

백모근 추출물의 T helper 2 세포 분화 조절 효과

김복규^{1,2#}, 임종순¹, 길기정^{2*}

1 : 대전대학교 한의과대학, 2 : 중부대학교 한방제약과학과

Effects of *Imperatae Rhizoma* Extract on T helper 2 cell differentiation

Bok-Kyu Kim^{1,2#}, Jong-Soon Lim¹, Ki-Jung Kil^{2*}

1 : Department of Oriental Medicine, Deajeon University,
2 : Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University

ABSTRACT

Objectives : The aims of this study were to exploring the therapeutic effect of *Imperatae Rhizoma* Extract(IRE) on Asthma.

Methods : To investigate biological modulation activities of IRE, we conducted the cell-based assay whether IRE could regulate T helper 2 cells activity with EL4 T cells and mouse splenocytes, and followed animal study to conform the efficacy of their therapeutic potential on OVA-induced asthmatic mouse.

Results : In cell study, IRE suppress the nuclear translocation of GATA binding protein-3 protein in phorbol 12-myristate 13-acetate/Ionomycin-stimulated EL4 T cells and Interleukine(IL)-4, IL-5 and IL-13 production in splenocytes at concentration dependent manner. In animal study, IRE-treated groups both 100mg/ml and 200mg/ml improve airway hypersensitivity reaction(AHR) response to methacholine about 30% and 40% with positive control group. Peritoneal blood analysis reveal that eosinophil number and ovalbumin-specific IgE is reduced by IRE treatment. Cell number of eosinophil is also reduced in bronchoalveolar lavage of IRE group like to peritoneal cell and real time-polymerase chain reaction data show that expression levels of IL-4, IL-5 and IL-13 were down regulated in lung tissue. Finally, histological analysis indicate that IRE protect the bronchial tissue damages through the accumulation of inflammatory cells and collagen, and these effect may be cause by interfering Th2 cells activity.

Conclusions : Our data represent that IRE potentiates therapeutic activities to the allergic diseases such as asthma by regulating Th2 cells differentiation.

Key words : *Imperatae Rhizoma* Extract, Th2 cells, Immune modulation activity, Asthma

서론

천식은 기도 과민증과 가역적인 호흡기계 반응을 특징으로 하는 가장 흔한 만성염증성 질환으로, 전 세계적으로 환자의 수가 급격히 증가하고 있으며, 특히 소아 청소년에서 정도가 심한 것으로 알려졌다¹⁻³. 천식의 발생 원인은 환경적 요인과 유전적 요인이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려졌으며⁴, 알레르기, 감염, 스트레스에 대한 심인성 생리반응, 공기감염 등과 같은 원인이 제시되고 있으나 아직은 알레르기

성 질환으로 받아들여지고 있다⁵. 천식의 임상적 증상은 발작적인 호흡 곤란, 기도 염증, 기도 내 호산구 증가, 점액 과분비를 동반한 점액세포의 과증식 등을 포함하고 있다⁶⁻⁸.

The Global Initiative for Asthma(GINA) program에 따르면 세계적으로 3억 명 정도가 천식을 앓고 있고, 최근 15~20년 사이에 약 1억 명 정도가 새로 발생한 것으로 추정되며, 우리나라의 경우 임상적으로 진단된 천식 비율은 3.9%에 이르며 인구 100,000명당 사망률도 1992년의 12.9명에서

*Corresponding author : Ki-Jung Kil, Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University
· Tel : +82-41-750-6225 · FAX : +82-41-750-6174 · E-mail : kildosa@joongbu.ac.kr

#First author : Bok-Kyu Kim, Department of Herbal pharmaceutical Science, Joongbu University

· Tel : +82-42-280-2646 · FAX : +82-42-280-2644 · E-mail : qhrrb79@gmail.com

· Received : 13 October 2014 · Revised : 18 November 2014 · Accepted : 20 November 2014

2002년에는 22.6명으로 증가하였다^{9,10}.

천식의 면역학적 특징은 T helper 1(Th1) 세포와 T helper 2(Th2) 세포 간의 불균형으로 인해 유발되며, 특히 Th2 세포의 면역반응이 두드러지게 작용한다¹¹. 원시 T 세포에서 Th2 세포로의 분화는 GATA-binding protein-3(GATA-3), Nuclear factor of activated T cell (NF-AT) 등의 전사인자와 Interleukin(IL)-4 등의 사이토카인에 의해 조절되며, 그 중 GATA-3가 Th2 세포로의 분화를 촉진하는 핵심적인 전사조절 인자이다¹².

