

황화패장, 백화패장의 항천식 작용의 비교연구

차종태¹, 이장천², 이영철^{1*}

1 : 상지대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 부산대학교 한의학전문대학원

Comparitive study on anti-asthmatic activities of *Patrinia scabiosaefolia* Fischer ex Link and *Patrinia villosa* Jussieu in a mouse model of asthma

Jong-Tae Cha¹, Jang-Cheon Lee², Young-Cheol Lee^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Sangji University Wonju 220-702, Republic of Korea

2 : Division of Pharmacology and Basic Korean Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, Pusan 609-735, South Korea

ABSTRACT

Objective : In the present study, we investigated the pharmacological profile of the aqueous extract of *Patrinia scabiosaefolia* Fischer ex Link (EPS) and *Patrinia villosa* Jussieu (EPV) for its anti-asthmatic activities. The purpose of this study is to ascertain if EPS result in better anti-asthmatic activities and functional outcome as compared with EPV.

Methods : In this study, BALB/c mice were systemically sensitized to ovalbumin (OVA) followed intratracheally, intraperitoneally, and by aerosol allergen challenges. We investigated the effect of EPS, EPV on the recruitment of pulmonary inflammatory cells, various immune cell phenotypes, Th1/Th2 cytokine gene expression and production and histamine production in serum.

Results : In BALB/c mice, we found that EPV-treated groups had more effectively suppressed inflammatory cell infiltration of lung and BALF, B220+IgE+, CD11b+Gr-1+ cell population in lung and these occurred by suppressing the gene expression of IL-4, IL-5 and IL-4 cytokine production in BALF and serum.

Conclusions : These results suggest that EPV may play an important role in the control of anti-asthmatic activities by down-regulation of Th2 cytokine (especially IL-4, IL-5). In general, EPV has shown a better anti-asthmatic activities compared to EPS.

Key words : *Patrinia scabiosaefolia* Fischer ex Link (EPS), *Patrinia villosa* Jussieu (EPV), asthma, IL-4, IL-5

서론

천식은 기도 벽을 침범하는 특징적인 만성 염증이 기도 반응성의 증가를 동반하는 질환으로서, 기도 반응성의 증가로 인한 기도 협착 및 폐쇄, 기도 염증에 의한 기도의 점막과 내강에서의 활성화된 호산구, 비만세포, 대식세포, T 림프구의 수가 증가되는 특징적인 소견을 보인다¹⁾. 또한, 이들 중 주로 Th2 세포 및 Th2세포에서 분비되는 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인들이 주요 병리적 발병인자로 알려져 있다²⁾.

패장은 패장과(마타리과 ; Valerianaceae)에 속한 다년생 초본인 독갈(白花敗醬) *Patrinia villosa* (THUNB.) Juss.와

마타리(黃花敗醬) *P. scabiosaefolia* FISCH.의 뿌리가 달린 전초를 건조한 것으로, 肝 大腸經으로入하고 성미가 寒苦辛하여, 消腫排膿, 清熱解毒의 효능으로 肺癰, 肺膿瘍, 肝膿瘍 및 子宮內膜炎, 子宮附屬器炎, 卵巢囊腫 등의 염증성 질환에 양호한 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다³⁾.

패장의 주성분으로 독갈의 전초에는 精油가 함유되어 있고, 건조된 果枝에는 sinigrin이 함유되어 있으며, 뿌리에는 morroniside, loganin, villoside, oleanolic acid, hederagenin, B-sitosterol-B-d-glucoside 등과 많은 종류의 saponin을 함유하고 있다¹⁾. 패장의 약리작용은 항바이러스, 항균작용, 간세포 재생작용, 소염작용 등이 있어 유행성 감기, 단독, 피

*교신저자 : 이영철, 강원도 원주시 우산동 상지대학교 한의과대학 본초학교실.

· E-mail : lyc072@sangji.ac.kr · Tel : 033-730-0672 · Fax : 033-730-0653

· 접수 : 2012년 4월 3일 · 수정 : 2012년 4월 23일 · 채택 : 2012년 4월 24일

진, 부종, 과민성 비염등의 염증성 질환에 유효한 것으로 보고되었다⁴⁾.

폐장에 대한 최신 연구로서 Seo 등⁵⁾의 황화패장의 급성췌장염 억제 효과, Cho 등⁶⁾의 황화패장 메탄올 추출물의 궤양성 대장염 억제효과, Lee 등⁷⁾의 RAW264,7 세포주에서 황화패장 에틸아세테이트 분획의 항염효과, Peng 등⁸⁾의 골수암세포주에서 STAT3 억제를 통한 항암효과, Li 등⁹⁾의 백화패장의 항염효과, Xie 등¹⁰⁾의 백화패장 정유성분의 항산화효과, Zhang 등¹¹⁾의 백화패장의 항암효과 등이 보고되어 폐장으로 활용되는 황화패장(마타리), 백화패장(뚝갈) 각각의 염증억제에 대한 효능이 주류를 이루고 있음을 알 수 있다. 이들의 개별적인 항염작용 등에 관한 연구가 있었지만 황화패장, 백화패장의 기도 염증을 특징으로 하는 알레르기성 천식에 미치는 효과와 비교연구는 보고되지 않았다. 폐장의 항염증 작용이 천식에서의 기관지 및 기도의 급만성 염증에 양호한 효과가 있을 것으로 사료되어 ovalbumin으로 유발된 천식 모델에서 기관지 염증 및 천식 억제에 대하여 비교 분석한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 연구방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험동물은 양성 4주령의 BALB/c 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2℃를 계속 유지하면서 2 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 황화패장(*Patrinia scabiosaefolia* FISCH. ex LINK) 및 백화패장(*Patrinia villosa* Jussieu)은 (주)제일약업(원주)에서 구입하여 상지대학교 한의과대학 본초학 교실에서 직접 확인한 뒤 정선하여 사용하였다.

