

Original Article / 원저

## 甘草麻黃湯 추출물의 배합 비율에 따른 투여가 Ovalbumin으로 유발된 천식 생쥐에 미치는 영향

조소현<sup>1)</sup> · 조은희<sup>2)</sup> · 박민철<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과

<sup>2)</sup> 원광대학교 한의과대학 침구과

### The Effects of *Gamchomahwang-tang* extract According to the ratio of 2 compounds on the Ovalbumin-Induced Allergic Asthma in Mice

*So-Hyun Jo<sup>1)</sup> · Eun-Hee Jo<sup>2)</sup> · Min-Cheol Park<sup>1)</sup>*

<sup>1)</sup> Dep. of Oriental Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology, Wonkwang University

<sup>2)</sup> Dep. of Acupuncture and Moxibustion, Wonkwang University

#### Abstract

**Background and Objective :** Asthma is a chronic inflammatory disease at the mucosa and is associated with excess production of Th2 cytokine and eosinophil accumulation in lung. *Gamchomahwang-tang* extract(GME) is one of the well known prescription used in oriental medicine for treating asthma. This study was designed to compare the anti-asthmatic effect of GME according to the ratio of 2 compounds.

**Methods :** To examine the effects of GME on asthma, mice were sensitized with 100  $\mu$ g of OVA and 1 mg of aluminum potassium sulfate(Alum; Sigma) intraperitoneally on day 1 and 15. From day 22, mice were challenged on 3 consecutive days with 5% OVA. The anti-asthmatic effects of GME were evaluated by enhanced pause(Penh), bronchoalveolar lavage fluids (BALF), inflammatory cytokine production and genes expression, serum IgE production, and histological change in lung tissue. GME I consists of ES and GU in the proportion 2:1(300 mg/kg group), GMEII consist of ES and GU in the prpotion 4:1(300 mg/kg group).

**Results :** GME I, II generally inhibited lung inflammation, inflammatory cells infiltration and cytokine production and gene expression such as IL-4, IL-5 and IL-13 in BALF and serum IgE level. GMEII significantly reduced the cytokine production and gene expression such as IL-4, IL-5 and IL-13 in BALF and GME I decreased cytokine

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

production of IL-4, IL-13 in BALF and gene expression of IL-4, IL-5 in Lung. GMEII potently inhibited the development of Penh and also reduced the number of eosinophil during OVA-induced AHR(airway hyper-reactivity).

Overall the results show that GMEII has more effect on inhibiting production, gene expression of cytokine, serum IgE level and development of Penh than GME I. Consequently, GMEII might be more effective than GME I at inhibiting allergic asthma on the OVA-induced mice model.

**Conclusion :** These results indicate that GME has a deep inhibitory effects on airway inflammation and hyperresponsiveness in mice model of asthma and that suppression of IL-4, IL-5, IL-13 expression and decrease of IL-4, IL-5, IL-13 production in BALF might contribute this effect. Hence, the results indicate that GME might be useful herbal medicine of allergic asthma. As a result, GMEII might be superior to GME I in the aspect of anti-asthmatic effect on the OVA-induced mice model.

**Key words :** allergic asthma; ovalbumin, *Gancho mahwang-tang*, Ephedra sinica Stapf, Glycyrrhiza uralensis Fisch

## 1. 서 론

천식은 전 세계적으로 약 3억 명 정도의 환자가 있는 것으로 추정되는 흔한 질환으로 천식의 유병률은 지역에 따라 1-18%정도로 알려져 있다. 2011년 기준 국내 성인 천식 유병률은 3.1%로 지속적으로 증가추세이며<sup>1)</sup>, 2005년 천식으로 인한 사회적 비용이 약 4조에 이르는 등 사회적으로 상당한 문제가 되고 있는 실정이다<sup>2)</sup>.

임상적으로 반복적인 천명, 기침, 가슴 답답함, 호흡곤란을 특징으로 하는 천식은 현재까지 원인과 기전이 명확히 밝혀져 있지 않으나, 최근 연구에서 천식의 특징적인 병리 기전을 기도의 만성 염증에 의한 기류 장애와 기도 과민성으로 보고하였다<sup>3-5)</sup>.

기도과민성은 다양한 물질이나 자극에 대한 과도한 반응으로 기도가 좁아지는 것을 일컫으며, 이에 따라 다양한 정도의 기류제한이 발생하는 것을 말하는데, 기도 과민성과 기도 염증은 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 기도의 염증은 대개 제 2형 조력 T 세포 (T helper T cell, Th2)에 매개되어지는 즉시형 알러지성 반응의 일종으로 이해되며, 알레르겐에 의

해 활성화된 Th2 세포가 생산하는 Type 2 cytokine 인 IL-4, IL-5 및 IL-13 등의 분비를 통해 B세포의 특이 IgE 항체 생성을 유도하고, 호산구의 생성을 촉진시켜, 기관지 천식의 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다<sup>9)</sup>.

천식은 한의학에서 哮喘證의 범주에 해당하고, 哮喘證, 喘證, 痰飲의 범주로 간주하고 있다<sup>7)</sup>. 喘은 呼吸急促한 것, 哮는 喉中有痰聲響한 것을 말하며, 심하면 張口抬肩, 鼻翼煽動하거나 平臥할 수 없는 것을 특징으로 한다<sup>8)</sup>. 哮喘證은 크게 병인에 따른 虛實의 구분으로 나누어지며, 外感風寒, 痰濕內盛 등에 의한 實證과 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛등에 의한 虛證이 있다. 치법으로는 實證에는 祛風散寒, 宣肺定喘, 燥濕化痰, 降氣定喘등이, 虛證에는 養肺定喘, 納氣定喘등의 치료법이 제시되고 있다<sup>7)</sup>.

甘草麻黃湯은 《金匱要略》<sup>9)</sup>에 최초로 언급된 처방으로, 주로 喘息發作이나 喘息에 특히 상반신의 부종을 수반하는 자, 浮腫, 脈浮, 腹滿한 자에게 응용한다고 알려져 있다<sup>10)</sup>. 《藥徵》<sup>11)</sup>에서 甘草의 효능에 대해 “主治急迫也. 故治裏急急痛攣急 而旁治厥冷煩躁衝逆之等. 諸般拔迫之毒也.”라고 언급하였고, 麻黃은 그 효능을 “主治喘咳水氣也. 旁治惡風, 惡寒, 無汗, 身疼, 骨節痛, 一身黃腫.”이라 밝혀두었다. 최근 천식과 관련하여 다양한 單味 및 處方을 이용한 염증반응이나 면

Corresponding author : Min-cheol Park, School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan Blvd 460, Iksan city, Chonbuk, 570-749, South Korea.

(Tel : 063-859-2821, E-mail : spinx11@wonkwang.ac.kr)

• Received 2015/10/6 • Revised 2015/11/6 • Accepted 2015/11/13

역기능에 관한 연구와 동물 천식 모델을 이용한 연구<sup>12-14)</sup>들이 지속적으로 이루어지고 있으며, 麻黃<sup>15)</sup>과 甘草<sup>16)</sup> 單味를 이용한 천식 관련 연구도 있었다. 하지만 복합처방인 甘草麻黃湯에 대한 기존의 연구는 시행된 바 없었다.

저자는 麻黃, 甘草의 배합비율에 따른 천식에 대한 항염증 및 항알러지성 효능을 규명하고자 Ovalbumin (OVA)으로 유도한 마우스의 알러지성 천식 모델에서 감초마황탕을 경구 투여하여, 기도저항, 폐 조직, 기관지폐포세척액 내 총 백혈구 수, 호산구 및 T 림프구 cytokine 분비 및 유전자 발현도, 혈청 내 IgE의 분비 등을 측정하여 알러지성 천식반응에 미치는 영향을 확인하여, 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 6주령된 암컷 BALB/C마우스를 (주)오리엔트바이오(성남, 한국)에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2 °C를 유지하였다.

Table 1. The Composition of *Gamchomahwang-tang* Extract

Herbal medicine name	Herb name	Scientific name	Weight (g)
GME I	麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	8.45g
	甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	4.23g
GME II	麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	11.70g
	甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	2.93g

### 2) 약재

본 실험에 사용된 약재는 마황(*Ephedra sinica* Stapf, ES), 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch, GUF)로 옴니허브(영천, 한국)에서 구입하여 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 정선하여 사용하였다.

### 3) 시약 및 기기

#### ① 시약

본 실험에 사용된 시약은 난알부민 (OVA, chicken egg ovalbumin, Grade V)은 Sigma (St. Louis, USA)에서, Alum (Aluminium potassium sulfate)은 Pierce(Rockford, IL, USA)에서, Diff-Quik Kit는 Green Cross (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

#### ② 기기

Rotary evaporator (BUCHI B-480, Switzerland), Freeze dryerm (EYELA FDU-540, Japan), clean bench, vortex mixer (Vision scientific Co, Korea), autoclave (Sanyo, Japan) micro-pipet (Gilson, France), centrifuge (Sigma, U.S.A), homogenizer (OMNI, U.S.A) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료의 추출

마황 추출물을 얻기 위하여 甘草麻黃湯 1첩을 아래 Table 1.과 같은 비율로 혼합물 100 g을 만들어 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻는 액을 흡입 여과한 후 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하였고, 이를 다시 동결건조기 (Freeze dryerm EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 마황 감초 분말 (2:1 - 12.68g, 4:1 - 14.63g) 을 냉동 (-84 °C) 보관하면서 3차 증류수에 녹여 filter (0.2 μm syringe filter)로 여과한 후 필요한 농도로 사용하였다.

