

## Ovalbumin과 디젤배기가스 입자로 유도된 기도염증과 기도 과민성에 대한 황금 추출물의 항천식 효과

임흥빈\*† · 김승형\*\*

\*충북대학교 농업생명환경대학 특용식물학과, \*\*대전대학교 한의과대학 동서생명과학연구원

### Antiasthmatic Effects on *Scutellaria baicalensis* Georgi Extracts Against Airway Inflammation and Hyperresponsiveness Induced by Diesel Exhaust Particles with Ovalbumin Sensitization

Heung Bin Lim\*† and Seung Hyung Kim\*\*

\*Department of Industrial Crop Science & Technology, Chungbuk National University Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea.

\*\*Institute of Traditional Medicine & Bioscience, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea.

**ABSTRACT :** The feature of asthma are airway inflammation (AI), reversible airway obstruction, and an increased sensitivity to bronchoconstricting agents, elevated airway hyperresponsiveness (AHR), excess production of Th2 cytokines, and eosinophil accumulation in the lungs. This study was performed to investigate if oral administration of *Scutellaria baicalensis* Georgi water extracts (SBG) have the antiasthmatic potential for the treatment of asthma. Asthmatic HI and AHR were induced by systemic sensitization to ovalbumin (OVA) with intratracheal instillation with 0.1 mg/mL of diesel exhaust particles (DEP) suspension once a week for 10 weeks in BALB/c mice. SBG was orally administered with the concentration of 200 mg/kg 5 days a week for 10 weeks. Long-term SBG treatment suppressed the eosinophil infiltration into airways from blood, the asthmatic AI and AHR by attenuating the production of cytokine IL-4, IL-5 and IL-13, histamine and OVA-specific IgE. Our data suggest that SBG has inhibitory effects on AI and AHR in a mouse model of asthma, may act as a potential Th2 cytokine antagonist, and may have a therapeutic effect on allergic asthma.

**Key Words :** *Scutellaria baicalensis* Georgi Extracts, Diesel Exhaust Particles, Ovalbumin, Airway Inflammation, Airway Hyperresponsiveness.

## 서 언

직경이 10  $\mu\text{m}$  이하인 미세먼지 (PM 10)와 같은 대기오염원은 코와 기도 점막에 잘 걸러지지 않고 폐포에 침착되어 인체에 미치는 영향은 가장 크다고 알려져 있으며, 미세먼지의 오염원, 크기, 함유성분 및 양에 따라서 다양한 질환을 유발한다고도 보고되고 있다 (Cho *et al.*, 2008). 도시대기를 빈사 상태로 빠트리는 주범은 트럭과 버스, 근래엔 미니밴 등 ‘RV’라고 부르는 레저용 차량까지 디젤 엔진을 쓰는 경유차로서 경유차 매연에 포함된 미세먼지 (0.003~0.1  $\mu\text{m}$ )는 black carbon, hydrocarbons (C<sub>14</sub>-C<sub>35</sub>)과 그 유도체, heterocyclics, polycyclic aromatic hydrocarbons과 그 유도체, acids, alcohols, esters anhydrides, ketones, nitriles, quinones, sulfonates, organic

halogens과 nitrates, inorganic sulfates와 nitrates 및 중금속 등을 함유하고 있으며 (Akiyama, 2006), 기도염증, 암이나 기관지 천식 등 알레르기성 만성호흡기 질환의 원인이 된다고 보고되고 있다 (Inoue *et al.*, 2008).

특히, 장기간 디젤배기가스입자 (diesel exhaust particles : DEP)를 allergen과 함께 실험동물의 호흡기내로 투여했을 때 기도내 호산구성 염증과 함께 기관지 천식이 유발된다고 보고하였다 (Ris, 2007; Sagai *et al.*, 1996). 또한 기도내 디젤배기가스입자의 투여는 B-세포에 의한 IgE 생산을 유도하고 (Liu *et al.*, 2008), lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils은 물론 eosinophils과 같은 염증세포가 침윤하고, IL-4, IL-5, IL-13과 같은 T<sub>H</sub>2 cytokine과 major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil

†Corresponding author: (Phone) +82-43-261-2521 (E-mail) heungbin@chungbuk.ac.kr

Received 2011 February 7 / 1st Revised 2012 March 20 / 2nd Revised 2012 March 29 / Accepted April 10

chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A), platelet activating factor (PAF)과 같은 pro-Th2 chemokine이 유리되는 것을 확인하고 있다 (Gowdy *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Finkelman *et al.*, 2004). 그리고 DEP를 항원과 함께 생쥐에 투여했을 때 기관지천식의 증상인 세기관지가 광범위하게 좁아지는 현상이 나타나며, 발작성인 호흡곤란이 자연적으로 혹은 치료에 의해서 원 상태로 되돌아가는 가역성의 성질을 보이고, 작은 자극에 의해서도 예민하게 기도과민성이 항진되며, 점액성분이 과다 분비된다고 보고되고 있다 (Lim and Lee, 2002; Lim *et al.*, 1998; Sagai *et al.*, 1996).

