

난알부민으로 유도된 천식 마우스에서 식방풍(植防風)의 알레르기 면역반응 조절효과 연구

강석용^{1#}, 오태우¹, 김진웅², 박용기^{1,3*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 서울대학교 약학대학 생약학교실, 3 : 동국대학교 한방신약개발센터

Effect of the water extract of *Peucedani Japonici Radix* on ovalbumin-induced allergic asthma in mice

Seok Yong Kang^{1#}, Tae Woo Oh¹, Jin Woong Kim², Yong-Ki Park^{1,3*}

1 : Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

2 : College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Science, Seoul National University

3 : Oriental Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The root of *Peucedanum japonicum* Thunberg (*Peucedani Japonici Radix*; PJR) has been traditionally used as an herbal medicine for the treatment of anti-headache, anti-paralysis, anti-cancer, vascular protection, and blood pressure regulation. In this study, we investigated the anti-allergic effect of PJR water extract on ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma in mice.

Methods : Mice were sensitized at days 1, 8 and 15 with OVA and airway challenged at days 22, 24, 26, 28, and 30 to induced allergic asthma. PJR-W extract at doses of 100 and 300 mg/kg/body weight (bw) was orally administered during OVA challenge once per a day. The levels of allergic mediators such as immunoglobulin (Ig) E, and Th1/Th2 cytokines (IFN- γ and IL-4) were measured in the sera of mice by ELISA. The histological change of lung tissue was observed with hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Results : The administration of PJR-W extract significantly decreased the serum levels of IgE, IL-4, and IFN- γ compared with those of OVA control group. In H&E staining, PJR-E extract inhibited OVA-induced airway inflammation and the inflammatory cells infiltration in the peribronchial regions of the lung.

Conclusions : These results indicate that PJR-W extract has an anti-inflammatory and anti-allergic effect on allergic response through the down-regulation of allergic mediators, suggesting that this herb may be used as a useful source for the treatment of allergic inflammatory diseases such as asthma.

Key words : *Peucedani Japonici Radix*, *Peucedanum japonicum* Thunberg, ovalbumin, allergic response, inflammation, asthma

서 론

현대 사회는 의료조건의 발달 등으로 양질의 의료서비스를 제공받음에도 불구하고 알레르기 질환은 증가하는 추세이며, 이는 실내생활의 증가와 흡연, 자동차 배기가스 등의 환경오염, 각종 화학물질 사용의 증가, 서구화된 생활환경 등의 변화

와 유전적 요인이 함께 어우러져 우리 몸의 면역계(immune system)에 혼란을 가져오는데서 비롯된다. 인체 내 면역계 기능이상은 각종 질병을 유발하게 되는데, 면역세포의 생산적 결함이나 기능적 이상은 다양한 형태의 면역결핍증을 야기하고 면역계 각 부분의 과도한 활성화 역시 자가면역증이나 각

*교신저자 : 박용기, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 054-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

#제1저자 : 강석용, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 054-770-2647 · E-mail : seokppo2@hanmail.net

· 접수 : 2013년 10월 23일 · 수정 : 2013년 11월 11일 · 채택 : 2013년 11월 12일

중 알레르기 반응을 유발하게 된다¹⁾.

알레르기(allergy)라 함은 외부항원(allergen)에 반복적으로 노출됨에 따라 일어나는 과민반응으로 면역시스템의 오류로 생각되어지는데 일반 사람에게는 별로 영향이 없는 물질이 어떤 사람에게만 두드러기, 가려움, 콧물, 기침 등의 이상 과민 반응을 일으키는 것이다²⁾. 이러한 면역 과민 반응에는 알레르기 반응, 접촉성 피부염, 과민성 쇼크 반응 등 5가지로 나누며 유발 원인이 되는 항원-항체 반응이 조금씩 다른데 일반적으로 제1형 과민반응은 외부 물질이 항원으로 인식되어 인체 내 들어오면 호산구와 T 세포의 침윤과 T 세포에서의 Th2 type(IL-4, IL-5)의 사이토카인 분비, IgE 생성과 비만 세포와의 결합(IgE-Fcε RI complex), 비만세포 활성화에 따른 알레르기 매개물질 방출 및 이를 통한 우리 몸의 항상성 파괴에 따른 면역체계 혼란으로 아나필락시, 두드러기, 혈관 부종, 아토피피부염, 천식, 비염 등 급·만성 알레르기성 질병을 유발하게 된다.

