4
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	4
杏仁	<i>Armeniaca Amarum Semen</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
沙參	<i>Adenophorae Radix</i>	4
阜角子	<i>Gleditsiae Spina</i>	4
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	4
山楂肉	<i>Crataegii Fructus</i>	6
桑白皮	<i>Mori Cortex</i>	4
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	6
牛膽南星	<i>Arisaematis Rhizoma</i>	4
Total amount		76

2. 시약 및 기기

1) 시약

Chicken egg albumin(ovalbumin : OVA), aluminum potassium sulfate (Alum), trichloroacetic acid, SRB, amphotericin, antibiotics, DNase, collagenase, chloroform, collagenase, RPMI-1640 배양액, isopropanol, 적혈구 용혈액(RBC lysis solution), ethidium bromide (EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, magnesium chloride (mgCl₂)는 Sigma사(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)는 Hyclone사(USA) 제품을 사용하였으며 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2) 기기

기기는 열탕추출기(대웅 Co., Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi, Switzerland), freeze dryer (EYELA, Japan), CO₂ incubator (Forma Scientific, USA), clean bench (Vision Scientific, Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson,

France), water bath(Vision Scientific, Korea), vortex mixer(Vision Scientific, Korea), spectrophotometer(Shimadzu, Japan), centrifuge(Sigma, USA), deep-freezer(Sanyo, Japan), flow cytometometer (Becton Dickinson, USA), thermocycler system(MWG Biotech, Germany), ice-maker(Vision Scientific, Korea), homogenizer(OMNI, USA), plate shaker (Lab-Line, USA) 등을 사용하였다.

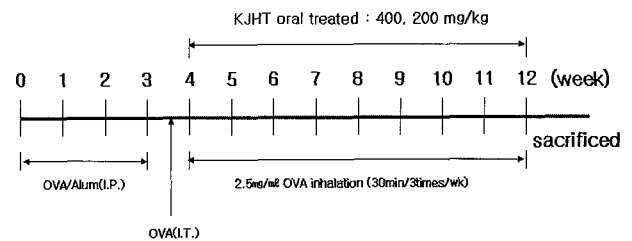
3. 방법

1) 加味地黃湯 추출물 분리

KJHT 4첩 분량을 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하였다. 추출액을 여과한 후 감압 증류장치(B-480, BUCHI, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결건조기(FDU-540, EYELA, Japan)를 이용하여 18.5 g의 분말을 얻었다. 완전 건조한 KJHT을 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 기관지 천식 생쥐 모델

500 µg/µl의 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate(Alum)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10 N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 × g 에서 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리한 OVA/ Alum 침전물을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후, 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강 내로 주사하여 전신 감작시켰다. 이후 4주째에 생쥐를 마취한 후, 난알부민(500 µg/ml) 100 µl를 기관지로 주사하여 직접 투여(I.T. : intra trachea)하였다. 5주째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰다. 이 때 음성대조군(wild type)은 PBS 또는 Alum 만을 복강과 기관에 주사하고, 분무기로 흡입시켰다(Scheme 1).



Scheme 1. Asthma OVA-induced mouse model.

3) 경구 투여

OVA/Alum로 전신 감작 시킨 후 4주째부터 KJHT (400, 200 mg/kg)을 일주일에 5회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구 투여하였다.

4) 폐장, 말초림프절 및 비장의 면역세포수 측정

실험 종료 후 OVA 천식 생쥐를 ethyl ether로 마취시킨 후 폐장, 말초림프절(peripheral lymph node; PLN), 그리고 비장을 분리하여 buffered ammonium chloride(ACK) 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시켰다. 이를 다시 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색하여 총 면역세포수를 측정하였다.

5) 폐 적출 및 호산구세포 분리

폐포세척액에서 세포를 분리하고, 폐의 무게를 측정 한 후, 폐조직을 잘게 절편하였다. 여기에 2% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 5분간 1,800 rpm 배지에서 원심분리하고, 5 ml의 RPMI1640 배양액에 50 μ l의 collagenase IV(100 μ g/ml)를 가한 후 37 $^{\circ}$ C shaking 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 2분간 방치한 후 상층액을 분리하고 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배양액에 세포를 포집하였다. 이 과정을 5회 이상 시행하여 폐 호산구세포를 분리하였다. 최종 분리된 폐 호산구세포는 배양액으로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들로부터 적혈구 용혈용액(ACK lysing buffer; 8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 37 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다.