## 2) 기관지 천식 생쥐 모델

실험 1일째에 100 $\mu$ g의 OVA와 1 mg Alum을 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4) 0.2 ml에 혼합하여 복강 내로 주사하였다. 1차 전신 감각(sensitization) 후, 실험 15일째에 동일한 방법으로 2차 감각을 통해 면역 boosting을 유도한 후, 실험 22, 23, 24일째에는 연속 3일 동안 5% OVA in PBS 20 ml를 분무하여 30분씩 연속 흡입(Challenge)시켜 알러지성 천식을 유도하였다. 마지막 OVA을 분무한 24시간 후에 마우스를 분석하였다.

실험은 6마리를 한 군으로 하여 정상군 (control group, Con), 천식 유발군 (positive group, OVA), GME I 투여군, GME II 투여군으로 나누었으며, GME I 투여군은 마황:감초 2:1 300 mg/kg group (천식 유발 후 마황:감초 2:1 300 mg/kg 투여군), GME II 투여군은 마황:감초 4:1 300 mg/kg group (천식 유발 후 마황:감초 4:1 300 mg/kg 투여군)으로 나누었다. 정상군은 아무런 처치를 하지 않았고, 실험군은 분석 전 6일간(19-24일) GME를 경구 투여하였으며, 천식 유발군은 실험군과 같은 시간에 같은 양의 생리식염수를 투여하였다(Fig. 1).

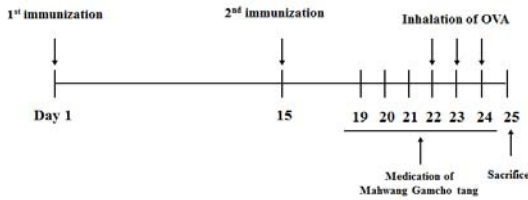


Fig. 1. Experimental schedule

Mice were sensitized by OVA at day 1 and 15. Before 6 days from sacrifice, mice were treated with GME(Mahwang Gamcho tang Extract). Last 3 day mice were challenged with 5% OVA via the airway. After 24hours from last challenge, mice were sacrificed.

## 3) 기관지폐포세척액 (Bronchoalveola Lavage Fluid; BALF) 검사

BALF는 마지막 OVA 분무 24시간 후 마우스에 Ketamine(Ketamine Hydrochloride 50 mg/ml, 유향

양행) 1 ml과 Rompun 주사액(바이엘) 1 ml을 혼합하여 마우스 복강내에 100  $\mu$ l를 주사하여 마취시킨 후 기관지를 절개하고 카테타를 이용하여 기도 내로 멸균된 PBS 1 ml를 주입하여 기관지폐포세척액(BALF) 약 700  $\mu$ l를 채취하여 Cytospin을 사용 2000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 슬라이드를 건조하였다. 건조된 슬라이드는 Diff-Quick 용액을 이용하여 염색하였다. 이 슬라이드로부터 세포의 모양과 염색을 특징으로 면역세포의 type을 결정하였다. 광학현미경  $\times 400$  배율에서 관찰하여 단핵구(monocyte), 호산구(eosinophil), 호중구(neutrophil), 림프구(lymphocyte) 등의 총 세포 수를 측정하였다.

## 4) 조직병리검사

마우스에서 BALF 채취 후 폐의 기관은 제거된 상태에서 폐 조직을 떼어내어 10% 포르말린에 고정시키고, 파라핀으로 embedding 한 후 4  $\mu$ m 두께로 조직을 잘라 슬라이드에 붙인 뒤 Hematoxylin/eosin (H&E) 염색하여  $\times 400$  배율로 관찰하였다.

## 5) 기도과민반응 (Airway hyper-reactivity; AHR) 측정

실험방법은 Peebles<sup>17)</sup>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 각 methacholine 농도마다 3분간 측정하여 평균을 대표값으로 취하였다.

$$\text{Penh} = \text{Pause} \times \text{PIF}/\text{PEF}$$

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

## 6) 바. RNA 추출

조직분쇄기에 적출한 폐 조직과 TRI-zol 1 ml을 넣

고 용해될 때까지 분쇄한다. 이 혼합 부유액에 100  $\mu$ l chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 용액을 가한 후 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 약 200  $\mu$ l 취하고 2-propanol을 회수한 상층액과 동량 혼합해 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% EtOH로 수세하고 3분간 침전물을 건조시켰다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 200  $\mu$ l의 증류수에 녹여 RNA를 용해시키고 정량하였다.

#### 7) 정량적 중합 효소 반응

기관지 천식 생쥐에서 적출한 폐 조직내의 IL-4, IL-13의 mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위하여 정량적 중합 효소 반응을 측정하였다. RT-PCR은 ABI step one plus 기계를 이용하였다. Real time PCR master mix 10  $\mu$ l (ABI), primer(IL-4, IL-5 or IL-13) 1  $\mu$ l를 사용했으며, DEPC 4  $\mu$ l를 샘플당 각각 정량해서 실험하였다. PCR 조건으로 50°C에서 2분 95°C 10분 반응한 뒤에 95°C에서 10초, 60°C에서 30초를 50 cycle 반응시켰다.

#### 8) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis

최종 감작 1일 후 마우스에서 채취한 BALF에서 천식 유발에 따른 Th2 사이토카인의 양을 측정하기 위하여 ELISA kit(R&D system)를 사용하여, IL-4, IL-5, IL-13의 생산량을 측정하였다. 또한 심장 천자로 얻은 혈청으로부터 IL-4의 영향으로 나타나는 항원 특이 항체 IgE의 양을 측정하기 위하여 IgE kit(R&D system)를 사용하여 ELISA 방법을 사용하였다. 심장 천자로 얻어진 혈액은 5000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후, 상청액을 취해 혈청을 얻었다.

#### 9) 통계 처리

실험결과와 통계적 처리는 SPSS(ver. 8.0)를 이용

하였으며, 기술통계학적 분석을 통해 각 집단 간의 유의성은 ANOVA test 방법으로 분석하였으며, 그 값이 0.05 이하일 경우 유의 수준으로 인정하였다. 실험치의 표현은 평균±표준편차 (mean±SD)로 하였다.

### III. 실험결과

#### 1. 염증 유발에 의한 기관지 수축에 대한 감초마황탕(GME)의 효과

알러지성 과민반응은 여러 인자에 의한 반응으로, 기관지 수축은 과민반응의 하나의 지표로 이용되고 있다<sup>2)</sup>. 본 실험에서는 알러지성 과민반응에 미치는 GME의 배합비율에 따른 효과를 조사하기 위해, 알러지성 천식 유발마우스의 정상군, 대조군, 실험군에서 methacholine에 대한 기도저항값(Penh)을 비교하였다(Fig. 2).

0-50mg/ml의 methacholine 비말에 노출시킨 후, Penh 값을 조사한 결과, Fig. 2에서 나타난 바와 같이 methacholine의 농도가 높을수록 Penh 값이 상승하였다. 각 group 간의 차이를 조사한 결과, 0 mg/ml, 2.5 mg/ml의 methacholine의 농도에 노출시켰을 때는 모든 군에서 비슷한 Penh 값이 확인되었다. 10 mg/ml 이상의 농도에서는 Penh 값이 크게 두 그룹으로 나뉘었다. 10 mg/ml, 20 mg/ml의 methacholine의 농도에서 GME II 투여군의 Penh 값은 정상군과 거의 동일하였으며, 50 mg/ml의 methacholine의 농도에서 약간의 차이가 있었다. 이에 비해 GME I 투여군의 Penh 값은 10 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/ml의 methacholine의 농도에서 대조군과 유사한 값이 관찰되었다. 50 mg/ml의 methacholine의 농도에 노출되었을 때 정상군의 Penh 값은 2.32를, 대조군은 7.36를, GME I 투여군은 6.9를, GME II 투여군은 3.58을 보였다.

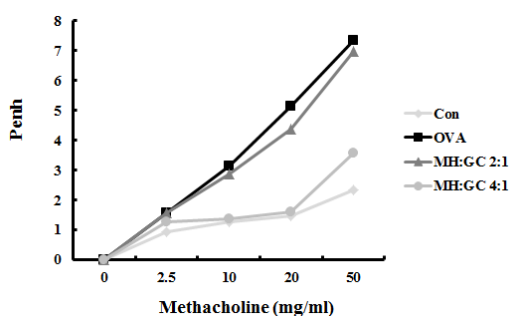


Fig. 2. Effect of GME on methacholine-induced airway hyper-reactivity (AHR) in asthmatic mice model.