천식 발병을 요약하면, 인체로 유입된 알레르겐을 항원 제시 세포(antigen presenting cell)가 인지하여 원시 T 세포에 전달한다. 항원을 제공받은 원시 T 세포는 Th2 세포로 분화하며 IL-4, IL-5, IL-13 등을 분비하여 기도 염증을 유발하고, 다양한 면역 세포를 자극하여 IgE 및 염증매개 물질들이 분비됨으로써 기도과민성 과민반응이 유발된다^{13,14}. 그러므로 한방에서 천식의 치료는 Th2 세포의 기능 억제를 중심으로 연구가 진행되고 있다¹⁵.

백모근(*Imperatae Rhizoma*)은 벼과 (Gramineae)에 속한 다년생 본초인 띠(*I. cylindrica* var. *koenigii*)의 가는 뿌리 및 비늘 모양의 잎을 제거한 뿌리 줄기를 말한다. 맛은 달고, 독이 없으며, 혈을 식히고, 지혈하며, 해열하고, 이뇨하는 효능이 있고, 토혈, 폐열 천식, 위열구토 등을 치료한다¹⁶. 백모근에 대한 기존연구로는 모근의 지혈효과¹⁷, 모근의 止血作用과 摘出壯觀¹⁸ 등과 같이 제한적인 보고가 되어 있으나, 알레르기 질환에서 Th2 세포와 관련된 연구는 전무한 상황이다.

그러므로 본 연구에서는 세포 실험을 통해 백모근 추출물이 Th2 세포의 활성을 억제하는 것을 확인하였고, Th2 세포에 의해 매개되는 대표적인 알레르기 질환인 천식의 치료 효과를 동물 실험을 통해 체계적으로 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

본 실험에 사용된 난 알부민(chicken egg ovalbumin; Grade V)의 모든 기초 시약은 Sigma사 (St Louise, USA)에서 구매하여 사용하였다. Diff-Quik 용액은 Baxter Healthcare사(Florida, USA), 우 태아혈청(Fetal bovine serum)은 Hyclone사(Logan, USA), anti-CD3 항체는 Pharmingen사(Torreyana, USA), GATA-3, YY-1 및 Horse radish peroxidase-conjugated Ig 항체는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, USA), 사이토카인에 대한 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 BioSource사(California, USA), ovalbumin-IgE ELISA kit는 MD bioproducts사(Zurich, Switzerland), PVDF membrane은 GE healthcare사(Buckinghamshire, UK), RNazol^B solution은 Tel-Test사(Texas, USA), ECL solution은 Intron Biotech 사(Teajon, KOREA)에서 구매하여 사용하였다.

2) 동물

실험에 사용한 암컷 6주령의 Balb/c 생쥐 (18~20g)는 한 일실험동물센터 (Korea)에서 공급받아 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12시간의 명암 주기(light-dark cycle) 환경에서 사육하며 사용하였다.

3) 약재 및 추출

백모근(*Imperatae Rhizoma*)은 금산약초시장에서 구매하여 중부대학교 한방제약과학과에서 감정한 후 정선하여 사용하였다. 성분의 추출은 초록한 백모근 50g에 증류수 500mL을 가한 뒤 3시간 동안 열탕 추출하였다. 추출액은 감압증류장치 (rotary vaccum evaporator)와 동결건조기 (freeze dryer)를 이용하여 백모근 추출물(*Imperatae Rhizoma* Extract, IRE) 8.3g을 얻은 뒤 -80℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

마우스 유래 T 세포주인 EL4 cell은 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM)에서 배양하며 실험에 사용하였다. 비장 세포는 Balb/C 마우스의 비장을 적출하여 100 mesh로 조직을 파쇄한 뒤 ACK 용액(NH₄Cl 8.29g, KHCO₃ 1g, Na₂-EDTA 0.0367g in 1L of distilled water)으로 적혈구를 제거하였다. 원심 분리하여 수득한 비장 세포는 D-PBS로 2회 세척한 뒤 실험에 사용하였다.

2) 핵 단백질 (Nuclear protein)추출 및 Western blot

EL4 cell은 6 well plate에 4×10⁵ cells/mL로 분주하고 24시간 뒤 IRE를 농도별로 전처리하였다. 1시간 후에 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)(50ng/mL)와 ionomycin(0.5 μM)으로 자극하고 6시간 후에 Nuclear extract : Nuclear extract kit (Active motif)를 사용하여 핵단백질을 분리하였다. 분리한 5μg의 핵단백질은 10% SDS page gel로 전개한 뒤 PVDF membrane에 단백질을 옮겨 5% skim milk로 blocking하고 GATA-3 항체와 반응시킨 뒤 HRP가 붙어 있는 2차 항체와 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 ECL 반응액을 이용하여 X-ray 필름에 감광시켰다.

