

OMC-2010 구성약재 배합추출물 투여가 Ovalbumin으로 유도한 마우스 알레르기성 기관지 천식에 미치는 영향

조일주^{1,2#}, 배기상³, 최선복^{1,2}, 송호준^{1,2}, 박성주^{1,2,3}, 서상완⁴, 옥주안⁴, 김민선⁵, 백선종⁵,
배익현⁵, 김현식^{5*}

1 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 원광대학교 한의학전문대학원 BK21사업팀,

3 : 원광대학교 한방체액조절연구센터, 4 : 충북테크노파크 바이오센터,

5 : 한국기초과학지원연구원 질량분석연구부

Effects of OMC-2010 Constituents Extract on the Ovalbumin-Induced Allergic Asthma in Mice

Il-Joo Jo^{1,2#}, Gi-Sang Bae³, Sun-Bok Choi^{1,2}, Ho-Joon Song^{1,2}, Sung-Joo Park^{1,2,3},
Sang Wan Seo⁴, Joo An Ok⁴, Min Sun Kim⁵, Sun Jong Baek⁵, Ik Hyun Bae⁵, Hyun Sik Kim^{5*}

1 : Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

2 : BK21 team, Professional graduate school of Oriental medicine, Wonkwang University,

3 : Hanbang Body-fluid Research Center, Wonkwang University, 4 : Chungbuk Techno Park Bio Center,

5 : Division of Mass Spectrometry Research, Korea Basic Science Institute

ABSTRACT

Objectives : We recently have reported that constituents of OMC-2010 have an immuno-modulatory effects via inhibiting tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-5. In this study, based on previous data, we investigated the effects of combinations with each OMC constituents on splenocyte cytotoxicity, cytokine productions, and ovalbumin (OVA) induced experimental allergic asthma.

Methods : Mouse splenocytes were pre-treated with ethanol extract of constituents of *Rehmannia glutinosa* (RG), *Pinellia ternata* (PT), *Schisandra chinensis* (SC). We made 4 combinations using RG, PT, and SC (A;1:1:1, B;2:1:1, C;1:2:1, D;1:1:2). The cells were pretreated with A, B, C, or D for 1 h, then stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml) for 48 h. Then the cells were harvested for real-time reverse transcription polymerase chain reaction to detect cytokine productions. Then using effective combination from RG, PT and SC, we administrated the combination orally, then challenged with OVA to induce asthma. Then we analyzed the airway hyper-reactivity (AHR), lung histology and lung TNF- α and IL-5 mRNA.

Results : A, B, C, and D did not showed significant cytotoxicity on splenocytes. Pre-treatment of A inhibited the expression of TNF- α and IL-5 significantly, but not B, C, and D. In experimental asthma, administration of A significantly inhibited the increase of AHR, lung damage, TNF- α and IL-5 expression.

Conclusions : Theses results could suggest that inhibitory effects of the ideal combination with RG, PT and SC (1:1:1) could be applied to treatment of asthma and study of asthma mechanisms.

Key words : OMC-2010, lipopolysaccharide (LPS), splenocyte, inflammation, Asthma

*교신저자 : 김현식, 363-883 충북 청원군 오창읍 연구단지 162 한국기초과학지원연구원 질량분석연구부

· Tel : 043-240-5120 · E-mail : fticr@kbsi.re.kr

#제1저자 : 조일주, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 063-850-6837 · E-mail : joilju3654@daum.net

· 접수 : 2013년 8월 15일 · 수정 : 2013년 9월 10일 · 채택 : 2013년 9월 23일

서론

기관지 천식은 기도 수축에 의해 발작적 호흡곤란, 천명, 해수 등의 증상을 나타내고 세계인구의 약 10%를 차지하는 흔한 질환이다¹⁾. 호흡기계 질환의 하나인 알레르기성 천식은 병태 생리학적으로 많은 세포와 세포성 요소들이 역할을 하는 만성 염증성 기도질환으로, 기도내 염증에 의한 기도과민성과 점액 과분비를 동반한 가역적 기도 폐쇄를 나타낸다²⁾. 기관지 천식의 염증반응은 T 세포, B 세포, 호중구, 비만세포 및 호산구 등의 염증세포와 사이토카인, 케모카인과 같은 화학 매개체들에 의해 유발된다³⁾. 기도 조직에서 나타나는 증상으로 점액의 과분비, 상피하 그물층의 비후, 평활근의 비후등과 같은 병리학적 변화는 이러한 염증 세포들의 직접적인 영향 때문이다. 특히 천식의 기도염증에서는 T 세포 중 CD4+ type 2 helper T(Th2) 세포들이 생성하는 사이토카인인 IL-4, IL-5 및 IL-13이 알레르기성 기관지 천식의 기도 과민성과 호산성 염증반응에 중요한 매개역할을 수행하는 반면⁴⁻⁵⁾, Th1 세포들이 분비하는 IFN- γ 는 Th2 세포들의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다⁶⁻⁷⁾. 기관지 천식과 알레르기는 많은 세포들이 관여하는 복잡한 기전이기에 때문에 어느 한가지만을 target으로 하였을 때 치료실패로 이어질 수 있다. 한약은 어느 하나의 단일 세포나 기전을 차단하는 것이 아니라 다면적으로 두루 작용할 수 있다고 생각되어지며 이러한 성질 때문에 한약이 천식 치료제로서의 개발 가능성을 높여 주고 있다.