알레르기 반응에 대한 한의학적 해석은 『素問癘論』에서 "衛氣之所在 與邪氣相合則病作"이라 하여 섭취한 음식의 양분이 피부와 주리(腠理)를 튼튼하게 하고 신체를 호위하는 기운(衛氣)은 면역방어기능과 거의 같은 작용을 한다고 보아 인체의 표부(表部)에서 외부로부터 인체에 침입하여 질병을 일으키는 사기(外邪)에 대한 저항력을 나타내는 위기의 견고한 정도가 면역계 불균형으로 인한 알레르기 질환의 발병여부가 되는 것으로 보고 있다³⁾. 또한 알레르기와 관련된 한의학적 이론은 기(氣)를 바탕으로 하며, 한방에서 '인체의 기가 강하면 병원균이 침범하지 못한다'(正氣存內 邪不可干)고 하여 인체 내 면역계의 저항력이 강하면 외부 물질의 침입을 막아낼 수 있다고 본다.

최근 알레르기 질환 증가와 더불어 치료약물 발굴에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 알레르기 질환 한방임상처방과 한약을 대상으로 다양한 면역조절작용에 대한 보고도 많이 이루어지고 있다. 식방풍(植防風)은 산형과(繖形科: Umbelliferae)에 속하는 갯기름나무 *Peucedanum japonicum* Thunberg의 뿌리로 성질(性)은 따뜻(溫)하고, 맛(味)은 맵고(辛) 달(甘)며, 두통(頭痛), 중풍(中風), 해열(解熱), 신경통(神經痛)의 주요 효능을 가지고 있다^{4,5)}. 또한 식방풍의 성분으로는 bergapten, hamaudol, peucedanol, khellactone, coumarin, pyranocoumarin, polyacetylene 화합물 등이 알려져 있다. 식방풍에 대한 실험연구로는 혈관성 치매에 대한 예방과 치료 효과⁶⁾, 혈압강화작용⁷⁾, 탄력섬유의 재생 및 회복 효과⁸⁾, Azoxymethane으로 유도된 대장암 마우스에서의 항 암효과⁹⁾ 등이 보고되었다. 또한 방풍 잎(葉) 추출물에 대한 연구로 고지방식으로 유도된 비만마우스에서의 항비만 효과¹⁰⁾, 부탄올 분획물의 항산화효과¹¹⁾가 보고되었다.

본 연구에서는 식방풍의 면역조절에 대한 효능을 알아보기 위해 식방풍의 물추출물을 제조하고 난알부민(ovalbumin)으로 알레르기성 천식이 유도된 마우스에 투여한 후 알레르기성 면역반응에 대한 조절 효과를 확인하였으며 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 식방풍(PJR) 추출물은 갯기름나무의 뿌리(*Peucedanum japonicum* Thunberg, *Peucedani Japonici Radix*)의 물추출물로서 식품의약품안전청 한약재품질표준화 연구사업단으로부터 제공받아(13D) 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 6주령 BALB/c계 수컷 생쥐(mouse, 20±2g)를 (주)샘타코(경기도, 한국)로부터 구입하였으며, 고형사료와 물을 제한 없이 공급하면서 온도(23±2℃)와 습도(55±5%)를 일정하게 유지되고, 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하는 환경에서 사육하였다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물실험 윤리위원회 규정에 따라 관리하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약으로 ovalbumin(OVA)과 ketotifen은 Sigma-Aldrich사(St Louis, CA, USA)로부터 구입하였으며, Al(OH)₃ gel은 InvivoGen사(InvivoGen, San Diego, USA), H&E 염색 시약(Seoulin Biosciences Co., Seoul, South Korea)과 Sandwich ELISA using OptEIA Set mouse OVA-specific IgE Kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 및 Murine IL-4, IFN-γ ELISA Kits(Peprotech, USA)를 사용하였다. 또한 실험기기로는 nebulizer(Devilbiss, PA, USA), microplate reader(Asys, Eugendorf, Austria), microscope(LEICA, Wetzlar, Germany) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 식방풍 추출물 제조

식방풍 200 g에 정제수 2L를 가하여 열탕추출기에서 3시간 동안 가열한 후 물추출물을 3겹 거어즈 및 왓트만(Whatman No. 1) 여과지로 여과하였다. 이를 회전식 감압농축기를 이용하여 감압농축한 후 동결 건조함으로써 최종 추출물을 제조하였다. 시료는 냉장보관하면서 실험직전 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) 동물모델 제작