3) 비장세포에서 Th2 사이토카인의 측정

분리한 비장 세포는 anti-CD3 항체로 coating된 48 well plate에 1×10⁶ cells/well로 분주한 뒤 IRE를 첨가한 뒤 24시간 이상 배양한 뒤 상층액 내의 IL-4, IL-5 및 IL-13의 양을 ELISA 방법으로 측정하였다.

4) 난황 단백질에 의한 기관지 천식 모델

500μg/mL의 난 알부민(OVA(Chicken egg ovalbumin; Grade V))은 phosphate-buffered saline(PBS)에 녹여 1%(w/v) Aluminum potassium sulfate(Alum)와 혼합하였다. 이 혼합물을 10N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 1,800rpm에서 5분 동안 원심 분리하였다. 이 OVA/alum 침전물(pellet)은 증류수에 50μg/mL의 농도로 재 현탁 하였다. Balb/C의 전

신 감작은 100 μ g을 0일과 7일째 복강 내 주사하였으며, 기도 감작은 50 μ g을 사용하여 4일째와 14일째 실시하였다. 3주차부터 1% OVA를 nebulizer를 사용하여 3주간 주 3회 비강 흡입시켰다. IRE의 투여는 4주째부터 2주간 경구 투여하였고, 대조 약물로는 Cyclosporine(CsA)을 사용하였다. 전 과정을 요약하면 다음과 같다(Fig. 1).

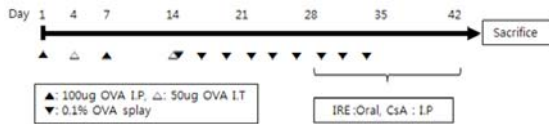


Fig. 1. Schematic representation of total experiment.

5) 기도저항 수치 측정

기도저항 수치는 측정 24시간 전에 2% OVA 흡입시킨 뒤 전신 체적변동기록 장비(Whole body plethysmographs, Buxco research system, Wilmington, USA)로 측정하였다. 즉, 천식이 유발된 마우스는 메타콜린 (methacholine)을 0, 6.25, 12.5, 25, 50mg/mL의 농도로 흡입시켜 기도 협착을 유발한 뒤 IRE의 투여로 개선된 기도 과민반응의 변화를 조사하였다. Penh 값은 Biosystem XA software (Buxco research system, Wilmington, USA)를 이용하여 아래 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Penh} = \text{Pause} \times \text{PIF} / \text{PEF}, \text{Pause} = (\text{Te} - \text{Tr}) / \text{Tr}$$

(PIF : peak inspiratory flow, PEF : peak expiratory flow, Te : expiratory time, Tr : relaxation time)

6) 혈액학적 검사

심장 천자법으로 채혈한 혈액은 바이오톡스텍(주)에 의뢰하여 백혈구 내 존재하는 호중구, 호산구, 호염구, 림프구 및 단핵구의 세포 수를 자동 혈구측정기(Minos-ST)로 측정하였다.

7) 기관지 폐포 세척액 (Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)의 분석

실험 종료 후 생쥐의 목 부분을 절개하여 기관지에 10% FBS/DMEM 배양액 1mL을 넣은 주사기를 기관지에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후 3회 순환시킨 뒤 회수하고 적혈구를 제거한 뒤 기관지 폐포 세척액 세포(BALF)를 얻었다. 폐포 세척액 세포의 호산구는 Cytospin에서 slide 위에 고정과 건조하여 Diff-Quik 용액 (Baxter Healthcare, Miami, USA)을 이용하여 염색하였다. 호산구의 수는 세포의 모양과 염색 특징을 기준으로 광학현미경(Nickon, Japan) 하에서 측정하였다.

8) 폐 조직에서 mRNA 유전자 발현 측정

폐 조직에서 RNA의 추출은 RNAzol^B를 사용하여 추출하였다. 추출한 RNA는 MMLV를 사용하여 cDNA를 합성하였으며, 유전자들의 증폭은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 사용하였으며, 증폭된 유전자의 양은 $y = x(1+e)^n$, (x = starting quantity,

y = yield, n = number of cycles, e = efficiency)의 공식에 따라 RQ (relative quantitative) 값을 계산하였다. Internal standard는 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)를 사용하였으며 실험에 사용된 oligonucleotide의 염기배열은 Table 1과 같다.

Table 1. The primers were used in the real-time PCR.