전통적으로 황금의 뿌리는 한국, 일본 및 중국 등 동아시아 국가에서 염증, 호흡기계 및 위장관계에서 발생하는 박테리아나 바이러스에 의한 염증 치료 및 각종 암 치료를 위한 약제로서 사용되어 왔다 (Lee *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2009). 또한 황금은 해열, 습과 화 제거, 독성 완화 그리고 콜레스테롤과 혈압을 낮추는 효과가 있으며, 담즙 분비, 이뇨작용과 배변효과를 나타낸다고 보고하고 있다 (Kumagai *et al.*, 2007). 그리고 황금은 시험관내에서 유방암, 간암, 췌장암, 전립선암, 요로상피종 암 그리고 경장암 세포의 성장을 억제할 수 있다고 보고하고 있다 (Ye *et al.*, 2002). 황금의 항암효과 메커니즘은 암세포와 염증에서 황금 추출물이 COX-2 활성도를 억제함으로써 PGE2 생성이 억제되기 때문이라고 보고하고 있다 (Zang *et al.*, 2003). 한편, 황금은 흰쥐 간에서 지질과산화물을 억제할 수 있으며 (Kim *et al.*, 2010), 세포면역반응에서 억제 활성을 나타내고 (Lim *et al.*, 2007), 산소라디칼에 의한 산화적 스트레스도 조절할 수 있다고 보고하고 있다 (Lee *et al.*, 2011). 그러나 황금은 이러한 효과 외에 각종 염증을 치료하는 효과가 크다고 알려지고 있으나 (Kim *et al.*, 2009) 천식의 특징인 기도의 만성 염증과 기도 과민성에 대한 효과는 거의 연구된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 생쥐에 10주 동안 DEP를 알리지 항원과 함께 기도내로 장기간 투여하여 천식성 호산구성 기도염증과 기도과민성을 유발하고, 또한 황금 추출물을 구강내로 투여하여, 천식성 기도염증과 기도 과민성이 미치는 황금 추출물의 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. DEP의 포집

DEP는 일본 국립환경연구소 대기영향평가팀으로부터 구입하였다. DEP는 일본 이쓰쯔 자동차 주식회사 4JB1형 2740 cc 4기통직분사식 디젤엔진을 1500 rpm, 10 torque (10 kg/m)의 부하조건하에서 운전했을 때 생기는 배기미립자를 glass fiber filter로 포집하고 -20°C로 보관하면서 실험에 사용하였다. DEP를 전자현미경으로 관찰했을 때 공모양으로 평균 직경이

0.4  $\mu\text{m}$ 인 크기를 갖고 있다고 보고되고 있다 (Sagai *et al.*, 1993).

### 2. 실험동물 사육조건

본 연구에서 사용된 실험동물은 Daehan Biolink Co. (Seongnam, Korea)에서 구입한 Balb/c계 생쥐로 수컷만을 이용하였다. 생쥐를 정상군, OVA + DEP 처리군 및 OVA + DEP + 황금추출물 처리군 세 그룹으로 나누고 한 그룹당 16마리씩 사육하여 기도과민성 측정 등에 8마리씩 사용하였고, 혈액과 기도폐 세정액 채취 등에 8마리씩 사용하였다. 동물사육실의 조건은 conventional system으로 온도는  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는 40~60%, 환기는 1시간당 12~15회로 하였으며, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 실험동물의 사료는 (주)삼양사 (Seoul, Korea) 제품의 고품 사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상 배합사료)를 사용하였다. 그리고 cage는 polycarbonate재질로 만든 것을 사용하였으며 깔집은 (주)JRS (MK- 2000 Corncob, Germany) 제품을 사용하였다. 실험동물의 사육과 모든 실험과정은 대전대학교 동물실험윤리위원회에서 승인되었으며, 국제동물이용관리 위원회 지침을 준수하였다.