알레르기성 천식의 동물모델을 제작하기 위해 먼저 난알부민(ovalbumin, chicken egg albumin; OVA) 1 mg을 PBS와 수산화알루미늄 겔(Al(OH)₃ gel)을 1:1로 혼합한 용액 0.3 ml을 실험 시작일로부터 7일 간격으로 하루에 1번 1일, 8일, 15일에 마우스 복강으로 주사하였다. 또한 마지막 복강 주사 7일 후 마우스를 50×15×50 cm 크기의 아크릴 상자 안에 넣고 2 mg/ml OVA 용액을 뉴블라이저(nebulizer) 기기를 이용하여 격일 간격으로 1일 3회 22일, 24일, 26일, 28일, 30일에 분사함으로써 호흡을 통한 알레르기성 천식을 유도하였다. 실험군으로는 생리식염수를 투여한 정상군(Normal), 난알부민(OVA) 감작에 의해 알레르기 면역반응이 유발된 대조군(OVA-Control), 면역반응이 유발된 대조군에

식방풍 물 추출물(PJR-W)을 100 mg/kg과 300 mg/kg 용량으로 투여한 실험군(OVA+PJR-W 100, OVA+PJR-E 300) 및 대조약물로서 항히스타민제인 케토티펜(Ketotifen)을 10 mg/kg 투여한 양성대조군(OVA+Keto 10)으로 나누었으며, 각 군 당 10마리의 마우스를 사용하였다. 실험 최종일에 모든 동물을 희생시키고 심장에서부터 혈액을 수집하였으며, 수집된 혈액은 6,000 rpm에서 10분간 2회 원심 분리함으로써 혈청을 분리하였다. 또한 폐의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 각 군으로부터 폐 조직을 수집하였다.

3) 혈청 내 난알부민 특이 IgE 농도 측정

혈청 내 난알부민 특이 IgE 항체의 농도는 IgE ELISA kit(BD Biosciences)를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well flat-bottom ELISA plate에 0.1 M sodium carbonate 용액으로 희석한 capture antibody(1:250)를 100 μ l씩 넣은 후 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 각 well에 10% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 1 \times PBS를 넣고 실온에서 1시간 동안 정치함으로써 blocking한 후 혈청을 100 μ l씩 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 다시 5회 washing buffer로 세척한 다음 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 plate를 5회 세척한 다음 각 well에 기질용액인 TMB를 넣어 10분 동안 암실상태에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였다. 반응이 끝난 후 각 well에 정지액을 50 μ l씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 IgE의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

4) 혈청 내 사이토카인 농도 측정

혈청 내 IL-4와 IFN- γ 의 농도는 Murin IL-4 및 IFN- γ ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well flat-bottom ELISA plate에 0.1 M sodium carbonate 용액으로 희석한 capture antibody(1:250)를 100 μ l씩 넣은 후 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 반응시킨 후 washing buffer로 3회 세척하였다. 각 well에 10% bovine serum albumin(BSA)이 함유된 1 \times PBS를 넣고 실온에서 1시간 동안 정치함으로써 blocking한 후 혈청을 100 μ l씩 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이를 다시 5회 washing buffer로 세척한 다음 peroxidase가 결합된 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 항체를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 plate를 5회 세척한 다음 각 well에 기질용액인 TMB를 넣어 10분 동안 암실상태에서 반응시킴으로써 발색을 유도하였다. 반응이 끝난 후 각 well에 정지액을 50 μ l씩 넣어 효소반응을 정지시킨 후 microplate reader의 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 IL-4와 IFN- γ 의 농도는 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

5) Hematoxylin & Eosin 염색

각 군으로부터 수집한 폐 조직을 4% formaldehyde 용액으로 3일간 고정한 후 파라핀으로 포매하여 블록을 제작하고 microtome을 이용하여 폐 조직을 3 μ m 두께의 절편을 제작

하였다. 폐 조직의 구조적 변화를 관찰하기 위해서 폐 조직 슬라이드를 60 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 조직을 말린 다음 xylene으로 15~20분 간 탈파라핀 시키고 100%, 95%, 80%, 75% 알코올 순서대로 함수시켰다. 이를 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 Permount로 마운팅하였다. H&E 염색된 폐 조직 슬라이드에서 기관지 상피세포층의 손상정도, 기관지와 폐포 주위 염증세포 침윤 등을 광학현미경(Leica Co., German)으로 관찰하였다.

6) 통계학적 검정

모든 실험 결과는 GraphPadprism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean \pm SD)를 이용하여 계산하였으며, 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA를 실시하고, p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 혈청 내 난알부민 특이-IgE 분비에 대한 효과

난알부민으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에서 식방풍 물추출물(JPR-W)의 IgE 항체 생성에 대한 억제효과를 확인하기 위해 혈청 내 IgE의 농도를 효소면역반응법(ELISA)으로 측정하였다. 그 결과, 정상군(Normal)에 비해 난알부민 감작으로 천식이 유발된 대조군(OVA-Control)에서 혈청 IgE의 농도가 유의적으로 증가되었으며, 식방풍추출물을 100 mg/kg(OVA+JPR-W 100)와 300 mg/kg 투여한 군(OVA+JPR-W 300)에서는 대조군에 비해 IgE의 농도가 유의적으로 감소하였다. 또한 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서도 IgE의 농도가 유의적으로 감소하였으며, 식방풍추출물을 300 mg/kg 투여하였을 때 ketotifen을 투여한 경우 보다 더욱 IgE의 생성이 억제되는 것으로 나타났다.