6) 유세포 분석

실험 종료 후 비장, 말초림프절, 폐를 각각 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 D-PBS로 5분간 원심분리(1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 이를 잘게 chopping한 후, collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37 $^{\circ}$ C shaker (180 rpm, 20 min) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 이들 세포들을 ACK 용액(8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 L of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 실온에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 총 세포수를 측정하였다. 측정된 비장, 말초림프절, 폐의 세포를 5 \times 10⁵ 세포로 조정 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다.

각각에 FITC-anti-CD4, FITC-anti-CD8을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4+, CD8+ 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대세포수(absolute number)를 산출하였다.

7) 통계처리

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

결 과

1. CD4+ 세포 수에 미치는 영향

1) Lung

Spleen에서 분리한 세포에서 CD4+ 세포 수를 측정 한 결과, 정상군은 1.4 \pm 0.1 (\times 10⁵), 대조군은 13.0 \pm 0.8 (\times 10⁵), 양성대조군 (CsA)은 4.4 \pm 0.0 (\times 10⁵), KJHT 400 mg/kg 투여군은 2.6 \pm 0.4 (\times 10⁵), 200 mg/kg 투여군은 6.2 \pm 1.5 (\times 10⁵)로 나타나, 대조

군에 비하여 KJHT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (**p<0.001, ***p<0.001) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 1).

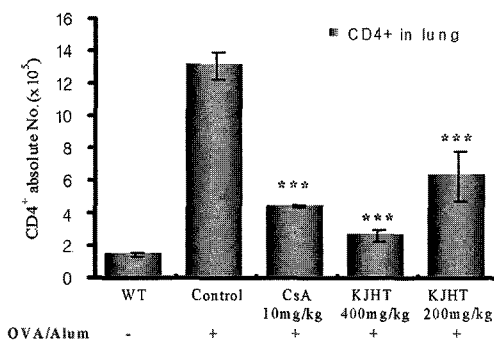


Fig. 1. Effect of KJHT extract on CD4+ absolute cell number in lung of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of KJHT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporine A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lung was removed and CD4+ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.001).

2) PLN

PLN에서 분리한 세포에서 CD4+ 세포 수를 측정 한 결과, 정상군은 24.8 \pm 0.3 (\times 10⁵), 대조군은 57.9 \pm 3.2 (\times 10⁵), 양성대조군 (CsA)은 35.0 \pm 4.5 (\times 10⁵), KJHT 400 mg/kg 투여군은 33.9 \pm 6.7 (\times 10⁵), 200 mg/kg 투여군은 34.2 \pm 8.5 (\times 10⁵)로 나타나, 대조군에 비하여 KJHT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 2).

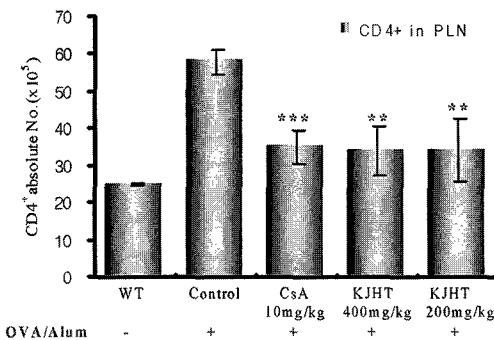


Fig. 2. Effect of KJHT extract on CD4+ absolute cell number in peripheral lymph node (PLN) of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of KJHT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporine A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PLN were removed and CD4+ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (**p<0.01, ***p<0.001).

3) Spleen

Spleen에서 분리한 세포에서 CD4+ 세포 수를 측정 한 결과, 정상군은 5.2 \pm 1.5 (\times 10⁶), 대조군은 17.8 \pm 4.2 (\times 10⁶), 양성대조군 (CsA)은 4.6 \pm 0.9 (\times 10⁶), KJHT 400 mg/kg 투여군은 6.7 \pm 0.5 (\times 10⁶), 200 mg/kg 투여군은 6.8 \pm 2.8 (\times 10⁶)로 나타나, 대조

군에 비하여 KJHT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, *p<0.05) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