金水六君煎은 肺腎虛寒의 虛症에 주로 사용하는 처방으로 1642년경 《景岳全書》에 최초로 수록된 처방으로서 일명 歸地二陳湯 혹은 熟地二陳湯이라고도 한다. 기관지 천식에 대한 金水六君煎의 연구로는 경구투여가 알레르기성 기관지 천식 모델 마우스의 기관의 폐 조직 및 미세구조에 미치는 영향 및 면역세포에 영향이 있음이 보고된바 있다⁸⁻⁹⁾, 그러나 金水六君煎의 효과적인 구성약재 배합 조절을 통한 마우스 알레르기성 기관지 천식 모델에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 증명되지 않은 실정이다. 최근 본 연구팀이 보고한 바에 따르면, 金水六君煎을 기본으로 하여 변형한 처방인 OMC-2010을 이용하여 면역세포 조절능력을 관찰해본 결과 OMC-2010 물 추출물과 에탄올 추출물은 비장세포에서 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 interleukin (IL)-5의 생성을 억제할 수 있었다¹⁰⁾. 이를 통하여 OMC-2010 추출물이 면역 질환 및 천식 등에 유효할 것으로 추정할 수 있었으며, 다음 연구에서 실제로 사이토카인 억제 역할을 하는 약재가 무엇인지 증명하기 위하여, OMC-2010 구성물인 숙지황(*Rehmannia glutinosa*, RG), 반하(*Pinellia ternata*, PT), 진피(*Citrus unshiu* Markovich, CUM), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*, GU), 길경(*Platycodon grandiflorum*, PG) 및 오미자(*Schisandra chinensis*, SC)를 물과 에탄올을 통해 추출한 다음 비장세포를 분리하여 기존에 효과를 보였던 TNF- α 와 IL-5의 발현을 조사하였다. 그 결과 숙지황 물 추출물과 숙지황, 반하, 오미자 에탄올 추출물은 비장세포에서 TNF- α 와 IL-5의 생성을 유의성 있게 억제하였다¹¹⁾. 이를 통하여 OMC-2010 물 추출에서는 숙지황이, OMC-2010 에탄올 추출에서는 숙지황, 반하, 오미자가 주로 작용할 것으로 추측할 수 있었다.

본 연구에서는, OMC-2010 구성약재들 중 면역세포 조절 능력에 유효한 효과를 보인 숙지황, 반하, 오미자를 사용해

배합비율을 다르게 조성하여 기존에 효과를 보였던 TNF- α 와 IL-5의 발현을 조사하였다. 또한 위의 결과를 통하여 구성약재의 유효한 조성 비율을 선정하여 ovalbumin으로 유도한 알레르기성 기관지 천식 마우스 모델에서의 기도과민반응과 폐 조직의 조직학적인 변화를 관찰하고, TNF- α 와 IL-5의 발현 정도를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

모든 실험은 원광대학교에서 정해놓은 동물 관리 규정에 따라 수행되었다. 본 실험에 사용된 실험동물은 C57BL/6 Mouse (15~20 g, 6주령, female)는 (주)오리엔트바이오(성남, 경기도, 대한민국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 원광대학교 한의과대학 동물 사육실에서 일정한 조건(온도: 21±2 °C, 습도: 50~60%, 명암: 12시간 주기)하에서 일반 고형사료 (주)오리엔트바이오, 성남)와 물을 충분히 공급하면서 환경 적응을 위해 일주일 동안 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

실험에 사용된 숙지황, 반하, 오미자는 Omniherb (영천, 경북, 대한민국)에서 구입, 정선한 후, 충북테크노파크 전통의약산업센터에서 확인한 후 약재를 실험약재로 사용하였으며, 일부는 -80°C에 보관하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험에 사용된 시약으로 LPS (lipopolysaccharides), 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin, Grade V), Alum (aluminum hydroxide)은 Sigma(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

(2) 기기

Clean bench, vortex mixer (Vision scientific Co, Korea), autoclave (Sanyo, Japan) micro-pipet (Gilson, France), homogenizer (OMNI, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 약재 추출 및 비율 조성

숙지황, 반하, 오미자를 (A) 1:1:1; (B) 2:1:1; (C) 1:2:1; (D) 1:1:2 비율로 섞은 처방을 각각 A, B, C, D로 분류하였으며, 각 처방에 50배의 70% 에탄올 용액을 가하여 37°C 항온수조에서 24시간 동안 추출하였다. 추출 후 에탄올 층(상등액)을 회전감압농축기(EYELA, RikakikiCo., Tokyo, Japan)로 농축한 후, 생리식염수 녹여 stock solution을 제조하였다. 제조된 stock solution은 -20°C에 보관하면서 분 석방법에 적합하도록 희석하여 사용하였다.