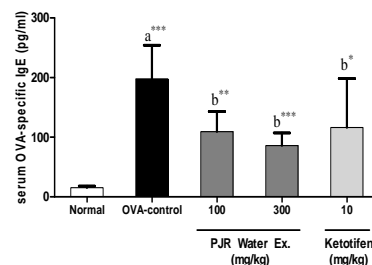


Fig 1. Effect of JPR-W extract on IgE levels in the sera of OVA-induced asthma mice. JPR-W extract was administrated orally at doses of 100 and 300 mg/kg/bw in OVA-induced asthma mice (OVA-control). The OVA-specific IgE levels were measured in the sera of OVA-induced asthma mice by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD (n=10 per a group). *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 vs. normal (a) or OVA-control (b) group.

2. 혈청 내 알레르기성 면역반응조절 사이토카인 분비에 대한 효과

난알부민으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에서 식방풍 물추출물(JPR-W)의 알레르기 면역반응조절 사이토카인(Th1/Th2) 생성에 대한 억제효과를 확인하기 위해 혈청 내인 IFN- γ 와 IL-4의 농도를 효소면역반응법(ELISA)으로 측정하였다.

먼저, 그림 2에서와 같이 IL-4의 분비는 정상군(Normal)보다 난알부민 감작으로 알레르기성 천식이 유발된 대조군(OVA-Control)에서 유의적으로 증가하였으며, 식방풍 물추출물을 100 mg/kg(OVA+JPR-W 100)와 300 mg/kg 투여한 군(OVA+JPR-W 300)에서는 대조군에 비해 IL-4의 농도가 유의적이고 용량에 의존적으로 감소하였다. 한편 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서는 IL-4의 분비가 감소되지 않는 것으로 나타났다.

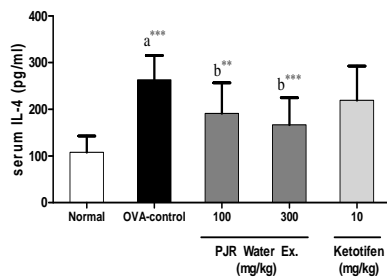


Fig 2. Effect of JPR-W extract on IL-4 levels in the sera of OVA-induced asthma mice.

JPR-W extract was administrated orally at doses of 100 and 300 mg/kg/bw in OVA-induced asthma mice (OVA-control). The IL-4 levels were measured in the sera of OVA-induced asthma mice by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD (n=10 per a group). * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 vs. normal (a) or OVA-control (b) group.

한편, IFN- γ 의 분비는 IL-4와 마찬가지로 정상군(Normal)에 비해 난알부민 감작으로 알레르기성 천식이 유발된 대조군(OVA-Control)에서 유의적으로 증가하였으며, 식방풍 물추출물을 100 mg/kg(OVA+JPR-W 100)와 300 mg/kg 투여(OVA+JPR-W 300)에 의해 대조군에 비해 유의적이고 감소하였다(Fig. 3). 한편 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서는 IFN- γ 의 분비가 다소 감소하였으나 유의적인 결과는 나타나지 않았다.

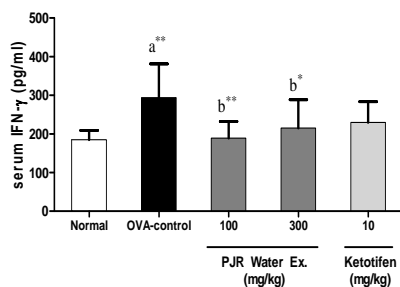


Fig 3. Effect of JPR-W extract on IFN- γ levels in the sera of OVA-induced asthma mice.

JPR-W extract was administrated orally at doses of 100 and 300 mg/kg/bw in OVA-induced asthma mice (OVA-control). The IFN- γ levels were measured in the sera of OVA-induced asthma mice by ELISA. Results are expressed as the mean \pm SD (n=10 per a group). * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 vs. normal (a) or OVA-control (b) group.