Gene	Primer	Sequence
mG3PDH	Left Primer	5'-GGGTGTGAACACGAGAAAT-3'
	Right Primer	5'-ACTGTGGTCATGAGCCCTTC-3'
mIL-4	Left Primer	5'-CCTCACAGCAACGAAGAACA-3'
	Right Primer	5'-TGCAGTCCATGAGAACAACACT-3'
mIL-13	Left Primer	5'-ATGCCCAACAAAGCAGAGAC-3'
	Right Primer	5'-TGAGAGAACCAGGGAGCTGT-3'
mCCR3	Left Primer	5'-CCCGAACTGTGACTTTTGCT-3'
	Right Primer	5'-CCTCTGGATAGCGAGGACTG-3'

9) 조직병리검사

적출한 폐는 10% formaldehyde 용액에 고정하였다. 고정된 조직은 바이오톡스텍(주)에 Hematoxylin & Eosin과 Masson-Trichrome 염색을 의뢰하였다.

10) 통계처리

실험으로부터 얻은 결과는 Mean \pm SE로 기록하였고, 유의성 검정은 Student's T-test를 이용하였다.

결 과

1. IRE가 Th2 세포 활성화에 미치는 영향

Th2 계열의 사이토카인은 B 세포를 활성화해 다양한 알레르기성 질환을 유발한다¹⁹⁾. 따라서 백모근 추출물이 Th2 세포의 분화를 유도하는 핵심 인자인 GATA-3의 translocation에 미치는 영향을 조사하였다. 즉, IRE를 처리한 EL4 세포는 PMA/Ionomycin으로 자극하여 6시간 뒤 핵으로 이동한 GATA-3 양을 Western blot을 이용하여 측정된 결과, IRE는 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 2A).

IRE가 GATA-3의 translocation을 억제하였으므로 IRE가 Th2 계열의 사이토카인 발현에 미치는 효과를 살펴보았다. 대표적 Th2 계열의 사이토카인인 IL-4는 정상군에서 0.05 \pm 0.68pg/mL, 대조군은 79.79 \pm 6.91pg/mL이었고, IRE 50, 100, 200 μ g/mL 처리군에서는 각각 64.41 \pm 10.01pg/mL, 52.87 \pm 10.72pg/mL, 36.97 \pm 2.53pg/mL 수준으로 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 2B). IL-5는 정상군에서 1.02 \pm 0.26pg/mL, 대조군은 13.43 \pm 0.57pg/mL이었으며, IRE 50, 100, 200 μ g/mL 처리군에서는 각각 8.88 \pm 0.39 pg/mL, 9.98 \pm 2.12pg/mL, 6.55 \pm 1.80pg/mL 수준으로 대조군과 비교하여 감소하였다(Fig. 2C). IL-13 역시 정상군에서 3.97 \pm 2.85 pg/mL, 대조군은 520.63 \pm 9.21pg/mL이었으며 IRE 50, 100, 200 μ g/mL 처리군에서는 각각 445.74 \pm 40.41pg/mL, 391.52 \pm 43.81pg/mL, 229.52 \pm 13.97pg/mL로 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2D).

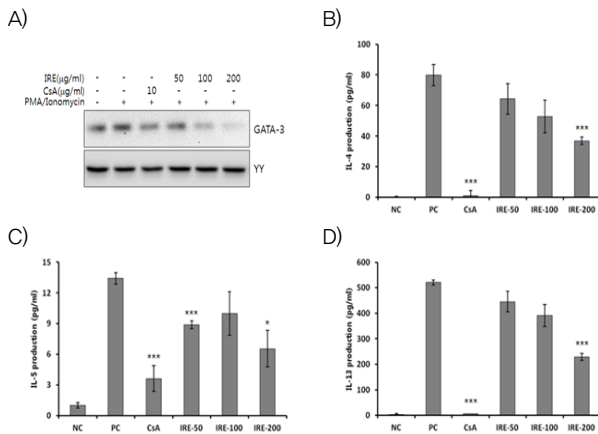


Fig. 2. IRE regulates T cells activation and cytokines expression. IRE inhibits GATA-3 nuclear translocation in EL4 mouse T cell during cell activation(A) and TCR-stimulated IL-4(B), IL-5(C) and IL-13(D) production in splenocytes. The result was represented by Mean \pm S.E(N=3). Statistically significant was conformed with Student's *t*-test. (*p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

2. 백모근 추출물에 의한 천식 치료 효과

Th2 세포 활성의 이상으로 매개되는 천식은 기도 염증 반응을 통한 기도 과민성을 동반하는 병태로 호흡량을 통해 측정 이러한 기도 과민성의 지표로 사용한다^{1,3,20}. 그러므로 IRE에 의한 천식 치료 효과는 OVA에 의해 유도된 천식 모델을 사용하여 측정하였다. 실험 종료 후 각 실험군에서 methacholine을 0, 6.25mg/mL, 12.5mg/mL, 25mg/mL, 50mg/mL의 농도별로 노출해 기도저항을 나타내는 Penh(Enhanced pause) 값을 측정하였다. OVA에 노출되지 않은 정상군은 methacholine의 노출에 따른 호흡량의 차이가 관찰되지 않았으며, IRE 투여군은 100mg/kg 및 200mg/kg 농도 모두에서 대조군과 비교하여 모두 현저히 감소하였다(Fig. 3).

