



Original Article / 원저

천식동물모델을 이용한 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물의 실험적 연구

서창우¹·이영철¹·이장천^{2*}

1:상지대학교 한의과대학, 2:부산대학교 한의학전문대학원

The Effects of *Lycium chinese Mill.*, *Morus alba L.* and Their Combination on the Asthmatic Murine Model

Chang-woo Seo¹ · Young Cheol Lee¹ · Jang-Cheon Lee^{2*}

1:College of Korean Medicine, Sangji University,
2:School of Korean Medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : To clarify the possible effect of *Lycium chinese Mill* (LC), *Morus alba L* (MA), and *Lycium chinese Mill.* + *Morus alba L.* (LC+MA), we have examined their influence on the development of pulmonary eosinophilic inflammation in the asthmatic murine model.

Methods : Female Balb/c mice (5weeks) were immunized on two different days (21 days and 7 days before inhalational exposure) by intraperitoneal injections of 0.2ml alum-precipitated Ag containing 100 μ g of OVA bound to 4 mg of aluminum hydroxide in PBS. Seven days after the second sensitization, mice were exposed to aerosolized ovalbumin for 30 minutes/day on 3 days/week for 8 weeks (at a flow rate of 250 L/min, 2.5% ovalbumin in normal saline) and, LC, MA, and LC+MA (500 mg/kg) were orally administered 3 times per a week for 8 weeks.



Results : The suppressive effect of LC, MA, and LC+MA were demonstrated by the accumulation of eosinophils into airways, with the reduction of eosinophil, total lung leukocytes numbers. These were correlated with the marked reduction of IL-5, IL-13 and IL-4 levels in the BALF and serum. OVA-specific IgE levels were also decreased in serum and BAL from these mice. LC, MA, and LC+MA decreased eosinophil CCR3 expression and CD11b expression in lung cells.

Conclusions : These results indicate that LC, MA, and LC+MA have high inhibitory effects on airway inflammation and hyper-responsiveness in the asthmatic murine model. The suppression of IL-5, IgE, eosinophil CCR3 expression and CD11b expression, and the increase of IFN- γ production in BALF seem to contribute to this effect. Hence, the results indicated that LC, MA, and LC+MA could act as a immuno-modulator which possesses anti-inflammatory and anti-asthmatic property by modulating the imbalance between Th1 and Th2 cytokines.

Keyword : *Lycium chinese Mill.*, *Morus alba L.*, Immuno-modulator, Anti-inflammatory, Anti-asthmatic.

I. 서 론

최근 주거형태의 변화와 환경오염이 원인이 되는 질병이 증가하고 있는 추세이다. 천식도 그 가운데 하나로, 공기의 소동이 원활하게 이루어 지지 않는 아파트나 대형 건물의 사무실에서 대부분의 시간을 보내는 현대인들에게 다발하는 질환 가운데 하나이다. 특히, 시멘트를 생산함에 있어 산업 폐기물을 원료와 재료로 사용할 수 있게 하는 법안이 통과된 이후로, 주거문제는 더욱 큰 심각성을 내포하게 되었다.

韓醫學의 最古 經典인 『黃帝內經』에서는 『素問·逆調論』에서 喘息을 肺·胃·腎의 문제로 인해 발생하는 것으로 설명하고 있고, 哮喘證에 대해서는 언급하지 않고 있다. 『內經』에서 哮喘證이라는 병명을 기술하지 않았지만, 『素問·陰陽別論』에서 “喘鳴”이라는 용어를 사용하고 있으니, 이 喘鳴症이 지금의 哮喘證과 유사성을 가지고 있다.

현대 의학에서 천식은 환경적 요인과 유전적 요인의 복합적 원인으로 발생하는 것으로 알려져 있으며^{1,2)}, 병리적인 특성은 기도 평활근의 수축, 부

종과 세포침윤으로 인한 점막 비후와 기도 내강의 비정상적으로 농도가 짙고, 끈적끈적한 농축된 점액이 특징으로서 이로 인한 기도저항이 증가되어 반복적이고 간헐적인 기침, 호흡곤란, 흉부 압박감과 천명이 유발되는 것으로 알려져 있다³⁾. 면역학적 모델에서 천식은 기도점막에서 비만세포에 부착하는 IgE 항체에 의해 유발되며, 이후 Th2 세포에서 생산되는 IL-4, IL-5, IL-13 등이 호산구를 유인하고 활성화시키며 B 세포의 IgE의 생성을 자극한다. 이들은 결국 기관지 수축 및 염증매개물질로 알려진 histamine, leukotriens 등의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다⁴⁻⁵⁾.

본 연구는 천식환자에 사용되는 많은 처방과 약물 중에 주로 實證性 喘息에 효과가 좋은 地骨皮 (root cortex of *Lycium chinese Mill.* : LC)와 桑白皮 (cortex of *Morus alba L.* : MA)가 천식억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동물모델인 생쥐로 면역학적 실험을 통하여 그 결과를 관찰한 것이다.

한편 地骨皮, 桑白皮에 대한 연구보고를 보면, 地骨皮는 염증질환의 주된 원인으로 밝혀진 NO 생성을 촉진하는 COX-2, iNOS 등을 억제하며⁶⁾, 조혈줄기세포의 증식을 촉진하고⁷⁾, 桑白皮는 compound48/80으로 유도된 아나필락시스 반응 및 IgE 매개에 의한 비만세포의 활성을 억제하며⁸⁾, COX-2, iNOS 생성

*교신저자 : 이장천, 경남 양산시 물금읍 범어리 부산대학교 한의학전문대학원

· Tel : 051-510-8459

· E-mail : jcl7788@pusan.ac.kr

·접수 2013/06/02 ·수정 2013/06/06 ·채택 2013/06/12

억제하고⁶⁾, 호산구의 탈과립 억제작용을 통한 기도과민반응을 억제하는 것으로 보고되었으며⁹⁾, 이외에 상백피의 항염작용¹⁰⁾, 마우스의 복강비만세포의 탈과립 및 히스타민 유리 억제효과¹¹⁾, 항알러지 작용¹²⁾,喘息모델 흰쥐의 BALF 내 면역세포 및 血清 IgE 생성 억제효과¹³⁾ 등이 보고되었다.

이와같이 地骨皮, 桑白皮가 소염, 항알러지 작용이 있는 것으로 보고되고 있지만 이들 및 배합약물에 대한 면역학적 천식 억제 기전 및 항천식효과에 관한 실험보고는 미비한 실정이다.

이에 저자는 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물의 천식 억제효과를 알아보기 위하여, Balb/c 생쥐에 ovalbumin으로 천식을 유발한 후 폐 및 기관지폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid)에 존재하는 총 폐세포수, 총 백혈구수, 총 호산구수, 비장과 DLN(drainage lymph node)내의 총 세포수와 그리고 유세포 형광염색한 폐조직내 CD3, CD19, CD3/CD69, CD4, CD8, CD3⁻/CCR3⁺, CD3⁺/NK1.1⁺와BALF내의CD3,CD19, CD3⁺/CD69⁺, CD3⁻/CCR3⁺, B220/IgE⁺와 ELISA분석에서 BALF내의 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin, IgE 그리고 혈청내의 IgE와 histamine 유출량의 변화와 마지막으로 H&E, M-T 두가지 염색법으로 폐세포조직을 분석하면서 모든 실험결과를 관찰한 후 유의성 있는 효능을 확인할 수 있었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

(1) 약물

실험에 사용된 약제는 地骨皮, 桑白皮이며, 대한민국 서울 경동시장에서 구입하여 상지대학교 한의과대학 본초·방제학교실에서 감정한 후 정선하여 사용하였다.