3. 폐 조직 손상에 대한 효과

난알부민으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에서 식방풍 물추출물(JPR-W)의 폐 조직 손상에 대한 억제 효과를 확인하기 위해 H&E 염색을 실시하였다. 그 결과, 그림 4에서와 같이 정상군(Normal)에서는 기관지(bronchiole), 세기관지(bronchi), 폐포낭(Alveolar sac) 및 혈관(vein, artery)의 형태가 잘 보존되어 있는 것을 확인하였으며, 난알부민 감작으로 알레르기성 천식이 유발된 대조군(OVA-Control)의 폐 조직에서는 세기관지와 세기관지 내 상피세포층의 손상 및 기관지와 폐포 주변으로의 염증세포 침윤에 따른 세기관지 면적이 좁아지고 기관지 벽이 두꺼워지는 병리적 현상이 관찰되었다. 또한 식방풍 물추출물을 각각 100 mg/kg와 300 mg/kg 투여한 군(OVA+JPR-W 100, 300)에서는 대조군에 비해 폐 조직의 염증과 구조적 손상이 개선되는 것으로 나타났다. 특히 식방풍 물추출물을 300 mg/kg 투여하였을 때 정상군의 폐 조직과 유사하게 염증세포 침윤과 세기관지 변형이 억제되는 것을 확인하였다. 한편 대조약물인 ketotifen을 10 mg/kg 투여한 군(OVA+Keto 10)에서도 기관지 형태와 상피세포층의 손상이 대조군에 비해 억제되는 것으로 나타났으나, 식방풍 물추출물 투여군에 비해서는 억제되지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 4).

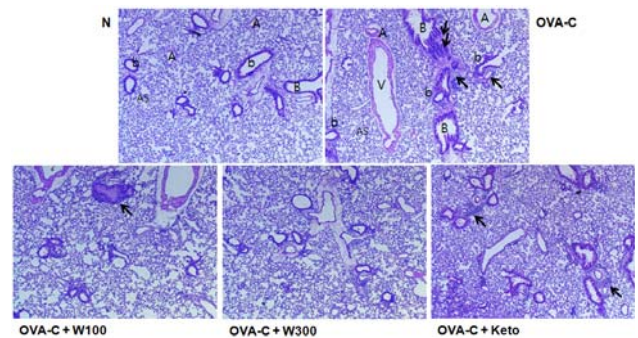


Fig 4. Effect of JPR-W extract on histopathological changes in lung tissue of OVA-induced asthma mice. JPR-W extract was administrated orally at doses of 100 and 300 mg/kg/bw in OVA-induced asthma mice (OVA-control). Lung tissues were stained with H&E (x50). N : Lung tissues were obtained from PBS-administrated mice, OVA-C : OVA-sensitized/challenged mice, OVA-C+W100 or 300 : JPR-W extract was administrated orally at doses of 100 and 300 mg/kg/bw in OVA-induced asthma mice (OVA-control), and OVA-C+Keto : Ketotifen was administrated orally at doses of 10 mg/kg/bw in OVA-induced asthma mice (OVA-control).

V : vein, A : artery, B : bronchi, b : bronchiole, AS : Alveolar sac, Arrow : infiltrated inflammatory cells

고찰

한의학에서 질병의 발생 및 전변과정은 정기(正氣)와 외사(外邪) 및 칠정(七情), 음식(飲食), 담음(痰飲), 어혈(瘀血) 등의 발병인자 간에 소장진퇴의 과정으로 설명하고 있으며, 면역역을 질병의 원인이 되는 몸의 나쁜 기운(病邪)으로부터 인체를 보호하는 정기(正氣)와 밀접한 상관성으로 보아 정기의 부족(正氣不足)은 곧 면역기능 저하로 보고 있다. 또한 《黃帝內經·靈樞·營衛生成篇》에서 “衛出於下焦”라는 말이 있는데 이는 위기(衛氣)의 근본이 되는 하초(下焦), 즉 간신(肝

腎)을 보(補)하는 것이 면역기능을 강화시키는 것으로 보았다. 즉 신장(腎陽)을 강장(強壯)하게 하고, 정혈(精血)을 보익(補益)하며, 근육과 뼈(筋骨)를 강하게 하는 약물이 면역기능을 증강시킬 수 있다고 보고 있다¹³⁾.

현대 의학에서의 면역기능 조절은 다양한 면역세포의 역할과 기능을 의미하며 여러 단계의 과정에서 면역제어세포의 복잡한 상호작용의 결과로 해석된다. 예로 T 세포와 B 세포는 면역기능을 증대하며 외부로부터 어떤 신호가 주어지면 여러 단계의 과정을 통해 신호를 전달함으로써 활성화에서부터 증식, 분화, 효과의 기능까지 나타나게 되고, 마지막 단계인 효과는 분화된 형질세포에 의한 항체 생성과 분비, 그리고 다른 세포의 기능을 조절하는 통제 역할 등을 하게 된다¹⁾.