### 3. 기도내 DEP 투여 및 황금추출물의 처리

0.05% Tween 80을 함유된 50 mM 생리식염수 인산완충 용액 (PBS pH 7.4)으로 1 mg/mL의 농도가 되도록 DEP suspension 용액을 만든 다음, -4°C에서 초음파 세포분쇄기 (Tomy UD-201, Tokyo, Japan)로 50% 최대 출력하에 5분 동안 sonication하였다. 생쥐를 10% chloral hydrate로 마취한 다음, 기도내 투여용 cannula를 이용하여 OVA + DEP 처리군 및 OVA + DEP + 황금추출물 투여군은 DEP suspension 용액 100  $\mu\text{L}$ 를, 정상군은 50 mM PBS용액 100  $\mu\text{L}$ 를 각각 10주 동안 일주일에 1회 기도내로 투여하였다. 한편 황금은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입 정선한 것을 사용하였으며, 황금추출물은 대전대학교 한의과대학 동서생명과학연구원에서 한약탕기에 황금약재와 증류수를 넣고 3시간 동안 달여서 여과하고 농축한 다음, 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 황금추출물에서 지표성분인 baicalin성분의 함량은 10.7%이었다. OVA + DEP + 황금추출물 투여군은 황금추출물을 50 mM PBS 용액으로 희석하여 200 mg/kg 농도로 10주 동안 일주일에 5일 식도내로 투여되었고, 정상군과 OVA + DEP 처리군은 50 mM PBS용액만을 동량 식도내로 투여되었다.

### 4. OVA 감작화 및 흡입

생쥐에 ovalalbumin (OVA) 감작화 및 흡입은 Kim 등 (2011)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 OVA/alum 용액은

OVA 농도가 500 µg/mL인 50 mM PBS 용액 (pH 7.4)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate 용액을 동량 혼합하여 제조하였고, 실온에서 60분 동안 방치한 다음 pH를 6.5로 조정하고 원심분리 (1000 rpm × 5분)하여 상층액을 사용하였다. OVA + DEP 처리군 및 OVA + DEP + 황금추출물 처리군은 DEP를 기도내에 투여하기 14일과 7일전에 OVA/alum 용액 0.2 mL씩 생쥐 복강내로 2회 투여하였고, DEP를 기도내 투여하기 11일과 2일전에는 1% OVA용액 0.1 mL씩 생쥐 복강내로 투여하였다. 또한 250 × 300 × 250 mm<sup>3</sup> polycarbonate 재질 (DJ-435, Daejong, Korea) chamber안에서 10주 동안 주 1회, 1일 30분 Buxco Aerosol Delivery System (NE-CT10, Buxco, USA)를 이용하여 6주간은 1% OVA 용액, 그리고 마지막 4주간은 2.5% OVA 용액을 aerosol화하여 생쥐에 분무하였다.

### 5. 혈액과 기도폐세정액 채취

실험 종료 후 생쥐는 복강내로 10% chloral hydrate를 투여하여 마취한 다음 심장채혈법으로 채혈하고, 원심분리 (3,000 rpm × 10분)하여 혈청을 얻었으며, 혈청은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 기도폐세정액 (Bronchoalveolar Lavage Fluid: BALF)은 37°C에서 10% fetal bovine serum DMEM 배양액을 기도에 주사기로 주입하고 흡입하여 얻었으며, 이 과정을 3회 반복하였다. Hemocytometer (Fisher)를 이용하여 BALF내 총 세포수를 조사하고 또한 BALF를 Cytospin centrifuge (Cellspin, Hanil, Korea)를 이용하여 원심분리 (400 g × 4분)하여 BALF 세포를 슬라이드 글라스 위에 도말하고 Diff-Quik로 염색하여 백혈구 중 호산구의 세포수를 조사하였다. 폐 세정액의 상층액은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 6. 기도과민성 측정

기도과민성의 측정은 Finotto 등 (2001)의 방법에 준하여 실시하였다. 생쥐의 기도 수축정도는 Buxco system (Biosystem XA; Buxco Electronic Inc, USA)을 이용하여 측정되었다. 기도저항 수치 Pehng값은 아래의 수식에 의해 기계적으로 자동 계산되었다. 10주 동안 DEP의 기도내 투여와 마지막 2.5% OVA 용액을 aerosol화하여 분무하고 난 24시간 후에, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mg/mL의 농도로 제조된 methacholine (MCH)수용액 각각을 aerosol화하여 연속해서 세 그룹의 생쥐에 분무하고 기도반응성을 30분 동안 조사하다.

$$Penh = \frac{PEF}{PIF} \times \left( \frac{Te}{Rt} - 1 \right)$$

(PEF = Peak Expiratory Height, PIF = Peak Inspiratory Height, Te = Expiratory Time, Rt = Time to expire 65% of the volume)

### 7. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

폐세정액에서 interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13의 함량과 interferon-gamma (IFN-γ) ELISA kit는 Biosource사 (Invitrogen, USA) 제품, 혈액으로 유리한 히스타민 함량은 Beckman Coulter사 (Fellerton, USA) 제품, 그리고 혈액에서 immunoglobulin-E (IgE) 함량은 Shibayagi사 (Shibukawa, Japan) 제품의 monoclonal antibody-based mouse IL ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉 well에 각각의 생쥐의 혈청과 BALF를 100 µL씩 분주하고, 1시간동안 실온에서 보관한 다음, 2회 세척용 용액으로 세척하고 biotin-conjugated antibody를 넣어 30분간 방치하였다. 다시 2회 완충용액으로 세척한 다음 avidin-HRP conjugated antibody 100 µL를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. Tetramethylbenzidine 기질을 100 µL씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 다음, stop 용액 100 µL로 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 조사하고 그 함량을 계산하였다.