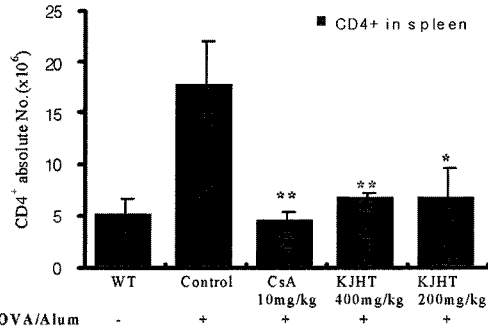


Fig. 3. Effect of KJHT extract on CD4+ absolute cell number in spleen of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of KJHT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporine A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice spleen was removed and CD4+ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

2. CD8+ 세포 수에 미치는 영향

1) Lung

Lung에서 분리한 CD8+ 세포 수를 측정된 결과, 정상군은 $0.7 \pm 0.1 (\times 10^5)$, 대조군은 $4.9 \pm 0.6 (\times 10^5)$, 양성대조군 (CsA)은 $2.7 \pm 0.5 (\times 10^5)$, KJHT 400 mg/kg 투여군은 $2.2 \pm 0.9 (\times 10^5)$, KJHT 200 mg/kg 투여군은 $3.3 \pm 0.7 (\times 10^5)$ 로 나타나, 대조군에 비하여 KJHT 투여군 모든 농도에서 유의성 있는 (*p<0.05, **p<0.01) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 4).

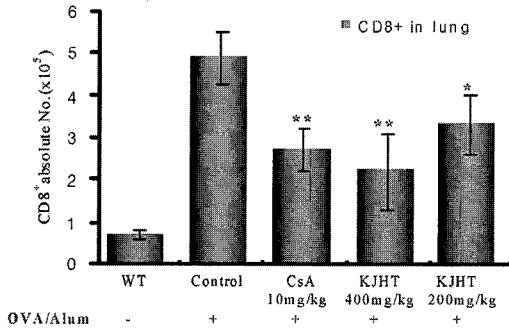


Fig. 4. Effect of KJHT extract on CD8+ absolute cell number in lung of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of KJHT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporine A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lung was removed and CD8+ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

2) PLN

PLN에서 분리한 CD8+ 세포 수를 측정된 결과, 정상군은 $17.5 \pm 1.0 (\times 10^6)$, 대조군은 $24.5 \pm 1.7 (\times 10^6)$, 양성대조군 (CsA)은 $19.5 \pm 3.1 (\times 10^6)$, KJHT 400 mg/kg 투여군은 $11.5 \pm 3.0 (\times 10^6)$, 200 mg/kg 투여군은 $15.7 \pm 1.0 (\times 10^6)$ 으로 나타나, 대조군에 비하여 KJHT 투여군 모든 실험 농도에서 유의성 있는

(**p<0.01, ***p<0.001) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 5).

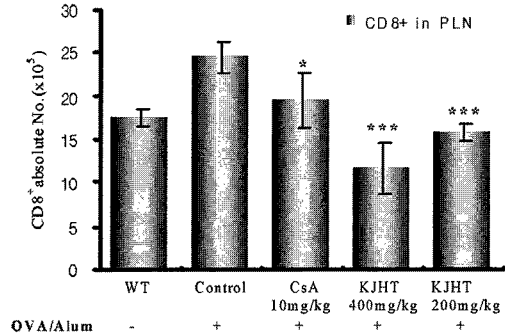


Fig. 5. Effect of KJHT extract on CD8+ absolute cell number in peripheral lymph node (PLN) of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of KJHT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporine A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice PLN were removed and CD8+ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (*p<0.05, ***p<0.001).

3) Spleen

Spleen에서 분리한 CD8+ 세포 수를 측정된 결과, 정상군은 $21.3 \pm 1.0 (\times 10^6)$, 대조군은 $31.2 \pm 2.3 (\times 10^6)$, 양성대조군 (CsA)은 $19.4 \pm 0.9 (\times 10^6)$, KJHT 400 mg/kg 투여군은 $14.8 \pm 0.8 (\times 10^6)$, 200 mg/kg 투여군은 $17.0 \pm 3.3 (\times 10^6)$ 으로 나타나, 대조군에 비하여 KJHT 모든 실험 농도에서 유의성 있는 (***p<0.001, **p<0.01) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 6).