면역세포인 T 세포는 CD8 cytotoxic T (Tc) 세포와 CD4 helper T 세포로 구분되며, Th 세포로부터 생성된 사이토카인을 통해 Tc 세포가 활성화되게 된다. Th 세포는 다시 분비되는 사이토카인에 따라 Th1 type(IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α)과 Th2 type(IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, TGF- β)으로 나누며^{14,15)}, Th1/Th2 세포는 공통의 naive T 세포로부터 분화하며 항원 자극 후 IL-4 존재 하에서는 Th2 세포로 분화하고 IL-12 존재하에서는 Th1 세포로 분화하게 된다²⁾. 특히 Th2 세포는 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)의 생산을 위해 B 세포를 자극하며 외부항원 제거를 위해 높은 항체가 요구되는 경우 그 항원의 제거를 돕게 된다. 즉, T 세포를 조절하는 세포나 사이토카인은 Th1과 Th2 세포 작용을 조절함으로써 인체 내 면역반응의 항상성을 유지시키게 된다¹⁶⁾. 한편, 알레르기 환자에서는 Th2 세포로의 분화가 많이 일어나는데 이러한 Th1과 Th2의 불균형은 알레르기 질환의 중요한 기전 중 하나로써 예로 천식 환자의 기관지나 알레르기성 비염 환자의 비점막, 아토피피부염 환자의 피부 등에서 Th2 세포가 분비하는 사이토카인의 양이 많은 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 또한 제1형 과민반응인 알레르기성 면역반응에서 IgE가 중요한 역할을 하는데 이는 Th2 세포로부터 생성된 IL-4가 B 세포를 자극함으로써 IgE 생성을 유도하게 된다¹⁸⁾. 따라서 전 세계적으로 알레르기 질환을 치료하는 약물은 궁극적으로 Th1/Th2의 불균형을 해소시킬 수 있는나에 있으며 가장 좋은 약물은 결국 IL-4, IL-5의 분비를 감소시키고 IFN- γ 분비는 증가시키는 것으로 이해되고 있다. 그러나 최근까지 Th1/Th2 세포의 양분법적 분류 외 새로운 helper T 세포의 아군들이 밝혀지면서 Th17 세포가 과민성 면역반응의 연관세포로 주목받고 있다¹⁹⁾.

알레르기 면역 이상반응에는 기관지 천식이나 두드러기, 알레르기 비염, 아토피 피부염, 아나필락시 같은 IgE에 의해 매개되는 즉시형 과민반응(IgE-mediated acute reaction)인 제1형 반응을 비롯하여 항체 의존형(antibody-dependent reactio)의 제2형 반응, 면역복합체(immune complex reaction)에 의한 제3형 반응 및 세포매개 지연반응(cell-mediated delayed type reaction)인 제4형 반응으로 나누어지며, 이들 중 제1형 반응이 가장 많이 알려진 알레르기 면역반응으로 알레르겐에 노출되어 Th2 세포로부터 인식되면 B 세포에서 IgE가 만들어지면서 비만세포나 호염기구(basophil)에 붙어 새롭게 항원에 노출될 때 세포로부터 여러 가지 화학매개물질을 쏟아내면서 일어나게 된다²⁰⁾. 다양한 알레르기 질환 중 천식은 각종 세포, 특히 비만세포, 호중구, T 세포가 작용하는

기도의 만성 염증성 질환으로, 기도 염증으로 인해 천명, 숨참, 가슴 답답함, 기침 등의 증상이 반복적으로 일어난다²¹⁾. 알레르기성 천식의 면역학적 기전은 IgE-매개성 기전으로 helper T 세포의 관여와 Th1/Th2 사이토카인의 불균형이 병태생리에 기여하는 것으로 보고 있다¹⁶⁾. 여기에서 Th2 세포로부터 분비되는 IL-4는 CD4 T 세포의 Th2 세포로의 분화를 유도하고 B 세포 분화를 통해 IgE로의 class swiching을 유도한다²⁾. IL-4는 naive T 세포를 Th2 세포로의 분화를 유도하는 사이토카인으로써 활성화된 T 세포와 B 세포의 성장 자극 및 B 세포의 형질세포 분화를 통해 IgE 생성을 유도하고, 자연살해세포(natural killer cell), 비만세포, 호중구 및 호산구 등으로부터 분비되어 알레르기성 면역반응을 일으키게 된다. 또한 IL-4는 후기 면역반응에서 호산구나 중성구 등의 염증세포를 조직 내로 유입시키며 독성 효소나 사이토카인 분비를 통해 조직에 해를 주게 되고, 점액이나 단백질, 세포들의 증가에 따른 기관지 협착, 기저막 비후, 부종 및 기관지 평활근 비대 등을 유발하게 된다^{22,23)}. 본 연구에서 식방풍의 물추출물은 난알부민 감작으로 천식이 유도된 마우스에서 Th2 세포로부터 분비되는 IL-4의 증가를 현저히 감소시켰으며, 호산구, 비만세포 활성화를 유도하는 난알부민 특이-IgE의 생성을 억제함으로써 천식에서의 알레르기성 면역반응을 조절하는 것으로 나타났다. 또한 천식 마우스의 폐 조직에서 염증세포의 침윤을 막고 기관지, 세기관지, 폐포낭 등의 구조적 손상을 억제함으로써 천식을 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.