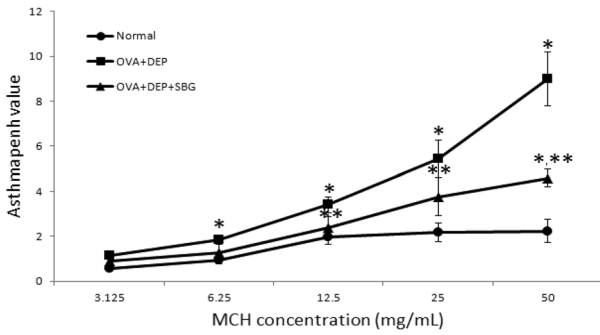
### 8. 통계처리

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 데이터 분석은 StatView version (4.0 Abacus Concepts, Inc. Berkeley, CA)을 이용하였고, Fisher's protected least significant difference test 혹은 Scheffe's F test에 의해 정상군과 OVA + DEP 처리군, 정상군과 OVA + DEP + 황금추출물 처리군 그리고 OVA + DEP 처리군과 OVA + DEP + 황금추출물 처리군 사이에 통계적인 유의성을 검증하였다. 두 처리군 사이에 p값이 0.05 혹은 0.01보다 작은 값을 나타내었을 때 통계적으로 유의성있는 차이가 있다고 판정하고, 각각의 표와 그림에 표기하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 기도과민성

기도과민성은 기관지 천식에 두드러지게 나타나는 특성으로 호흡량의 감소정도로 평가하거나 기도의 평활근 수축체이면서 muscarinic agonists인 MCH, histamine, leukotriens, prostaglandins 등을 처리하여 그 정도를 평가하고 있다. 즉 실험동물에 MCH, acetylcholine 등의 기도수축제를 농도별로 흡입시켰을 때 기도수축제에 의한 기도저항 값이 50% 증가하는 농도로 나타내어 평가하거나 기도의 수축정도를 나타내는 Pehng값으로 평가하고 있다 (Cockcroft, 2010). Fig. 1은 정상군, OVA + DEP 처리군과 OVA + DEP + SBG 처리군에 MCH를 농도별로 처리하고 asthma Pehng값을 측정하여 그룹별 기도과민성을 비교한 결과이다. MCH 분무 농도를 3.125, 6.25, 12.5, 25.0과 50.0 mg/mL로 증가시켰을 때 Pehng값은 각각 0.55, 0.92, 1.95, 1.92와 2.12로 MCH 분무 농도에 따라



**Fig. 1. Change of airway hyperresponsiveness by MCH concentration.** MCH : methacholine, OVA : ovalbumin, DEP : diesel exhaust particle, SBG : *Scutellaria Baicalensis* Georgi extracts. Values recorded are the mean  $\pm$  SD with 8 male Balb/c mice per each group. \*Significantly different from normal group ( $p < 0.01$ ). \*\*Significantly different from OVA + DEP group ( $p < 0.01$ ).

Pehn값은 증가하는 경향을 나타내었다. 한편, OVA + DEP 처리군에서는 MCH 분무 농도에서 Pehn값은 각각 1.14, 1.86, 3.41, 5.44와 8.99로 MCH 분무 농도에 따라 정상군과 달리 Pehn값은 크게 증가하였다. 그러나 OVA + DEP + SBG 처리군에서는 Pehn값이 각각 0.89, 1.27, 2.39, 3.77과 4.59로 같은 MCH 농도로 비교했을 때 상대적으로 정상군에 비해서는 높았으나 OVA + DEP 처리군에 비해서 낮았다. 10주 동안 OVA 감작화와 함께 DEP를 처리하면 기도과민성은 크게 증가하였으나 여기에 황금추출물을 병행 처리하면 기도과민성은 어느 정도 완화된다는 것을 나타내는 결과라고 생각된다.