3) 시료제조

황화패장, 백화패장 200 g에 증류수 1,500 ml을 가하여 열탕 추출기에서 3 시간 추출하여 얻은 추출액(*Extracts of Patrinia scabiosaefolia* FISCH. ex LINK ; EPS, *Extracts of Patrinia villosa* Jussieu ; EPV)을 흡입 려과하여, 이를 감압 증류장치(Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland)로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 얻은 완전 건조된 분말(30, 28 g)을 냉동(-80℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

4) 시료의 경구 투여

OVA/Alum로 전신 감작 시킨후 3주째부터 EPS(100mg/kg), EPV(100mg/kg), 일주일에 3회 경구 투여 하였다. 대조군에는 증류수를 동량 경구투여 하였다.

4) 시약 및 기기

Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), magnesium chloride(MgCl₂)은 Sigma사(U.S.A.)제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa사(Japan) 제품을, 역전사효소(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사(Madison, U.S.A.) 제품을, RNazol^B는 Tel-Test 사(U.S.A.) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone사(Logan, U.S.A.)제품, 그리고 agarose(FMC, U.S.A.)등을 사용하였고, 유세포 형광분석에 사용된 anti-CD3-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-CCR3-FITC, anti-CCR5-FITC, anti-B220-FITC, anti-CD23-PE, anti-IgE-PE, anti-CD69-FITC, anti-Gr1-PE, anti-CD11b-FITC, anti-CD8-PE, propidium iodide (PI) 등은 Pharmingen社(Torreyana, U.S.A.)의 제품을, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 light microscope(Nikon, Japan), inverted microscope(Nikon, Japan), flow cytometry (Becton Dickinson, U.S.A.) spectrophotometer (Shimadzu, Japan), CO₂ incubator(Napco, Germany), Imager II photo-system (Bioneer, Korea), 원심분리기(Centrifuge, Sigma), bio-freezer(Sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany), icemaker(Vision과학) 및 homogenizer(OMNI, U.S.A) 등의 것을 사용하였다.

2. 연구방법

1) 세포 분리 및 OVA에 의한 천식 모델 유발

(1) 폐세포(Lung cell)의 분리

폐세포는 각 대조군과 실험군에서 BALB/c mice의 분리된 폐조직을 잘게 절편 한 후 2% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에 collagenase VIII (1mg/ml)를 처리하여 37℃에서 30 분간 5회 digestion 시켰으며, 이로부터 얻어진 폐세포를 실험에 사용하였다. 분리된 폐세포는 배지로 세척한 후 cell strainer (FALCON)에 통과시켜 세포외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거한다. 이들 세포들로부터 ACK 용액을 37℃에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 다시 배지로 세척한 후 0.04% trypan blue로 염색한 후 세포수를 측정한다.

(2) 감작 및 OVA에 의한 천식 유발

① 감작 및 항원 유발 처치(Sensitization and antigen challenge)

각 그룹별(정상군 제외) BALB/c mice에 10 μg의 chicken egg ovalbumin(Grade IV, Sigma, St Louis, MO, USA) 실험 첫 주에 복강 주사한다. 이후 6주동안 일주일에 세 번 씩, 각 회마다 30 분간 aerosolized ovalbumin을 분사시켜 (at a flow rate of 250L/min, 2.5% ovalbumin in normal saline) 흡입시켰다.

② BALF(Bronchoalveolar lavage fluid) study

마지막 기도 inhalation 유발 일주일 후에 말초 혈액을 채취하고 곧바로 기관을 절개하여 기관 상단부를 통해 polyethylene 도관을 삽입하여 고정시키고, 4°C의 멸균된 생리 식염수 3 ml(1 ml씩 3회)로 BALF를 얻었다. 회수된 BALF의 양을 기록하고 즉시 광학 현미경을 사용하여 총 세포수를 계산하였다. BALF를 4°C, 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액은 염증반응에 관여하는 cytokines (protein level)을 ELISA를 이용하여 검사한다.

2) 유세포 형광분석기를 이용한 폐세포에서의 surface marker 분석

Collagenase VIII (1mg/ml) 처리에 의해 얻어진 폐세포를 인산완충생리식염수(3% 우태아혈청, 0.1% NaN₃)로 2회 수세하였다. 4°C에서 면역 형광염색(immunofluorescence staining)을 실시하였고, 각각에 anti-CD3-PE (phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-CCR3-FITC, anti-CCR5-FITC, anti-B220-FITC, anti-CD23-PE, anti-IgE-PE, anti-CD69-FITC, anti-Gr1-PE, anti-CD11b-FITC, anti-CD8-PE, propidium iodide (PI) 등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, USA)를 사용하여 폐세포에 있어서 천식에 관여하는 eosinophil, T cell 등의 표면 분자의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 Cell Quest 프로그램으로 각각의 positive cells의 비율(gated, %)을 산출하였다.