한편, Th1에서 분비되는 IFN- γ 는 Th2 세포들의 분화를 억제하며 IL-4에 의한 IgE 생성을 방해함으로써 알레르기 반응을 줄이는 것으로 알려져 있고, 또한 알레르기 염증반응에도 관여하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 또한 IFN- γ 는 기도에 영향을 미쳐 천식 발생에 관여하는 것으로 생각되기도 하며 최근에는 IFN- γ 가 Th1 세포 반응을 통해 알레르기 반응을 약화시키기도 하지만 강화시키기도 하는 것으로 보고되고 있다²⁾. 본 연구에서 식방풍의 물추출물은 난알부민 유도 천식 마우스에서 Th2 사이토카인인 IL-4의 분비는 효과적으로 억제시키나 IFN- γ 에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 이는 식방풍 물추출물이 천식의 알레르기 면역반응에 있어서 Th1/Th2 길항작용을 통한 면역조절작용으로 알러지성 염증을 억제하지는 않음을 의미한다. 그러나 식방풍 물추출물의 Th1/Th2 항상성 조절조절작용에 대해서는 향후 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

한편, 천식과 같은 호흡기 질환에서는 기도의 염증과 더불어 호산구, 비만세포, T 세포 뿐 아니라 대식세포, 호중구, 기도 상피세포(airway epithelial cell) 등 다양한 염증성 면역세포들이 관여하며 실제 천식에서의 알레르기 염증반응에 의한 기도의 구조적 변형(airway remodeling)으로 폐 기능의 지속적인 이상소견이 초래되는 것으로 보고되고 있다²⁵⁾. 본 연구에서 식방풍의 물 추출물은 알레르기성 천식이 유도된 마우스의 폐 조직에서 기관지 상피세포(층)의 손상과 폐 조직 내 기관지, 세기관지, 폐포낭, 정맥 및 동맥 등의 구조적 손상을 억제시켰으며, 각 종 염증세포 침윤을 막음으로써 폐 조직에서의 염증반응을 막아주는 것으로 나타났다. 이는 식방풍의 물 추출물이 천식에서와 같은 알레르기성 면역반응에 따른 다양한 알레르기 염증물질의 생성과 분비를 막음으로써 폐 조

직을 보호할 수 있음을 의미한다.

결론적으로 식방풍의 물 추출물은 난알부민 감작으로 천식이 유도된 마우스에서 혈청 내 난알부민 특이-IgE와 Th2 사이토카인인 IL-4의 분비를 감소시키고, 폐 조직에서의 염증 세포 침윤 및 구조적 손상을 막음으로써 알레르기성 천식과 같은 호흡기 질환 치료에 효과적인 한약으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

결론

본 연구는 난알부민 감작으로 알레르기성 천식이 유발된 마우스에서 식방풍 물추출물의 알레르기 면역반응 조절효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 식방풍의 물추출물은 난알부민 유도 천식 마우스에서 혈청 내 난알부민-특이 IgE의 분비를 유의적으로 감소시켰다.
2. 식방풍의 물추출물은 난알부민 유도 천식 마우스에서 혈청 내 Th2 사이토카인인 IL-4의 분비를 유의적으로 감소시켰다.
3. 식방풍의 물추출물은 난알부민 유도 천식 마우스의 폐 조직에서 기관지 및 혈관의 구조적 손상을 막고, 염증세포 침윤을 억제시킴으로써 염증반응을 억제하였다.

본 연구결과로부터 식방풍의 물추출물은 알레르기 면역반응 매개물질들의 분비를 감소시키고 폐 조직 내 염증반응을 억제함으로써 기관지 천식을 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 식품의약품안전청 한약재품질표준화연구사업의 연구비 지원(12172한약표989-2202)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. The Korean Association of Internal Medicine. Disease of immunesystem, Harrison's Principles of Internal Medicine 13th ed (2). Seoul : Jeongdam, 1997 : 1663-79.
2. Park YC, Lim JD, Park YK, Yoon MS, Lee SD. Review : Clinical application and efficacy of herbal medicines by modulating cytokines in atopic dermatitis-induced animal model. Kor J Herbology. 2012 ; 27(4) : 33-44.
3. Kang SY, Hong SU, Park YK. Effects of KOB, a polyherbal medicine for allergic rhinitis and its main herb, Astragali Radix on allergic responses in OVA-induced Allergic rhinitis mice. Kor J Herbology.