## 2. 폐 세정액의 세포수

생쥐에 장기간 OVA 감작화와 함께 기도내로 DEP를 투여하고 식도내로 황금 추출물을 투여했을 때 폐의 무게변화와 폐 세정액에서 총 세포수 및 호산구수를 측정된 결과는 Table 1에 나타나 있다. 일반적으로 기도의 염증은 물리적, 화학적, 생물학적인 외적요인에 의해서 생기는 생체반응으로서 일반적인 특징은 염증세포의 침윤과 부종과 기관지선의 비대, 그리고 배세포의 증가 등의 병리생태학적 변화가 나타난다고 한다 (Sagai *et al.*, 1993; Kwak and Lim, 2011). 그러나 일반 급성염증에서는 염증부위에 혈액에서 백혈구 중 호중구가 침윤

하고, 만성염증에서는 주로 림파구가 침윤하는데 반해 기관지 천식성 만성염증에서는 호산구가 침윤하는 특징이 있다 (Takizawa, 2003). 폐 무게의 경우 OVA + DEP 처리군과 OVA + DEP + SBG 처리군 모두 정상군에 비해 통계적 유의성 없이 높은 경향만을 나타냈으며, OVA + DEP 처리군과 OVA + DEP + SBG 처리군 사이에도 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 폐세정액에서 총 세포수는 OVA + DEP 처리군은 정상군에 비해 4.7배 증가하였고 ( $p < 0.01$ ), OVA + DEP + SBG 처리군은 정상군에 비해 2.6배 증가하였으나 ( $p < 0.01$ ) OVA+DEP 처리군에 비해 오히려 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). 한편 폐정액에서 호산구수도 OVA+DEP 처리군이 정상군에 비해 매우 크게 증가하였으나 ( $p < 0.01$ ), OVA + DEP + SBG 처리군은 OVA + DEP 처리군보다는 증가폭이 크지 않았다 ( $p < 0.01$ ). 따라서 생쥐에게 OVA 감작화와 함께 DEP를 기도내로 투여하면 생체의 방어작용의 일환으로 혈액의 염증세포가 기도내로 크게 침윤하며, 염증세포 중에서도 특히 호산구의 침윤이 급증하여 천식성 만성 기도염증이 크게 증가되었다. 그러나 생쥐에 OVA 감작화와 DEP와 함께 장기간 황금추출물을 병용 투여하면 혈액에서 기도내로 침윤하는 총 염증세포 수의 증가가 크게 완화되고, 특히 크게 증가하는 호산구의 침윤도 조절될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 생쥐에 장기간 황금추출물의 투여는 OVA 감작화와 함께 DEP에 의한 천식성 기도 염증을 완화시킬 수 있는 가능성이 있다고 판단된다.

## 3. 혈액에서 IgE와 히스타민 함량

IgE는 기도 염증이 확장되거나 특히 급성 알러지반응으로 나타나는 기관지 천식 발증에 중추적인 역할을 담당한다 (Kuhl and Hananial, 2012). 알러지를 일으키는 항원이 생체에 들어오면, macrophage가 인식, helper T 세포에서 관련 cytokine이 유리, 그리고 B세포에서 IgE항체가 만들어져 mast 세포에 부착시킨다. 그 다음 mast세포는 히스타민, ECF-A, prostaglandin, tromboxane, leucotriene C4, leucotriene D4, leucotriene E4 및 PAF를 생성하여 유리하는 특징을 갖고 있는데, 특히 히스타민의 유리는 혈액에서 기관지조직에 호산구를 침윤시켜 활성화하는 작용을 하여 알러지성 기관지 천식 발증에 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다 (Tomas *et al.*,

**Table 1.** Change of lung weights, the number of total cells and eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid.

	Normal	OVA + DEP	OVA + DEP + SBG
lung weights (g)	0.14 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.04	0.16 $\pm$ 0.03
Total Cells ( $\times 10^5$ cells)	1.81 $\pm$ 0.23	8.59 $\pm$ 1.50*	4.76 $\pm$ 0.40***
Eosinophils ( $\times 400$ )	2.00 $\pm$ 0.50	356.0 $\pm$ 59.0*	205.6 $\pm$ 9.6***

OVA : ovalbumin, DEP : diesel exhaust particle, SBG : *Scutellaria baicalensis* Georgi extracts. Values recorded are the mean  $\pm$  SD with 8 male Balb/c mice per each group. \* Significantly different from normal group ( $p < 0.01$ )

\*\* Significantly different from OVA + DEP group ( $p < 0.01$ )

**Table 2.** Change of histamine and IgE levels in serum.

	Normal	OVA + DEP	OVA + DEP + SBG
Histamine (ng/mL)	46.6 ± 13.6	178.8 ± 29.8*	114.6 ± 15.8***
IgE (U/mL)	26.2 ± 2.0	161.0 ± 26.0*	68.8 ± 6.6***

OVA : ovalbumin, DEP : diesel exhaust particle, SBG : *Scutellaria Baicalensis* Georgi extracts. Values recorded are the mean ± SD with 8 male Balb/c mice per each group. \* Significantly different from normal group (p < 0.01)

\*\* Significantly different from OVA + DEP group (p < 0.01)