2) Mouse splenocytes 준비

C57BL/6 마우스로부터 spleen을 분리하여 micro slide glass로 잘게 으갠 뒤, 0.4 μm nylon cell strainer로 여과하였다. spleen 여과물을 1200rpm에서 10분간 원심분리 한 후 증류수를 이용하여 적혈구를 파괴한 뒤, splenocyte를 세척하여 RPMI-1640으로 부유한 후 cell수를 측정하였다.

3) 세포 독성 분석

Spleen cell의 생존율은 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자줏빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)용액을 이용하여 측정했다. 간단히 설명하면 지수성장을 하는 세포들은 RPMI-1640배지에서 동일한 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 A, B, C, D를 처리하였다. A, B, C, D를 처리하여 48시간 동안 배양한 뒤 5 mg/ml의 농도로 배양하기 위해서 MTT용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO를 첨가함으로써 용해했다. formazan의 양은 용해액을 96-well plate에 loading한 후, 540 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정하였다.

4) RNA 추출

Total RNA는 TRIzol (invitrogen, USA) 시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포에 A, B, C, D를 전 처리하고 LPS로 자극한 후 48시간 배양한 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 PBS 1 ml씩 가해 세포를 포집하였다. 포집된 세포를 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물에 TRIzol 용액을 1 ml 가하여 세포를 용해시킨 후 100 ul의 chloroform 용액을 넣어 고르게 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm, 4℃에서 20분간 원심 분리하여 맨 위의 상층액을 취하였다. 그 후 -20℃에 보관된 2-propanol과 1:1로 희석하여 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol 500 ul를 넣어 15,000 rpm, 4℃에서 5분간 원심 분리하여 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC treated water를 15 ul씩 넣어 RNA를 용해시키고 fluorometer를 이용하여 정량한 뒤 동량의 mRNA를 cDNA로 합성하여 실험에 사용하였다. 또한 기관지 천식을 유도한 후 적절한 폐조직은 TRIzol 시약을 200 ul 넣고 homogenizer를 이용하여 조직이 용해될 때까지 분쇄한 다음 TRIzol 시약의 total volume이 1 ml이 될 수 있도록 800 ul의 시약을 더 첨가한 후 splenocyte RNA 추출방법과 동일한 방법으로 mRNA를 추출하였다.

5) 정량적 중합 효소 반응

비장세포 및 폐조직의 mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 중합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA를 가지고 Taqman 방식으로 염증성 활성 물질을 측정 하였다. 각 primer는 Applied Bio systems (CA, USA)에서 구입하였다. TNF-alpha는 Mm00443258_m1 #4331182를 사용하였으며, IL-5는 Mm00439646_m1 #4331182를 사용하여 StepOne Software v2.2.2 Applied Bio systems (CA, USA)로 분석하였다.

6) 기관지 천식 Mouse 모델

비장세포에서 TNF-alpha와 IL-5의 생성을 유의성 있게 억제할 수 있었던 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 배합비율 A의 기관지 천식모델에서의 효과를 확인하기 위하여, 100 μg의 OVA과 1 mg Alum을 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 0.2 ml에 혼합하여 복강내로 주사하였다. 1차 전신 감작 후, 15일째에 동일한 방법으로 2차 감작을 통해 면역 boosting을 유도 한 후, A를 생리식염수로 농도별로 희석하여 18일부터 24일까지 일주일간 경구 투여하였다. 또한 5% OVA in PBS를 22, 23, 24일에 3일 연속 30분간 분무하여 알레르기성 기관지 천식을 유도하였다. 마지막 OVA을 분무한 뒤, 24시간 후에 마우스를 분석하였다 (Fig. 1).

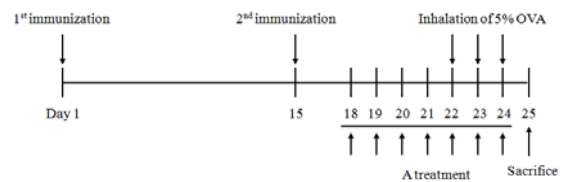


Fig. 1. The experimental protocol of asthma

7) 기도과반응성 (Airway hyper-reactivity; AHR) 측정

실험방법은 Peebles RS Jr12) 의 방법을 약간 변형하였다. 마지막 분무 24시간 후, methacholine (Sigma, USA)을 PBS로 희석하여 2.5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 및 50 mg/ml의 농도로 각각 5분간 분무하여 노출시킨 후 동물용 체적 변동 측정기를 사용하여 Penh (enhanced pause) 값을 5초 간격으로 3분간 측정하여 평균을 대표값으로 취하였다.

8) 조직병리검사

마우스에서 폐조직을 떼어내어 10% 포르말린에 고정시키고, 파라핀으로 embedding 한 후 4 μm 두께로 조직을 잘라 슬라이드에 붙인 뒤 Hematoxylin/eosin (H&E) 염색하여 ×200 배율로 관찰하였다.