Mice were sensitized at day 1 and 15 and then challenged with OVA for 3 days on 22, 23, 24. After 24 hours from last challenge, AHR was measured by enhanced pause (Penh) under exposure to specific doses of methacholine. These results are representative of three independent experiments (n=6 in each group).

## 2. OVA로 유도한 천식 마우스 모델의 기관지 폐 조직에 대한 감초마황탕(GME)의 효과

본 실험에서는 마우스를 OVA와 Alum으로 면역한 후에 5% OVA로 연속으로 3일간 총 3회에 걸쳐 감작하였고, 최종 감작 24시간 후에 기관지 폐 조직을 H&E 염색하여 관찰하였다(Fig. 3).

Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 정상군에서는 기도 벽이 얇게 유지되고 있고, 기도 주변 alveola의 모양이 균형적이며, 염증세포의 침착은 관찰되지 않았다. 그러나 대조군(Fig. 3B)에서는 기도의 협착과 기도벽의 두께 증가와 동시에 염증세포의 침착이 현저히 증가된 모습을 보인다. Fig. 3C에서는 기도의 협착이나 염증세포의 침착은 대조군과 마찬가지로 기도의 협착, 염증세포 침착, 주변 alveola의 비정상적 형태 등이 관찰되는데, 이는 GME I 투여군의 기관지 폐 조직의 모습으로 대조군과 큰 변화가 없음을 알 수 있다. GMEII 투여군에서는 기도 내경이 확장되었고, 주변 alveola의 균일한 형태가 거의 정상군과 유사하며, 염증세포의 침착도 대조군이나 GME I 투여군에 비해 완화되었다.

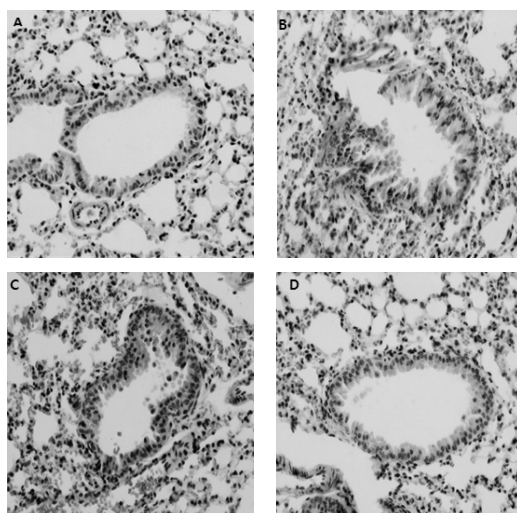


Fig. 3. Effect of GME on the lung histological structure in OVA-induced Asthma.

Lung tissues were sectioned and stained with hematoxylin and eosin(H&E). Mice (Fig. 3B,3C,3D) were immunized and challenged to OVA.

Fig. 3A, non immunized mice, Fig. 3B, mice that were immunized and challenged 3 consecutive days with OVA were sacrificed 24hours after last challenge. Fig. 3C, 3D mice that were immunized and treated with GME I,II for 6 days and last 3 consecutive days with OVA were sacrificed 24 hours after last challenge. Original magnification,  $\times 400$ . Images are representative section of 6 mice per group.

## 3. 기관지 천식 유발 시 BALF 내 세포 수의 변화

천식은 기도의 염증반응이며, 알러지성 염증반응은 호산구의 침윤이 특징적으로 나타난다. 특히 호산구 과다증은 천식 마우스모델에서 나타나는 특징 중 하나이다<sup>4)</sup>.

본 실험에서는 OVA로 유도한 기관지 천식 모델에서 기관지폐포세척액의 단핵구, 호산구, 림프구, 호중구의 수를 종류별로 나누어 조사하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이 정상군에 비해 대조군, GME 투여군의 전체 백혈구 수와, 호산구 수가 유의하게 증가하였음을 알 수 있다. 그리고 대조군에 비해 GME 투여군의 전체 백혈구 수와 호산구 수가 유의성 있게 감소하였음을 확인하였으며, 특히 GMEII 투여군에서 호산구의 감소가 뚜렷하게 나타났다.

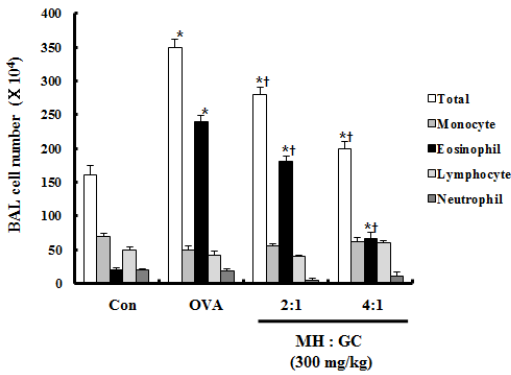


Fig. 4. GME reduces inflammatory cells in BALF

Effect of GME treatment on the number of WBC and eosinophils in OVA-induced airway inflammation. BALF was performed at 24 hours after last aerosol challenge. Mice were sensitized at day 1 and 15 day and then challenged with OVA for 3 consecutive days and were sacrificed 24 hours after last challenge. Data are mean value of 6 mice. \*p < 0.05 vs, control; †p < 0.05 vs, OVA positive group.

#### 4. 기관지 천식 유발 시 혈청 내 사이토카인 분비에 미치는 영향

본 실험에서는 OVA로 유도한 기관지 천식 모델의 폐 조직에서 real time RT-PCR을 이용하여 IL-4, IL-5, IL-13 mRNA의 발현을 분석하였다(Fig. 5A, 6A, 7A). 또한 기관지 천식 모델의 기관지폐포세척액에서 Th2형의 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13의 농도를 확인하였다(Fig. 5B, 6B, 7B).

##### 1) IL-4 생성에 미치는 영향

폐 조직에서 추출한 IL-4 mRNA의 발현도를 정상군의 발현도를 1이라고 가정하여 상대적으로 계산하였다. 각 군의 IL-4 mRNA의 상대적인 발현도는 대조군은 8.68, GME I 투여군은 6.84, GME II 투여군은 4.61으로 확인되었으며, Fig. 5A에서 보이는 바와 같이 GME II 투여군에서 IL-4 mRNA의 상대적인 발현도가 대조군에 비해 유의하게 감소하였음을 알 수 있다.

Fig. 5B에서 보이는 바와 같이 BALF 내 IL-4의 양은 정상군은 12pg/ml였고, 대조군에서는 33pg/ml로

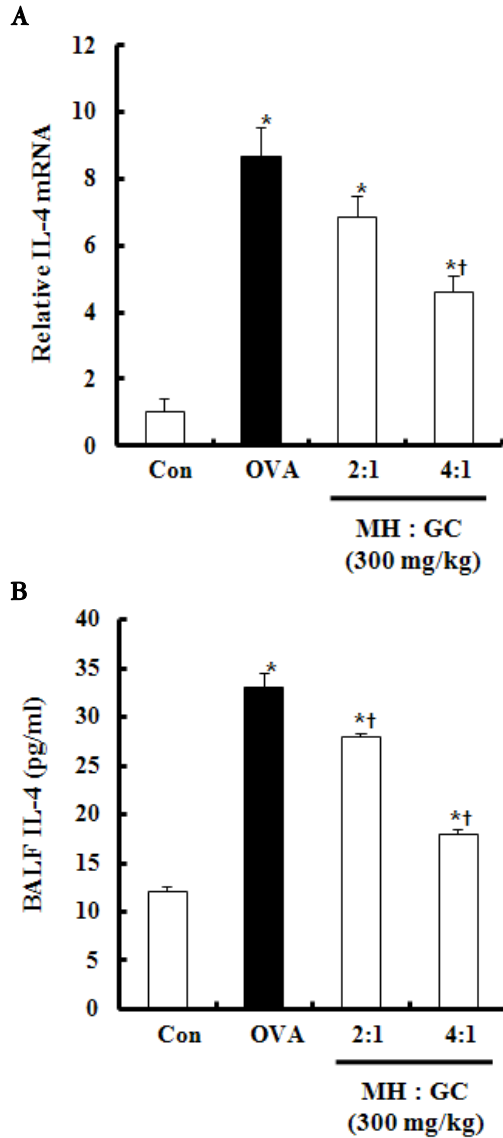


Fig. 5. GME decreases the level of IL-4 mRNA expression in lung tissue and the level of IL-4 in BALF

OVA-sensitized mice were treated as described in Materials and methods. The expression of IL-4 genes in tissues were determined by real-time RT-PCR (Fig. 6A), also BALF sup were determined by ELISA(Fig. 6B). Data represent mean±SD from 6 independent experiments. \*p < 0.05 vs, control; †p < 0.05 vs, OVA positive group.