(2) 동물

실험동물은 雌性인 5주령의 Balb/c 생쥐 30수를 (주)대한바이오링크(대한민국충북 음성)에서 공급받아 실험 당일까지 고품사료(항생제 무

첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃를 유지하여 2주간 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 정상군, 대조군, 실험군으로 나누고, 각군은 5마리씩을 배정하였다. 대조군과 실험군은 난알부민으로 천식을 유도하였고, 정상군은 PBS 만을 처리하였다.

(3) 시료의 추출

地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물을 각각 200g에 각각 증류수 2,000 ml를 가한 뒤 열탕 추출기(대웅, Korea)로 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압증류장치(rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하고, 다시 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전건조한 시료 26, 24, 25g을 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

(4) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 thiazol-2,5-carboxymethoxyphenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), complete adjuvant, chloroform, collagenase, isopropanol, 적혈구용혈액(RBC lysis solution), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), formaldehyde, magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma 사 (U.S.A) 제품을 사용하였으며, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Hyclone 사 (Logan, U.S.A) 제품을 사용하였으며, 유세포 분석을 위한 항체인 anti-CD3-PE(phycoerythrin), anti-CD4-FITC(fluorescein isothiocyanate), anti-Gr1-PE, anti-CD8-FITC, anti-CD11b-FITC, anti-IgE-FITC, anti-CD69-FITC, propidium iodide (PI)와 RNase는 Pharmingen 사 (Torreyana, U.S.A) 제품을, IL-5는 R & D system社 (Minneapolis, U.S.A) 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 방법

(1) 천식 생쥐모델



500 μ g/ml의 난알부민(ovalbumin : OVA)과 10%(w/v)aluminum potassium sulfate (Alum; Sigma)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750xg에서 5분동안 원심분리한다. 이 침전물(pellet)을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한후 100 μ g OVA을 0.2 ml로 조정하여 복강 내로 주사하여 전신감작을 시킨다. 이후 14일째에 생쥐를 마취한후 OVA(500ug/ml) 100 μ l를 기도투여(i.t)하였다. 21일째부터 분무기를 이용하여 2.5 mg/ml OVA용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 8주 동안 비강 및 기도 내로 흡입시킨다. 이때 정상군은 PBS 만을 주사, 흡입시켰다.

(2) 시료의 경구 투여

OVA로 전신감작 시킨 후 21일째부터 地骨皮(500 mg/kg), 상백피(500 mg/kg) 및 두 배합약물의 추출물 (500 mg/kg)을 일주일에 5회 경구 투여 하였다. 대조군에는 생리식염수를 동량 경구 투여하였다. 또한 양성대조군으로 1주일에 3회 cyclosporin A (CsA, 20 mg/kg)를 8주간 복강주사 하였다.

(3) 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)분리 및 분석

8주 후 기도저항을 측정한 뒤, 생쥐의 눈에서 혈액을 분리하고 BALF로부터 세포를 분리하기 위해 목부분을 해부하여 10% FBS/DMEM 배양액 1ml을 넣은 주사기를 기관(trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 3회 순환시켜 분리하였다. ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고 배지로 세척한 뒤 0.04% trypan blue로 염색하여 세포수를 측정하였다.

분리된 BALF 세포를 cytospin (한일과학)에서 1000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 slide를 건조하여 Diff-Quick 용액 (Baxter Healthcare, Miami, FL)을 이용하여 염색하였다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 염색특징 등으로 면역세포의 type을 결정한 뒤 광학현미경(400 \times , Nikon, japan)으로

관찰하여 infiltration된 호산구 수를 측정하였다. 다시 폐를 적출하여 무게를 측정한 후 폐조직을 잘게 절편하고 2% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에 1 mg/ml의 collagenase IV를 가한 용액 3 ml로 37°C, shaking 배양기에서 30분 동안 5회 이상 조직을 분해 (digestion) 하여 폐세포를 분리한 뒤 cell strainer (FALCON)로 조직이나 불순물을 제거한 뒤 세포수를 측정하였다.

(4) 기도의 과민반응 (airway hyperreativity : AHR) 측정

한약재 투여군의 폐기능 검사를 위하여 전신체적변동기록법(Whole body plethysmograph, model Biosystem XA; Buxco Electronics Inc, Troy, New York, USA)을 이용하여 메타콜린에 의한 기도 협착을 유발하여 기도의 과민 반응을 측정하였다.

메타콜린 반응의 측정은 최종 흡입 후 생쥐를 각각의 chamber bias에 넣고 30분 후 안정화가 되면 메타콜린을 3분간 흡입시키고 1분간 dry한 후에 10분간 기록을 하고 데이터를 10초 간격으로 자동 흡산하여 나타내며, 본 실험에서는 기록후 5-6분 동안 기록한 데이터를 흡산한 결과이다. 메타콜린은 3.125 mg/ml에서 50 mg/ml 까지 농도를 증가하면서 PenH 값을 측정하였다. PenH 값은 다음과 같은 공식에 의하여 측정하였다.

$$\text{PenH} = \text{Pause} \times \text{PEF}/\text{PIF}, \text{Pause} = (\text{Te} - \text{Tr}) / \text{Tr} (\text{PIF, peak inspiratory flow; PEF: peak expiratory flow; Te, expiratory time; Tr, relaxation time}).$$

(5) 유세포 분석 (flow cytometry analysis)

폐와 폐포세척액으로부터 분리한 세포로부터 여러가지 세포표면 분자들에 대한 항체를 이용하여 면역염색하기 위하여 2~5 $\times 10^5$ 세포로 조정하여 염색 완충용액 (1% 우태아 혈청, 0.01% NaN₃가 포함된 인산염 완충용액, pH 7.4)으로 1회 세척하였다. 이를 FITC (fluoresceinated isothiocyanate) 또는 PE (phycoerythrin) 형광물질이 결합된 CD3,

CD4, CD8, CD69, CD11b, Gr-1 등의 항체를 시료에 가하여 4°C에서 40분간 반응시키고 염색 완충 용액으로 2회 세척한 후 세포표면 분자들의 발현을 유세포분석기 (FACScan, BD Biosciences, U.S.A) 로 분석한다.

(7) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 분석

생쥐에서 분리한 폐포세척액에서 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin과 혈청에서 IgE, Histamine의 양을 측정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Endogen, USA) 와 IL-13는 ELISA kit (R&D system)로 생산량을 측정한다.

(8) 조직병리검사

적출된 폐를 10% paraformaldehyde에서 24 h 포르말린에 고정된 뒤 알코올로 2시간 dehydration 시킨 뒤 xylene (I, II, III)으로 dealcoholization을 시켰다. 조직을 파라핀으로 포매하여 5 μ m 부분의 두께로 조직절편을 만들었으며, hematoxyline/eosin (H&E)으로 염색하였고, 조직의 손상 정도를 관찰하기 위하여 Masson/trichrome (M-T) 염색을 동시에 시행하여 관찰하였다.

(9) 통계처리

모든 실험은 5회 반복하였으며, 총 30 마리의

생쥐로부터 얻은 결과를 종합하여 mean \pm standard error 값으로 나타내었다. 대조군과 실험군 간의 차이에 대한 통계학적 유의성 검증은 Student's T-test 방법으로 분석하였으며, p값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

III. 실험 결과

1. PenH 값 측정

기도 과민반응의 억제 효과를 확인하기 위하여 메타콜린에 대한 PenH값을 측정한 결과 정상군 (Normal : WT)에 비해 OVA를 투여한 대조군 (CON)의 PenH값이 메타콜린 농도에 비례하여 증가되었으며, 대조군에 비하여 地骨皮(LC), 桑白皮(MA) 및 병용투여군(LC+MA)에서 모두 PenH값이 메타콜린 농도에 비례하여 현저히 감소되었다. 특히 병용 투여군에서 현저하게 기도과민 반응이 감소된 것을 볼 수 있었다(Fig. 1).

