

三子化痰煎이 천식모델 생쥐의 면역세포에 미치는 영향

이정은, 박양춘

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Effects of *Samjawhadam-jeon* on Immune Cells in Ovalbumin-induced Asthmatic Mice

Joung-eun Lee, Yang-chun Park

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

ABSTRACT

Objective : The purpose of this study was to evaluate the effect of *Samjawhadam-jeon* (SJHDJ; 三子化痰煎) on immune cells in OVA-induced asthmatic mice.

Material and Methods : C57BL/6 mice were injected, inhaled and sprayed with OVA for 12 weeks (four times a week) for asthma induction. Two experimental groups were treated with different concentrations of SJHDJ group (400 mg/kg) extracts and cyclosporin A (10 mg/kg) for the latter 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse lung, peripheral lymph node (PLN) and spleen were removed and immune cells were analyzed by flow cytometer.

Results : Lung weight, total cells in lung, PLN, and spleen of the SJHDJ group decreased significantly compared with that of the control group. Number of CD3e⁺/CD69⁺, CD3e⁺/DX5⁺ cells in lung, PLN and spleen, number of CD3⁺ cells in PLN and spleen, number of CD3e⁺/CCR3⁺ cells in lung and PLN, and number of B220⁺/IgE⁺ cells in PLN of the SJHDJ group decreased compared with that of the control group. Number of CD4⁺/CD25⁺ cells in PLN and spleen of the SJHDJ group increased compared with that of the control group.

Conclusion : These results demonstrate that SJHDJ will be a desirable alternative therapy for allergic asthma by inhibiting the expression of immune cells.

Key words : *Samjawhadam-jeon*(三子化痰煎), asthma, immune cells

1. 서론

기관지천식(이하 천식)은 과거 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민반응을 보이며 가역적인 기도 폐쇄가 있는 상태로 정의하였으나 천식에 있어서 근본 문제는 기관지수축이 아니라 염증이라는 것이 알려지면서 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 인식되고 있다¹. 초기에는 비만세포와 호산구

가 천식과 관련된 기도 염증반응을 야기하는데 가장 중요한 역할을 한다고 생각되었으나 이후 보조 T세포(T helper cell: 이하 Th세포)가 이러한 염증반응에 관여하는 것으로 알려졌고, 그 중에서도 제 II형 보조 T세포(Helper T type 2 cell: 이하 Th2 세포)가 알레르기 기도 염증반응을 일으키고 조정하는 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려지면서 Th2 가설이 기관지천식의 병태생리를 설명하는 주된 가설로 받아들여지고 있다². Th2 가설은 초기 항원 노출시에 Th1/Th2 불균형이 알레르기 염증의 발생에 있어서 중요한 기전으로 작용한다고 설

· 교신저자: 박양춘 충북 청주시 용담동 173-9
대전대 부속 청주한방병원 내과
TEL: 043-229-3704 FAX: 043-253-8757
E-mail: omdpyc@dju.kr

명한다³. 하지만 Th2 가설은 너무나 단순화된 가설이며 기관지천식의 병태생리를 설명하기에는 한계가 있다는 지적과² 이 가설과 상반되는 여러 결과에 대한 연구도 있으니^{4,5} 아직까지는 이러한 관점이 알레르기 염증질환을 연구하는데 핵심 이론으로 남아있다.

三子化痰煎⁶은 蘇子降氣湯⁷에 加減한 처방으로 기관지천식을 비롯한 호흡기질환에 다용하는 처방이다. 최근 천식과 관련하여 다양한 單味 및 處方을 이용한 염증반응이나 면역기능에 관한 실험이 이루어지고 있고^{8,9}, 동물 천식 모델을 이용한 연구^{10,11}와 천식환자를 대상으로 임상연구^{12,13}도 활발하게 이루어지고 있으나 三子化痰煎에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 三子化痰煎이 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향을 규명하고자 기관지천식 생쥐모델을 대상으로 폐 무게와 폐, 말초림프절, 비장 조직의 총 세포 수 및 CD3⁺, CD3e⁻/CCR3⁺, CD3e⁺/CD69⁺, CD4⁺/CD25⁺, B220⁺/IgE⁺, CD3e⁺/DX5⁺ 세포 수를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

동물은 체중 18-25g의 C57BL/6 (샘타코, Korea) 생쥐로, 실험 당일까지 고품사료와 물을 충분히 공급하고, 실온 22 ± 2°C, 상대습도 50 ± 10%, 조명 시간 12시간(07:00-19:00), 조도 150-300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용된 약제는 三子化痰煎⁶으로 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였으며 처방내용과 1첩의 용량은 각각 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of *Samjawhadam-jeon*