가장 높게 증가하였고, GME I 투여군에서 28pg/ml, GME II 투여군에서는 18pg/ml로 실험군과 대조군

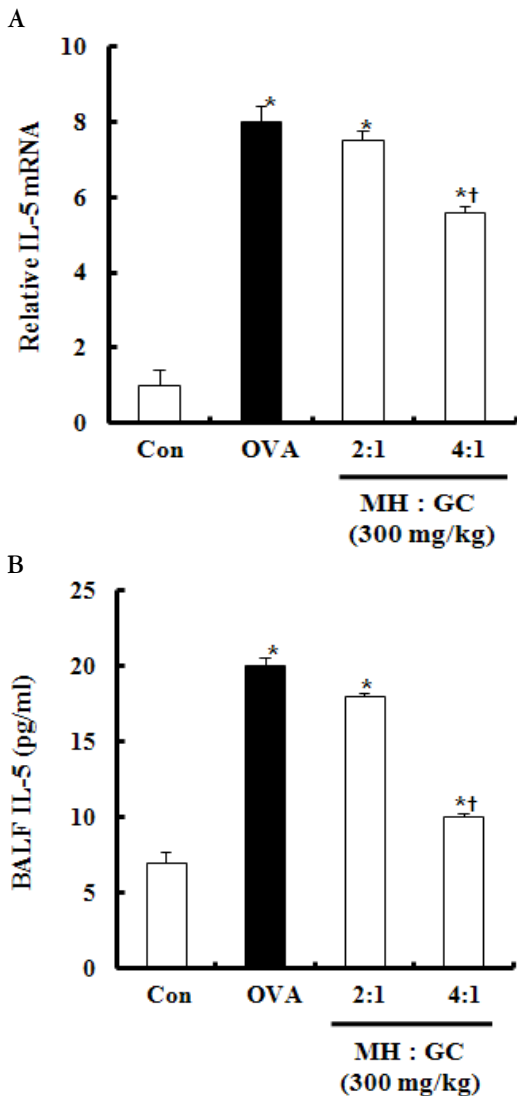


Fig. 6. GME decreases the level of IL-5 mRNA expression in lung tissues and the level of IL-5 in BALF.

OVA-sensitized mice were treated as described in Materials and methods. The expression of IL-5 genes in tissues were determined by real-time RT-PCR (Fig. 6A), also BALF sup were determined by ELISA(Fig. 6B). Data represent mean±SD from 6 independent experiments. \*p < 0.05 vs, control; †p < 0.05 vs, OVA positive group.

모두에서 정상군에 비해 유의성 있게 IL-4의 양이 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, GME I 투여군과 GMEII 투여군의 IL-4양은 대조군에 비해 유의성 있

게 감소하였다.

## 2) IL-5 생성에 미치는 영향

Fig. 6A에서 보는 바와 같이 폐 조직에서 추출한 IL-5 mRNA의 발현도를 정상군의 발현도를 1이라고 가정하여 상대적으로 계산하였으며, 대조군의 IL-5 mRNA의 상대적인 발현도는 8, GME I 투여군에서는 7.51, GMEII 투여군에서는 5.59으로 관찰되었다. 정상군에 비해 대조군, GME I 투여군, GMEII 투여군에서 모두 유의성 있게 IL-5 mRNA의 상대적 발현도가 증가하였으며, GMEII 투여군에서는 대조군에 비해 IL-5 mRNA의 상대적 발현도가 유의성 있게 감소하였다.

BALF 내 IL-5의 양은 정상군은 7pg/ml로 확인되었으며, 정상군에 비해 모두 유의성 있게 BALF 내 IL-5의 양이 증가하였음을 확인하였다(Fig. 6B). GMEII 투여군에서는 대조군에 비해 IL-5 mRNA의 상대적 발현도가 유다. 대조군은 20pg/ml, GME I 투여군은 18pg/ml, GMEII 투여군은 10pg/ml이 관찰되었음을 유의성 있게 감소하였다.

## 3) IL-13 생성에 미치는 영향

폐 조직에서 추출한 IL-13 mRNA의 발현도를 정상군의 발현도를 1이라고 가정하여 상대적으로 측정하였을 때, 대조군의 IL-13 mRNA의 발현도는 7.62, GME I 투여군은 6.23, GMEII 투여군은 2.85으로 확인되었다(Fig. 7A). 정상군에 비해 대조군, GME I 투여군, GMEII 투여군의 IL-13 mRNA의 상대적 발현도는 유의성 있게 증가하였으며, 대조군에 비해서 GME I 투여군, GMEII 투여군의 IL-13 mRNA의 상대적 발현도는 유의하게 감소하였음을 확인하였다.

Fig. 7B에서 보는 바와 같이 BALF 내 IL-13의 양은 정상군은 6pg/ml였고, 대조군에서는 23pg/ml로 가장 높았다. GME I 투여군의 BALF 내 IL-13의 양은 20pg/ml, GMEII 투여군에서는 10pg/ml이었다. 대조군과 GME I 투여군, GMEII 투여군에서 모두 정상



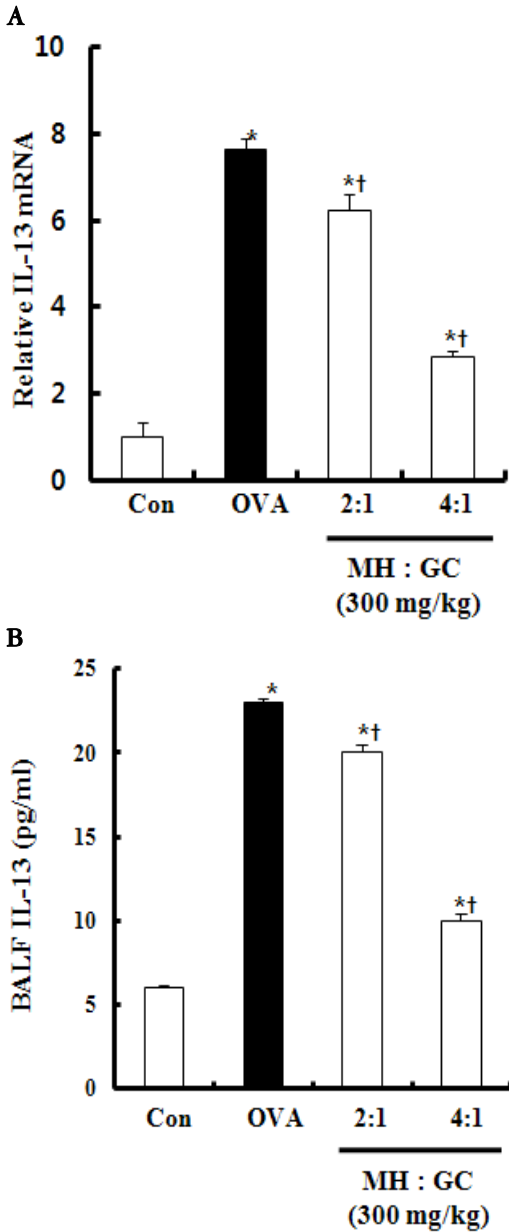


Fig. 7. GME reduces the level of IL-13 mRNA expression in lung tissues and the level of IL-13 in BALF.

OVA-sensitized mice were treated as described in Materials and methods. The expression of IL-13 genes in tissues were determined by real-time RT-PCR (Fig. 7A), also BALF sup were determined by ELISA (Fig. 7B.). Data represent mean±SD from 6 independent experiments. \*p < 0.05 vs, control; †p < 0.05 vs, OVA positive group.

군에 비해 BALF 내 IL-13양이 유의하게 증가하였다. 대조군에 비해 GME I,II 투여군의 BALF 내 IL-13 양은 모두 유의성 있게 감소하였다.

### 5. 기관지 천식 유발 시 Ig E 분비에 미치는 영향

본 실험에서는 OVA로 유도한 기관지 천식 모델의 혈청내 Ig E 분비를 측정된 결과, 정상군은 200±12.22(ng/ml), 대조군은 960±24.12(ng/ml), GME I 투여군에서는 810±23.65(ng/ml), GMEII 투여군에서는 512±16.33(ng/ml)로 나타나, 정상군에 비하여, 대조군, GME I 투여군, GMEII 투여군의 혈청내 Ig E양이 모두 유의하게 상승하였고, 대조군에 비해, GME I 투여군, GMEII 투여군의 혈청내 Ig E양이 모두 유의성 있게 감소하였다.

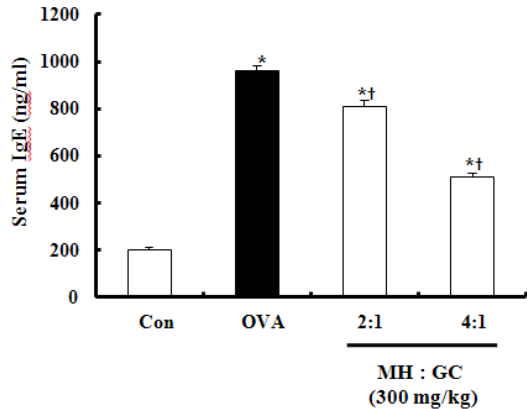


Fig. 8. The effect of GME on IgE levels in serum of OVA-sensitized and OVA challenged.