2. 면역세포 분석 실험

(1) 폐중량, 총 폐세포 및 BALF의 세포중의 세포수에 미치는 영향

OVA를 투여하지 않은 정상군에 비해 OVA를 투여한 대조군의 폐무게는 증가하였다. 대조군에 비하여 LC, MA 및 병용투여군에서 모두 감소되

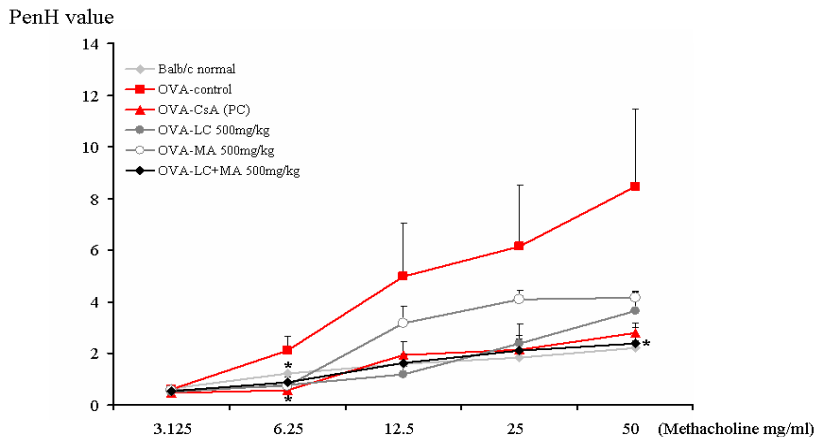


Fig. 1. Effects of LC, MA and LC+MA on methacholine-induced AHR in the sensitization protocol. PenH was measured in a Buxco box, as previously described (in Materials and methods). *p<0.05, control group versus LC, MA and LC+MA and CsA treated groups.

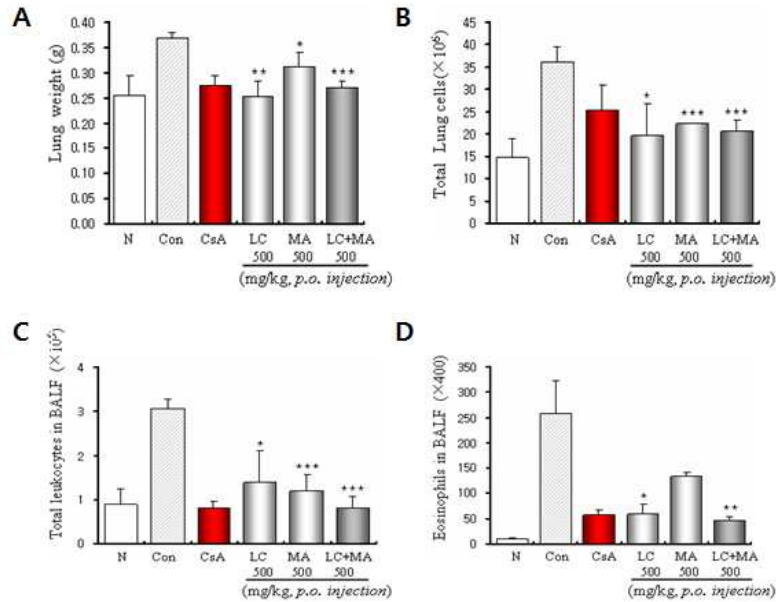


Fig. 2. Effect of LC, MA and LC+MA on lung weight (A), total lung cells (B), Leucocytes(C), and Eosinophiles (D) in BALF in OVA-induced asthma mice. Balb/c mice were injected, inhaled and sprayed with OVA three times a week for 8 weeks for asthma induction. One experimental group was treated with extract of LC, MA and LC+MA for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mouse lungs were dissected out and weighted. The results are expressed as mean \pm S.E.M. (N=5). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's T-test. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** < 0.001). N: normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), CsA : OVA + cyclosporine A(20 mg/kg), LC: OVA + LC(500 mg/kg), MA: OVA + MA(500 mg/kg), LC+MA: OVA + [LC+MA](500 mg/kg)

었다(Fig. 2A). OVA를 투여하지 않은 정상군에 비해 OVA를 투여한 대조군의 폐세포수가 증가되었다. 대조군에 비하여 LC, MA 및 병용투여군에서 모두 감소되었으며, 특히 MA(500 mg/kg) 단독투여군과 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 2B). BALF내의 총백혈구는 OVA를 감작시키지 않은 정상군에 비해 BALF 내 백혈구의 수가 OVA를 감작시킨 대조군에서 현저하게 증가되었다. 대조군에 비하여 LC, MA 및 병용투여군에서 모두 감소되었으며, 특히 모든 농도의 MA 단독투여군과 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 2C). BALF내의 총호산구 수는 OVA를 감작시키지 않은 정상군에 비해 BALF 내 호산구의 수가 OVA를 감작시킨 대조군에서 현저하게 증가되었다. 대조군에 비하여 LC, MA 및 병용투여군에서 모두 감소되었으며, 특히 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 2D).

(2) 폐조직내 유세포 형광염색 분석

폐조직 내 T세포인 $CD3^+$ 세포수는 정상군에서 $70.2 \pm 13.3 (\times 10^4)$ 인 반면, 대조군에서의 세포수는 $205.6 \pm 9.1 (\times 10^4)$ 로 현저히 증가되었다. LC, MA 그리고 병용투여군의 $CD3^+$ 세포수는 각각 $88.1 \pm 23.7 (\times 10^4)$ (LC 500mg/kg), $106.2 \pm 9.4 (\times 10^4)$ (MA 500mg/kg), $90.2 \pm 8.8 (\times 10^4)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소되었다. 모든 군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 3A). 폐조직내 B세포인 $CD19^+$ 세포수는 정상군에서 $44.2 \pm 3.9 (\times 10^4)$ 인 반면, 대조군에서의 세포수는 $102.6 \pm 3.3 (\times 10^4)$ 로 현저히 증가되었다. LC, MA 그리고 병용투여군의 $CD19^+$ 세포수는 각각 $72.3 \pm 27.7 (\times 10^4)$ (LC 500mg/kg), $69.4 \pm 18.3 (\times 10^4)$ (MA 500mg/kg), $70.3 \pm 2.0 (\times 10^4)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소되었다. 특히 병용투여군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 3B). 폐조직내 $CD3^+/CD69^+$ 의 세포수는 천식을 유발시키지 않은 정상군의 $CD3^+/CD69^+$ 세포수는 $9.8 \pm 1.0 (\times 10^4)$ 인 반면, OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에서의 세포

수는 $49.5 \pm 1.5 (\times 10^4)$ 로 현저히 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 CD3⁺/CD69⁺ 세포수는 각각 $22.8 \pm 7.8 (\times 10^4)$ (LC 500mg/kg), $21.2 \pm 1.2 (\times 10^4)$ (MA 500mg/kg), $21.8 \pm 3.6 (\times 10^4)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 3C). 폐조직내 CD4⁺의 세포수는 천식을 유발시키지 않은 정상군에서의 CD4⁺ 세포수는 $50.9 \pm 9.0 (\times 10^4)$ 이며, OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에서 $146.8 \pm 3.7 (\times 10^4)$ 으로 현저하게 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 CD4⁺ 세포수는 각각 $69.1 \pm 21.2 (\times 10^4)$ (LC 500mg/kg), $68.3 \pm 0.6 (\times 10^4)$ (MA 500mg/kg), $64.4 \pm 4.1 (\times 10^4)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3D). 폐조직내 CD8⁺의 세포수는 천식을 유발시키지 않은 정상군에서의 CD8⁺ 세포수는 $7.1 \pm 0.2 (\times 10^4)$ 이며, OVA를 감작하여 천식을