3) 폐세포에서 사이토카인 유전자발현

(1) RNA 추출

각 대조군과 실험군의 BALB/c mice의 폐세포를 RNazol^B를 이용하여 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. RNazol^B에 1/10 양으로 chloroform(40 μ l/400 μ l RNazol^B)을 넣은 후 15 초간 vortex로 혼합하고 얼음에서 15분간 방치하였다. 고속원심분리기(4°C)로 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하고 천천히 흔들어 주었다. 그리고 고속원심분리기로 4°C, 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고, 1 ml의 80% EtOH/DEPC D.W를 넣고 살짝 vortex 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 다시 제거한 speed-vac으로 건조시켰다. DEPC/D.W (0.05%)추출한 total RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

(2) 역전사 반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75°C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이어서 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25 pmole/ 25 μ l), 1 μ l RNase inhibitor(20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000

rpm에서 5 초간 원심분리하여 37°C 항온 수조에서 60 분 동안 반응시켜 firststrand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(3) cDNA PCR

유전자 증폭은 Primus 96 thermocycler system(MWG Biotech., Germany)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하였고, 주형에 대한 primers는 β -actin, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, Interferon- γ (IFN- γ), IL-4, IL-5, IL-13 각각의 sense primer(20 pmole/ μ l)와 antisense primer(20 pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5 mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq polymerase (5 U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation; 95°C, 5분, denaturation; 95°C, annealing; 55°C, 1분, elongation; 72°C, 1분을 25cycles한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

실험에 사용된 Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

Table. 1 Sequences of the oligonucleotide primers

Gene	Primer	Sequence
β -actin	Sense	5'-TGGAATCTGATCCATGAAC-3'
	Antisense	5'-TAAACGCGAGCTCAGTAGTCCG-3'
IL-1 β	Sense	5'-GCAACTGTTCTGAACTCA-3'
	Antisense	5'-CTCGGAGCCTGTAGTGCAG-3'
IFN- γ	Sense	5'-AGCGGTGACTGAAGTCAAGTGTAG-3'
	Antisense	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
IL-6	Sense	5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGA-3'
	Antisense	5'-GGTTTGCCGAGTAGATCTCAA-3'
IL-4	Sense	5'-TAGTTGTCATCCTGCTCTT-3'
	Antisense	5'-CTACAGAGTAATCCATTTGC-3'
IL-5	Sense	5'-GTGCAAATGCAAGGGATAACC-3'
	Antisense	5'-TCCATCTCCAGCACTTCATG-3'
IL-13	Sense	5'-ATGCCCAACAAAGCAGAGAC-3'
	Antisense	5'-TGAGAGAACCAGGGAGCTGT-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program(AAB, USA)을 이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

4) BALF, serum에서의 사이토카인(IL-4, IFN- γ) 및 histamine 측정

BALF를 4°C, 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액 및 각 대조군과 실험군의 mice에서 얻어진 serum을 ELISA와 histamine release assay에 사용하였다. ELISA는 IL-4 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, U.S.A.), IFN- γ ELISA kit (Pharmingen, U.S.A.), histamine release kit(ImmunoTech., France)으로 분비량을 측정하였다. 각 항체(antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세

척한 후 B 세포 배양상층액(culture supernatant)을 100 μ l 씩 분주하였다. 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l 씩 분주하고 암소에서 30 분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error 로 기록하고 ANOVA 검정을 수행하였으며, 각 처리군간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test 분석방법에 의해 $P < 0.05$ 수준에서 결정하였다.

실험결과

1. EPS 및 EPV가 total BALF, lung 세포수에 미치는 영향

각 그룹별(정상군 제외) BALB/c mice에 10 μ g의 chicken egg ovalbumin(Grade IV, Sigma, St Louis, MO, USA)으로 감작 및 항원 유발시켜 기관지 천식을 유도한 뒤 얻어진 BALF, lung의 총 세포수를 관찰한 결과, 정상군에 비해 OVA를 처리한 대조군에서 total BALF 세포수가 증가하였으며, OVA 처리군에 비해 EPV 병용 투여한 실험군에서 total lung, BALF 세포수가 감소하였으나 EPS 투여군에서는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1A, 1B).

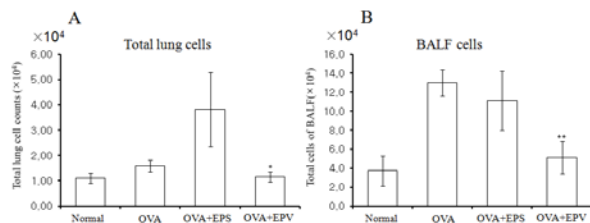


Fig. 1. Numbers of total lung and BALF cells after repeated airway OVA allergen exposure. As described in materials and methods, lung and BALF cells were harvested 24 hrs after the last OVA challenge. Total inflammatory cell numbers in lung and BALF were counted. Results are expressed as mean \pm S.E (N = 5). Statistical significance between control and treatment groups was assessed by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (* $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$). Normal: normal BALB/c mice, OVA: Ovalbumin inhalation+vehicle, OVA+EPS: OVA + EPS (100 mg/kg), OVA+EPV: OVA + EPV (100 mg/kg).