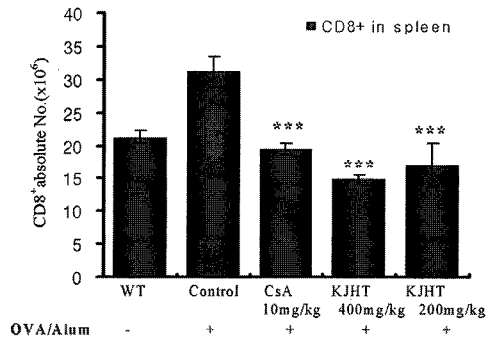


Fig. 6. Effect of KJHT extract on CD8+ absolute cell number in spleen of OVA-induced mice. C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of KJHT (400 mg/kg and 200 mg/kg) extract and cyclosporine A (10 mg/kg) for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice spleen was removed and CD8+ T cells for analyzed by flow cytometer. The results are expressed the mean \pm S.E (N=5). Statistically significant value compared with control group data by T test (***p<0.001).

고찰

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 만성염증성질환이

라는 개념으로 인식되고 있다¹⁶⁾.

천식의 병인에 중요하게 관여하는 T세포의 표면 항원 수용체를 T세포 수용체(T cell receptor, 이하 TCR)라 하며 TCR은 다시 TCR1과 TCR2로 구별되고 그 중 TCR2를 가진 T세포는 CD4+인 보조T세포와 CD8+인 세포독성T세포로 나뉜다¹⁷⁾. 보조T세포(이하 Th세포)는 사이토카인 분비양상에 따라 서로 길항작용을 나타내는 Th1세포와 Th2세포로 나뉜다. 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 있다¹⁸⁻²⁰⁾. CD8+ 세포는 세포독성T세포로 주로 방어세포로서 감염시 적세포를 죽이고 억제하는 기능이 주요기능으로만 알려져 있었으나^{21,22)} 알레르겐으로 자극시 CD4+ 세포와 같이 CD8+ 세포에서도 IL-4의 생성이 많고 IFN- γ 의 생산이 적다고 알려지게 되었고^{23,24)} Th세포와 마찬가지로 사이토카인 분비 양상에 따라 IL-2, IFN- γ 를 분비하는 T cytotoxic 1(Tc1) 세포와 IL-4, IL-5 등을 분비하는 T cytotoxic 2(Tc2) 세포로 분류하게 되었다³⁾. 또한 기관지천식환자에서 기관지폐포세척액내 CD8+ 분율은 정상 대조군에 비해 증가되어 있고, 기관지폐포세척액내 호산구 분율 및 기도폐쇄 정도와 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다²⁵⁾. 따라서 CD4+ 세포뿐만 아니라 CD8+ 세포도 기관지 천식의 병인에서 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다.

加味地黃湯은 六味地黃湯⁵⁾에 宣肺化痰, 止咳平喘하는 麻黃, 生薑, 杏仁, 款冬花, 桑白皮, 養陰清肺, 祛痰止咳하는 沙蔘, 燥濕化痰하는 牛膽南星, 清熱燥濕하는 黃芩, 消腫排膿하는 皂角子, 消食積, 化痰散結하는 山楂肉, 調和諸藥, 潤肺하는 甘草를 가미²⁶⁾하여 기관지천식을 비롯한 호흡기질환에 대응하는 처방으로 기관지천식 모델을 대상으로 CD4+ 세포와 CD8+ 세포에 대한 영향을 평가해 보고자 하였다.

실험 결과 천식을 유발한 대조군은 폐, 말초림프절, 비장 모두에서 정상군보다 CD4+ 세포와 CD8+ 세포의 수가 증가하였으며, 加味地黃湯을 투여하였을 때 폐, 말초림프절, 비장 모두에서 대조군보다 CD4+ 세포와 CD8+ 세포가 유의하게 감소하였다(Fig. 1-6). 항원으로 유발한 특이 기관지유발검사 전후를 비교한 연구에서 먼저 기관지폐포세척액내 CD4+ 세포가 증가한다는 보고가 많았으나²⁷⁻²⁹⁾ 이후 CD8+ 세포 또한 증가하여 기관지천식의 병인에 관여한다는 결과들이 보고되었으며³⁰⁻³²⁾ 특히 호흡기 바이러스 감염이 기관지천식 환자의 CD8+ 세포를 활성화시키는 것이 type2 사이토카인의 과잉 분비를 유발하며 이로 인해 증가된 알레르기 염증 반응으로 기관지천식의 악화에 기여한다고 한다^{33,34)}. 따라서 加味地黃湯이 CD4+ 세포와 CD8+ 세포의 증가를 모두 억제하는 것은 다양한 기관지천식의 알레르기 염증반응에 좀 더 폭넓게 작용할 가능성을 보여주는 것으로 생각된다. 기존