유발시킨 대조군에서 $28.8 \pm 2.8 (\times 10^4)$ 으로 현저하게 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 CD8⁺ 세포수는 각각 $9.7 \pm 3.8 (\times 10^4)$ (LC 500mg/kg), $13.6 \pm 0.9 (\times 10^4)$ (MA 500mg/kg), $14.0 \pm 4.2 (\times 10^4)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3E). 폐조직내 Gr-1⁺/CD11b⁺의 세포수는 천식을 유발시키지 않은 정상군에서의 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포수는 $14.0 \pm 1.1 (\times 10^4)$ 이며, OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에서 $61.7 \pm 4.2 (\times 10^4)$ 으로 현저하게 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 Gr-1⁺/CD11b⁺ 세포수는 각각 $13.3 \pm 1.7 (\times 10^4)$ (LC 500mg/kg), $25.7 \pm 0.5 (\times 10^4)$ (MA 500mg/kg), $20.2 \pm 1.1 (\times 10^4)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3F). 폐조직내 CD3⁻/CCR3⁺(eosinophil)의 세포수는 천식을 유발시키지 않은 정상군에서

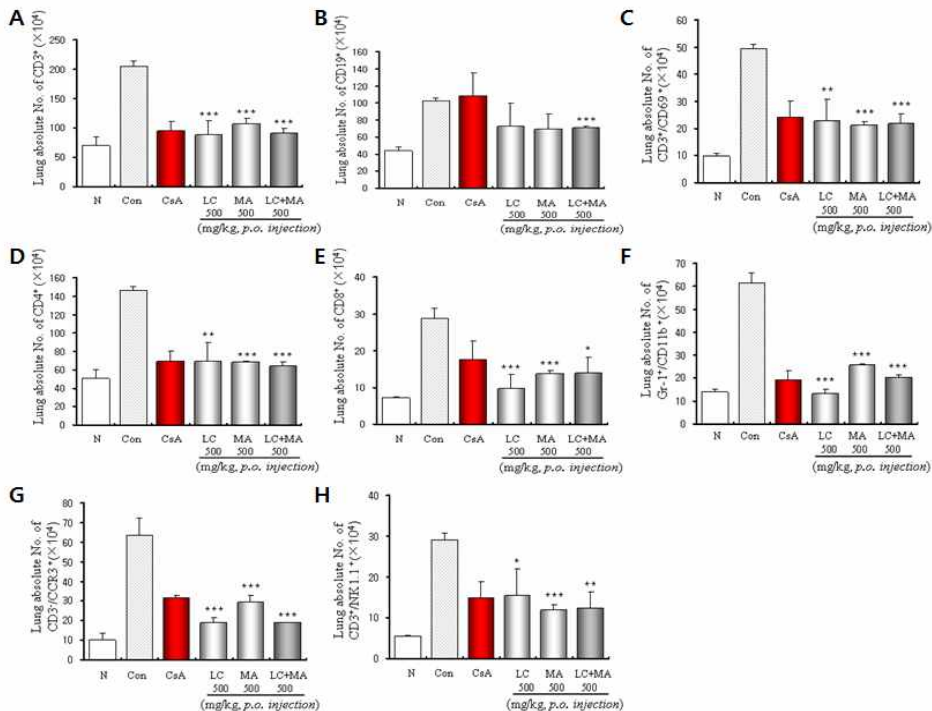


Fig. 3. Effect of LC, MA and LC+MA on CD3⁺ (A), CD19⁺ (B), CD3⁺/CD69⁺ (C), CD4⁺ (D), CD8⁺ (E), Gr-1⁺/CD11b⁺ (F), CD3⁺/CCR3⁺ (G), and CD3⁻/NK1.1⁺ (H) absolute number of lung cells in OVA-induced asthma mice. Total number multiplied by gating percent in lung made absolute number of cells (described in materials and methods). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's T-test. (*p < 0.05, **p < 0.01, *** < 0.001). N: normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), CsA : OVA + cyclosporine A (20 mg/kg), LC: OVA + LC(500 mg/kg), MA: OVA + MA(500 mg/kg), LC+MA: OVA + [LC+MA](500 mg/kg)

의 $CD3^+ / CCR3^+$ 세포수는 $10.2 \pm 3.4 (\times 10^4)$ 이며, OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에서 $63.5 \pm 9.0 (\times 10^4)$ 으로 현저하게 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 $CD3^+ / CCR3^+$ 세포수는 각각 $18.9 \pm 2.4 (\times 10^4)$ (LC 500mg/kg), $29.3 \pm 3.5 (\times 10^4)$ (MA 500mg/kg), $18.7 \pm 0.2 (\times 10^4)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3G). 폐조직내 $CD3^+ / NK1.1^+$ (NKT)의 세포수는 천식을 유발시키지 않은 정상군에서의 $CD3^+ / NK1.1^+$ 세포수는 $5.4 \pm 0.2 (\times 10^4)$ 이며, OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에서 $29.1 \pm 1.7 (\times 10^4)$ 으로 현저하게 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 $CD3^+ / NK1.1^+$ 세포수는 각각 $15.5 \pm 6.6 (\times 10^4)$ (LC 500mg/kg), $11.9 \pm 1.1 (\times 10^4)$ (MA 500mg/kg), $12.3 \pm 3.9 (\times 10^4)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 3H).

(3) BALF내 세포수 분석

BALF 내 T세포인 $CD3^+$ 세포수는 정상군에서 $4.8 \pm 1.9 (\times 10^3)$ 인 반면, 대조군에서의 세포수

는 25.3 ± 2.7 로 현저히 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 $CD3^+$ 세포수는 각각 $8.9 \pm 4.0 (\times 10^3)$ (LC 500mg/kg), $7.1 \pm 1.7 (\times 10^3)$ (MA 500mg/kg), $4.6 \pm 0.8 (\times 10^3)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 4A).

BALF내 B세포인 $CD19^+$ 는 세포수는 정상군에서 $0.2 \pm 0.0 (\times 10^3)$ 인 반면, 대조군에서의 세포수는 1.0 ± 0.1 로 현저히 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 $CD19^+$ 세포수는 각각 $0.4 \pm 0.2 (\times 10^3)$ (LC 500mg/kg), $0.4 \pm 0.1 (\times 10^3)$ (MA 500mg/kg), $0.2 \pm 0.1 (\times 10^3)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 4B).

BALF내 $CD3^+ / CD69^+$ 의 세포는 천식을 유발시키지 않은 정상군에서 $1.0 \pm 0.2 (\times 10^3)$ 인 반면, 대조군에서의 세포수는 $7.9 \pm 2.0 (\times 10^3)$ 로 현저히 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 $CD3^+ / CD69^+$ 세포수는 각각 $4.6 \pm 2.5 (\times 10^3)$ (LC 500mg/kg), $3.3 \pm 1.4 (\times 10^3)$ (MA 500mg/kg), $2.3 \pm 1.0 (\times 10^3)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 특히 병용투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 4C).