Herb	Herbal name	Dose(g)
蘇子	<i>Perillae Fructus</i>	12
半夏	<i>Pinelliae rhizoma</i>	6
蘿菔子	<i>Raphani Semen</i>	6
白茯苓	<i>Poria</i>	6
前胡	<i>Peucedani Radix</i>	4
皂角刺	<i>Gleditsiae Spina</i>	4
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
杏仁	<i>Armeniaca Amarum Semen</i>	4
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	4
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	4
款冬花	<i>Farfarae Flos</i>	3
白芥子	<i>Sinapis Semen</i>	3
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	3
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	3
Total amount		73

2. 방법

1) 실험군의 구분

실험 동물은 정상군(Normal), 대조군(Control), 양성대조군(CsA), 400 mg/kg의 삼자화담전 추출물을 투여한 실험군(SJHDJ)의 4개 군으로 구분하였다(Table 2).

Table 2. Experimental Grouping

Group ID	Treatment	Dosage
Normal	Distilled Water	0
Control	OVA/album inhalation	2.5 mg/ml
CsA	OVA + Cyclosporin A	10 mg/kg
SJHDJ	OVA + SJHDJ extracts	400 mg/kg

SJHDJ extracts: *Samjawhadam-jeon* extracts

2) 三子化痰煎 추출

SJHDJ 4첩 분량(252 g)을 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하였다. 추출액을 여과한 후 감압 증류장치(B-480, BUCHI, Switzerland)로

농축하고, 다시 동결 건조기(FDU-540, EYELA, Japan)를 이용하여 1첩 당 4.62 g, 총 18.5 g(수율 약 7.34%)의 분말을 얻었다. 완전 건조한 SJHDJ 을 냉동(-84°C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

3) 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 침전 물을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후, 100 µg OVA를 0.2 ml로 조정하여 복강 내로 주사하여 전신 감각시켰다. 이 후 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 기관지에 주사하고, 분무기로 흡입시켰다.

4) 약물투여

OVA/Alum로 전신 감각 시킨 후 4주째부터 SJHDJ 400 mg/kg을 일주일에 5회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구 투여 하였다.

5) 폐장, 말초림프절 및 비장의 총 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 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색하여 총 면역세포수를 측정하였다.

6) 폐 적출 및 호산구세포 분리

폐포세척액에서 세포를 분리하고, 폐의 무게를

측정한 후, 폐 조직을 잘게 절편하였다. 여기에 2% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 5분간 1,800 rpm 배지에서 원심분리하고, 5 ml의 RPMI1640 배양액에 50 µl의 collagenase IV (100 µg/ml)를 가한 후 37°C shaking 배양기에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후 2분간 방치한 후 상층액을 분리하고 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배양액에 세포를 포집하였다. 이 과정을 5회 이상 시행하여 폐 호산구세포를 분리하였다. 최종 분리된 폐 호산구 세포는 배양액으로 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 이들 세포들로부터 적혈구용혈용액(ACK lysing buffer: 8.3 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, in 1 ℓ of demineralized water + 0.1 mM EDTA)을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정하였다.

7) 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 썬 후, collagenase 1 mg/ml (in 2% FBS + RPMI 1640)을 넣고 37°C shaker (180 rpm, 20 분) 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 × 10⁵ 세포로 조정한 후 4°C에서 면역 형광 염색(immunofluorescence staining)을 실시하였다.

각각에 PE-anti-CD3e, PE-anti-CCR3, PE-anti-CD25, FITC-anti-CD69, PE-anti-B220, FITC-anti-IgE,

PE-anti-DX5, PE-anti-NK을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 Cell Quest 프로그램을 이용하여 CD4⁺/CD25⁺, B220⁺/IgE⁺, CD3e⁻/CCR3⁺, CD3e⁺/CD69⁺, CD3e⁺/DX5⁺ 그리고 세포수를 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 각 조직에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

8) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± SE로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석 방법을 이용하여 측정하였다. 통계분석은 SPSS/PC statistics™ 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)으로 수행하였으며, 통계적 유의성 차이는 * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001로 정의 하였다.