의 연구에서 神秘湯과 神秘湯加味, 定喘湯, 加味清金降火湯이 주로 CD4+ 세포의 증가를 억제하고 CD8+ 세포의 증가에는 유의한 효과를 나타내지 않았고^{9,10,35)}, 麥門冬湯이 CD4+ 세포와, CD8+ 세포의 증가를 모두 유의하게 억제한 것으로 나타난 결과³⁶⁾와의 비교 연구도 필요하리라 생각된다.

이상의 결과는 加味地黃湯이 기관지천식의 병리에서 T 세포와 관련된 과민반응에 일정하게 작용한다고 볼 수 있는 근거를 제시하는 것으로 생각되며, 향후 加味地黃湯을 대상으로 기관지천식에 관련되는 다양한 세포들과 사이토카인 및 케모카인에 미치는 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

천식을 유발시킨 생쥐에 加味地黃湯(200, 400 mg/kg)을 투여하여 폐, 말초림프절, 비장의 CD4+ 세포의 수를 측정한 결과 두 농도 모두에서 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였고, 폐, 말초림프절, 비장의 CD8+ 세포의 수를 측정한 결과 두 농도 모두에서 대조군에 비하여 유의성있게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 加味地黃湯이 기관지천식으로 인한 과민반응에 영향을 나타내는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Busse, W.W., Lemanske, R.F. Asthma, N Engl J Med. 344(5):350-362, 2001.
2. Constant, S.L., Bottomly, K. Induction Th1 and Th2 CD4+ T cell responses : The alternative approaches. Annu Rev Immunol, 15: 297-322, 1997.
3. Sad, S., Marcotte, R., Mosmann, T.R. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. Immunity, 2(3):271-279, 1995.
4. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울, 한문회사, pp 329-331, 2002.
5. 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 사람 비만세포주에서의 케모카인에 대한 지황평천탕의 효과. 대한한방내과학회지 23(3):375-385, 2002.
6. 정진용, 정희재, 정승기, 이형구. 小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 대한한의학회지 24(1):74-83, 2003.
7. Ko, E., Rho, S., Cho, C., Choi, H., Ko, S., Lee, Y., Hong, M.C., Shin, M.K., Jung, S.G., Bae, H. So-Cheong-Ryong-Tang, traditional Korean medicine, suppresses Th2 lineage development. Biol Pharm Bull, 27(5):739-743, 2004.
8. 유선웅, 박양춘. 생쥐의 B세포에서 anti-CD40과 rIL-4로 유도된 Cytokine 생산과 IgE, Histamine에 대한 冷哮丸의 효과. 대한한방내과학회지 25(2):245-257, 2004.
9. 염종훈, 정희재, 정승기, 이형구. 定喘湯과 定喘湯加減方이 알