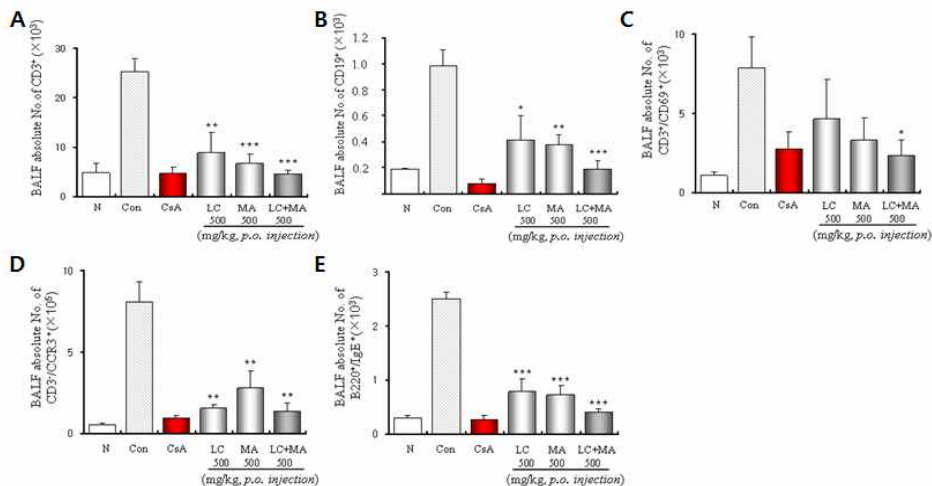


Fig. 4. Effect of LC, MA and LC+MA on $CD3^+$ (A), $CD19^+$ (B), $CD3^+ / CD69^+$ (C), $CD3^+ / CCR3^+$ (D), and $B220^+ / IgE^+$ (E) absolute number of BALF cells in murine model of OVA-induced asthma. Total number multiplied by gating percent in BALF made absolute number of $CD3^+$ cells (described in materials and methods). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's T-test. (*p < 0.05, **p < 0.01, *** < 0.001). N: normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), CsA : OVA + cyclosporine A(20 mg/kg), LC: OVA + LC(500 mg/kg), MA: OVA + MA(500 mg/kg), LC+MA: OVA + [LC+MA](500 mg/kg)

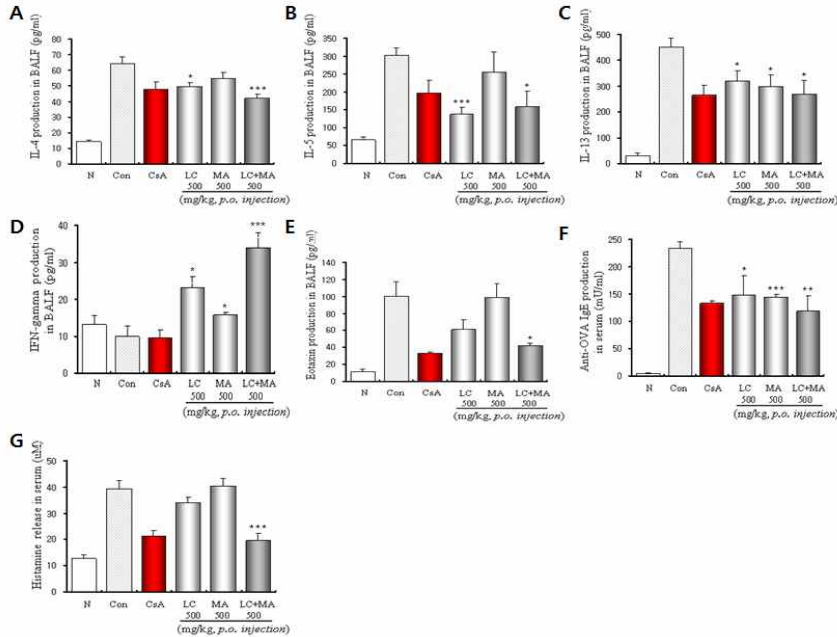


Fig. 5. Effect of LC, MA and LC+MA on IL-4, IL-5, IL-13, IF- γ , and Eotaxin level in BALF and Histamine level in serum in OVA-induced asthma mice. Balb/c mice were injected, inhaled and sprayed with OVA three a week for 8 weeks for asthma induction. One experimental group was treated with extract of LC, MA and LC+MA for the later 8 weeks. IL-4, IL-5, IL-13, Eotaxin, and Histamine levels were assayed by ELISA kit (R&D system). The results are expressed as mean \pm S.E.M. (N=5). Comparisons between control and test groups were analyzed using Student's T-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). N: normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), CsA: OVA + cyclosporine A(20 mg/kg), LC: OVA + LC (500 mg/kg), MA: OVA + MA(500 mg/kg), LC+MA: OVA +[LC+MA](500 mg/kg)

BALF내 CD3⁻/CCR3⁺ (eosinophil)의 세포수는 천식을 유발시키지 않은 정상군에서의 CD3⁻/CCR3⁺ 세포수는 $0.5 \pm 0.1 (\times 10^5)$ 인 반면, 대조군에서의 세포수는 $8.1 \pm 1.3 (\times 10^5)$ 로 현저히 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 CD3⁻/CCR3⁺ 세포수는 각각 $1.5 \pm 0.2 (\times 10^5)$ (LC 500mg/kg), $2.8 \pm 1.0 (\times 10^5)$ (MA 500mg/kg), $1.4 \pm 0.5 (\times 10^5)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 4D).

BALF내 B220⁺/IgE⁺의 세포수는 천식을 유발시키지 않은 정상군에서의 B220⁺/IgE⁺ 세포수는 $0.3 \pm 0.1 (\times 10^3)$ 인 반면, 대조군에서의 세포수는 $2.5 \pm 0.1 (\times 10^3)$ 로 현저히 증가되었다. LC, MA 및 병용투여군의 B220⁺/IgE⁺ 세포수는 각각 $0.8 \pm 0.2 (\times 10^3)$ (LC 500mg/kg), $0.7 \pm 0.2 (\times 10^3)$ (MA 500mg/kg), $0.4 \pm 0.1 (\times 10^3)$ (LC+MA 500mg/kg)로 대조군에 비해 감소하였다. 모든 군에서 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 4E).

(4) ELISA에 따른 BALF에서 IL-4, IL-5, IL-13,

Exotacin 및 혈청내 IgE와 Histamine 분석

천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 BALF 내 IL-4, IL-5, IL-13, Eotaxin과 혈청내 IgE는 현저히 증가되었다. IL-4는 LC, MA 및 병용투여군에서의 대조군에 비해 감소되었으며, 특히 LC와 병용투여군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5A). IL-5는 LC, MA 및 병용투여군에서의 감소되었으며, 특히 LC와 병용투여군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5B). IL-13는 LC, MA 및 병용투여군에서의 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5C). BALF내 IFN- γ 는 천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군에 비해 감소되었고, LC, MA 및 병용투여군에서의 IFN- γ 가 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다(Fig. 5D).

Eotaxin은 병용투여군에서만 유의성 있게 감소

되었다(Fig. 5E).