Blood was collected by cardiac puncture to measure serum IgE. All experiments were analyzed using ELISA (n=6. Values shown are means±SD). \*p < 0.05 vs, control; †p < 0.05 vs, OVA positive group.

## IV. 考 察

천식은 기도에 알러지성 질환의 특징과 비슷한 양상의 염증반응을 보이는 질환으로 여러 가지 염증세포가 관여하여, 다양한 자극에 대한 기관지 반응의 증

가를 일으킴으로써 기도의 광범위한 수축이 나타나는 질환으로 알려져 있다. 서로 다른 형태의 천식에서 호산구와 T림프구의 침윤, 비만세포의 활성화 등 특징적인 병리학적 소견이 일관되게 관찰된다<sup>18)</sup>.

천식의 발병에 영향을 끼치는 요소로는 아토피, 감염, 알레르겐, 식이, 흡연, 운동, 오염 등 여러 가지 인자들이 제시되고 있으나 명확하게 밝혀진 원인은 없는 실정이다<sup>18,19)</sup>. 그 중 아토피는 천식과 매우 밀접한 관련을 가지고 있으며 천식의 발생과 악화에 있어 중요한 위험인자로 알려져 있는데<sup>20-22)</sup>, 천식환자의 75-80%에서 알리지성 비염이 동반되며<sup>22,23)</sup>, 아토피 피부염 환자의 약 43-44.6%에서 천식이 발생하였다는 연구<sup>23,24)</sup>가 있으며, 이는 IgE 매개, Th2면역반응, 만성 염증이라는 공통된 면역반응에 의한 것으로 설명할 수 있다<sup>25)</sup>.

현재까지 천식의 병인론 중 전통적인 외인성 천식의 발병기전은 IgE 관련 Type I 과민반응으로 항원이 기도 내로 유입되면 항원의 일차적 제거는 폐포 대식세포가 담당하고<sup>26)</sup> helper T-cell의 보조작용에 의해 B세포에서 IgE와 IgG 항원 특이항체가 생성된다. IgE는 비만세포를 활성화시키고 항원과 IgE가 결합하면 비만세포에서 탈과립이 일어나 초기 천식반응을 유발하게 된다<sup>27)</sup>. 또한 항원에 노출된 B 세포는 CD4 T 세포를 자극하여 T helper 2 (Th2) 세포로 분화되고, 분화된 Th2 세포는 IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-11, IL-13, GM-CSF 등을 분비하여 호산구를 자극하고 후기 알리지성 기도반응을 유발한다<sup>4,28,29)</sup>.

초기 반응은 전형적으로 비만세포의 탈과립에 의한 히스타민, 류코트리엔 및 혈소판 활성화인자 등에 의해 기관지 평활근 수축, 점액생산 및 혈관투과성의 증가가 관찰된다. IL-4, IL-13은 Th2반응을 일으키고 B 세포에서 IgE 생성을 촉진시키며 IL-5는 호산구를 활성화하고 침윤시킨다. 후기 반응은 주로 호산구, 호중구 및 Th2세포를 포함하는 백혈구의 유입을 동반하는 염증으로 이루어지며, 비만세포, 상피세포와 T세포에 의해 생산되는 chemokine, cytokine에 의해 자

극되어 백혈구의 유입이 일어난다. 반복되는 항원 노출이 기도에 만성 염증상태를 야기하고, 만성기도염 증은 다양한 자극에 의해 천식성 기도의 과민성을 일으키는 것으로 생각된다. 항원 이외의 찬 공기, 운동, 감정적 stress 및 화학적 자극물 등이 급성 천식증상을 일으키고 이들 자극이 직접 혹은 간접으로 매개물질이나 수축을 일으키는 신경전달물질의 유리를 불러일으킨다고 추정되고 있다<sup>4,18,30,31)</sup>.

喘息은 한의학의 哮喘에 해당하는 질환으로 갑작스레 반복 발작하는 喘促上氣, 喉中有水鷄聲의 증상을 특징으로 갖는 질병으로 반드시 喘이 겸하여 발생하기 때문에 哮喘이라고 한다<sup>32)</sup>. 喘息에 관하여 《內經》에서는 그 증상을 “人有逆氣 不得臥而息有音者…是陽明之逆也<sup>33)</sup>”와 같이 묘사하였으며, 병인을 脾胃의 기능에 문제가 생겨 痰飲이 쌓이고 胃의 降濁이 원활하지 못하면 肺의 宣發, 肅降기능이 상실되는 것으로 기술하였다. 哮喘은 隋代 巢<sup>34)</sup>의 《巢氏諸病源候論》에서 “上氣鳴息”, “呻嗽”라고 칭하는 데에서 그 유래를 찾아볼 수 있으며, 그 병인을 肺의 장기적인 기능 실조로 보았다. 이후 唐代의 《千金要方》<sup>35)</sup>과 宋代의 《聖濟總錄》<sup>36)</sup>등에서 咳와 喘에 대한 논의가 있었으며, 金元代的 朱<sup>37)</sup>에 의해 하나의 독립된 질병으로 설정되어 哮와 喘이 나누게 되었다. 明·清代에 여러 의가에 의해 증상에 따라 더욱 세분화되었으나, 오늘날에는 哮, 喘의 구별 없이 하나의 증후군으로 인식되고 있다<sup>7)</sup>.

哮喘의 원인으로는 巢<sup>34)</sup>는 痰氣上擊이라 하였고, 孫<sup>35)</sup>은 大逆上氣라 하였으며, 朱<sup>37)</sup>는 痰으로 인하여 발생한다고 하였다. 또한 張<sup>38)</sup>은 夙根이라 하여 그 內的素因이 痰濕한 사람이 過寒과 過勞시 나타난다고 보았다. 哮喘의 치료는 朱<sup>37)</sup>의 補陰, 降心火, 降痰下氣의 치법과 王<sup>39)</sup>의 《證治準繩》에서 外邪와 攝生에 대한 주의 그리고 張<sup>38)</sup>의 虛實판별에 의한 扶正氣, 攻邪氣의 治法을 기본으로 하였다. 최근에는 小青龍湯<sup>40)</sup>, 宣肺湯<sup>41)</sup>, 清上補下湯<sup>42)</sup>, 五拗湯<sup>43)</sup> 및 三子地黃湯<sup>44)</sup> 등이 천식에 효과가 있다는 연구 보고가 있었고 임

상에서 활용되고 있다.

《金匱要略·水氣病脉證并治第十四》<sup>9)</sup>에 최초로 수록된 甘草麻黃湯은 《類聚方》<sup>45)</sup>에서는 麻黃甘草湯의 異名으로 실려 있는 처방으로 麻黃과 甘草가 2:1의 비율로 구성되어 있다. 《方極》<sup>46)</sup>에서는 喘하며 急息迫, 혹은 自汗, 혹은 不汗하는 자를 치료한다고 하였고, 《韓方處方解說》에서는 喘息의 發作 시에 복용한다고 하였으며, 《漢方治療의 實際》에서도 심한 발작을 누르기 위해 頓服用 혹은 兼用方으로 흔히 사용한다고 하였으며, 《古方類聚》 등에서도 본 방제를 통해 喘息의 발작을 완화시킨 사례가 있어<sup>47)</sup>, 甘草麻黃湯이 통상적으로 喘息 發作을 완화시킬 수 있는 기본적인 방제로 사료되어 본 연구를 진행하였다.

구성 약물인 麻黃은 마황목 마황과 식물로 학명은 *Ephedra sinica* Stapf으로, 그 性味는 辛, 微苦, 溫하고, 肺, 膀胱經으로 歸經하고, 효능으로는 發汗散寒, 宣肺平喘, 利水消腫이 있다<sup>48)</sup>. 약리작용으로는 발한작용, 평천작용, 이뇨작용, 항염증 및 항과민 작용, 진해와 거담작용, 해열, 항균 및 항바이러스 작용 외에 중추신경 흥분작용, 강심 및 혈압상승 작용, 장근육 수축의 억제 등이 있다고 하였다<sup>49)</sup>. 甘草는 콩과식물로 학명은 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch이고, 그 性味는 甘平하며 脾 胃 肺經으로 歸經하고 효능으로는 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥 등이 있다<sup>48)</sup>. 약리작용으로 부신피질호르몬양 작용, 소화기계에 대한 작용, 항염증 및 항알러지 작용, 항바이러스 작용, 해독작용, 진해 및 거담작용 등이 있다고 하였다<sup>49)</sup>.