2. FACS에 의한 폐세포의 변화 측정

OVA로 감작 및 항원 흡입 유발을 통하여 기관지 천식을 유도한 뒤 얻어진 각 그룹별 폐세포에서 FACS 분석을 통하여 유세포를 분석한 결과, 정상군에 비해 OVA를 처리한 대조군에서 CD3⁺CCR3⁺, CD3⁺CCR5⁺, CD23⁺B220⁺, IgE⁺B220⁺, CD3⁺CD69⁺, Gr1⁺CD11b⁺, CD4⁺CD8⁻ 등의 세포수가 증가하였고, OVA 처리군에 비해 EPS병용 투여한 실험군에서는 CD3⁺CCR5⁺(Th1), IgE⁺B220⁺, Gr1⁺ CD11b⁺, CD4⁺CD8⁻(Th

세포수가 현저하게 감소되었으며, EPV병용 투여한 실험군에서는 IgE⁺B220⁺, Gr1⁺CD11b⁺, CD4⁺CD8⁻ 세포수가 현저하게 감소되어 주로 IgE⁺ B 세포, granulocytes 및 T helper 세포가 감소되었다(Fig. 2).

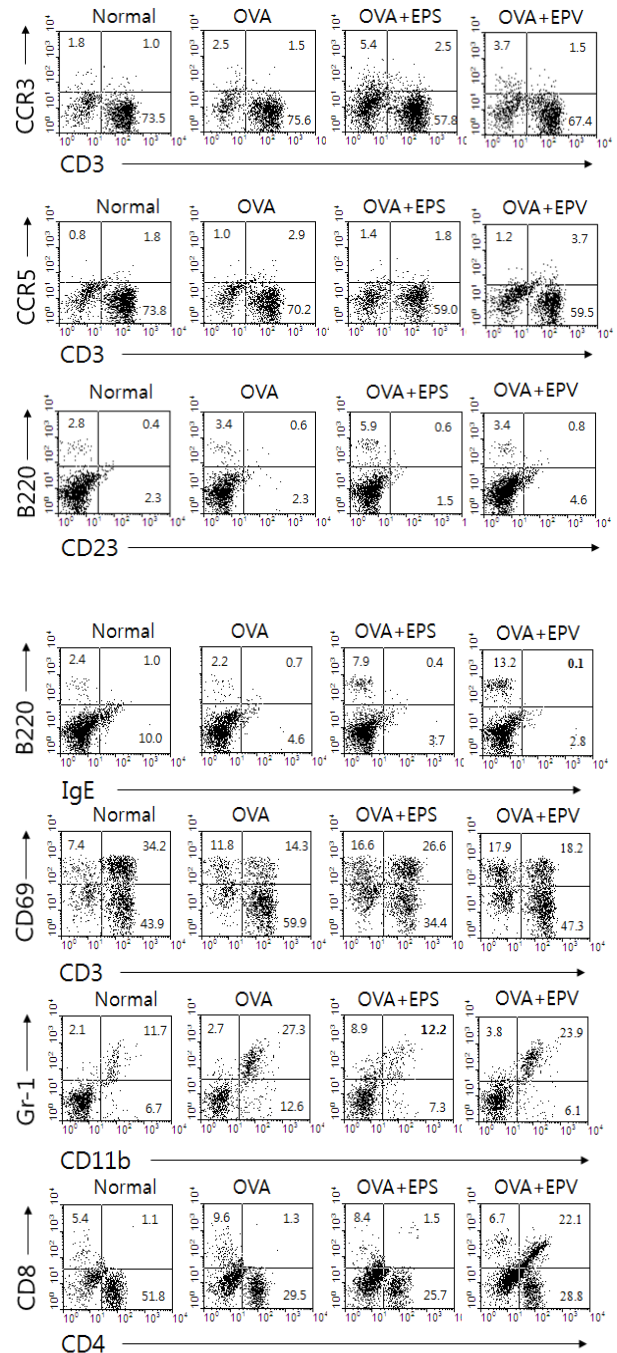


Fig. 2. Effects of EPS and EPV on the expression of various immune cell types in lung cells. BALB/c mice were actively sensitized by intraperitoneal injections of 10 μ g OVA and exposed to aerosolized ovalbumin for 30 min/day, on 2 or 3 consecutive days for 6 weeks(at a flow rate of 250 L/min, 2.5% ovalbumin in normal saline). In each exposures, mice were injected with EPS, EPV (100 mg/kg per os, dissolved in water). One week after the last of the OVA exposures, the mice lung cells were collected and stained with individual antibodies in staining buffer (PBS containing 1% FBS and 0.01% NaN3) for 10 min on ice, and analyzed by two color flow cytometry on a FACScalibur using CellQuest software (BD Biosciences, Mountain View, CA).