III. 결 과

1. 폐장의 무게 변화에 미치는 영향

OVA/Alum으로 유발한 기관지 천식 동물 모델에서 폐 무게를 측정된 결과, 정상군은 0.17 ± 0.02 g, 대조군은 0.40 ± 0.01 g, CsA군은 0.25 ± 0.01 g, 실험군은 0.27 ± 0.01 g으로 나타나, 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.001) 감소 효과가 나타났다(Fig. 1).

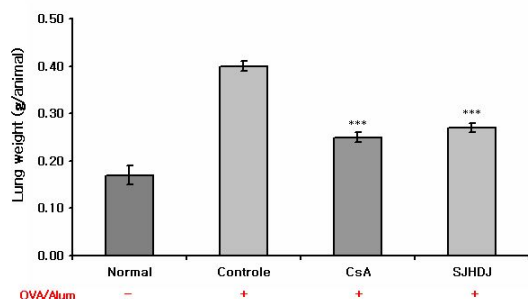


Fig. 1. Effects of SJHDJ extracts on lung weight in OVA-induced mice.

Normal, Control, CsA and SJHDJ were listed

in Table 2. Data were expressed as mean ± SE. Statistically significant value compared with control group data by *t*-test (***) p<0.001).

2. 총세포수에 미치는 영향

Trypan blue로 염색한 후 총 폐세포수(total lung cells)를 측정된 결과, 폐장과 비장에서는 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.01) 감소 효과가 나타났고, 말초림프절에서는 대조군에 비하여 실험군에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 3).

Table 3. Effects of SJHDJ extracts on total lung cells, total PLN cells and total spleen cells No in OVA-induced Mice

	CD3 ⁺ absolute cell numbers			
	Normal	Control	CsA	SJHDJ
Lung (×10 ⁷)	1.43 ± 0.08	8.20 ± 0.30	4.73 ± 0.53***	6.47 ± 0.65**
PLN (×10 ⁶)	5.31 ± 0.75	9.82 ± 0.07	8.16 ± 0.48**	7.67 ± 0.63
Spleen (×10 ⁷)	8.63 ± 0.38	13.10 ± 1.10	9.13 ± 0.13**	3.81 ± 1.38**

Normal, Control, CsA and SJHDJ were listed in Table 2. Data were expressed as mean ± SE. Statistically significant value compared with control group data by *t*-test (** p<0.01, *** p<0.001).

3. CD3⁺ 세포 수에 미치는 영향

폐장에서 분리한 세포로부터 CD3⁺ 세포 수를 측정된 결과, 폐장과 비장에서는 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.001, p<0.01) 감소 효과가 나타났고, 말초림프절에서는 대조군에 비하여 실험군에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 4).

4. CD3⁺/CCR3⁺ 세포 수에 미치는 영향

폐장에서 분리한 세포로부터 CD3⁺/CCR3⁺ 세포 수를 측정된 결과, 폐장과 말초림프절에서는 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.01, p<0.001) 감소 효과가 나타났고, 비장에서는 대조

군에 비하여 실험군에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 5).

Table 4. Effects of SJHDJ extracts on CD3⁺ Absolute Cell Numbers in Lung, PLN and Spleen of OVA-induced Mice

CD3 ⁺ absolute cell numbers				
	Normal	Control	CsA	SJHDJ
Lung (×10 ⁵)	4.8 ± 0.4	38.7 ± 0.2	14.1 ± 0.1***	25.7 ± 1.1***
PLN (×10 ⁵)	40.7 ± 1.1	83.7 ± 2.2	55.8 ± 10.0**	57.1 ± 20.8
Spleen (×10 ⁶)	53.6 ± 5.9	69.2 ± 4.2	46.6 ± 2.1***	53.9 ± 3.8**

Normal, Control, CsA and SJHDJ were listed in Table 2. Data were expressed as mean ± SE. Statistically significant value compared with control group data by *t*-test (** p<0.01, *** p<0.001).

Table 5. Effects of SJHDJ extracts on CD3⁺/CCR3⁺ Absolute Cell Numbers in Lung, PLN and Spleen of OVA-induced Mice

CD3 ⁺ /CCR3 ⁺ absolute cell numbers				
	Normal	Control	CsA	SJHDJ
Lung (×10 ⁵)	1.5 ± 0.1	10.4 ± 1.5	3.5 ± 0.1***	5.5 ± 0.2**
PLN (×10 ⁵)	1.6 ± 0.0	8.2 ± 0.6	3.5 ± 10.3***	3.5 ± 1.0***
Spleen (×10 ⁶)	1.3 ± 0.3	3.8 ± 0.9	1.9 ± 0.0*	1.9 ± 0.5

Normal, Control, CsA and SJHDJ were listed in Table 2. Data were expressed as mean ± SE (N=5). Statistically significant value compared with control group data by *t*-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

5. CD3⁺/CD69⁺ 세포 수에 미치는 영향

폐장에서 분리한 세포로부터 CD3⁺/CD69⁺ 세포 수를 측정된 결과, 폐장, 말초림프절, 비장에서 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.001, p<0.01, p<0.05) 감소 효과가 나타났다(Table 6).