**Table 3.** Change of cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid.

Cytokine	Normal	OVA + DEP	OVA + DEP + SBG
IL-4 (pg/mL)	15.7 ± 3.1	183.1 ± 41.7*	85.0 ± 19.6***
IL-5 (pg/mL)	48.3 ± 9.2	507.0 ± 87.5*	243.2 ± 46.2***
IL-13 (pg/mL)	7.4 ± 2.2	100.3 ± 14.6*	39.6 ± 9.4***
IFN-gamma (pg/mL)	12.5 ± 5.6	30.8 ± 14.8	37.3 ± 14.2*

OVA : ovalbumin, DEP : diesel exhaust particle, SBG : *Scutellaria Baicalensis* Georgi extracts. Values recorded are the mean ± SD with 8 male Balb/c mice per each group. \* Significantly different from normal group (p < 0.01)

\*\* Significantly different from OVA + DEP group (p < 0.01)

2011). Table 2는 생쥐에 10주동안 OVA 감작화와 함께 기도 내에 DEP를 투여하고 식도내로 황금추출물을 투여했을 때 혈장에서 알러지 반응의 주체인 히스타민 함량과 IgE의 함량을 측정하고 비교한 결과이다. 혈장에서 histamine함량은 OVA + DEP 처리군이 정상군에 비해 3.8배 증가하였으나 (p < 0.01) OVA + DEP + SBG 처리군에서는 오히려 OVA + DEP 처리군에 비해서 감소하였다 (p < 0.01). 혈장에서 IgE함량도 OVA + DEP 처리군이 정상군에 비해 6.1배 증가하였으나 (p < 0.01), OVA + DEP + SBG 처리군은 정상군에 비해 2.6배 증가하여, OVA + DEP 처리군에 비해 크게 감소하였다. 따라서 생쥐에게 장기간 DEP를 OVA 감작화와 함께 기도내로 투여했을 때 천식 발증에 중요한 지표인 IgE와 histamine 함량이 증가하지만 황금추출물은 이들 함량의 증가를 완화시키는 효과가 있다고 생각된다.

#### 4. 폐 세정액에서 Cytokine 함량

사람과 실험동물에 담배연기입자, 자동차배기가스 입자 및 지하철 분진 및 가정분진과 같은 환경오염물질에 노출시키면, 알러지원의 감작화를 더 쉽게 유도하고, 천식의 증상을 악화시키며, 알러지원으로 유도되는 특이 IgE 함량, IL-4, IL-5와 IL-13 함량, 그리고 히스타민 함량을 증가시키는 것이 특징이라고 보고되고 있다 (Peden and Reed, 2010). Table 3은 10 주동안 OVA 감작화와 함께 기도내 DEP를 투여하고 황금추출물을 식도내 투여했을때 폐세정액에서 cytokine함량을 조사한 결과이다. OVA + DEP 처리군에서 IL-4, IL-5와 IL-13 함량은 정상군에 비해 각각 11.7배, 10.5배와 13.6배 증가하였으나 OVA + DEP + SBG 처리군에서 이들의 함량은 정상군에 비해 각각 5.4배, 5.0배와 5.4배로 OVA + DEP 처리군에 비해

크게 감소하였다 (p < 0.01). 한편, 폐세정액에서 IFN-γ의 함량은 OVA + DEP 처리군이 정상군에 비해서 통계적 유의성 없이 증가하는 경향을 보였으나, OVA + DEP + SBG 처리군은 정상군에 비해 증가하였고 (p < 0.01), OVA + DEP 처리군에 비해서는 증가하는 경향만을 나타내었다. 따라서 생쥐에 장기간 DEP를 OVA 감작화와 함께 병용투여하면 면역계세포에 면역조절작용이 현저하다고 알려진 IFR와 같은 helper T1 세포형 cytokine함량에는 큰 영향을 미치지 못하지만 B세포의 IgE항체생성 촉진작용을 나타내는 IL-4와 B세포의 분화 및 항체생성을 자극하고, IgA 생성을 촉진하고, 또한 백혈구 중 호산구를 활성화시키는 IL-5와 IL-13과 같은 helper T2 세포형 cytokine의 함량은 크게 증가되었으며, 이는 선행 연구한 결과 (Lim and Kim, 2009)와 같았다. 그러나 생쥐에 장기간 황금추출물 병용투여는 OVA 감작화와 DEP 투여로 인한 IL-4, IL-5 및 IL13의 함량 증가를 억제하였다. 따라서 황금추출물은 알러지원에 의한 천식성 기도 염증과 기도과민성의 특징인 cytokine IL-4, IL-5와 IL-13 함량의 증가를 완화시킬 수 있는 효과가 있다는 것을 나타내는 결과라고 판단하였다.