혈청내 IgE 천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군의 BALF 내 IgE가 현저히 증가되었고, LC, MA 및 병용투여군에서의 BALF 내 IgE가 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 5F). 혈청내 histamine 천식을 유발시키지 않은 정상군에 비해 OVA를 감작하여 천식을 유발시킨 대조군의 serum 내 histamine이 현저히 증가되었고, LC, MA 및 병용투여군에서의 serum 내 histamine이 대조군에 비해 감소되었다. 특히 병용투여군에서 유의성있게 감소되었다(Fig. 5)

(5) H&E 및 masson trichrome염색에 의한 폐 단편 분석

H&E의 염색에서 정상군에 비해 OVA로 유발된 천식대조군에서 폐포 주위에 호산구 같은 천식유발 염증세포의 침윤이 다량으로 존재하는 것이 관찰되었다. 그러나 LC, MA 및 병용투여군에서는 폐포 주위에 침윤된 염증세포들이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, M-T(masson trichrome)염색은 폐포 조직의 주위에 collagen이 침착된 것을 자주색으로 염색하여 조직의 손상정도를 관찰하는 것으로 대조군에 비하여 LC, MA 및 병용투여군에서 조직손상이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다.(Fig. 6)

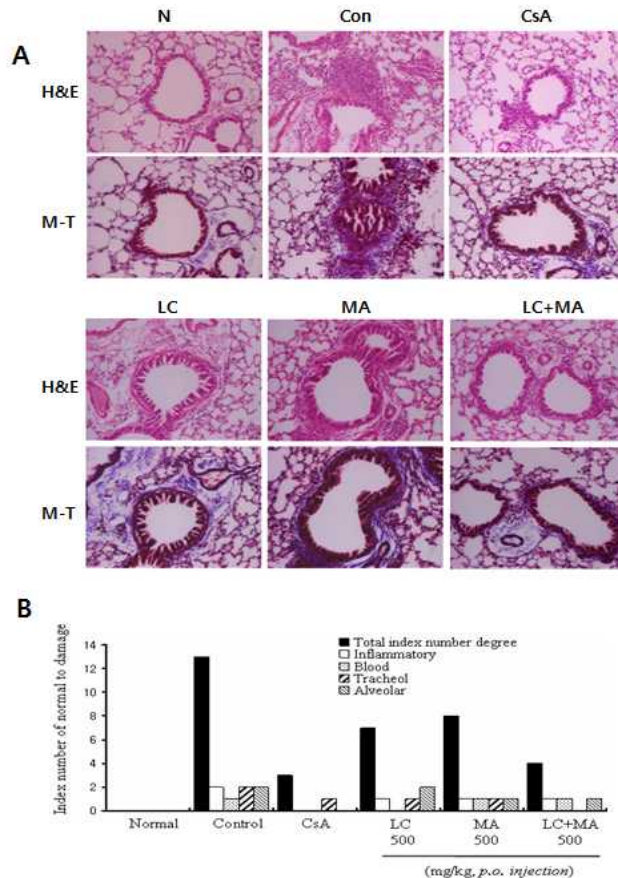


Fig. 6. Effect of LC, MA and LC+MA on histology of lung tissue (H&E and M-T staining) in murine model of OVA- induced asthma lung cells. Balb/c mice were injected, inhaled and sprayed with OVA 3days/week for 8 weeks for asthma induction. One experimental group was treated with extract of LC, MA and LC+MA for the later 8 weeks. At the end of the experiment, the mice lungs were dissected out and analyzed histology. N: normal Balb/c mice, Con: Ovalbumin inhalation (control), CsA: OVA + cyclosporine A(20 mg/kg), LC: OVA + LC(500 mg/kg), MA: OVA + MA(500 mg/kg), LC+MA: OVA + [LC+MA](500 mg/kg).

IV. 고 찰

한의학에서는 哮喘證을 外氣의 刺戟으로 外感遺熱이 氣管支에 몰려서 痰液이 氣道를 狹小시켜 呼吸이 困難해지고 때로 氣管支의 痙攣 또는 痰液의 氣管支 閉塞으로 인하여 呼吸時에 고통을 호소하며 피리 부는 소리가 나는 症狀으로 표현하고 있으며³⁸⁾ 앞에서도 언급하였듯이 『內經』에서는 喘證에 대한 기술만 있고 哮證에 대한 언급은 없다. 다만, “喘鳴”에 대한 설명이 있는데, 이 喘鳴症이 오늘날 말하는 哮症의 증상과 유사하다고 할 수 있다.

먼저 『內經』에서 표현한 喘證과 관련된 내용을 살펴보면, 『素問·逆調論』에서는 喘證을 편히 누울 수 있는나의 여부, 즉 “得臥”와 “不得臥”의 증상을 연계하여 설명하고 있다. 또한 喘息이 발생하는 원인에 대해서 肺·胃·腎과 관련이 있고, 원인에 따라 각각의 증상 양태가 다르다고 하였다. 먼저 胃에 의해 발생한 경우는 잘 눕지 못하는 증상이 있으면서 숨 쉴 때 소리가 나는 喘證이 생긴다고 하였다. 이는 降濁작용을 하는 胃에 문제가 발생하여 痰濁이 上逆하여 肺를 窸박하기 때문에 발생하는 것이다. 둘째로 肺에 의해 발생하는 喘證은 평소 생활에는 아무런 변화가 없고, 다만 숨을 쉴 때 소리가 나거나 혹은 숨 쉴 때에는 문제가 없다가 움직이게 되면 그때서야 숨을 헐떡이는 것으로 설명하고 있다. 이는 肺의 絡脈이 逆亂하여 발생하는 것으로, 비교적 가벼운 병증에 속하는 것이다. 마지막으로 腎에 의해 발생하는 喘證은 잘 눕지도 못하고 다니지도 못하는데, 항상 喘證이 발생하는 경우도 있고 혹은 눕게 되면 그때서야 喘證이 발생하는 경우가 있다고 설명하고 있다. 이는 腎陽이 虛하여 氣化작용이 일어나지 않아 水가 停滯되고, 停滯된 水가 肺를 압박하여 발생하는 것이다. 이상에서와 같이 『內經』에서는 喘證에 대해 주로 肺·胃·腎 세 藏의 문제에 의해 발생하는 것으로 설명하고 있다. 이 내용을 근간으로 하여 근자에는 喘證의 발생 원인을 風寒束肺, 表寒裏熱, 熱邪壅肺, 痰濁阻肺, 氣鬱傷肺, 肺虛, 腎不納氣 등의 7가지로 세분하고 있으니(楊思澍, 張樹

生, 傅景華 主編. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. 1991:87-91.), 참고할만 하다.

현대의학에서는 기도의 만성염증으로 인해서 기도가 과민해짐으로써 수축이 발생하여 기침과 호흡 곤란 증상이 유발되는 질환으로 설명하고 있다. 일부에서는 기도의 염증과 기관지 과민증 그리고 기도의 가역적 폐쇄라는 세가지 요소가 충분한 근거가 될 수 없다는 반론도 제기되고 있으며, 외부 환경에 존재하는 알레르겐이 원인이되어 발생된다고도 설명하고 있다. 그러나 최근에는 호산구와 T세포의 침윤, 비만세포, 호염기구 및 상피세포의 활성화 등 모든 면역체계가 관여하는 염증성 질환으로 밝혀지면서, 기도 과민성(Airway hyperreactivity)과 폐쇄(obstruction)가 증상 발현에 중요한 것으로 알려졌으며, 특히, BALF에서는 Th2 림프구의 기능 활성도가 관찰된다고 보고하고 있다.

한의학에서는 이러한 哮喘證을 實證과 虛證으로 구분하여 治療하게 되는데 이에 저자는 實證性 喘息治療에 주로 應用된 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합 약물이 喘息治療에 어느정도의 효능이 있는지를 免疫學的인 실험을 통해 연구해 보고자 Balb/c 생쥐에 ovalbumin으로 천식을 유발한 후 BALF에 존재하는 총폐세포수, 총백혈구수, 총호산구수와 유세포 형광염색한 폐조직내 CD3, CD19, CD3/CD69, CD4, CD8, CD3⁻/CCR3⁺, CD3⁺/NK1.1⁺와 BALF내의CD3,CD19, CD3⁺/CD69⁺, CD3⁻/CCR3⁺, B220/IgE⁺와 ELISA분석에서 BALF 내의 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin 그리고 혈청내의 IgE와 histamine 유출량의 변화와 마지막으로 H&E, M-T 두가지 염색법으로 폐세포조직을 분석 관찰하게 되었다.

천식 모델에서 BALF 세포를 연구하는 것은 천식 병리기전에 있어 중요한 연구방법으로 여겨지고 있으며, 다른 염증매개인자들을 제외하더라도 OVA로 유발된 이들 염증매개인자들은 BALF 세포에서 분비되며 이들 세포는 천식의 병리기전에 있어 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾.