Table 6. Effects of SJHDJ extracts on CD3⁺/CD69⁺ Absolute Cell Numbers in Lung, PLN and Spleen of OVA-induced Mice

C3 ⁺ /CD69 ⁺ absolute cell numbers				
	Normal	Control	CsA	SJHDJ
Lung (×10 ⁵)	0.4 ± 0.1	5.8 ± 0.3	2.4 ± 0.0***	3.3 ± 0.3***
PLN (×10 ⁵)	2.3 ± 0.3	10.1 ± 1.3	4.7 ± 2.2*	4.1 ± 1.2**
Spleen (×10 ⁶)	1.5 ± 0.2	5.1 ± 0.1	2.0 ± 0.6***	3.3 ± 0.9*

Normal, Control, CsA and SJHDJ were listed in Table 2. Data were expressed as mean ± SE (N=5). Statistically significant value compared with control group data by *t*-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

6. CD4⁺/CD25⁺ 세포 수에 미치는 영향

폐장에서 분리한 세포에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포 수를 측정된 결과, 비장에서는 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.05) 증가 효과가 나타났고, 폐장과 말초림프절에서는 대조군에 비하여 실험군에서 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 7).

Table 7. Effects of SJHDJ extracts on CD4⁺/CD25⁺ Absolute Cell Numbers in Lung, PLN and Spleen of OVA-induced Mice

CD4 ⁺ /CD25 ⁺ absolute cell numbers				
	Normal	Control	CsA	SJHDJ
Lung (×10 ⁵)	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.4	1.3 ± 0.0***	1.2 ± 0.3
PLN (×10 ⁵)	2.8 ± 0.5	2.0 ± 0.6	3.8 ± 0.1**	3.1 ± 0.4
Spleen (×10 ⁶)	0.9 ± 0.0	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.2	1.5 ± 0.5*

Normal, Control, CsA and SJHDJ were listed in Table 2. Data were expressed as mean ± SE (N=5). Statistically significant value compared with control group data by *t*-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

7. B220⁺/IgE⁺ 세포 수에 미치는 영향

폐장에서 분리한 세포로부터 B220⁺/IgE⁺ 세포 수를 측정된 결과, 말초림프절에서는 대조군에 비

하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.05) 감소 효과가 나타났고, 폐장과 비장에서는 대조군에 비하여 실험군에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Table 8).

Table 8. Effects of SJHDJ extracts on B220⁺/IgE⁺ Absolute Cell Numbers in Lung, PLN and Spleen of OVA-induced Mice

	B220 ⁺ /IgE ⁺ absolute cell numbers			
	Normal	Control	CsA	SJHDJ
Lung	0.6	10.3	3.2 ±	7.6
(×10 ⁵)	± 0.1	± 0.5	1.3***	± 2.8
PLN	0.3	6.7	1.8 ±	1.9 ±
(×10 ⁵)	± 0.2	± 1.7	0.2**	0.6*
Spleen	1.7	7.7	3.2 ±	5.4
(×10 ⁶)	± 0.2	± 1.6	0.5**	± 1.0

Normal, Control, CsA and SJHDJ were listed in Table 2. Data were expressed as mean ± SE (N=5). Statistically significant value compared with control group data by *t*-test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

8. CD3e⁺/DX5⁺ 세포 수에 미치는 영향

폐장에서 분리한 세포에서 CD3e⁺/DX5⁺ 세포 수를 측정된 결과, 폐장, 말초림프절, 비장에서 대조군에 비하여 실험군에서 유의성 있는(p<0.01, p<0.001, p<0.001) 감소 효과가 나타났다(Table 9).