예로부터 황금은 한국, 일본, 중국 등 아시아국가에서 다양한 형태의 염증성 질환의 치료제로서 사용되어 왔다 (Kim *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2009; Yune *et al.*, 2009) 특히 황금의 뿌리는 항바이러스, 항박테리아 및 항염증 제제로 널리 사용되고 있으며, 현재 호흡기계 감염, 설사, 황달, 간염 치료를 위한 약제로도 사용되고 있고, 특히 항염증 활성이 가장 크다고 보고하고 있다 (Yune *et al.*, 2009). 황금의 뿌리에는 baicalein, baicalin, wogonin, acteoside와 같은 flavonoid계와 wogonoside, neobaicalein, oroxylin, oroxylin A, skullcapflavone, dihydrooroxylin A, Chrysin, Stigmasterol, β-sitosterol

등 생리활성 성분이 존재하며, 이들 성분이 free radical 제거 및 항산화활성 뿐만 아니라 in vitro와 in vivo계에서 항균, 항알러지, 항염증, 이노, 담즙배출, 항경련, 고혈압저하 및 해열작용은 물론 중추신경계와 지질대사 등의 다양한 약리효과를 나타낸다고 보고하고 있다 (Yoon *et al.*, 2009). 이들 성분 중에서 특히 baicalin은 뇌 손상에 대한 항염증 효과와 파킨슨병 유발 흰쥐에서 cytokine IL-1과 tumor necrosis factor의 함량을 감소시키는 효과가 있으며 (Kim *et al.*, 2009), 또한 baicalin과 baicalein 성분은 비만세포의 과민성 물질의 방출을 억제하여 항염과 항알러지 작용을 나타낸다고 보고하고 있다 (Jung *et al.*, 2012). 본 실험에서 장기간 생쥐에 알러지원 OVA 감작화와 DEP 처리로 인한 각종 염증세포의 침윤과 기관지 천식성 염증반응에서도 황금 추출물은 알러지와 관련된 면역 항체와 Th2 cytokine들의 증가를 완화시키는 효과가 있기 때문에 알러지원에 의한 기관지 천식을 치료하기 위한 약제로서 가능성이 있다고 생각된다. 또한 동물실험에서 염증 제거에 효과가 있으며, 한방에서 각종 염증치료에 많이 이용하는 약재 중에서 황금 추출물은 기관지 천식성 염증을 억제하는 효과가 다른 추출물에 비해서 가장 우수하였다 (데이터 미 제시). 한편 황금추출물을 기관지 천식을 치료하기 위한 약제로서 사용하기 위해서는 황금추출물을 계통별로 분리하고 구성 약리성분을 확인하며, 이들 성분이 직접적으로 작용해서 나타나는 효과인지 아니면 이차 대사산물에 의한 효과인지 추가적인 연구가 필요하며, 또한 많은 논문에서 확인된 황금의 대표적 약리활성 성분인 baicalin이 천식성 기도염증과도 관련이 있는 지 그리고 현재 기관지 천식 치료제로 사용되고 있는 cyclosporin A, heperidine과 같은 성분들과 그 효과를 비교하면서 더 세심한 성분연구 및 메카니즘 연구가 필요하리라 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 2011년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## LITERATURE CITED