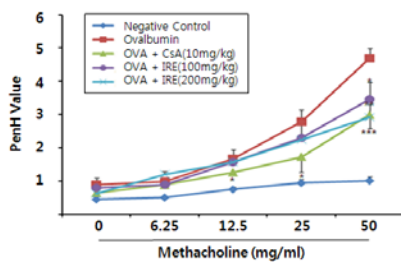


Fig. 3. IRE suppresses methacholine-induced airway hypersensitivity reaction. Established asthmatic mouse was administered 100 and 200mg/kg/day of IRE for 4 weeks, and then AHR induced with various concentration of methacholine. AHR was measured as described in Material and Methods. The result was represented by Mean \pm SE(N=4). Statistically significant was conformed with Student's *t*-test. (*p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001)

3. 말초 혈액 내 면역 세포 분석 및 IgE 분석

만성 천식 환자는 말초 혈액 내 과립구의 수가 증가한다²¹. 그러므로 IRE 투여군 내의 면역 세포를 분석한 결과, 백혈구 내의 단핵구와 호염구 호중구의 비율은 대조군과 비교하여 모든 실험군에서 크게 차이가 나타나지 않았다. 그러나 호산구는 정상군과 비교하여 대조군에서 15배 이상 증가하였고,

또한 IRE 투여군은 대조군과 비교하여 100mg/kg 투여군 및 200mg/kg 투여군 모두에서 감소하였다(Fig. 4A).

IRE 투여로 변화한 혈청 내 OVA 특이적 IgE 수준은 정상군은 25.6 \pm 12.3ng/mL, 대조군은 3191.5 \pm 303.1ng/mL로 정상군과 비교하여 120배 이상 증가하였다. 그리고 CsA 10mg/kg 군에서는 1649.4 \pm 138.5ng/mL로 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소되었고, IRE 100mg/kg과 IRE 200mg/kg 투여군도 각각 2312.9 \pm 197.21ng/mL, 2320.1 \pm 172.1ng/mL로 대조군과 비교하여 감소되었다(Fig. 4B).

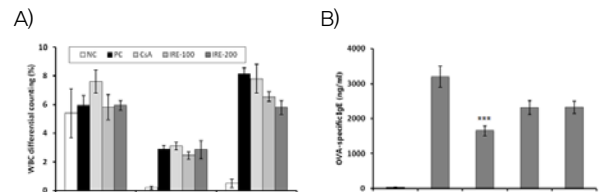


Fig. 4. IRE modulates the increment of eosinophile(A) and OVA-specific IgE production(B) in peripheral blood. The result was represented by Mean \pm S.E(N=4), and Statistically significant was conformed with Student's *t*-test. (*p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001)

4. 폐 조직에 침윤된 호산구 및 관련 유전자 분석

말초 혈액에서 IRE가 호산구의 수를 감소시키는 활성과 함께 폐 조직 내로의 호산구의 침윤에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 정상군은 2.5 \pm 0.95개, 대조군은 43.25 \pm 8.05개로 약 17배 이상 증가하였고, 대조군과 비교하여 CsA 10mg/kg과 IRE 100mg/kg 투여군에서는 각각 27 \pm 0.81개와 27 \pm 1.78개로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5A). 또한, 폐 조직 내에서의 CCR3, IL-4 및 IL-13 유전자의 발현을 분석한 결과, CCR3의 발현량은 대조군에 비교하여 IRE 100mg/kg과 200mg/kg 투여군에서 각각 약 35% 및 46% 감소하였다(Fig. 5B). IL-4의 경우 각각 약 25% 및 52% 감소하였고(Fig. 5C), IL-13은 각각 약 50% 및 48% 감소하였다(Fig. 5D).

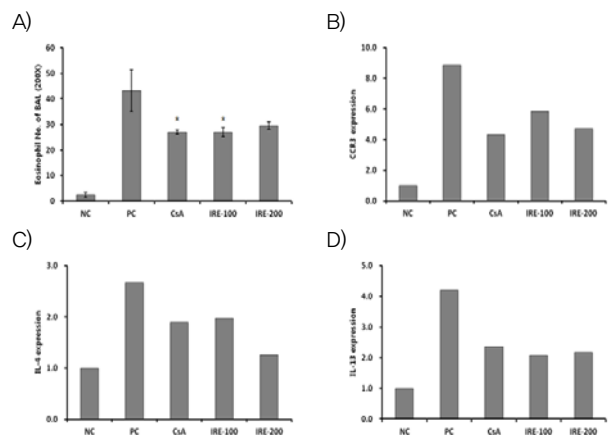


Fig. 5. IRE suppresses eosinophile infiltration into the bronchoalveolar lavage, and down regulates Th2-related cytokine expression in lung tissue(B, C, and D). The result was represented by Mean \pm SE(N = 4), and Statistically significant was conformed with Student's *t*-test. (*p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001)