甘草麻黃湯에 대해 시행된 기존의 연구는 없으나 麻黃과 甘草 單味の 천식에 대한 연구로는 이 등<sup>15)</sup>의 연구에서 마황이 폐 조직에서 기도 협착과 염증 세포의 침윤을 억제하고, 기관지폐포세척액에서 IL-4, IL-5, IL-13 및 호산구를 유의성 있게 억제하였다고 보고하였고, 송 등<sup>50)</sup>은 마황 약침 투여군에서 BALF 내 호산구수, IL-4, 혈청 내 IL-4, IL-13, IgE 등이 유의성 있게 감소하였다고 하였다. 김 등<sup>51)</sup>의 연구에서는 감초 추출물이 RBL-2H3 비만세포에서  $\beta$

-hexosaminidase 분비 및 IL-4, IL-13의 mRNA 발현량을 감소시켰다고 보고하였고, 이 등<sup>52)</sup>은 감초 약침 투여 군에서 IL-4, TNF- $\alpha$ 의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 결과를 보고하였으며, 한 등<sup>16)</sup>은 감초가 기관지폐포세척액에서 호산구, 백혈구, IL-4, IL-5, IL-13, IgE의 생성을 감소시켰고, IFN- $\gamma$ 의 생성을 감소시켰다는 보고가 있었으며, 김<sup>53)</sup>은 감초의 주성분인 glyceric acid가 selectine 매개성 유착을 억제함으로써 항염증작용을 나타내었다고 하였으며, 황<sup>54)</sup>은 마황이 세포성 및 체액성 면역반응에 대해 억제적으로 작용하는 것으로 보고하였다.

이상에서 보면 甘草나 麻黃 개별 單味 혹은 약침, 주요 성분이 천식 병태 동물의 기관 및 폐의 조직학적 변화나 기도저항, 세포활성물질, 호산구, IgE에 미치는 영향에 대한 단편적인 연구는 있으나, 복합처방인 甘草麻黃湯에 대한 연구는 없었다. 이에 저자는 천식 모델 생쥐에 미치는 항염증 및 항알러지 작용에 대한 甘草麻黃湯의 배합비율에 따른 효과를 연구하기 위해, 麻黃과 甘草를 본방의 비율대로 배합한 GME I 투여군과 麻黃을 2배 증량하여 배합한 4:1의 GME II 투여군에 대한 실험을 진행하여, 폐 조직과 BALF 내의 IL-4, IL-5, IL-13, 혈청 내 IgE 분비량과, 폐 조직 내의 총 세포수 및 세포분포변화, 기도저항, 폐 조직의 변화를 관찰하였다.

실험동물을 이용하여 천식을 유발할 경우 천식 유발 여부의 확인 기준은 호산구의 증가와 조직 내 호산구 침윤, 천식 관련 인자의 발현 및 세기관지 과민성의 증가에 있다<sup>4,55)</sup>. OVA 마지막 유발 후 24-72시간 사이에서는 BALF 내 호산구 유입은 물론이며 기도과민증을 관찰할 수 있다. 또한 혈액 내 특이 IgE 증가와 폐 조직에서 염증세포의 유입, 기도개형에 따른 점액분비 증가 등을 관찰할 수 있어 본 실험에 응용하였다<sup>4)</sup>.

기도 과민성(Airway hyperresponsiveness, AHR)은 천식의 전형적인 증상인 기침, 호흡곤란, 천명음 등과 연관이 깊고, 천식 진단에 AHR 측정이 유용하

므로, 메타콜린을 이용한 AHR 측정이 가장 흔하게 시도되고 있다<sup>17)</sup>. 본 실험에서는 AHR의 척도를 Penh 값을 기준으로 하였으며, 정상군, 대조군, 실험군을 비교한 결과, 대조군에서 정상군에 비해 Penh 값이 뚜렷이 증가하는 것이 관찰되었다. GME I, II 투여군 모두에서 대조군에 비해 Penh 값이 모두 감소하는 결과를 보였으나, GME II 투여군에서 유의성 있게 감소하는 것이 관찰되었다(Fig. 2).

천식 환자의 폐 조직에서는 상피하 기저막 비후, 점막하층에 염증세포의 침윤, 술잔세포 화생, 기도 평활근 비후 및 기도의 부종, 발적, 좁아진 기도 등으로 관찰된다<sup>18,30)</sup>. GME I 투여군에서는 기도 협착 정도 및 점액분비, 염증세포 침착이 대조군과 거의 유사하게 수준이었으나, 주변 폐포의 구조는 비교적 잘 유지되었다(Fig. 3C). GME II 투여군에서는 정상군과 거의 유사한 양상의 기도내경, 기도벽의 두께를 보였고, 주변 폐포의 형태도 균일하게 유지되었다. 또한 염증세포의 침착과 술잔세포 화생이 미미하였고, 점액분비는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3D). 이상의 결과들로 유추하였을 때, GME II가 IgE 및 cytokine에 의해 매개되는 염증반응에 있어, 염증세포의 기관지 유입과 침윤에 관여하는 여러 세포 활성물질, 유착분자 등을 억제하는데에 GME I 보다 효과적일 것으로 사료된다.

GME가 BALF 내 총 백혈구 수에 미치는 영향을 살펴보면, 대조군에서 총 백혈구 수가 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였고, GME 투여군에서 BALF 내 총 백혈구 수가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 확인할 수 있으며, GME II 투여군에서 더욱 감소한 수치를 보였다. 이를 통해 GME의 투여가 천식 모델의 기도 내 염증 세포 증가를 억제함으로써 이들 세포에 의한 염증반응을 억제하는 작용을 할 것으로 유추해 볼 수 있다(Fig. 4).

알러지성 기관지 천식 반응에서 호산구과다증은 마우스의 알러지성 모델에서 나타나는 두드러진 특징으로 알려져 있다<sup>56)</sup>. GME의 투여가 BALF 내 호산구

수에 미치는 영향은 대체로 백혈구 수와 유사한 양상을 보였다. 정상군에 비해 대조군의 BALF 내 호산구 수는 현저히 증가하였고, GME 투여군의 BALF 내 호산구 수는 대조군에 비해 모두 유의성 감소하였는데, GME II 투여군에서 감소폭이 현저하였다. 이는 천식에서 나타나는 염증 반응이 호산구를 중심으로 일어나며, GME의 투여가 호산구의 수를 감소시킴으로서 폐 내 염증반응을 억제하는 역할을 할 수 있을 것으로 사료되며, 이런 작용에 있어 GME II가 GME I 보다 효과적일 것으로 유추할 수 있을 것으로 보인다(Fig. 4).

대표적인 Type 2 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13은 알러지성 천식에서 특징적으로 과량 분비되는 cytokine으로 천식의 병리기전에 있어 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>55,57)</sup>. IL-4는 T림프구와 비만세포, 호흡기에서 생성되는 물질로서 B 림프구의 성장 및 분화인자이며, 세포표면에 MHC class II 항원과 Fc수용체 발현을 촉진하여 Th2 cell의 분화를 촉진시키고, IgG<sub>1</sub>과 IgE의 분비를 향진시키며, 수지상세포의 성숙 및 VCAM-1의 발현을 자극한다<sup>59)</sup>. IL-13은 IL-4와 함께 IgE의 생산을 증진시키는 역할을 하며, 기관지 점막 밑샘으로부터 점액의 분비를 자극하고, 상피세포, 섬유모세포와 평활근 근세포 등에서 IL-6, IL-33, SCF 등의 염증성 cytokine의 분비를 유도한다. 가장 강력한 호산구 활성 cytokine인 IL-5는 국소적으로 호산구를 유입시키며, 호산구의 분화, 생존에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>4,30,60)</sup>. 또한 IL-4, IL-13은 IgE생산을 통하여 비만세포를 활성화하고 술잔세포 화생 및 점액 과분비를 유도하며, IL-13은 IL-9, IL-11과 함께 기도과민증을 유도한다고 밝혀졌다<sup>4,61)</sup>.

ELISA분석을 통해 GME의 투여가 BALF 내 cytokine양에 미치는 영향을 살펴본 결과, BALF 내 IL-4, IL-5, IL-13은 모두 대조군에서 현저하게 증가하였고, GME I 투여군에서 BALF 내 IL-4, IL-13가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, GME II 투

여군에서는 BALF내 IL-4, IL-5, IL-13 모두가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, GMEII 투여군에서 감소 폭이 더욱 큰 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5B,6B,7B).

Real-time PCR에 의한 폐 조직 내 IL-4, IL-5, IL-13에 대한 유전자 발현 실험에서는 정상군에 비해 대조군의 IL-4, IL-5, IL-13 유전자 발현도가 상대적으로 현저히 증가하였으며, GME I 투여군에서 IL-13 유전자 발현도가 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, GMEII 투여군에서는 IL-4, IL-5, IL-13 유전자 발현도가 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, 이 또한 GMEII 투여군에서 상대적 유전자 발현도가 현저히 감소된 것이 확인되었다(Fig. 5A,6A,7A).