9) 통계 처리

실험 결과는 Mean ± SE로 표시하였고, 대조군과 실험군의 차이를 검정할 때에는 one way ANOVA로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 숙지황, 반하, 오미자 배합비율 조성이 세포 독성에 미치는 영향

숙지황, 반하, 오미자 배합비율별 조성인 A (1:1:1), B (2:1:1), C (1:2:1), D (1:1:2)가 마우스 비장 세포의 대사 및 독성에 영향을 미쳐서 사이토카인 조절에 관여할 수 있음을 배제하기 위하여, 비장 세포에서 A, B, C, D를 48시간 동안 처리하여 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과, 아래

Fig. 2과 같이 A, B, C, D는 마우스 비장세포에서 유의성 있는 세포 독성을 보이지 않았다 (**p* < 0.001).

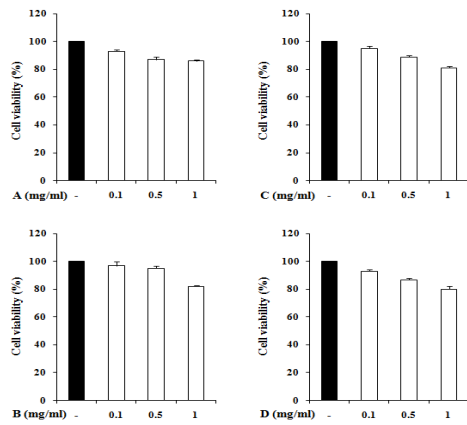


Fig. 2. The cytotoxicity of combination with RG, PT, and SC. The splenocytes were incubated with A (RG:PT:SC=1:1:1), B (RG:PT:SC=2:1:1), C (RG:PT:SC=1:2:1), or D (RG:PT:SC=1:1:2) for 48 h. Then the cell viability was examined by MTT assay. The results were similar in 3 additional experiments.

2. 숙지황, 반하, 오미자 배합비율 조성이 전염 증성 사이토카인 분비에 미치는 영향

숙지황, 반하, 오미자 배합비율별 조성인 A, B, C, D가 마우스 비장세포에서 LPS로 유도한 전염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해, A, B, C, D를 마우스 비장세포에 1시간 동안 전처리한 후, LPS (1 µg/ml)를 48시간 동안 처리하여 비장 세포의 활성화 및 사이토카인 분비를 촉진시켜 TNF-α의 발현정도를 확인하였다. 그 결과, A는 TNF-α의 발현을 유의성있게 억제하였으나 B, C, D는 TNF-α의 발현을 억제하지 못하였다 (Fig. 3).

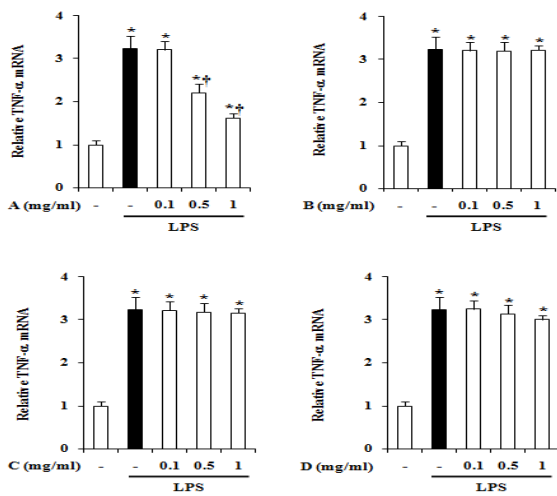


Fig. 3. Effect of combination with RG, PT, and SC on the mRNA expression of TNF-α. The cells were pre-treated A (RG:PT:SC=1:1:1), B (RG:PT:SC=2:1:1), C (RG:PT:SC=1:2:1), or D (RG:PT:SC=1:1:2) as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 1 µg/ml LPS for 48 h. Detail methods were described Materials and Methods. **P* < 0.05 : significant as compared to saline, †*P* < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

3. 숙지황, 반하, 오미자 배합비율 조성이 IL-5 사이토카인 분비에 미치는 영향

숙지황, 반하, 오미자 배합비율별 조성인 A, B, C, D가 마우스 비장세포에서 LPS로 유도한 IL-5 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 A, B, C, D를 마우스 비장세포에 1시간 동안 전처리한 후, LPS (1 µg/ml)를 48시간 동안 처리하여 비장 세포의 사이토카인 분비를 촉진시켰다. 그 결과, A는 IL-5의 발현을 유의성있게 억제하였으나, B, C, D는 IL-5의 발현을 억제하지 못하였다 (Fig. 4).