현재까지 연구결과에 의하면 호산구는 천식에서 기도 염증을 일으키는데 가장 중요한 역할을 담당하는 세포이며, Th2 세포에 의해 매개되는 염증 및



IL-13을 활성화시켜 천식 발생에 있어서 중요한 역할을 하였다고 알려져 있다¹⁵⁻¹⁷).

in vivo 실험을 고찰해보면 첫째, LC, MA 및 병용투여군이 총 폐무게에 미치는 영향을 살펴보면, LC, MA 및 병용투여군에서는 각각 폐무게가 감소하였다. 이는 OVA로 유발된 기관지염증으로 인한 각종 면역세포의 증가와 관련이 있는 것으로 생각되며, 즉 이들 약제에 의하여 염증작용이 억제된 것으로 생각된다(Fig 2A).

두 번째, LC, MA 및 병용투여군이 총 폐세포수에 미치는 영향을 살펴보면, 투여군에서는 유의성 있게 세포수가 감소되었다. 이는 폐내 호산구, 림프구, 대식세포, 비만세포 등의 염증 유발 세포들이 기도에 많이 침착되어 있거나, 기도 및 기관지의 부종 및 점액 분비과다를 의미한다. 천식대조군에서 각종 면역 관련 세포를 포함하는 총 폐세포수가 증가되었고, 투여군에서 총 폐세포수가 유의성있게 감소됨으로써 기도내 염증세포의 증가를 억제하고, 이들 세포에 의한 염증반응을 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다(Fig. 2B).

또한 BALF내 총백혈구 수에 미치는 영향을 살펴보면, 폐내 세포수와 유사한 양상을 보이고 있으며, 이는 폐 자체의 염증과 관련한 면역세포의 수가 증가했음을 의미한다. 대조군에 비해 백혈구가 감소되었는데, 이는 천식 모델의 기도 내 염증세포의 증가를 억제하고, 이들 세포에 의한 염증반응을 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다(Fig. 2C).

마지막으로 BALF내 호산구 수에 미치는 영향을 살펴보면, 투여군에서 대조군에 비해 현저하게 호산구 수가 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이는 투여군이 호산구 증가에 의한 천식 기전을 억제하는 작용이 있음을 시사한다(Fig. 2D).

세 번째, 유세포 형광분석에서 CD3⁺는 T 세포 모두에 존재하는 표면분자이며, CCR3⁺ receptor는 주로 호중구, 호산구, 비만세포 및 Th2 세포에서 발현된다¹⁸). 폐조직과 BALF 내 CD3⁺의 세포수를 살펴보면 LC, MA 및 병용투여군에서 대조군에 비해 CD3⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A, 4A). 그리고 CD19는 B세포에서 발현하는 주요 marker이다.¹⁹ 폐조직과

BALF 내 CD19⁺의 세포수를 살펴보면, 투여군에서 대조군에 비해 CD19⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 3B, 4B).

또 CD69⁺는 T 세포, 대식세포, 호산구, 호중구 등에서 발현되는데 세포의 활성화 marker로서 알려져 있으며^{20,21}), T 세포의 초기 활성화를 나타내며, 활성화된 호산구에서 발현되므로 천식모델에서 호산구 침윤의 표지로 사용될 수 있다. 본 실험에서 폐조직과 BALF에서 CD3⁺/CD69⁺의 세포수를 살펴보면, 투여군에서 대조군에 비해 CD3⁺/CD69⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 3C, 4C).

CD4 T 세포는 호산구와 함께 천식 모델의 기도벽에 침윤되는 대표적인 세포인데, 천식모델에서 증가되고, 활성화 marker인 CD25를 발현하는 것으로 알려져 있다. 또한, CD4 Th2 세포는 천식을 유발하고 지속시키는 대표적인 세포로 알려져 있다²²). CD8 T 세포는 CD4 T 세포와 마찬가지로 천식 유발 cytokines인 IL-4, IL-5, IL-13을 분비하는 것으로 알려져 있다^{23,24}).

본 실험에서 투여군에서 대조군에 비해 폐조직에서 CD4⁺, CD8⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 3D, 3E).

CD11b는 천식환자의 호중구나 호산구에서 특이적으로 높게 발현되는 세포유착분자이며^{25,26}), Gr-1은 과립구의 표지자로서 과립구의 분화, 성숙에 관여하며²⁷), Gr-1⁺/CD11b⁺는 성숙된 과립구, 단핵구를 표현하며 myeloid suppressor 세포에서 발현되는 marker이기도 하다. 이들은 종양이나 감염 등에서 사이토카인을 분비하여 면역기전에 작용하는 것으로 알려져 있다²⁸).

투여군에서 대조군에 비해 Gr-1⁺/CD11b⁺의 세포수가 감소하였고 LC, MA, 병용 투여군에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 3F).

네 번째, ELISA 분석을 살펴보면, BALF내 IL-4, IL-5, IL-13, IgE, eotaxin이 투여군에서는 유의성있게 모두 감소되었으며, 특히 병용투여군에서 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 한편, IFN- γ 는 대조군에서는 감소되는 것이 관찰되었고, 투여군에서는 모두 증가되었다(Fig. 5D).

이는 투여군이 천식반응에 있어서 유의성 있는 억제작용이 있음을 시사한다. 히스타민은 prostacyclin (PGI₂)을 합성하게 하여 이들이 혈관확장을 일으킴으로써, 알러지성 과민반응의 구진과 발적 확장이 일어나게 된다.

히스타민 생성에 미치는 영향을 살펴보면 본 실험에서 투여군의 경우 히스타민 생성량이 감소하였다 (Fig. 5G). 이 결과는 투여군이 천식반응에 주된 인자로 알려진 히스타민의 생성 억제에 유의한 작용이 있음을 보여준다.

다섯 번째, 폐세포조직을 살펴보면, 투여군에서는 폐포 주위에 침윤된 염증 세포들이 감소된 것을 확인할 수 있었으며 M-T 염색결과 조직손상이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

이처럼 투여군은 천식모델에 있어서 호산구의 세포증식억제, 폐세포의 CCR3 발현억제, BALF, serum 내의 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 생성 억제, IFN- γ 의 생성증가 등에 의한 작용을 통하여 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제시켜 천식 증상이 완화되는 것으로 생각된다. 특히, 단독투여시보다 병용투여군에 의하여 총폐무게, BALF에서의 호산구 수, 폐세포에서의 CD3⁻/CCR3⁺, Gr-1⁺/CD11b⁺ 등의 세포수, IL-4 생성량, serum에서의 IL-5, IgE 생성량 억제 효과와 BALF에서의 IFN- γ 생성량의 증가가 높은것으로 나타났으며, 이는 병용투여군이 천식의 주요발생 기전 및 유병 원인인 Th1/Th2 밸런스 조절작용에 관계가 있는 것으로 사료되며, 차후 본 실험연구를 참조하여 LC, MA 및 두 배합약물의 천식 치료효과에 대해 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 실험연구는 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물을 OVA로 감작된 천식동물모델에서의 항 천식 효과를 알아보기 위해, Balb/c 생쥐에 ovalbumin으로 천식을 유발한 후 폐 및 기관지폐포세척액에 존재하는 총 폐세포수, 총 백혈구수, 총 호산구수와 유세포 형광염색한 폐조직내 CD3⁺, CD19⁺,

CD3⁺/CD69⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁻/CCR3⁺, CD3⁺/NK1.1⁺와BALF내의CD3⁺, CD19⁺, CD3⁺/CD69⁺, CD3⁻/CCR3⁺, B220/IgE⁺ 분석과 그리고 ELISA 분석에서 BALF내의 IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , Eotaxin, IgE 그리고 혈청내의 IgE와 histamine 유출량의 변화와 H&E, M-T 두가지 염색방법으로 폐세포조직을 분석하면서 모든 결과를 관찰한 후 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군에 비해 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물 투여군에서의 폐무게, 폐세포수, BALF내 백혈구 수, 호산구 수가 현저하게 감소되었다.