5. 폐 조직의 조직학적 검사

최종적으로 IRE의 투여에 의한 기도 조직 보호 효과를 H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색과 M-T (Masson trichrome) 염색으로 확인하였다. H&E 염색에서 정상군과 비교하여 대조군에서는 기도가 현저하게 협착된 것을 확인하였고 CsA군에서는 기도 협착 증상이 회복된 것이 확인되었다. 또한, 예상했던 것과 마찬가지로 IRE 투여군에서도 기도 협착 증상이 호전되어 있는 것을 확인하였다. 기도 주변에 침착된 콜라젠을 M-T 염색을 통해 분석한 결과 대조군과 비교하여 CsA군의 기도 주변에서는 거의 관찰되지 않았으나, IRE 100mg/kg과 IRE 200mg/kg 투여군에서는 기도 협착 증상이 거의 없었음에도 콜라젠이 관찰되었다(Fig. 6).

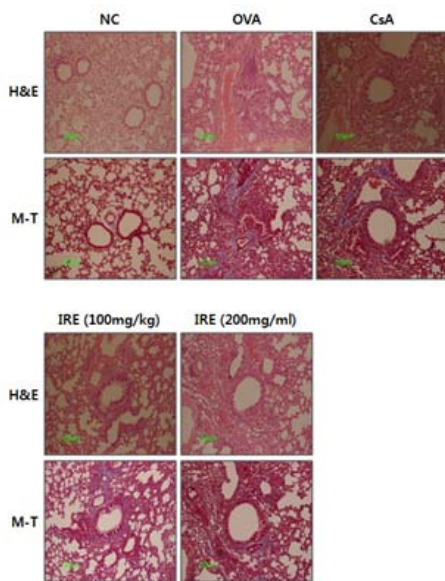


Fig. 6. IRE protect airway obstruction in OVA-induced airway hypersensitivity mouse. Established asthmatic mouse were orally received IRE by one time a day for 2 weeks, and histological analysis were assessed with H&E and Masson-Trichrome staining. Scale bar represents 50µm.

고찰

천식은 기도 점막에 존재하는 다양한 면역 세포가 외부 항원에 과다하게 반응하여 분비하는 염증 매개 인자로 인해 조직의 과한 염증 반응이 진행되는 면역질환으로 알려져 있다²²⁾. 이러한 염증 반응은 대표적으로 Th2 세포와 호산구가 작용하게 된다. Th2 세포는 IL-4, IL-5 및 IL-13과 같은 대표적인 사이토카인을 분비하여 초기 염증 반응을 촉발하게 되는데, IL-4는 Th2 세포의 증식을 촉진함과 동시에 B 세포를 자극하며 isotype switching을 유도하게 된다²³⁾. IL-5는 호산구의 활성화를 통해 염증 반응을 증폭하는 역할을 하며²⁴⁾, IL-13은 IL-4와 마찬가지로 B 세포를 자극하게 된다^{14,25,26)}.

그러므로 본 실험에서는 백모근 추출물인 IRE가 가진 면역 조절 활성을 조사하기 위하여 Th2 세포의 활성을 중심으로 살펴보았다. 우선 Th2 세포 분화의 핵심 전사 조절 인자로 알려진 GATA-3 단백질의 핵 이동을 웨스턴 블롯을 통해 살펴본 결과 100µg/mL 및 200µg/mL의 농도에서 효과적으로

억제하는 것을 확인하였다. 또한, Th2 세포에 의한 알레르기성 염증 반응의 핵심 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13의 분비에 대한 영향을 알아보기 위해 마우스의 비장 세포를 사용하여 측정해 본 결과 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 데이터는 T 세포의 활성화 과정에서 IRE는 GATA-3 단백질의 핵 이동을 저해하여 Th2 세포의 분화를 억제한다는 것을 시사한다.

Th2 세포의 활성을 억제하는 세포 실험의 결과를 바탕으로, IRE가 Th2 세포에 의해 매개되는 대표 질환인 천식에 대해 실제 치료 효과를 보이는지 난황단백질에 의해 수립된 실험 동물 모델을 사용하여 조사하였다. 실험적 접근은 IRE 투여 후 기도 저항 값(PenH value), 말초 혈액, 폐포 세척액 및 폐 조직의 분석 등을 실시하였다.