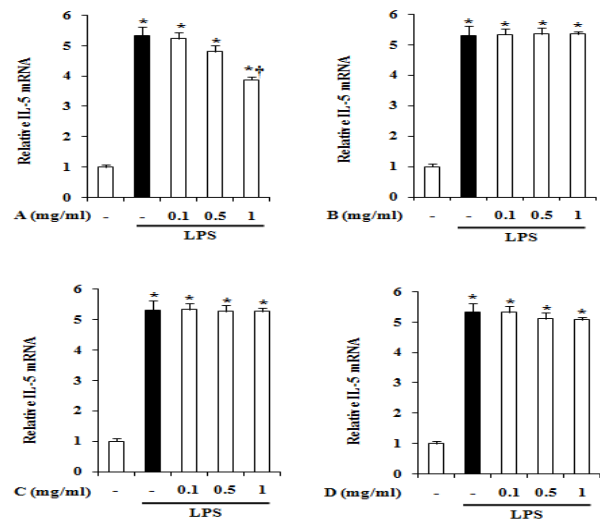


Fig. 4. Effect of combination with RG, PT, and SC on the mRNA expression of IL-5. The cells were pre-treated A (RG:PT:SC=1:1:1), B (RG:PT:SC=2:1:1), C (RG:PT:SC=1:2:1), or D (RG:PT:SC=1:1:2) as indicated concentrations for 1 h, and then incubated with or without 1 µg/ml LPS for 48 h. Detail methods were described Materials and Methods. **P* < 0.05 : significant as compared to saline, †*P* < 0.05 : significant as compared to LPS alone. The similar results were obtained from three additional experiments.

4. OVA로 유도한 기관지 천식에서 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1배합 추출물이 기도과민성 변화에 미치는 영향

마우스 비장세포에서 TNF-α와 IL-5의 발현에 유의성있는 효과를 보인 A (1:1:1)를 기관지 천식 모델 적용하여 알레르기성 과민반응에 의해 나타나는 기도과민성의 변화를 확인하기 위하여 정상군 (Normal)과 천식유발군 (ovalbumin, OVA) 및 실험군 (A 0.05, 0.1, 0.5 g/kg 처리군)에 methacholine을 농도별로 노출시켜 그에 대한 기도저항값 (Penh)을 조사하였다 (Fig. 5). 실험군의 Penh 값은 0.05 g/kg, 0.1 g/kg 농도에서 농도 의존적으로 감소하여 유의한 효과를 확인 할 수 있었으나, 0.5 g/kg 농도에서 Penh 값이 다시 증가하였다.

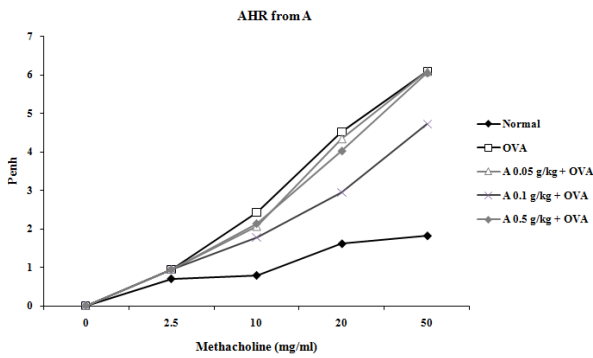


Fig. 5. Effect of A (RG:PT:SC=1:1:1) on airway hyper-reactivity (AHR) in ovalbumin (OVA)-induced Asthma. Mice that were immunized with OVA were sacrificed 24 hours after last challenge. AHR was measured by enhanced pause (Penh) under exposure to indicated doses of methacholine. These results are representative of three independent experiments (n=6 in each group).

5. OVA로 유도한 기관지 천식에서 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1배합 추출물이 폐조직의 조직학적 변화에 미치는 영향

기관지 천식 유발 마우스의 폐조직에 A가 미치는 효과를 확인하기 위하여 OVA 마지막 분무 24시간 후에 폐조직을 H&E 염색해 관찰하였다 (Fig. 6). 그 결과, 정상군에서는 기도벽이 얇고 선명하며, 염증세포의 침윤이 보이지 않으나, 천식유발군에서는 기도의 협착과 기도벽의 두께가 증가되어 있고 염증세포의 침착이 현저하게 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 실험군 A 0.05 g/kg군에서는 기도의 협착과 기도벽의 두께가 천식유발군에 비해 감소하였는데, A 0.1 g/kg군에서는 천식유발군에 비해 기도벽이 얇아지고, 손상된 폐포의 형태도 정상수준으로 돌아왔으며 염증성세포의 침윤 또한 정상군의 수준으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 하지만 실험군 A 0.5 g/kg군의 결과 기도벽의 두께 증가와 폐조직 내의 염증 수준이 A 0.1 g/kg 농도에 비해 증가 하는 것으로 확인되었다.