Table 9. Effects of SJHDJ extracts on CD3⁺/DX5⁺ Absolute Cell Numbers in Lung, PLN and Spleen of OVA-induced Mice

	CD3 ⁺ /DX5 ⁺ absolute cell numbers			
	WT	Control	CsA	SJHDJ
Lung	0.2	2.7	0.8 ±	1.1 ±
(×10 ⁵)	± 0.1	± 0.6	0.1***	0.0**
PLN	1.4	5.0	1.6 ±	1.8 ±
(×10 ⁵)	± 0.0	± 0.7	0.8**	0.1***
Spleen	0.9	4.9	1.5 ±	2.0 ±
(×10 ⁶)	± 0.3	± 0.5	0.0***	0.5***

Normal, Control, CsA and SJHDJ were listed in Table 2. Data were expressed as mean ± SE (N=5). Statistically significant value compared with control group data by *t*-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

IV. 고찰

천식은 가역적인 기도 폐쇄에 의한 호흡곤란과 천명의 증상을 보이면서 기관지 과민성을 특징으로 하는 만성 알레르기 염증성 질환으로 기도염증의 특징적인 소견은 기도의 점막과 내강에서 활성화된 호산구, 비만세포, 대식세포, T 림프구의 증가로 이들을 통해 화학매체, 사이토카인, 유착분자, 성장인자 등의 분비를 일으켜 기도의 수축과 자극에 대한 과도한 반응을 일으키게 된다¹⁴.

천식에 있어서 일련의 병리는 IgE에 알레르기 항원의 결합으로 인한 비만세포의 활성화에 의하여 시작된다. 활성화된 비만세포는 히스타민과 같은 생물원성 아민, PGD₂, LTC₄, LTE₄ 및 PAF과 같은 지질 매개물질, 그리고 IL-3, IL-4, IL-5, IL-1, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α 와 같은 사이토카인 등 3종류의 중요한 매개물질을 생산한다. 생물원성 아민과 지질 매개물질들은 혈관 유출, 혈관 확장 및 기관지 수축과 같은 즉시형 과민반응의 초기면역 반응을 야기하며 사이토카인은 후기면역반응과 만성염증반응에 기여한다^{15,16}.

Th세포는 생성되는 사이토카인 종류에 따라서 Th1세포와 Th2세포로 나누어진다. 천식이나 알레르기 질환에서 왜 Th2세포로의 분화가 주도적으로 일어나게 되는지에 대해서 확실히 규명되지는 않았지만 Th세포의 일차 분화시기에 주위의 사이토카인 환경이 중요하며, 항원의 용량, 항원제시세포의 종류, 항원전달세포와 T 림프구 반응시 동반 자극 신호의 종류 등에 의해 Th1 혹은 Th2로의 세포 분화가 결정된다고 알려져 있다¹⁷. Th1세포는 바이러스 및 세포내 미생물체 사멸과 같은 세포방어기전에 중요한 IL-2, IFN- γ 를 분비하고, B림프구의 활성화와 IgE합성을 억제하는 IFN- γ , TNF- α 를 분비한다. 천식에서 주로 작용하는 Th2세포는 알레르기 염증반응을 매개하는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 등과 같은 사이토카인을 분비한다¹⁸. 또한 eotaxin, RANTES, MIP-1 α 등을 생성하여

호산구의 분화, 성숙 활성화 및 생존을 증가에 관계한다¹⁹.

병변 부위로 침윤된 호산구에서는 major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil derived neurotoxin (EDN), eosinophil peroxidase (EPO) 등이 분비되어 기도 손상을 유발한다. 즉 이들은 천식의 특징적인 호산구성 염증양상과 기도 상피의 섬모운동 억제, 상피세포의 탈락, 점액 과다분비 및 기도 과민증을 초래한다. 또 활성화된 호산구는 많은 양의 leukotrien C4 (LTC4)를 유리하며 혈관과 기도 평활근에 작용함으로써 알레르겐 흡입 유발시에 조기반응과 후기 반응을 일으킨다^{17,19}.

대식세포는 T세포의 생성을 억제하지만 천식에서는 알레르기 항원에 폭로되면 T세포 생성의 억제 작용이 감소한다²⁰. 대식세포는 기관지에 유해한 호소, 사이토카인, 점액분비촉진물질, 혈소판-활성화 인자 등을 분비하여 기도 폐색의 유발과 기도 염증의 조절에 관여한다²¹. 또한 섬유증과 관련된 섬유모세포의 성장촉진인자, 사이토카인, 그리고 PDGF, bFGF, TGF- β 등과 같은 성장인자를 분비하여 기도개형에 관여하기도 한다²².

韓醫學에서는 천식은 呼吸急促, 喘鳴有聲을 특징적인 症候群으로 하는 哮喘證에 該當되며, 治療는 주로 虛實을 구별하여 虛證에는 補肺, 益心腎을 기본으로, 實證에는 祛風寒, 燥濕, 清熱, 溫肺, 化痰, 降氣宣肺, 定喘의 治法으로하여 化痰, 定喘의 治法을 加하여 사용한다¹.