- 레르기 천식모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지 24(1):169-180, 2003.
10. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 加味清金降火湯 및 加味六味地黃湯이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지 24(3):1-10, 2003.
 11. 한영주, 박양춘. 감초(Glycyrrhiza uralensis Fisch, GLU)가 천식모델 생쥐의 BALF내 면역세포 및 Cytokine에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 25(3):408-417, 2004.
 12. 정승기, 황우석, 이재성, 최준용, 정희재, 이형구. 加味貝母湯의 기관지천식환자의 증증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지 24(3):155-164, 2003.
 13. 황우석, 최준용, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 기관지천식환자에서 加味貝母湯치료에 따른 IgE, 호산구 및 Cytokine의 변화. 대한한방내과학회지 24(4):747-758, 2003.
 14. 정승기, 정희재, 이재성, 이견영, 정승연, 이형구, 최준용. 加味清上補下湯역기스제의 기관지천식환자의 증증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지 25(2):110-118, 2004.
 15. 최준용, 이재성, 정승연, 이견영, 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 虛實辨證과 加味清上補下湯의 임상효과. 대한한방내과학회지 25(3):379-387, 2004.
 16. 최인선. 천식의 병리, 대한 천식 및 알레르기학회, 천식과 알레르기 질환. 서울, 군자출판사, pp 257-264, 2002.
 17. 김세종. 면역학. 서울, 고려의학, pp 150-153 1994.
 18. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev, 8(3):223-246, 2003.
 19. Mazzeola, G., Bianco, A., Catena, E., De Palma, R., Abbate, G.F. Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. Allergy, 55(Suppl 61):6-9, 2000.
 20. Brightling, C.E., Symon, F.A., Birring, S.S., Bradding, P., Pavord, I.D., Wardlaw, A.J. TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. J Allergy Clin Immunol, 110(6):899-905, 2002.
 21. Mehrotra, P.T., Wu, D., Crim, J.A., Mostowski, H.S., Siegel, J.P. Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD8+ T lymphocytes. J Immunol. 151(5):2444-2452, 1993.
 22. Horvat, B., Loukides, J.A., Anandan, L., Brewer, E., Flood, P.M. Production of interleukin 2 and interleukin 4 by immune CD4-CD8+ and their role in the generation of antigen-specific cytotoxic T cells. Eur J Immunol. 21(8):1863-1871, 1991.
 23. Seder, R.A., Boulay, J.L., Finkelman, F., Barbier, S., Ben-Sasson, S.Z., Le Gros, G., Paul, W.E. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. J Immunol. 148(6):1652-1656, 1992.
 24. Croft, M., Carter, L., Swain, S.L., Dutton, R.W. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. J Exp Med. 180(5):1715-1728, 1994.
 25. 이숙영, 윤형규, 신윤, 이상화, 김석찬, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성화. 기관지천식 환자의 기관지폐포세척액내 T 세포 아형과 임상양상과의 관계, 천식 및 알레르기 19(6):904-911, 1999.
 26. 전국한의과대학본초학교수 공편. 본초학. 서울, 영림사, pp 121-123, 136-137, 178-179, 369-370, 440-441, 450-451, 478-479, 481-485, 540-541, 587-588, 1991.
 27. Yurovsky, V.V., Weersink, E.J., Meltzer, S.S., Moore, W.C., Postma, D.S., Bleecker, E.R., White, B. T-Cell repertoire in the blood and lungs of atopic asthmatics before and after ragweed challenge. Am J Respir Cell Mol Biol. 18(3):370-383, 1998.
 28. Gerblich, A.A., Salik, H., Schuyler, M.R. Dynamic T-cell changes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage after antigen bronchoprovocation in asthmatics. Am Rev Respir Dis. 143(3):533-537, 1991.
 29. Corrigan, C.J., Haczku, A., Gemou-Engesaeth, V., Doi, S., Kikuchi, Y., Takatsu, K., Durham, S.R., Kay, A.B. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. Am Rev Respir Dis. 147(3):540-547, 1993.
 30. 이상엽, 이승룡, 김제형, 신철, 심재정, 강경호, 유세화, 인광호, 이지혜, 정운용, 김한겸. 천식과 호산구성 기관지염에서 CD4, CD8 림프구 침윤. 결핵 및 호흡기질환 55(5):459-466, 2003.
 31. 박수영, 조영주. 내인성 천식 및 외인성 천식 환자의 CD8 양성 세포에서 interleukin 4 및 interferon gamma 생산. 천식 및 알레르기 21(1):65-72, 2001.
 32. Cho, S.H., Stanciu, L.A., Holgate, S.T., Johnston, S.L. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. Am J Respir Crit Care Med. 171(3):224-230, 2005.
 33. O'Sullivan, S., Cormican, L., Faul, J.L., Ichinohe, S., Johnston, S.L., Burke, C.M., Poulter, L.W. Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. Am J Respir Crit Care Med. 164(4):560-564, 2001.
 34. Stanciu, L.A., Roberts, K., Papadopoulos, N.G., Cho, S.H., Holgate, S.T., Coyle, A.J., Johnston, S.L. IL-4 increases type 2, but not type 1, cytokine production in CD8+ T cells from mild atopic asthmatics. Respir Res. 6: 67, 2005.
 35. 김승수, 정희재, 정승기, 이형구. 신비탕 및 신비탕가미방이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한의학회지 23(2):198-210, 2002.
 36. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 맥문동탕 및 정천화담강기탕이 Allergy 천식 모델 흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한의학회지 23(1):37-49, 2002.