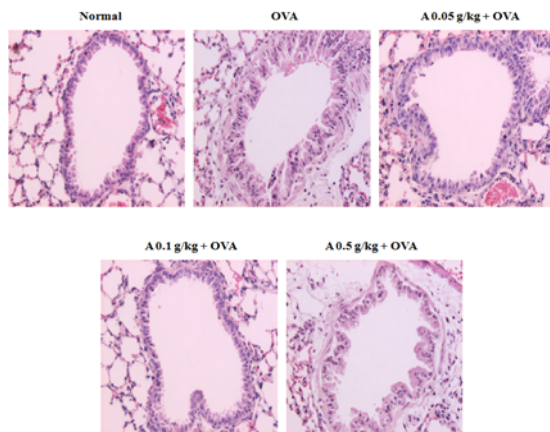


Fig. 6. Effect of A (RG:PT:SC=1:1:1) on the lung histological structure in OVA-induced Asthma. Lung tissues were sectioned and stained with hematoxylin and eosin(H&E). Original magnification, x400. Images are representative section of six mice per group. * $P < 0.05$ vs, control; + $P < 0.05$ vs, OVA positive group.

6. OVA로 유도한 기관지 천식에서 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1배합 추출물이 폐조직의 사이토카인 변화에 미치는 영향

비장세포의 활성화로 인하여 발현된 사이토카인을 유의하게 억제할 수 있었던 숙지황, 반하, 오미자 배합비율 A의 기관지 천식에서의 사이토카인 억제효과를 확인하기 위하여 기관지 천식 유발 마우스의 폐조직에서 면역작용에 관여하는 염증성 세포들로 인하여 발현된 전염증성 사이토카인 TNF-alpha와 Th2 타입의 사이토카인인 IL-5의 농도를 조사하였다. 항원을 인지한 면역세포 및 T 림프구는 림프절에서 활성화하여 염증조직으로 이동하게 된다. 알레르기성 항원인 OVA에 특이적으로 작용한 면역세포들은 다수가 염증부위인 폐조직으로 이동하여 염증작용 및 Th-2 반응을 통하여 사이토카인을 생산하기 때문에 폐조직 내에서 발현되는 사이토카인양을 조사하였다¹³⁻¹⁴. 폐조직의 mRNA 레벨에서 사이토카인 변화정도를 확인한 결과, TNF-alpha와 IL-5 수준 모두 천식유발군에서 정상군에 비하여 확연하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 실험군인 A 0.1 g/kg에서 유의하게 억제되었다. 하지만 실험군 A 0.5 g/kg 농도에서는 유의한 억제효과가 나타나지 않았다 (Fig. 7).

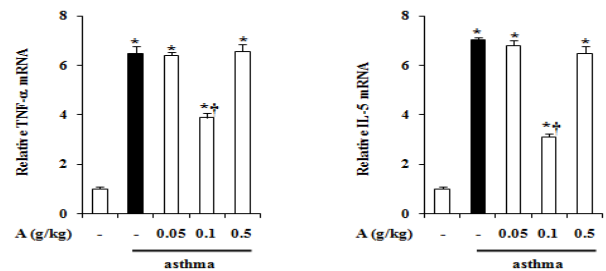


Fig. 7. Effect of A (RG:PT:SC=1:1:1) on TNF- α and IL-5 expression in lung tissue in OVA-induced Asthma. The expression of indicated genes in tissues were determined by real-time RT-PCR. * $P < 0.05$ vs, control; + $P < 0.05$ vs, OVA positive group.

고찰

최근 본 연구팀이 보고한 결과, in vitro 실험 결과에서 OMC-2010이 비장세포에서 보여준 면역조절효과에 대하여 유의성이 있음을 직접적으로 확인하고, 그 유효 약재로서 숙지황, 반하, 오미자 물 추출물 및 에탄올 추출물에 유효성분이 있음을 확인하였다^{10,11}. 본 연구에서는 숙지황, 반하, 오미자 배합비율 조성에 따라서 in vitro와 in vivo에서 나타나는 면역 조절 및 기관지 천식에 대한 효과를 조사하였고, 그 결과 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율 조성에서 TNF-alpha와 IL-5의 발현 및 기관지 천식에 유의성 있는 억제효과를 보여주었다.

기관지 천식은 기도염증반응이 중요한 기전으로 알려져 있으며, 면역학적 병인과 관련하여 Th1 사이토카인인 IL-2, IFN- γ 등과 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13 등의 불균형이 핵심적인 요인으로 인식되고 있다¹⁵⁻¹⁶. 한편, 기도 과민성은 천식증상의 발현에 다른 질환과 구별되는 대표적인

표현형으로서 이를 증가시키는 원인으로서는 기관지 평활근의 수축이 중요한 것으로 여겨진다. 즉 기관지벽의 부종, 염증세포의 침윤 및 기관지내강의 점액물질 분비로 기도상피세포의 손상에 의한 기관지 수축 반사가 증가되고, 점액 분비선의 증가, 점막과 점막하 부종, 호산구 및 염증세포의 침윤 등으로 기도 저항이 증가되어 천식이 유발되어 기침, 호흡곤란, 천명의 3대 증상이 나타나는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁷.