Th2 세포에 의해 매개되는 천식은 염증 반응에 의한 기도 확장과 침윤된 점액 세포들에 의한 점액 과분비로 기도의 축소로 인해 호흡 곤란이 동반된다. 이러한 기도 과민 반응은 호흡량을 통해 측정할 수 있다^{13,20)}. 예상했던 것과 같이 각 실험군에 대한 기도 저항 수치(PenH) 값을 측정한 결과 12.5mg/ml의 methacholine 농도에서부터 호흡 개선 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 최대 methacholine 농도인 50mg/ml에서는 CsA 투여군과 200mg/mL의 IRE 투여군에서 약 40%, 25mg/mL의 IRE 투여군에서 약 30%의 호흡 개선 효과를 보였다. 말초 혈액의 분석에서는 호산구의 숫자가 IRE의 투여로 감소함과 난황 알부민 특이적 IgE의 양 역시 감소하는 것이 확인되었다. 기관지 폐포 세척액 내에서 호산구의 수를 측정해 본 결과 말초 혈액에서와 마찬가지로 IRE 투여로 감소하는 것을 확인하였으며, 폐 조직에서 염증 반응에 관여하는 케모카인 수용체인 CCR3와 Th2 세포의 대표적 사이토카인인 IL-4와 IL-13의 유전자 역시 IRE 투여로 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 *in vitro*의 실험과 동일한 결과를 보여주고 있다. 조직 검사 결과 중에서 H&E 염색 결과는 IRE의 투여로 기도 협착 증상을 회복시켰으나, M-T 염색의 결과는 IRE를 투여한 군에서도 회복된 기도 주변에 콜라젠 침착되어 있는 것을 보여준다. 이는 IRE가 Th2 세포의 분화와 활성을 조절하는 활성을 갖고 있기는 하지만 CsA에 비해 낮은 면역 억제 활성과 범위일 가능성 때문으로 판단된다.

이러한 결과를 종합하면 IRE는 천식의 발병 과정에서 염증 세포들의 기관지로 유입, 침윤을 억제하여 기도 폐쇄로 인한 기류 제한을 억제하여 천식 증상을 호전시키는 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 백모근 추출물(IRE)의 면역학적 조절 특성을 알아보기 위해 Th2 세포의 활성을 중심으로 조사하였다. 활성 분석은 세포 실험에서 Th2 세포 분화 조절 핵심인자와 중요 사이토카인 조절을 중심으로 실시하였다. 또한, *in vivo* 활성을 평가하기 위하여 OVA에 감작된 천식 모델을 사용하여 기도 저항 측정, 말초 혈액 분석, 폐포 세척액 분석 및 폐 조직의 조직검사를 통해 다음과 같은 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IRE는 PMA/Ionomycin에 의해 자극된 EL4 세포에서 Th2 세포의 핵 전사 조절 인자인 GATA-3 단백질의 nuclear translocation을 효과적으로 억제하였으며, 비장 세포를 anti-CD3로 자극한 뒤 배양하여 측정된 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13은 IRE 처리군에서 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소하였다.
2. 메타콜린에 의한 기도 저항 수치는 대조군과 비교하여 IRE 투여군 모든 농도에서 감소하였으며, 50mg/mL에서는 유의성 있게 감소하였다.
3. 말초 혈액에서 단핵구와 호염구의 비율은 크게 차이가 없었지만, 호산구의 비율은 유의성 있게 감소하였으며, 혈청 내 OVA 특이적 IgE 양은 대조군과 비교하여 IRE 투여군에서 유의성 있게 감소하였다.
4. 폐포 세척액에 존재하는 호산구의 양은 말초 혈액의 결과와 같이 IRE 투여군에서 유의성 있게 감소하였고, 폐 조직 내에서 발현된 CCR3, IL-4 및 IL-13의 유전자 발현 역시 IRE 투여군에서 감소하였다.
5. 폐 조직을 H&E 및 M-T 염색으로 조직학적 검사 결과는 IRE 투여군은 기도 폐쇄 증상을 호전시켰으나, 기도 주변의 콜라젠은 남아 있었다.

위와 같은 결과를 종합하면 백모근 추출물은 T 세포에서 GATA-3의 핵 이동을 억제하여 Th2 세포의 분화 및 활성을 억제하며, 천식 모델에 투여한 결과 기도 저항을 개선하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 말초 혈액에서 호산구와 Th2 계열의 사이토카인의 양을 감소시켰으며, 폐포 세척액에서도 호산구 양의 증가를 억제하였으며 폐 조직에서 염증성 케모카인 수용체(CCR3), IL-4 및 IL-13의 유전자 발현 역시 억제하여 기도 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 그러므로 본 실험을 통해 IRE는 천식과 같이 Th2 세포의 이상 활성화에 의해 매개되는 다양한 면역 질환의 치료제로 응용될 가능성을 확인하였다.