三子化痰煎⁶은 調氣降逆, 平喘化痰하는 蘇子降氣湯⁷에 溫肺祛痰, 下氣定喘하는 白芥子, 蘿菔子, 宣肺化痰, 止咳平喘하는 杏仁, 款冬花, 消腫排膿하는 皂角子, 破氣行痰하는 枳殼, 利水滲濕하는 白茯苓을 가미²³한 처방으로 기관지천식을 비롯한 호흡기 질환에 다용하고 있으나 이에 대한 기존 연구는 찾아보기 어려웠으며 특히 천식 모델을 대상으로 관련 면역세포에 대한 영향을 관찰한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 三子化痰煎이 면역세포 및 사이토카인에 미치는 영향을 규명하고자 기관지천식 생쥐모델을 대상으로 三子化痰煎을 400 mg/kg으로 8주간 투여한 뒤에 폐 무게, 폐, 말초림프절, 비장의 총세포수, CD3+, CD3e-/CCR3+, CD3e+/CD69+, CD4+/CD25+, B220+/IgE+, CD3e+/DX5+ 세포의 수를 측정하였다.

폐의 무게 변화를 살펴보면, 대조군은 정상군에 비해 증가하였으나 실험군에서는 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다. 폐, 말초림프절, 비장의 총세포수에 미치는 영향을 살펴보면, 대조군은 정상군에 비해 증가하였으나 실험군에서는 폐와 비장에서 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였다. 폐의 무게와 폐, 말초림프절, 비장의 총세포수의 증가는 비만세포, 호산구, 림프구, 대식세포 등의 천식을 일으키는 면역세포들이 활성화된 후 증식됨으로써 나타나는데²⁴, 폐의 무게와 폐, 말초림프절, 비장의 총세포수의 증가가 三子化痰煎의 투여로 감소한 것은 三子化痰煎이 폐와 기관지뿐만 아니라 전신적인 알레르기 염증반응을 감소시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

폐, 말초림프절, 비장의 CD3+, CD3e-/CCR3+, CD3e+/CD69+ 세포의 수에 미치는 영향을 살펴보면, 실험군에서는 말초 림프절에서 CD3+, 비장에서 CD3e-/CCR3+ 세포의 수를 제외한 세 곳 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

CD3는 T세포에서 발현되는 표면분자로 T세포 결정표식인자이며 CD69는 활성화된 B세포 및 T세포 및 대식세포, 세포독성 세포에 존재하는 표면분자이다. CD3e+/CD69+는 T세포의 초기 활성화를 나타낸다²⁵. 실험군에서 CD3+, CD3e+/CD69+ 세포의 수가 대조군에 비하여 감소하는 것은 三子化痰煎이 T세포의 활성화를 억제시키는 것으로 생각된다.

케모카인은 사이토카인 중 화학주성효과를 갖는 사이토카인들을 말한다. Eotaxin같은 케모카인에 노출된 백혈구들은 케모카인 수용체를 발현하게

된다. CCR3는 주로 호산구에서 발하는 케모카인 수용체이다. 이 CCR3가 발현되면 호산구에서 integrin이 재배열하게 되어 혈관 내피세포와 결합한 후 조직내로 침투하도록 한다²⁶. 케모카인 수용체 억제제 중에 CCR3억제제(호산구 화학주성능 억제)도 연구 중이나 임상적인 효능은 입증된 바 없다²⁷. 실험군에서 CD3e-/CCR3+ 세포의 수가 대조군에 비하여 감소하는 것은 三子化痰煎이 호산구의 활성화를 억제하여 호산구의 기도 조직내 유입을 감소시킴으로써 천식의 후기면역반응에서 효과를 나타낼 수 있다는 가능성을 보여 준다고 생각된다.

폐, 말초림프절, 비장의 CD4+/CD25+ 세포의 수에 미치는 영향을 살펴보면, 실험군에서 CD4+/CD25+ 세포의 수가 비장에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가 하였다. CD25는 활성화된 T 세포와 B 세포에 분포한다. CD4+/CD25+ 조절 T 세포는 Th0세포로부터 Th1과 Th2 세포로의 분화를 억제하여 질환의 발생을 막으며 Th1과 Th2 세포에서 분비되는 사이토카인을 억제한다²⁸. 실험군에서 CD4+/CD25+ 세포의 수가 모든 장기에서 대조군보다 증가하였으나 비장에서만 유의성 있게 증가한 결과를 보인 것은 三子化痰煎이 Th2 매개 면역반응을 감소시키는 효과는 부분적으로만 나타나는 것으로 추정된다.