Th2 cytokine의 종류별 GME 투여가 유전자 발현도 및 BALF 내 생산량에 미치는 영향을 살펴보면, IL-13의 유전자 발현도 및 BALF 내 생산량은 GME I,II 투여군에서 모두 유의성 있게 감소하였지만, IL-5의 유전자 발현도 및 BALF 내 생산량은 GMEII 투여군에서만 유의성 있게 감소하였다. GME I 투여군은 IL-4의 유전자 발현도를 유의성 있게 억제시키지 못하였지만, IL-4의 BALF 내 생산량은 유의성 있게 감소시켰고, GMEII 투여군에서는 IL-4 유전자 발현도 및 BALF 내 생산량이 모두 유의성 있게 감소하였음을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 Th2 cytokine에 의해 매개되는 알러지성 염증 반응의 억제에 있어 GMEII의 투여가 GME I 보다 유의성 있을 것으로 생각된다.

혈중 IgE 농도는 기관지 천식의 중증도와 상관관계가 있다. 항원에 노출된 후 생산된 IgE 항체는 혈중에 존재하거나 비만세포, 호염구 세포 표면에 부착하고 동일 항원에 재 노출되면 이 항원은 비만세포 표면에 부착된 IgE 항체에 결합하면서 많은 염증매개 물질이 분비되는데 이를 제 1형 과민반응이라고 한다. 이 반응을 통해 기도 염증 및 기관지 수축을 일으키기 때문에 IgE 항체는 Type I 과민반응의 중심역할을 한다<sup>4,62,63</sup>. 또한 IgE 는 초기반응 및 후기반응에 모두

관여하면서 사이토카인 등을 생산하므로 천식의 염증 발생에 있어 중요한 역할을 한다<sup>30</sup>.

본 실험에서는 혈청 IgE에 미치는 GME의 영향에 대해서 연구하였다. 우선 OVA를 투여한 대조군은 기존의 보고와 유사하게 혈청 IgE가 현저히 증가된 것을 관찰할 수 있었다. GME 투여군은 대조군에 비해 모두 혈청 IgE가 유의성 있게 낮아졌음을 확인할 수 있었으며, GMEII 투여군에서 감소 폭이 더욱 컸다.

본 실험에서 마황이 증량된 GMEII 투여군에서 제 1형 알러지성 과민반응 타입에서 특징적으로 나타나는 Th2 cytokine의 분비 및 유전자 발현이 유의성 있게 감소되었으며, 호산구-IgE 매개 면역반응을 억제해 통해 염증을 줄이고, 기도 과민성을 낮추는 효과가 GME I에 비하여 우수함을 확인할 수 있었다. 이런 작용은 마황의 증량에 의한 것으로 추측할 수 있으나, 마황의 어떤 성분에 의한 것인지 아직까지 명확히 밝혀진 바가 없다. Saito<sup>64</sup>는 그의 연구에서 마황부자세 신탄 및 마황의 투여가 IgE 매개 과민반응을 억제하고, RBL-2H3(rat basophilic leukemia)세포에서 히스타민 유리를 감소시키고, cAMP(cyclic adenosine monophosphate)의 양을 증가시켰고, 부자, 세신의 투여로는 유의성 있는 결과를 얻지 못했다고 보고하였으며, 또한 마황의 주요 성분으로 알려져 있는 ephedrine, methylephedrine, 그리고 pseudoephedrine은 히스타민 유리 억제에 영향을 미치지 않았다고 하였다. 다른 보고<sup>65</sup>에서는 마황부자세신탄이 혈청 IgE와 복강 내 호산구 비율, 비장세포에서 IL-4 생산 억제를 통해 제 1형 과민반응을 억제하는 효과와 연관이 있을 수 있다고 하였다. 이를 토대로 마황은 Th2 cytokine 발현을 억제하고, 이를 통하여 IgE, 히스타민 유리 등에 영향을 미쳐 제 1형 알러지성 과민반응을 억제하는 데에 영향을 미칠 것이라고 사료되며, 또한 기도 과민성을 낮춤을 통해 천식의 알러지성 염증에 일정한 효과가 있을 것으로 유추할 수 있다.

이상의 결과를 종합하면 GMEII가 천식의 주요 병

리가 되는 기도 과민성을 낮추고, 혈청 IgE 양을 감소시키며, 천식의 주요 면역반응 경로인 Th2 경로의 항진에 관여하는 cytokine인 IL-4, IL-5, IL-13의 분비를 억제하여 호산구성 염증을 특징으로 갖는 천식의 염증반응에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다. 이를 통하여 천식 증상의 중증도 및 양상에 따른 甘草麻黃湯의 투여에 있어 처방의 용량 및 배합 비율에 대한 재고가 필요할 것으로 권장된다.

하지만 본 연구에서는 甘草麻黃湯의 배합비율을 단순히 2가지만 비교하였다는 한계점이 있다. 또한 실험 연구 상에서의 약리 효과와 임상에서의 효과가 반드시 일치하는 것이 아니므로 추후 보다 높은 근거 수준을 제시할 수 있는 관련 임상 시험 및 연구가 시행되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

마우스에 OVA 투여를 통한 알러지성 기관지 천식을 유발하고 GME를 투여한 후 기도과민성을 측정하고, 폐 조직의 상태를 관찰하였으며, BALF 내 총 백혈구 수 및 분획별 비율, BALF 내의 cytokine의 변화와 폐 조직 내 cytokine mRNA 발현도, 혈청 IgE에 대하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GME I,II는 10, 20, 50 mg/ml의 methacholine의 농도에서 알러지성 기관지 천식에 대한 Penh 값을 감소시켰으며, GMEII 투여군에서 Penh 값이 현저히 감소하였다.
2. GME I은 폐 조직에서 알러지성 염증 반응을 억제하는 효과가 미미하였으나, GMEII는 폐 조직에서 점액 생성, 염증세포의 침윤, 술잔세포 화생 그리고 기도벽의 비후 및 기도협착을 현저히 억제하였다.
3. GME I,II는 BALF에서 총 백혈구 수와 호산구 수를 유의성 있게 감소시켰으며, GMEII 투여군에서

호산구가 현저히 감소하였다.

4. GME I,II는 BALF 내 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생성을 대부분 유의성 있게 감소시켰고, GMEII 투여군에서 생산량이 현저히 감소하였다.
5. GME I,II는 폐 조직 내 IL-4, IL-5 및 IL-13의 mRNA 발현도를 대부분 유의성 있게 억제하였고, GMEII 투여군에서 억제 효과가 컸다.
6. GME I,II는 혈청 내 IgE를 유의성 있게 감소시켰으며, GMEII 투여군에서 감소 폭이 컸다.

이상의 결과로 보아 GME는 마우스에 유발된 알러지성 기관지 천식을 억제시키는 효과가 있었으며, 원방에 비해 마황을 증량한 GMEII 투여군에서 그 효과가 더욱 뚜렷하게 나타났다.

## 감사의 글

이 논문은 2015년도 원광대학교의 교내 연구비 지원에 의해서 수행됨.

## References

1. Global Initiative for Asthma, Global strategy for asthma management and prevention: National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, 2015:11-4.
2. Kim YI, Choi IS, Park DJ, Kim YJ, Cho DH, Jee SY, et al. Etiologic Factors for Methacholine Upper Airway Hyperresponsiveness and Upper Airway Obstruction, J of asthma, allergy and clinical immunology. 2010;30(1):21-9.
3. COPD Research Center, Korean asthma management guideline for adults. Seoul; Jingihwik, 2011:2-14.

4. The Korean Academy of Asthma, Allergy and clinical Immunology. Asthma and Allergic Disease. Seoul: Ryomoongak, 2012:71-2,143-4, 253-66.
5. Lee SY, In KH. Immunopathogenesis of Asthma. Tuberc Respir Dis. 2006;60(4): 379-90.
6. Kim UK. Airway Hyperresponsiveness in Bronchial Asthma. The DongGuk Journal of Medicine. 2009;16(1):55-62.
7. Jeongukhanuigwadaehak Pyegyenaegwahakgyosil. Donguiipyogyonaegwahak. Seoul: Hanmunhwasa, 2004:192-9.
8. Yang SS, Jang GS, Bu GH. Junguiimsangdaejeon. Seoul:Uisungdang. 1993:87-100.
9. Kyeonghui University Presidential Commission for graduation, the 49th, Geumgweoryaktangjeunglongchi. Seoul:Jeongdam, 2001: 446-8.
10. Lee JH. Doseol Hanbangjinryoyobang. Seoul:Uibang pub, 2004:88-9.
11. Gilikdongdong. Yakjing. Seoul:Cheonghong pub, 2006;161-4,105-11.
12. Jung HJ, Jung SK, Rhee HK, Chung W. The Effects of Armeniacae Arnarum Semen and Platycodi Radix on IL-4, IL-5, IL-6 in Asthma Model. J Korean Oriental Med, 2000; 21(1):31-8.
13. Kim JJ, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. The Effects of Maekmoondong-tang and Jeongcheonhwadamgangki-tang on Immune Cell and Serum OA-specific IgE in BALF in Rat Asthma Model. J of Korean Medicine, 2002;23(1):37-49.
14. Lee JU, Jeong HJ, Jeong SG, Lee HG. The Effects of Socheongryong-Tang on Lymphocytes in BALF of rat. K,H,M, 2001;17(2):242-53.
15. Lee SC, Park SJ, Seo SW, Hwang SW, Kim YW, Song DS, et al. Effect of Herba Ephedrae on Airway hyperreactivity. Korean J of Herbology, 2005;20(4):69-76.
16. Han YJ, Park YC. Effects of Glycyrrhiza uralensis Fisch on Immunocyte and Cytokine Production in Asthma Model Mouse. J of Korean Medicine, 2004;25(3):408-17.
17. Peebles RS, Sheller JR, Johnson JE, Mitchell DB, Graham BS. Respiratory Syncytial Virus Infection Prolongs Methacholine-Induced Airway Hyperresponsiveness in Ovalbumin-Sensitized Mice. J of Medical Virology 1999;57:186-92.
18. The Korean Association of Internal medicine. Harrison internal medicine. The 17th, Vol.2, MIP. 2010:1926-38.
19. Kim YK, Kwon JN, Mun MG. The Investigation between Oriental and Western Medicine on Cause for Asthma. J Dong-Eui Orient Med, 2000;4:85-105.
20. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. N Engl J Med, 1995;332:133-8.
21. Arshad SH, Kurukulaaratchy RJ, Fenn M, Matthews S. Early life risk factors for current wheeze, asthma, and bronchial hyperresponsiveness at 10 years of age. Chest, 2005;127:502-8.
22. Nolte H, Nepper-Christensen S, Backer V. Unawareness and undertreatment of asthma and allergic rhinitis in a general population.