2012 ; 27(4) : 1-7.

4. Korea Food & Drug Administration. The Korean Herbal Pharmacopoeia. Seoul : Korea Food & Drug Administration, 2012 : 229.
5. Korea Food & Drug Administration. Search for herb medicine data base. Retrieved Oct. 1, 2013, from, <http://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do?nMenuCode=7&code=KHP-903&includeUrl=/herbmed/view.jsp>.
6. Kim KN, Choi MJ, Lee YH, Cho SH. The Protective and Recovery Effects of Peucedanum Japonicum Thunberg for Vascular Dementia. J Oriental Neuropsychiatry. 2013 ; 24(1) : 123-30.
7. Moon YH, Baik CS, Ko ST. Effects of Peucedani Japonici Radix Extract on the Blood Pressure in the Rabbits. J Pharm Res CS Univ. 1983 ; 5 : 21-9.
8. Kim JJ, Moon JS, Chung JH. A Morphological Study on the Elastic Fibers of the Artery Wall of Rats by High-Fat Diet and Peucedanum Japonicum Thunberg Extract Administration. Med J CS Univ. 1985 ; 10(1) : 137-50.
9. Morioka T, Suzui M, Nabandith V, Inamine M, Aniya Y, Nakayama T, Ichiba T, Mori H, Yoshimi N. The modifying effect of Peucedanum japonicum, a herb in the Ryukyu Islands, on azoxymethane-induced colon preneoplastic lesions in male F344 rats. Cancer Lett. 2004 ; 205(2) : 133-41.
10. Okabe T, Toda T, Nukitragansan N, Inafuku M, Iwasaki H, Oku H. Peucedanum japonicum Thunb inhibits high-fat diet induced obesity in mice. Phytother Res. 2011 ; 25(6) : 870-7.
11. Hisamoto M, Kikuzaki H, Ohigashi H, Nakatani N. Antioxidant compounds from the leaves of Peucedanum japonicum thunb. J Agric Food Chem. 2003 ; 51(18) : 5255-61.
12. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. J Exp Med. 2001 ; 194(10) : 1541-7.
13. Kim HJ, Hwang SY, Mok JY, Hwang BS, Jeong SI, Jang SI. Gagam-Gongjin-dan Extract Attenuates Immune Responses to Ovalbumin in Balb/c Mice. Kor J Herbology. 2009 ; 24(4) : 127-35.
14. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol. 1986 ; 136(7) : 2348-57.
15. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of

- Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production, *J Clin Invest.* 1991 ; 88(1) : 346-50.
16. Kang SY, Jung JK, Lee SK, Lee SH, Park YK, Effects of the ethanol extract of *Codonopsis Pilosulae Radix* on ovalbumin-induced allergic responses in mice. *Kor J Herbology.* 2013 ; 28(2) : 9-15.
 17. Kralovec JA, Power MR, Liu F, Maydanski E, Ewart HS, Watson LV, Barrow CJ, Lin TJ. An aqueous *Chlorella* extract inhibits IL-5 production by mast cells in vitro and reduces ovalbumin-induced eosinophil infiltration in the airway in mice in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2005 ; 5(4) : 689-98.
 18. Lee KJ, Kim BK, Kil KJ, Suppressive effects of *Morus alba* Linne Root Bark (MRAL) on activation of MC/9 mast cells. *Kor J Herbology.* 2013 ; 28(1) : 33-42.
 19. Kim WK, Regulation and Function of Th17 Cells, *J Asthma Allergy Clin Immunol.* 2011 ; 31(1) : 1-8.
 20. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol.* 2002 ; 2(10) : 773-86.
 21. Lee CM, Chang JH, Moon DO, Choi YH, Choi IW, Park YM, Kim GY. Lycopene suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 ; 374 : 248-52.
 22. Jung JK, Park YK, Effects of *Saposhnikovia Radix* on allergic responses in OVA-induced Allergic rhinitis mice. *Kor J Herbology.* 2012 ; 27(5) : 85-91.
 23. Ahn KM, Role of Mast Cells in Allergic Inflammation and Innate Immunity. *Korean J Pediatr.* 2004 ; 47(11) : 1137-41.
 24. Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4+ T lymphocytes acquired in response to mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol.* 1993 ; 151(1) : 518-25.
 25. Koh YY. Pathophysiology of asthma. *Pediatr Allergy Respir Dis.* 2000 ; 10(4) : 255-62.