폐, 말초림프절, 비장의 B220+/IgE+, CD3e+/DX5+ 세포의 수에 미치는 영향을 살펴보면, 실험군에서는 CD3e+/DX5+ 세포의 수가 세 곳 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, B220+/IgE+ 세포수는 말초림프절에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

B220은 사람에게에는 없는 마우스의 B세포 표면에 있는 표식자이다. B세포에서 생산된 IgE 항체는 비만세포 표면 FCεRI에 결합하여 항원 수용체 기능을 한다. 이 IgE 항체에 항원이 결합하면 비만세포의 활성화에 의하여 여러 화학매체들을 분비하게 되는 제1형 과민반응이 일어난다^{15,29}. 실험군에서 B220+/IgE+세포의 수가 모든 장기에서 대조군보다 감소하였으나 말초림프절에서만 유의성 있게 감소한 결과를 보인 것은 三子化痰煎이 B세포에서 유래되는 IgE를 직접적으로 감소시키는 효과는 부분적으로만 나타나는 것으로 추정된다.

CD3e+/DX5+ 세포는 T 세포와 natural killer cell(NK 세포)의 marker를 발현하여 NK-T 세포라고 부르는데 NK 세포와 T 세포의 특성을 공유한다. NK-T 세포는 가장 강력한 면역 조절자 중 하나이다. 이는 활성화된 상태에서 Th0 세포가 Th1 또는 Th2 세포로의 분화에 영향을 미치는 IL-4, IFN-γ를 포함한 다양한 사이토카인을 대량 분비하여 이루어진다. NK-T 세포는 NK 수용체를 통해 자극받으면 IL-4 생산 없이 많은 IFN-γ를 생산하게 되며 반면에 IL-7이 존재하는 환경에서는 IL-4의 생산을 촉진하게 된다. 천식의 발전에 있어서 NK-T 세포의 유력한 병리적 역할은 두드러진 IL-4의 생산능력에 기인한다³⁰. 실험군에서 CD3e+/DX5+ 세포의 수가 대조군에 비하여 감소하는 것은 三子化痰煎이 NK-T 세포의 발현을 억제함으로써 기도 염증을 감소시켜 천식에 효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것으로 생각된다.

기관지천식 생쥐모델을 대상으로 한 본 실험에서 三子化痰煎은 전신적으로 알레르기 염증반응에 작용하는 각종 면역세포의 발현을 억제하는 효과를 나타내 천식의 치료에 유용하게 활용 가능할 것으로 판단되며 향후 지속적인 연구 및 임상연구가 기대되는 바이다.

V. 결론

三子化痰煎의 알레르기 천식모델 생쥐에서 천식 및 면역에 미치는 효과를 알아보기 위한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 천식을 유발시킨 생쥐에 폐무게와 폐, 말초림프절, 비장의 총폐세포수를 측정된 결과 실험군에