3. 폐세포에서 RT-PCR을 이용한 Th1, Th2 유전자 발현 분석

IL-4, IL-5, IL-13 등의 Th2 유전자 및 IFN- γ , IL-1, IL-6 등의 유전자 발현은 OVA를 감작하지 않은 정상 생쥐의 폐세포보다 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에서 증가된 것을 확인할 수 있었으며, EPS투여군에서는 IL-4, IL-13이 감소되었고, EPV 투여군에서는 IL-4, IL-5 등이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 EPS에 의해서는 IL-4가, EPV에 의해서는 IL-5가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

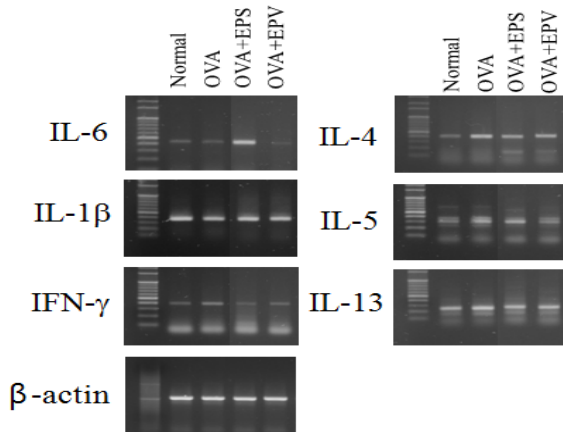


Fig. 3. Effect of EPS and EPV on IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-13 mRNA gene expression profiles in OVA-induced asthmatic mouse lung cells. BALB/c mice were injected, inhaled and sprayed with OVA three times a week for asthma induction. One experimental group was treated with EPS and EPV three times a week for the later 6 weeks. At the end of the experiment, the mouse lungs were dissected out and analyzed RT-PCR. Normal: Normal BALB/c mice, OVA-control: Ovalbumin inhalation (control), OVA+EPS: OVA + EPS (100 mg/kg), OVA+EPV: OVA + EPV (100 mg/kg).

6) ELISA analysis

정상군에 비해, 대조군의 BALF 내 IL-4, IFN- γ , serum 내 histamine 발현량이 증가되었으며, EPS를 투여한 실험군의 BALF 내 IFN- γ , serum 내 IL-4가 감소되었으며, 특히 EPV에 의해서 BALF 및 serum내 IL-4, histamine 생성량이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4).

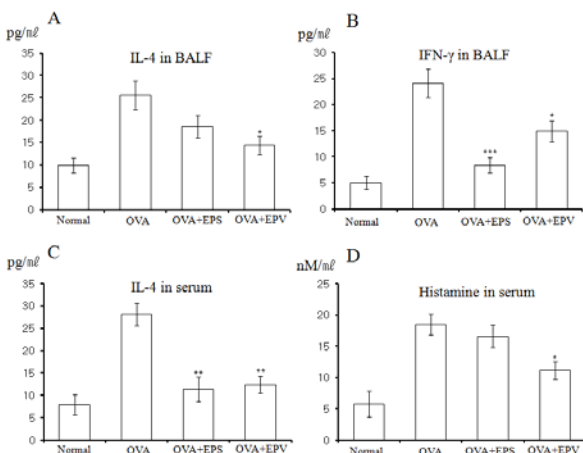


Fig. 4. Effect of EPS and EPV on IL-4, IFN- γ level in BALF and IL-4, histamine in serum in OVA-induced asthma. IL-4, IFN- γ production in the BALF and IL-4, histamine production in serum were assayed by ELISA kit (R&D system). The results are expressed the mean \pm S.E.M. (N=5). Comparisons between control and test groups were analyzed using ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (*P < .05, **P < .01, ***P < .001). Normal: normal BALB/c mice, OVA: Ovalbumin inhalation+vehicle, OVA+EPS: OVA + EPS (100 mg/kg), OVA+EPV: OVA + EPV (100 mg/kg).

고찰

천식은 기도의 만성염증으로 인해서 기도가 과민해짐으로써 가역적인 기도의 수축이 발생하여 기침과 호흡곤란 증상이 유발되는 질환으로 알려져 있으며, 최근에는 호산구와 T 세포의 침윤, 비만세포, 호염기구 및 상피세포의 활성화 등 모든 면역체계가 관여하는 염증성 질환으로 밝혀지면서, 폐조직 및 기관지 폐포세척액에서는 Th2 림프구의 기능 활성화가 관찰되고 있다¹²⁾.

천식은 한의학에서哮喘의 범주에 속하며, 그밖에 上氣, 喘咳, 喘鳴, 喘逆, 喘嘔 등이 이에 해당되는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 치료 원칙은 급성 발작기에는 宣肺豁痰하고, 寒熱을 살피서 宣肺散寒과 宣肺清熱로 나누어 치료하며, 완해기에는 肺, 脾, 腎의 근본을 살피 補益脾肺하거나 肺腎을 雙補하는데, 발작기는 風寒型, 痰濁型, 肺熱型으로 나누어 각각 小青龍湯, 葶藶大棗瀉肺湯, 麻杏甘石湯 등을 체질과 병증에 따라 약물을 적절히 가감하여 치료하고, 완해기는 肺虛型, 脾虛型, 腎虛型으로 나누어, 각각 補肺湯, 六君子湯, 金水六君煎 등의 처방으로 치료한다^{13,14)}.

서론에서 언급된 것과 같이 황화패장 및 백화패장은 청열해독제로서 다양한 염증성 증상에 활용되는 한약재로서, 패장의 항염증 작용이 천식에서의 기관지 및 기도의 급만성 염증에 양호한 효과가 있을 것으로 사료되어 ovalbumin으로 유발된 천식 모델에서 기관지 염증 및 천식 억제에 대하여 비교 분석하였다.