감사의 글

This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry for Health, Welfare & Family Affairs, Republic of Korea (A091121).

References

1. Sugita M, Kuribayashi K, Nakagomi T, Miyata S, Matsuyama T, Kitada O. Allergic bronchial asthma: airway inflammation and hyperresponsiveness. *Intern Med*. 2003 ; 42(8) : 636-43.
2. Jarvis D, Burney P. The epidemiology of allergic disease. *BMJ*. 1998 ; 316 : 607-10.
3. Kay AB. Allergy and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2001 ; 344 : 30-7.
4. Factor P. Gene therapy for asthma. *Molecular Therapy*. 2003 ; 7 : 148-52.
5. Cho EH, Seo YB, Roh SS. Effects of extract of herba polygalae japonica on inflammation cells of lung in asthma-induced mice by OVA exposure. *Kor J Herbology*. 2008 ; 23(2) : 87-97.
6. Adelroth E, Hargreave FE, Ramsdale EH. Do physicians need objective measurements to diagnose asthma? *Am Rev Respir Dis*. 1986 ; 134(4) : 704-7.
7. Kay AB. Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 1991 ; 87(5) : 893-910.
8. Palmerio EM, Hopp RJ, Biven RE, Bewtra AK, Nair NN, Townley RG. Probability of asthma based on methacholine challenge. *Chest*. 1992 ; 101(3) : 630-3.
9. Cho SH, Park HW, Rosenberg DM. The current status of asthma in Korea. *J Korean Med Sci*. 2006 ; 21(2) : 181-7.
10. Mehlhop PD, van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, Oettgen HC. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 ; 94(4) : 1344-9.
11. Bosse Y, Pare PD, Seow CY. Airway wall remodeling in asthma : from the epithelial layer to the adventitia. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008 ; 8(4) : 357-66.
12. Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'shea JJ, Frucht DM. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new player and new insights. *J Clin Immunol*. 2003 ; 23(3) : 147-61.
13. Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for Th2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and Th1-type (interleukin 2 and interferon γ) cytokine in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatics and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 ; 12(5) : 477-87.
14. 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(5677) : 1678-82.
15. Cui Y, Choi IS, Koh YI, Koh YA, Lee HC. Suppressive effect of dehydroepiandrosterone on the development of asthmatic reaction in BALB/c mice. *J Asthma Allergy Clin Immunol*. 2004 ; 24(1) : 116-26.
16. Kim CM, Shin MK, Ahn DK, Lee KS. (The)Encyclopedia of oriental herbal medicine, Seoul : Jungdam,

- 1999 : 1600-1.
17. Kim SK, Hong ND, Choi JH. Studies on hemostatic effects of *Imperatae Rhizoma*. Kor J Pharmacogn, 1984 ; 15(1) : 45.
 18. Choi JH, Hong ND, Rho YS, Kim SK. Studies on hemostatic activity and effects on isolated intestine of *imperatae rhizoma*. Kyunghee Pharma Sci, 1984 ; 12(1) : 49-55.
 19. Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leiden JM. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. Nature, 1996 ; 384(6608) : 474-8.
 20. Robinson DS, Ying S, Bentley AM, Meng Q, North J, Kay AB, Hamid Q. Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. J Allergy Clin Immunol, 1993 ; 92(3) : 397-403.
 21. Elena GR, Alejo C, Mario D. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. Nat Rev Immunol, 2007 ; 7(1) : 52-63.
 22. Schwartz DA, Thorne PS, Jagielo PJ, White GE, Bleuer SA, Frees KL. Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract. Am J Physiol, 1994 ; 267(5 Pt 1) : 609-17.
 23. DeKruyff RH, Turner T, Abrams JS, Palladino MA, Umetsu DT. Induction of human IgE synthesis by CD4⁺ T cell clones. Requirement for interleukin 4 and low molecular weight B cell growth factor. J Exp Med, 1989 ; 170(5) : 1477-93.
 24. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW. Th2 cytokines and asthma-The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. Respir Res, 2001 ; 2(2) : 71-9.
 25. Alison AH, Clare ML, Sarah JM, Daniel SF, Georgina X, Erin EM, Sorina G, Norma PG, Channing Y, Stuart HO, Craig G. A Critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. Science, 2004 ; 305(5691) : 1776-9.
 26. James JL, Dawn D, MiMi PM, Sergei IO, Michael PM, Katie RO, Cheryl P, Ralph P, Thanh N, Stephania AC, Elizabeth L, Dana C, Lisa R, Steven JA, Charles GI, Nancy AL. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. Science, 2004 ; 305(5691) : 1773-6.