본 연구에서 기관지의 수축과 함께 염증세포의 침착을 수반하게 됨으로서 나타나는 기관지 천식의 특징적인 증상인 기도과민성을 측정한 결과 추출물 A의 0.1 g/kg 농도에서 유의한 효과를 보였다. 이는 추출물 A가 기도의 평활근 증식을 억제하여 기도 두께를 감소했을 가능성이 있고, 또한 호산구나 염증세포의 기관지로 유입, 침윤을 막음으로서 기도과민성을 줄일 수 있었을 것으로 추측할 수 있었다. 그리하여 추출물 A가 이에 미치는 효과를 확인하기 위하여 폐조직의 조직학적 검사를 통하여 기도벽의 두께와 염증세포의 침윤정도, 기관지의 수축 정도를 확인하였다. 그 결과, 추출물 A는 0.1 g/kg 농도에서 천식유발군 비해 기도의 협착과 기도벽의 두께, 염증세포의 침착정도도 유의성 있게 감소할 수 있었다. 하지만 추출물 A 0.5 g/kg 농도에서 기도과민성과 폐조직의 조직학적 변화 모두 유의한 효과를 가지지 못하였다. 이는 추출물 농도 차이에 따른 영향으로 오히려 고농도에서는 독성을 나타낸 결과로 사료된다.

면역 반응 시 다른 세포에게 영향을 줄 수 있는 분비성 단백질인 사이토카인은 세포간의 상호작용을 매개하는 중요한 역할을 담당한다. TNF- α 는 가장 많이 연구된 염증 유발 사이토카인이며, 상당히 광범위한 생물학적 활성을 가지고 있다. 주로 전신성 염증과, 급성 반응을 조절하는 사이토카인으로서 활성화된 대식세포에서 생성되며, 또한 CD4+ T cell이나 NK cell에서도 생성된다. TNF- α 의 주요한 역할은 면역세포 조절이다¹⁸⁻¹⁹. 실제로 TNF- α 의 분비를 억제하였을 때, 대장염, 천식 등을 억제했다는 보고가 다수 있다²⁰⁻²¹. 그렇기 때문에 TNF- α 의 억제는 큰 의미를 가질 수 있다. 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율조성의 에탄올 추출물 A는 LPS로 활성화된 비장세포에서의 TNF- α 의 발현 및 기관지 천식 마우스의 폐조직에서 또한 크게 억제하였다. 이는 추출물 A가 면역세포 조절에 직접적으로 관여함으로써, TNF- α 의 발현을 조절해 기관지 천식에 유의한 효과를 가져온 것으로 추측할 수 있다. 특히 알레르기성 기관지 천식의 경우 Th2 형의 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13 등이 알레르기 반응에 관여하는 여러 백혈구들의 이동에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있으며²², 그 중 특히 IL-5는 염증이 유발된 조직으로 호산구의 침윤에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, IL-5 결핍 마우스를 이용한 많은 보고에 의하면 염증조직에 모이는 호산구의 수가 감소한 것을 볼 수 있다²³. 실제로 본 연구에서 또한 *in vivo*와 *in vitro* 실험 상에서 추출물 A가 TNF- α 와 IL-5의 발현 수준을 유의하게 억제할 수 있었다.

본 연구에서는 OMC-2010의 구성약재 중 숙지황, 반하, 오미자를 배합비율을 다르게 하여 에탄올로 추출하고, *in vitro* 상에서 TNF- α 와 IL-5의 발현을 분석해 유의한 비율 조성을 선택하여, 그 효과를 *in vivo* 상에서 기관지 천식 마우스 모델에 적용하여 조사하였다. 숙지황, 반하, 오미자를

1:1:1 비율로 배합한 처방 A가 비장세포의 활성화에 미치는 사이토카인 억제에 유의한 억제효과를 가졌으며, 또한 기관지 천식 마우스의 기도과반응성, 조직학적 변화 및 사이토카인 억제에 유의한 효과를 보여주었다. 이는 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율 조성의 에탄올 추출물에서 유효성분이 다수 포함된 것으로 추측할 수 있다. 추출물 A 0.5 g/kg 농도에서는 유의한 억제효과를 보이지 못하였지만, A 0.1 g/kg 농도에서 월등한 효과를 보여주었기 때문에 농도를 조정하여 추가실험이 이루어져야 할 것으로 생각되어진다. 또한 배합 비율에 따른 효과변화에 따라서, 단일 추출과 혼합추출물에 따른 유효 성분 변화가 있을 것으로 사료되어 성분 분석에 대한 추가실험이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

OMC-2010의 구성약재 중 숙지황, 반하, 오미자를 배합비율을 다르게 한 에탄올로 추출물의 *in vitro*와 *in vivo*에서 면역조절 능력 및 기관지 천식 마우스 모델에서의 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 숙지황, 반하, 오미자 배합비율에 따른 에탄올 추출물은 비장세포에서 세포 독성을 보이지 않았다.
2. 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율 조성의 에탄올 추출물 A는 비장세포의 전염증성 사이토카인 TNF- α 의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
3. 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율 조성의 에탄올 추출물 A는 비장세포의 Th2 타입 사이토카인 IL-5의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
4. 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율 조성의 에탄올 추출물 A 0.1 g/kg는 기관지 천식 마우스의 기도과반응성을 유의성 있게 억제하였다.
5. 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율 조성의 에탄올 추출물 A 0.1 g/kg는 기관지 천식 마우스의 폐조직의 조직학적 손상을 유의성 있게 억제하였다.
6. 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율 조성의 에탄올 추출물 A 0.1 g/kg는 기관지 천식 마우스의 전염증성 사이토카인 TNF- α 및 Th2 타입 사이토카인 IL-5를 유의성 있게 억제하였다.