OVA로 유발된 천식모델에서 각종 염증매개인자들은 BALF 세포에서 분비되며, 또한 이들 세포는 천식의 병리기전에 있어 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 호산구는 천식에서 기도 염증을 일으키는 데 가장 중요한 역할을 담당하는 세포이며, Th2 세포에 의해 매개되는 염증 및 IL-5, IL-13을 활성화시켜 천식 발생에 있어서 중요한 역할을 했다고 알려져 있다¹⁶⁾.

EPS, EPV가 총 폐 세포수, BALF내 세포수에 미치는 영향을 살펴보면, 정상군에 비해 대조군에서 증가했고, EPV 병용 투여군에서 유의성 있게 감소되었다. 이는 대조군에서의 폐 내 호산구, 림프구, 대식세포, 비만세포 등의 염증 유발 세포들이 기도에 많이 침착되어 있거나, 기도 및 기관지의 부종 및 점액 분비 과다를 의미한다. EPV 병용 투여군에서 총 폐 세포수 및 BALF 세포수가 유의성 있게 감소된 것은 기도 내 염증세포의 증가를 억제하고, 이들 세포에 의한 염증 반응을 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다(Fig. 1).

CD3는 T 세포 모두에 존재하는 표면분자이며, CCR3⁺ receptor는 주로 호중구, 호산구, 비만세포 및 Th2 세포에서 발현된다¹⁷⁾. 폐세포에서 CD3⁺의 세포수를 살펴보면 정상군에

비해 대조군에서 CD3⁺의 세포수가 현저하게 증가한 것을 관찰할 수 있으며, EPS, EPV 병용 투여군에서 대조군에 비해 CD3⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

CD3⁺CCR3⁺는 폐세포 내 Th2 세포에서 주로 발견되며, CD3⁺CCR5⁺는 주로 Th1 세포에서 발견되는데¹⁸⁾, 본 실험결과 EPS 투여군에서 CD3⁺CCR3⁺의 세포수는 증가되었으며, CD3⁺CCR5⁺는 감소되었다. 이는 본 실험의 다른 결과와 다소 상이한 결과로서 CD3⁺CCR3⁺ 내에서 아형의 면역세포변화를 추가적으로 재검증해야 할 것으로 사료된다. CD23은 성숙된 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 수지상 세포등에서 발견되며, IgE에 IgE의 Fc수용체로서 친화력을 가지고 있고, IgE 생성과 조절에 관여하며¹⁹⁾, CD23과 IgE의 결합에 의하여 과민반응이 진행되므로 이러한 결합 및 활성을 억제하는 것이 천식 치료의 방법이 될 수가 있다. B220는 생쥐의 B 세포에서 주로 발견되는 표면분자²⁰⁾이고 IgE 항체는 B 림프구에 의해 생성된다. IgE+/B220+ 세포수에서 EPS, EPV를 투여한 실험군에서의 세포수가 감소되었으며, 특히 EPV 투여군이 EPS 투여군보다 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

CD69는 주로 초기 활성화된 T 세포, 대식세포, 호산구, 호중구 등에서 발견되며²¹⁾, 본 실험에서 폐세포에서의 CD3⁺CD69⁺의 세포수를 살펴보면 정상군에 비해 대조군에서 감소되고, EPS, EPV를 투여한 실험군에서 대조군에 비해 CD3⁺CD69⁺의 세포수가 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이는 다양한 면역세포들이 약물 투여에 의해서 전반적으로 활성화된 것을 의미하는데 보다 세분화된 세포들의 변화를 추가적으로 확인해야 할 것으로 생각된다.

CD11b는 천식환자의 eosinophil, basophils 에서 높게 발견되는 세포 표면분자이며²²⁾, Gr-1은 과립구의 표지분자로서 과립구의 분화, 성숙에 관여하며²³⁾, CD11b⁺Gr-1⁺는 성숙된 과립구, 단핵구를 표현하며 myeloid suppressor 세포에서 발견되는 지표이기도 하다. 정상군에 비해 대조군에서 폐세포 내 Gr-1⁺CD11b⁺의 세포수가 현저하게 증가한 것을 관찰할 수 있으며, EPS, EPV를 투여한 실험군에서 대조군에 비해 Gr-1⁺CD11b⁺의 세포수가 감소되었으며, EPS 투여군에서 보다 현저하게 감소되었다 (Fig. 2).

CD3 T 세포는 CD4⁺CD8⁻의 T helper 세포와 표적세포를 파괴하는 CD4⁻CD8⁺의 cytotoxic T 세포로 분류되며, CD8 T 세포는 CD4 T 세포와 마찬가지로 천식 유발 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13을 분비하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 정상군에 비해 대조군에서 폐조직 내 CD4⁻CD8⁺의 세포수가 현저하게 증가한 것을 관찰할 수 있으며, EPS, EPV 투여군에서 대조군에 비해 CD8⁺의 세포수가 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

천식은 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 과다한 생성으로 유발되는 기관지 점막의 만성 염증성 질환으로서, 호산구는 조직손상과 기도 과민반응을 포함한 알러지성 천식의 임상적 특징을 유발하는 주요 원인이 되며, 또한 기관지 수축 및 염증매개물질로 알려진 히스타민, 류코트리엔 등의 분비를 야기하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. IL-4는 호산구를 내피세포로 유도하며, IL-5 및 기타 chemokines의 작용에 의해서 염증 조직으로 침윤시키는 것으로 알려져 있다²⁶⁾.