2. 地骨皮, 桑白皮 및 두배합약물 투여군의 CD3⁺/CD69⁺, Gr-1⁺/CD11b⁺의 비율은 폐조직과 BALF내에서 대조군에 비해 현저하게 감소되었다.

3. 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물투여군에서 대조군에 비해 폐조직내 CD4⁺의 세포수가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

4. CD8⁺의 세포수는 모든 농도의 地骨皮, 桑白皮 투여군과 병용투여군에서, 폐조직 내에서는 병용투여군에서 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

5.ELISA분석에서 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물 투여군에서의 BALF내 IL-4, IL-5, IL-13와 serum내 IgE, histamine이 대조군에 비해 감소되었다.

6. 地骨皮, 桑白皮 및 두 배합약물 투여군에서 염증세포의 침윤과 collagen 부착이 대조군에 비해 현저하게 감소 되어있다.

이상의 결과로 地骨皮, 桑白皮 배합약물은 천식동물모델에 있어서 호산구의 세포증식 억제, BALF, serum내의 Th2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 생성 억제, IFN- γ 의 생성증가 등에 의한 작용을 통하여 기도의 염증반응 및 과민반응을 억제시켜 천식 증상을 완화시키는 것으로 확인할 수 있었으며, 특히 地骨皮, 桑白皮의 단독투여시보다 총 폐무게, BALF에서의 호산구수, 폐세포에서의 Gr-1⁺/CD11b⁺ 등의 세포수, IL-4 생성량, serum에서의 IgE생성량 억제효과와 BALF에서의 IFN- γ 생성량의 증가가 유의성 있게 나타난것으로 확인할 수가 있었다.



참 고 문 헌

1. Djukanović R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:434-57.
2. Factor P. Gene Therapy for Asthma. *Mol Ther.* 2003;7:148-52.
3. 강구일 외 역. Basic clinical pharmacology. 서울: 도서출판한우리. 1998:370-387.
4. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;85:422.
5. 김광혁 외 역. Cellular and Molecular Immunology. 서울: 정문각. 1998:367.
6. Hong CH, Hur SK, Oh O, Kim SS, Nam KA, Lee SK. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J Ethnopharmacol.* 2002;83:153-9.
7. Hsu H, Yang J, Ho Y, Lin C. Difference in the effects of radioprotection between aerial and root parts of *Lycium chinense*. *J Ethnopharmacol.* 1999;64:101-108.
8. Chai OH, Lee MS, Han E, Kim HT, Song CH. Inhibitory Effects of *Morus alba* on Compound 48/80-Induced Anaphylactic Reactions and Anti-Chicken Gamma Globulin IgE Mediated Mast Cell Activation. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:1852-8.
9. 임홍진, 김정근, 심은기, 홍철희, 황충현. 마우스 모델을 이용한 상백피 추출물의 알러지성 천식 억제 효과. *한국전통의학지.* 2004;14:79-99.
10. 정경옥, 남경수, 박중희, 門田 重利, 문전옥. 새로운 항산화제 검색법에 의한 SOD Mimic 천연약물의 개발-상백피의 항염증 효과. *생약학회지.* 1998;29:1-7.
11. 채옥희, 배형운, 이무삼, 이종인, 송창호. 상백피가 사람정장에 의한 흰쥐 복강비만세포의활성화에 미치는영향. *천식 및 알레르기학회지.* 1999;19: 666-76.
12. 조형준, 이진용, 김덕곤. 桑白皮가 항알러지 및 항염증반응에 미치는 영향. *大韓韓方小兒科學會誌.* 2005;19:175-195.
13. 김대걸, 이상재, 김광호. 桑白皮가 제 I형 알레르기 喘息모델 흰쥐의 BALF內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響. *대한예방의학회지.* 2002; 6:140-55.
14. Schwartz DA, Thorne PS, Jagielo PJ, White GE, Bleur SA, Frees KL. Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract. *Am J Physiol.* 1994;267:609-17.
15. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, Protheroe C, Pero R, Nguyen T, Cormier SA, Lenkiewicz E, Colbert D, Rinaldi L, Ackerman SJ, Irvin CG, Lee NA. Defining a Link with Asthma in Mice Congenitally Deficient in Eosinophils. *Science.* 2004;305:1773-6.
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. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, Hamid Q, Elias JA. Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. *Science.* 2004;304:1678-82.
18. Boushey HA. New and Exploratory Therapies for Asthma. *Chest.* 2003;123:439-45.
19. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:108-16.
20. Otero DC, Anzelon AN, Rickert RC. CD19 Function in Early and Late B Cell Development: I. Maintenance of Follicular and Marginal Zone B Cells Requires CD19-Dependent Survival Signals. *J Immunol.* 2003;170:73-83.
21. Mukae H, Kadota J, Kohno S, Matsukura S, Hara K. Increase of activated T-cells in BAL fluid of Japanese patients with bronchiolitis obliterans organizing pneumonia and chronic eosinophilic pneumonia. *Chest.* 1995;108:123-8.
22. Marzio R, Mauel J, Betz-Corradin S. CD69 and

- regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999;21:565-82.
23. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of Disease Persistence and Progression. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:789-91.
24. Marsland BJ, Le Gros G. CD8⁺ T cells and immunoregulatory networks in asthma. *Springer Semin Immunopathol.* 2004;25:311-23.
25. Kemp RA, Ronchese F. Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. *J Immunol* 2001;167:6497-502.
26. Berends C, Hoekstra MO, Dijkhuizen B, de Monchy JG, Gerritsen J, Kauffman HF. Expression of CD35 (CR1) and CD11b (CR3) on circulating neutrophils and eosinophils from allergic asthmatic children. *Clin Exp Allergy.* 1993;23:926-33.
27. Yachie A, Toma T, Miyawaki T, Taniguchi N. Expression of surface CD11b antigen and eosinophil activation. *Nippon Rinsho.* 1993;51:593-7.
28. 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.
29. Serafini P, De Santo C, Marigo I, Cingarlini S, Dolcetti L, Gallina G, Zanollo P, Bronte V. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cell. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:64-72.
30. Romagnani S. T-cell responses in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001;1:73-8.
31. Bochner BS, Schleimer RP. The role of adhesion molecules in human eosinophils and basophils recruitment. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 94:427-38.
32. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med.* 1996;183:195-201.
33. Wang J, Palmer K, Lötvald J, Milan S, Lei XF, Matthaei KI, Gauldie J, Inman MD, Jordana M, Xing Z. Circulating, but not local lung, IL-5 is required for the development of antigen-induced airways eosinophilia. *J Clin Invest.* 1998;102:1132-41.
34. Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Watnick AS, Jones H, Mauser PJ, Fernandez X, Umland S, Kreutner W, Chapman RW, Egan RW. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94:1217-24.
35. Gulbenkian AR, Egan RW, Fernandez X, Jones H, Kreutner W, Kung T, Payvandi F, Sullivan L, Zurcher JA, Watnick AS. Interleukin-5 modulates eosinophil accumulation in allergic guinea pig lung. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146:263-6.
36. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* 1999;103:779-88.
37. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghow R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin. *J Clin Invest.* 1992;90:1479-85.
38. 金永勳. 晴崗醫鑑. 서울:成輔社. 1998:129.