- Akiyama K.** (2006). Gas chromatographic analysis and aerosol mass spectrometer measurement of diesel exhaust particles composition. *Talanta*. 70:178-181.
- Cho YS, Lee JT, Jung CH, Chun YS and Kim YS.** (2008). Relation between particulate matter measured by optical particle counter and mortality in Seoul, Korea, during 2001. *Journal of Environmental Health*. 71:37-43.
- Cockcroft DW.** (2010) Direct challenge tests. airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 138: 18S-24S.
- Finkelman FD, Yang M, Orekhova T, Clyne E, Nerbstein J, Whitekus M, Diaz-Sabchez D and Morris SC.** (2004). Diesel exhaust particles suppress in vivo IFN-gamma production by inhibiting cytokine effects on NK and NKT cells. *The Journal of Immunology*. 172:3808-3813.
- Finotto S, De Sanctis GT, Lehr HA, Herz U, Buerke M, Schipp M, Bartsch B, Atreya R, Schmitt E, Galle PR, Renz H and Neurath MF.** (2001). Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *The Journal of Experimental Medicine*. 193:1247-1260.
- Gowdy K, Krantz QT, Daniels M, Linak WP, Jaspers I and Gilmour MI.** (2008). Modulation of pulmonary inflammatory responses and antimicrobial defenses in mice exposed to diesel exhaust. *Toxicological and Applied Pharmacology*. 229:310-319.
- Inoue KI, Koike E, Yanagisawa R and Takano H.** (2008). Effects of pulmonary exposure to diesel exhaust particles on extrathoracic CD4 polarization in asthmatic mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 28:1-6.
- Jung MA, Jang SE, Hong SW, Han MJ and Kim DH.** (2012). The role of intestinal microflora in anti-inflammatory effect of baicalin in mice. *Biomolecules and Therapeutics*. 20:36-42.
- Kim EH, Shim BS, Kang SH, Jeong GJ, Lee JS, Yue YB and Chun MS.** (2009). Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *Journal of Ethnopharmacology*. 126:320-331.
- Kim SH, Kim BG and Lee YC.** (2011). Antiasthmatic effects on hesperidin, a potential Th2 cytokine antagonist, in a mouse model of allergic asthma. *Mediators of Inflammation*. 2011, ID 485-402, 12 pages.
- Kim SJ, Moon YJ and Lee SM.** (2010). Protective effects of baicalein against ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Journal of Natural Products*. 73:2003-2008.
- Kuhl K and Hanania VA.** (2012). Targeting IgE in asthma. *Current Opinion of Pulmonary Medicine*. 18:1-5
- Kumagai T, Muller CI, Desmond JC, Imai Y, heber D and Koeffler HP.** (2007). *Scutellaria baicalensis*, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. *Leukemia Research*. 31:523-530.
- Kwak HG and Lim HB.** (2011) Inhibitory effects of *Angelicae Dahuricae* Radix extract on COPD induced by cigarette smoke condensate and lipopolysaccharide in mice. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:380-387.
- Lee IK, Kang KA, Zang R, Kim BJ, Kang SS and Hyun JW.** (2011). Mitochondria protection of baicalein against oxidative damage via induction of manganese superoxide dismutase. *Environmental Toxicology & Pharmacology*. 31:233-241.
- Lee SE, Lee JH, Kim JK, Kim GS, Kim YO, Soe JS, Choi JH, Lee ES, Noh HJ and Kim SY.** (2011) Anti-inflammatory activity of medicinal plant extracts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:217-226.
- Li YJ, Takizawa H, Azuma A, Kohyama T, Yamauchi Y, Takahashi S, Yamamoto M, Kawada T, Kudoh S and Sugawara I.** (2008). Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel

- exhaust particles in mice. *Clinical Immunology*. 128:366-373.
- Lim BO, Choi SY, Choi DK, Park PJ, Choi WS, Kim JD and Shin HM.** (2007). Inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis* root extract on chemical mediator release and immune response. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:132-137.
- Lim HB and Kim SH.** (2009). The effect of crude saponins of Korean red ginseng against airway inflammation and airway hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:90-96.
- Lim HB, Ichinose T, Miyabara Y, Takano H, Kumagai Y, Shimoyjo N and Sagai M.** (1998). Involvement of superoxide and nitric oxide on airway inflammation and hyperresponsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 25:635-644.
- Lim HB and Lee DW.** (2002). Diesel exhaust particles and airway inflammation: effect of nitric oxide synthase inhibitors. *Journal of Korean Society for Atmospheric Environment*. 18:121-128.
- Liu J, Ballaney M, Alalem U, Quan C, Jin X, Perera F, Chen LC and Miller RL.** (2008). Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production *in vivo*. *Toxicological Science*. 102:76-81.
- Peden D and Reed CE.** (2010). Environmental and occupational allergies. *Journal of Clinical Immunology*. 125:S150-S160.
- Ris C.** (2007). US EPA health assessment for diesel engine exhaust : a review. *Inhalation Toxicology*. 19:229-39.
- Sagai M, Furuyama A and Ichinose T.** (1996). Biological effects of diesel exhaust particles(DEP). III. Pathogenesis of asthma-like symptoms in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 21:199-209.
- Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M and Mori Y.** (1993). Biological effects of diesel exhaust particles. I. In Vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Radical Biology and Medicine*. 14: 37-47.
- Takizawa H.** (2003). Role of inflammatory cells in the development of airway inflammation. *Nippon Rinsho Journal*. 61:2107-2112.
- Thomas A, Platts-Mills E and Woodfolk JA.** (2011). Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunological Reviews*. 242:51-68
- Ye F, Xui L, Yi J, Zhang W and Zhang DY.** (2002). Anticancer activity of *Scutellaria baicalensis* and its potential mechanism. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 8:567-572.
- Yoon SB, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae HS, Ko SG, Choi HY, Oh MS and Park WS.** (2009). Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract of RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 125:286-290.
- Yune TY, Lee JY, Cui CM, Kim HC and Oh TH.** (2009). Neuroprotective effect of *Scutellaria baicalensis* on spinal cord injury in rats. *Journal of Neurochemistry*. 110:1276-1287.
- Zang DY, Wu J, Ye F, Xue L, Jiang S and Yi J.** (2003). Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Research*. 63:4037-4043.