IL-5는 기도의 호산구 과다증을 유발하는 결정적인 사이토카인이며 IL-13은 점막세포에서의 점액분비를 유도하며, IL-4와 같이 작용하여 점막 섬유세포의 성장과 화학주성을 자극하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. IL-1 β , IL-6 및 IFN- γ 는 전염증성 cytokines로 알려져 있으며, IFN- γ 다소 복잡하며 상충되는 역할을 담당하는데 일반적으로 Th2 세포의 분화와 성장을 억제하며 이들 세포로부터 분비되는 Th2 사이토카인들의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있으나, 때로는 심각한 천식을 유도하는 매개자로도 알려져 있다²⁷⁾. IL-6 전염증성 cytokine으로서, 천식유발에 있어서도 중요한 인자로 작용하지만, 이와는 반대로 Th2 세포로 유도되는 염증, 천식을 억제하는 작용도 밝혀져 있다²⁸⁾. RT-PCR에 결과에서, EPS, EPV를 투여한 실험군에서 IL-4, IL-5, IFN- γ 에 대한 유전자 발현이 감소되었으며, EPS 투여군에서는 IL-6가 현저하게 증가되었고, EPV 투여군에서는 IL-5가 현저하게 감소되었다. 선행 연구등에 비추어 보면 EPS는 IL-6, IFN- γ , IL-4 관련 cytokine signal pathway를 통한 천식 억제 기전에, EPV는 IL-5, IFN- γ cytokine signal pathway를 통한 천식 억제 기전에 관여되는 것으로 사료된다. 특히, EPV는 폐세포, BALF 로의 세포 침윤 (Fig. 1), B220+IgE+B 세포 발현 억제 (Fig. 2), IL-5 발현 억제를 통한 천식 염증에 관여하는 것으로 판단된다.

ELISA 분석을 살펴보면, EPV를 투여한 실험군에서 BALF, serum 내 IL-4, BALF 내 IFN- γ , serum 내 histamine이 유의성 있게 감소되었으며, EPS에 의해서는 BALF내 IFN- γ , serum 내 IL-4가 감소되었다 (Fig. 4). Histamine은 프로스타사이클린 (prostacyclin, PGI2)을 합성하여 혈관 확장을 야기하고, 알러지성 과민반응의 구진과 발적 확장을 촉진하는데, EPV가 유의성 있게 histamine 생성을 억제하는 것으로 나타나 EPV가 천식 반응에 있어서 보다 유의성 있는 억제 작용이 있음을 시사한다.

이처럼 EPV는 EPS보다 천식 모델에 있어서 폐조직, BALF로의 세포 침윤억제, 호산구의 유도 및 발현 억제, IL-5 발현 억제, BALF, 혈청 내의 Th2 사이토카인인 IL-4등의 생성 억제에 있어서 효과적으로 작용하는 것으로 나타났으며, 이러한 기전을 통하여 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제시켜, 천식 증상을 완화하는 것으로 생각된다. 이는 EPV가 EPS보다 천식의 주요발생 기전 및 유발원인인 Th1/Th2 밸런스 조절에 보다 효과적으로 관여하는 것으로 생각되며, 앞으로 본 연구를 바탕으로 천식치료의 targets에 따른 효과를 보다 다양한 실험을 통하여 비교평가해야 할 것으로 생각된다.

결론

OVA로 유도된 천식모델에서, 세포를 분리 배양하여 실험을 진행하고 천식에 관여되는 면역학적 인자들을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. OVA 처리군에 비해 EPV 병용 투여한 실험군에서 total lung, BALF 세포수가 감소하였으나 EPS 투여군에서는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다 (Fig. 1).
2. 폐세포에서 FACS 분석한 결과, OVA 처리군에 비해 EPS 병용 투여한 실험군에서는 CD3⁺CCR5⁺(Th1), IgE⁺B220⁺,

Gr1⁺CD11b⁺, CD4⁺CD8⁻(Th) 세포수가 현저하게 감소되었으며, EPV병용 투여한 실험군에서는 IgE⁺B220⁺, Gr1⁺CD11b⁺, CD4⁺CD8⁻ 세포수가 현저하게 감소되어 주로 IgE⁺ B 세포, granulocytes 및 T helper 세포가 감소되었다(Fig. 2).

3. RT-PCR 분석결과, EPS 투여군에서는 IL-4, IL-13이 감소되었고, EPV 투여군에서는 IL-4, IL-5 등이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 EPS에 의해서는 IL-4가, EPV에 의해서는 IL-5가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).
4. ELISA 분석에서, EPS를 투여한 실험군의 BALF 내 IFN- γ , serum 내 IL-4가 감소되었으며, 특히 EPV에 의해서 BALF 및 serum내 IL-4, histamine 생성량이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4).