- Respir Med 2006;100:354-62.
23. Bachert C, Vignola AM, Gevaert P, Leynaert B, Van Cauwenberge P, Bousquet J. Allergic rhinitis, rhinosinusitis, and asthma: one airway disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24:19-43.
  24. Gustafsson D, Sjoberg O, Foucard T. Development of allergies and asthma in infants and young children with atopic dermatitis, a prospective follow-up to 7 years of age. *Allergy* 2000;55:240-5.
  25. Yu JH. Allergic March: Progression from Atopic Dermatitis to Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;32(3):137-43.
  26. Fels AO, Cohn ZA, Cohn. The alveolar macrophages. *J Appl Physiol*. 1986;60:355-69.
  27. Matsuno O, Miyazaki E, Takenaka R, Ando M, Ito T, Sawabe T, et al. Links between bronchial asthma and allergic rhinitis in the Oita Prefecture, Japan. *J Asthma*. 2006; 43:165-7.
  28. Daser, A, N. Meissner, U Herz, H Renz. Role and modulation of T-cell cytokines in allergy. *Curr. Opin. Immunol*. 1995;7:762-70.
  29. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2003;111:450-63.
  30. Kumar V, Abbas, ASTER, Faus, Robbins & Cotran Pathology. Seoul:Bummun Education, 2011:686-90.
  31. Korean Association of Pharmacy Education, Pharmacology. Seoul;Sinilbooks. 2009:317-8.
  32. Yang SS, Jang SS, Bu GH, Lee JH. Donguiimsangnaegwahak II. Seoul:Beopin pub. 1999:683-99.
  33. Wangbing. Sinpyunhwangjaenaekyungsomun, Seoul:Daeseongmunhwasa. 1994:221-2.
  34. Sowonbang. Jebyeongwonhurongkyoju. Beijing: Inminwisaeng pub. 1991:389-97,424-38.
  35. Sonsamak. Cheongeumyobang. Seoul: Daeseongmunhwasa. 1984:64.
  36. Jogil. Seongjechonglockjunhwabon. Beijing: Gwahak pub. 1998:315.
  37. Jujinhyeong. Dangyesimbeopbuyeo. Seoul: Daeseongmunhwasa. 1993:328-33.
  38. Janggaebin. Gyeongakjeonseo II. Seoul: Iljunga. 1992:354-64.
  39. Wanggeungdang. Jeungchijunseung I. Beijing:Inminwisaeng pub. 1991:229-31.
  40. Jung S, Cho SJ, Moon KI, Kim HW, Kim BY, Cho SI. Effects of Socheongryong-Tang on Immunoglobulin Production in Asthmatic Mice. *Korean J of Herbology*. 2008;23(1):23-8.
  41. Lee JG, Park YC. Effects of Seonpye-tang on OVA-Induced Asthmatic Mice. *Kor J of Oriental Physiology & Pathology*. 2009; 23(2):457-63.
  42. Jung SK, Hwang WS, Ju CY, Lee JS, Cho IH, Jung HJ. Clinical Effects of Chuong-sangboha-tang in Asthmatic Patients. *J of Korean Medicine*. 2002;23(4):151-60.
  43. Kwon SH, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK. The Effects of Oyo-Tang on the Respiratory Patterns and Tracheal Tissues in Allergic Asthma. *J of Korean Medicine*. 1999; 20(2):98-107.
  44. Kim WK, Park YC. Anti-asthmatic Effects of Samjajihwang-tang in OVA-induced Mice. *J Orient Physiology & Pathology*. 2009;23 (2):343-50.
  45. Deungmunuilimhoe. Yuchwibanggwanguihaesul. Seoul:Uibang pub. 2007;216-8.



46. Tangbongujin, Gukyeok Hwanghanuihak I, Seoul:Gyechukmunhwasa, 2008:323-6.
47. Roh EJ, Kang HE. Gobangyuchwi, Seoul:Gobang pub, 2009:289-91.
48. Jeongukhanuigwadaehak Bonchohakgyosu, Herbology. Seoul: Younglimsa, 2004;172-5, 322-5.
49. Han JH, Kim KY. Pharmacology of traditional oriental medicine, Seoul: Uisungdang, 2004;88-93,474-8.
50. Song HG, The Effect of EH-HA(Ephedrae Herba Herbal Acupuncture) at ST36 on OVA-induced Asthma in Mice, J Kor Acu & Moxibus, 2006;23(1):1-14.
51. Kim JM, Kim DJ, Kim TH, Baek JM, Kim HS, Choi M, Effects of Water Extract of Glycyrrhiza uralensis on  $\beta$ -Hexosaminidase Release and Expression of the Cytokines of RBL-2H3 Mast Cells, J of Korean Medicinal Crop Science, 2010;18(4):231-7.
52. Lee HD, Song CH, Effect of Glycyrrhizae Radix Pharmacopuncture on PCA and Secretion of  $\beta$ -Hexosaminidase and Cytokines in RBL-2H3 Cells, J Kor Acu & Moxibus, 2011;28(3):73-83.
53. Kim MK, Antagonism of licorice on selectin - mediated eosinophil and neutrophil adhesion, J Allergy Clin Immunol, 1998;18(1):61-8.
54. Park SB, Kim TH, Yang GS, Hwang EJ, Kang EM, Effects of Ephedrae Herba Extract on Cellular and Humoral Immune Responses, Korean J of Pharmacognosy, Vol,21 No,3 [1990] 1990;21(3):255-6.
55. Schwartz DA, Thorne PS, Jagielo PJ, White GE, Bleur SA, Frees KL, Endotoxin responsiveness and grain dust-induced inflammation in the lower respiratory tract, American Journal of Physiology 1994;267:609-17.
56. Rothenberg ME, N Engl J Med, 1998; 338:1592-600.
57. Paolo S, Carmela DS, Ilaria M, Sara C, Luigi D, Giovanna G, Derangement of immune responses by myeloid suppressor cell, Cancer Immunol Immunother, 2004;53:64-7.
58. Schwartz RS, A new element in the mechanism of asthma, N Engl J Med, 2002;346:857-8.
59. Renz H, Bradley K, Gelfand EW, Production of IL-4 and IFN- $\gamma$  by TCR-V $\beta$ -expressing T-cell subsets in allergen-sensitized mice, Am J Respir Cell Mol Biol, 1996;14:36-43.
60. Levitt RC, McLane MP, MacDonald D, et al, IL-9 pathway in asthma: new therapeutic targets for allergic inflammatory disorders, J, allergy Clin, Immunol, 1999;103:s485-91.
61. Choi JH, Park SW, Jang AS, Lee JH, Kim DJ, Park JS, et al, IL-13 And IL-5 in Induced Sputum in Patients with Eosinophilic Bronchitis and Asthma: an Association with Airway Hyperresponsiveness, J Allergy Clin Immunol, 2006;26(4):302-9.
62. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG, Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens, N Engl J Med, 1989;320:271-7.
63. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD, Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children, N Engl J Med, 1991; 325:1067-71.

64. Saito SY, Maruyama Y, Kamiyama S, Nakahata N, Ohizumi Y. Ephedrae herba in Mao-Bushi-Saishin-To inhibits IgE-mediated histamine release and increases cAMP content in RBL-2H3 cells. J Pharmacol Sci, 2004;95(1):41-6.
65. Yoshiki I, Akira I, Sakae A, Atsuchi I, Yasuhiro K, Eiichi F. Anti-type I Allergic Mechanisms of *Mao-bushi-saisahin-to* in Mice. Jpn. J. Pharmacol, 2000;82:29-33.