- 서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
2. 천식을 유발시킨 생쥐에 CD3e⁺/CD69⁺ 세포 수를 측정된 결과 폐, 말초림프절, 비장 모두에서 유의성 있게 감소하였다.
 3. 천식을 유발시킨 생쥐에 CD3e⁺/DX5⁺ 세포 수를 측정된 결과 폐, 말초림프절, 비장 모두에서 유의성 있게 감소하였다.
 4. 천식을 유발시킨 생쥐에 CD3⁺ 세포 수를 측정된 결과 폐와 비장에서 유의성 있게 감소하였다.
 5. 천식을 유발시킨 생쥐에 CD3e⁻/CCR3⁺ 세포 수를 측정된 결과 폐와 말초림프절에서 유의성 있게 감소하였다.
 6. 천식을 유발시킨 생쥐에 B220⁺/IgE⁺ 세포 수를 측정된 결과 말초림프절에서만 유의성 있게 감소하였다.
 7. 천식을 유발시킨 생쥐에 CD4⁺/CD25⁺ 세포 수를 측정된 결과 말초림프절에서만 유의성 있게 증가하였다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 폐계내과학교실. 동의폐계내과학. 서울: 도서출판 국진; 2004, p. 329-31.
2. Salvi SS, Babu KS, Holgate ST. Is asthma really due to a polarized T cell response toward a helper T cell type 2 phenotype? Am J Respir Crit Care Med. 2001;164:1343-6.
3. von Hertzen LC, Haahtela T. Could the risk of asthma and atopy be reduced by a vaccine that induces a strong T-helper type 1 response? Am J Respir Cell Mol Biol. 2000;22(2):139-42.
4. Krug N, Madden J, Redington AE, Lackie P, Djukanovic R, Schauer U, et al. T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 1996;14(4):319-26.
5. Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. J Clin Invest. 1999;103(2):175-83.
6. 김영훈. 청강의감. 서울: 정보사; 1985, p. 134-6.
7. 宋 太平惠民和劑局方 編. 太平惠民和劑局方. 북경: 인민위생출판사; 1985, p. 110.
8. 이경기, 정희재, 이형구, 정승기. 사람 비만세포 주에서의 케모카인에 대한 지황평천탕의 효과. 대한한방내과학회지. 2002;23(3):375-85.
9. 정광진, 정희재, 정승기, 이형구. 瀉白散과 瀉白散加沙蔞이 인간 기관지 상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2002;23(1):15-24.
10. 염종훈, 정희재, 정승기, 이형구. 定喘湯과 定喘湯加減方이 알레르기 천식모델 흰쥐의 BALF 내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003;24(1):169-80.
11. 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. 2003;24(3):1-10.
12. 황우석, 최준용, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 기관지천식환자에서 加味貝母湯치료에 따른 IgE, 호산구 및 Cytokine의 변화. 대한한방내과학회지. 2003;24(4):747-58.
13. 정승기, 정희재, 이재성, 이진영, 정승연, 이형구, 최준용. 加味清上補下湯 역기스제의 기관지 천식환자의 중증도에 따른 임상효과. 대한한의학회지. 2004;25(2):110-18.
14. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161(5):1720-45.
15. 강제성 역. 세포분자면역학. 서울: 범문사; 2002, p. 242-7, 424-43.

16. Siraganian RP. Biochemical events in basophil or mast cell activation and mediator release. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. Allergy: principles & practice. 5th ed. Vol. 1. St. Luis: Mosby-Year Book: 1998, p. 204-27.
17. 안강모, 김미경, 조상현, 박춘식, 이민걸. 알레르기 염증반응에 관여하는 세포, 대한 천식 및 알레르기학회, 천식과 알레르기 질환. 서울: 군자출판사; 2002, p. 32-45.
18. Lane SJ, Lee TH. Mast cell effector mechanism. J Allergy Clin Immunol. 1996; 98(5 Pt 2):S67-72.
19. 이양근. 호산구와 천식. 결핵 및 호흡기질환. 1999;46(1):5-16.
20. Spiteri MA, Knight RA, Jeremy JY, Barnes PJ, Chung KF. Alveolar macrophage-induced suppression of peripheral blood mononuclear cell responsiveness is reversed by in vitro allergen exposure in bronchial asthma. Eur Respir J. 1994;7(8):1431-8.
21. Poulter LW, Janossy G, Power C, Sreenan S, Burke C. Immunological/physiological relationships in asthma: potential regulation by lung macrophages. Immunol Today. 1994;15(6):258-61.
22. Kovacs EJ, DiPietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. FASEB J. 1994;8(11):854-61.
23. 전국한의과대학본초학교수 공편. 본초학. 서울: 영림사; 1991, p. 302-3, 351-2, 373-4, 440-1, 450-1, 453-4, 478-9, 482-3.
24. Booth BW, Newcomb DC, McKane SA, Crews AL, Adler KB, Bonner JC, et al. Proliferation of the airway epithelium in asthma: are inflammatory cells required? Chest. 2003;123(3 Suppl):384S-5S.
25. Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. Immunology. 1993;80(2):281-6.
26. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. Blood. 2000;95(10):3032-43.
27. Gangur V, Birmingham NP, Thanavorakul S, Joseph S. CCR3 and CXCR3 as drug targets for allergy: principles and potential. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2004;2(1):53-62.
28. Xu D, Liu H, Komai-Koma M, Campbell C, McSharry C, Alexander J et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice. J Immunol. 2003;170:394-9.
29. 조상현. IgE 항체 생성과 조절. 알레르기. 1993;13:460-64.
30. Oki S, Miyake S. Invariant natural killer T (iNKT) cells in asthma: a novel insight into the pathogenesis of asthma and the therapeutic implication of glycolipid ligands for allergic diseases. Allergol Int. 2007;56(1):7-14.