이상의 결과로 보아 EPS 및 EPV가 일정하게 천식 억제 작용을 가지고 있는 것으로 사료되나, EPV가 EPS보다 천식의 주요발생 기전 및 유병원인인 Th1/Th2 밸런스 조절에 보다 효과적으로 관여하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Lee SY, In KH. Immunopathogenesis of Asthma. Tuberc Respir Dis. 2006 ; 60(4) : 379-390
2. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Immunol. 2008 Mar ; 8(3) : 183-92.
3. The textbook compilation committee of Korean herbology. Korean herbology. Seoul : Younglimsa. 2010 : 255-256.
4. English-Chinese collegiate textbooks in traditional chinese medicine for institutions of traditional chinese medicine of higher learning edited by Beijing University of Traditional Chinese Medicine. The Chinese Materia Medica. Beijing : Xue Yuan Academy Press. 1998 ; 78, 422.
5. Seo SW, Park CS, Hong SH, Kwon KB, Moon HC, Song BK, Kim KY, Park YM, Song HJ, Kim HM, Park SJ. Inhibitory effect of *Patrinia scabiosaefolia* on acute pancreatitis. World J Gastroenterol. 2006 ; 12(7) : 1110-4.
6. Cho EJ, Shin JS, Noh YS, Cho YW, Hong SJ, Park JH, Lee JY, Lee JY, Lee KT. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Patrinia scabiosaefolia* in mice with ulcerative colitis. J Ethnopharmacol. 2011 ; 136(3) : 428-35.
7. Lee EJ, Kim C, Kim JY, Kim SM, Nam D, Jang HJ, Kim SH, Shim BS, Ahn KS, Choi SH, Jung SH, Ahn KS. Inhibition of LPS-induced inflammatory biomarkers by ethyl acetate fraction of *Patrinia scabiosaefolia* through suppression of NF- κ B activation in RAW 264.7 cells. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2012 Apr ; 34(2) : 282-91.
8. Peng J, Chen Y, Lin J, Zhuang Q, Xu W, Hong Z, Sferra TJ. *Patrinia scabiosaefolia* extract suppresses proliferation and promotes apoptosis by inhibiting the STAT3 pathway in human multiple myeloma cells. Mol Med Report. 2011 ; 4(2) : 313-8.
9. Li N, Zhao B, Yu YF, Dong XP. Studies on anti-inflammation chemical constituents of *Patrinia villosa*. Zhong Yao Cai. 2008 ; 31(1) : 51-3.
10. Xie Y, Peng J, Fan G, Wu Y. Chemical composition and antioxidant activity of volatiles from *Patrinia villosa* Juss obtained by optimized supercritical fluid extraction. J Pharm Biomed Anal. 2008 Nov4 ; 48(3) : 796-801. Epub 2008 Aug 14.
11. Zhang T, Li Q, Li K, Li Y, Li J, Wang G, Zhou S. Antitumor effects of saponin extract from *Patrinia villosa* (Thunb.) Juss on mice bearing U14 cervical cancer. Phytother Res. 2008 May ; 22(5) : 640-5.
12. Phillip Factor. Gene Therapy for Asthma. Mol Ther. 2003 ; 7(2) : 148-52.
13. Kim YK, Kwon JN, Mun MG. The Investigation between Oriental and Western Medicine on Cause for Asthma. Thesis collection of Oriental Medical Research center of Dong-Eui University. 2000 ; 12 : 85-105.
14. Lim JK, Roh SS, Kil KJ, Lee YC, Seo YB. The Study of *Duchesnea chrysanta* Inhibition Blocks Airway Inflammation in a OVA-induced Asthma mouse Model. Korea J Herbol. 2005 ; 20(1) : 73-83.
15. Schwartz DA, Thorne PS, Jagielo PJ, White GE, Bleur SA, Frees KL. Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract. Ame J Physiol. 1994 ; 267 : 609-17.
16. Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C. A Critical Role for Eosinophils in Allergic Airways Remodeling. Science. 2004 ; 305 : 1776-9.
17. Boushey HA. New and Exploratory Therapies for Asthma. Chest. 2003 ; 12 3 : 439-45.
18. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol. 2001 ; 1(2) : 108-16.
19. Pène J, Rousset F, Brière F, Chrétien I, Wideman J, Bonnefoy JY, De Vries JE. Interleukin 5 enhances interleukin 4-induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen. Eur J Immunol. 1988 ; 18(6) : 929-35.
20. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, et al. Eosinophilic

- inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990 ; 323(15) : 1033-9.
21. Marzio R, Mauël J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1999 ; 21(3) : 565-82.
 22. Yachie A, Toma T, Miyawaki T, Taniguchi N. Expression of surface CD11b antigen and eosinophil activation. *Nippon Rinsho*. 1993 Mar ; 51(3) : 593-7.
 23. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 1993 ; 151 : 2399-408.
 24. Marsland BJ, Le Gros G. CD8+ T cells and immunoregulatory networks in asthma. *Springer Semin Immunopathol*. 2004 ; 25(3-4) : 311-23.
 25. Shalaby KH, Martin JG. Overview of asthma: the place of the T cell. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 ; 10(3) : 218-25.
 26. Romagnani S. T-cell responses in allergy and asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2001 ; 1(1) : 73-8.
 27. Al Heialy S, McGovern TK, Martin JG. Insights into asthmatic airway remodelling through murine models. *Respirology*. 2011 ; 16(4) : 589-97.
 28. Wang J, Homer RJ, Chen Q, Elias JA. Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol*. 2000 ; 165(7) : 4051-61.