이상의 결과, 숙지황, 반하, 오미자 1:1:1 비율 조성의 에탄올 추출물 A는 비장세포에서 TNF- α 와 IL-5의 생성을 유의성 있게 억제하였으며, 기관지 천식 마우스 모델에서의 기도과민성과 폐 조직학적 손상 및 사이토카인 TNF- α 와 IL-5의 생성을 유의성 있게 억제하였다. 하지만 추출물의 농도적용에 따른 효과 변화가 있음을 인지할 수 있었으므로, 추출물의 농도에 따른 추가연구 및 단일 추출과 혼합 추출에 따른 효과 성분 분석이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 충청북도 바이오국제공동연구사업[OMC-2010 기관지 천식치료제 개발]의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

References

- Liu J, Xiong H, Cheng Y, Cui C, Zhang X, Xu L, Zhang X. Effects of taraxasterol on ovalbumin-induced allergic asthma in mice. *J Ethnopharmacol*. 2013 ; 148(3) : 787-93.
- Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008 ; 31(1) : 143-78.
- Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med*. 2001 ; 344(5) : 350-62.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsiocopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992 ; 326(5) : 298-304.
- Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*. 1992 ; 146(1) : 109-15.
- Aronica MA, McCarthy S, Swaidani S, Mitchell D, Goral M, Sheller JR, Boothby M. Recall Helper T Cell Response: T Helper 1 Cell-resistant Allergic Susceptibility without Biasing Uncommitted CD4 T Cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 ; 169(5) : 587-95.
- Barnes PJ. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 ; 161(3 Pt 2) : 176-781.
- Jo JK, An CG, Kim KJ, Kim NK, Park MC. Effects of Kumsooyukkun-jeon extract on the Ovalbumin-Induced Allergic Asthma in Mice. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2007 ; 20(3) : 107-17.
- Kim CS, Choi HY, Kim JD. Effects of Kumsooyukkun-jeon on Asthma Induced by Ovalbumin in Mice. *J Korean Oriental Med*. 2002 ; 23(3) : 104-18.
- Bae GS, Park KC, Choi SB, Jo IJ, Seo SW, Kim JJ, Shin YK, Kim MS, Park KH, Kim HS, Song HJ, Park SJ. Effects of OMC-2010 extracts on cytokine productions in mouse spleen cells. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(5) : 21-5.
- Bae GS, Kim HS, Park KC, Choi SB, Jo IJ, Lee CH, Seo SW, Kim JJ, Shin YK, Kim MS, Park KH, Song HJ, Park SJ. Effects of OMC-2010 constituents on cytokine productions in mouse spleen cells. *Kor J Herbology*. 2012 ; 27(6) : 49-54.
- Peebles RS Jr, Sheller JR, Johnson JE, Mitchell DB, Graham BS. Respiratory Syncytial Virus Infection Prolonges Methacholine-induced Airway Hyperresponsiveness in Ovalbumin-Sensitized Mice. *J Med Viro*. 1999 ; 57(2) : 186-92.
- Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis*. 1989 ; 139(3) : 806-17.
- Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 ; 105(3) : 399-408.
- Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 ; 111(3) : 799-804.
- Kim YK. Th1/Th2 imbalance vs. T cell priming in asthma immunopathogenesis. *Biowave*. 2005 ; 7(4) : 1-13.
- Factor P. Gene Therapy for Asthma. *Mol Ther*. 2003 ; 7(2) : 148-52.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975 ; 72 (9) : 3666-70.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*. 1985 ; 316 (6028) : 552-4.
- Mikocka-Walus AA, Turnbull DA, Moulding NT, Wilson IG, Andrews JM, Holtmann GJ. Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007 ; 13 (2) : 225-34.
- Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987 ; 330 (6149) : 662-4.
- Jinquan T, Quan S, Jacobi HH, Reimert CM, Millner A, Hansen JB, Thygesen C, Ryder LP, Madsen HO, Malling HJ, Poulsen LK. Cutting edge: expression of the NF of activated T cells in eosinophils: regulation by IL-4 and IL-5. *J Immunol*. 1999 ; 163(1) : 21-4.
- Webb DC, Mahalingam S, Cai Y, Matthaei KI, Donaldson DD, Foster PS. Antigen-specific production of interleukin IL-13 and IL-5 cooperate to mediate IL-4R-independent airway hyperreactivity. *Eur J Immunol*. 2003 ; 33 : 3377-85.