

택사와 alisol B acetate의 병용 투여가 천식 동물 모델에 미치는 영향

박미준*, 허준이*, 권민정, 한창우
부산대학교 한의학전문대학원

Anti-asthmatic Effect of Alismatis Rhizoma and Alisol Acetate B Combination Therapy in a Murine Asthma Model

Mi-jun Park*, June-yi Heo*, Min-jung Kwun, Chang-woo Han
School of Korean Medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives: The aim of the study was to evaluate the anti-asthmatic effect of alismatis rhizoma and alisol acetate B combination therapy in a murine asthma model.

Methods: C57BL/6 mice were sensitized to and challenged with a mixture of ragweed, dust mite, and aspergillus to induce an asthma animal model. Alismatis rhizoma extract and alisol acetate B combination therapy was co-administered only in the experimental group. To evaluate the anti-asthmatic effect of the combination therapy, inflammatory cell counts in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were determined, and tissue was examined histologically with hematoxylin and eosin (H & E) and periodic acid-Schiff (PAS) stains, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgE, IL-4, and IL-5, and with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of IL-5, IL-33, MUC5AC.

Results: Alismatis rhizoma and alisol acetate B combination therapy reduced the number of inflammatory cells, alleviated histologic features, and down-regulated all the investigated asthma mediators, IgE, IL-4, IL-5, IL-33, and MUC5AC.

Conclusions: According to the above results, alismatis rhizoma and alisol acetate B combination therapy may have therapeutic potential for asthma.

Key words: Alismatis rhizoma (*Alisma orientale*), alisol acetate B, asthma

1. 서론

천식은 여러 면역 세포들과 다양한 매개 인자들이 복합적으로 관여하는 기도의 만성 염증 질환으로, 임상적으로는 반복적 호흡곤란과 천명음을 특징으로 한다¹. 가역적 기도 폐쇄, 기도 과민성, 점액 분비 증가, 및 기도 만성 염증을 특징으로 하며, 점진적 기도 개형(airway remodeling)이 동반된다².

최근 수십 년 동안 천식의 유병률은 지속적으로 증가해왔으며³, 2015년 기준 전 세계인구의 약 5%

· 투고일: 2017.09.15, 심사일: 2017.12.24, 게재확정일: 2017.12.28
· 교신저자: 한창우 경상남도 양산시 물금읍 금오로20
부산대학교교한방병원 한의약임상연구센터 418호
TEL: 055-360-5957 FAX: 050-4181-6118
E-mail: hancw320@pusan.ac.kr

· *These authors contributed equally to this work.

· This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (NRF-2014R1A1A1006076).

에 해당하는 358,000,000명이 천식에 이환되어 있었고, 397,000명이 천식으로 사망하였다⁴⁵. 한국에서의 유병률은 2015년 기준 19세 이상 전체 국민에서는 3.1%, 65세 이상 고령 인구에서는 4.5%이다⁶.

천식환자에서는 기관지확장제를 사용하여 기도 수축에 의한 호흡곤란을 완화시키고, 글루코코르티코이드를 사용하여 기도의 염증 상태를 개선시킨다⁷. 글루코코르티코이드는 천식 발작을 줄이고, 기도 과민성을 완화시키며, 기도의 비가역적 변화에 대한 예방 효과가 있으나, 그 효과가 모든 환자에서 나타나는 것은 아니다⁸. 또한, 글루코코르티코이드는 감염, 골다공증, 위궤양, 체간비만, 고혈압, 당뇨, 백내장, 우울, 근위근병증, 자반 등의 부작용이 동반될 수 있는 문제점이 있다⁹. 따라서, 이러한 기존 치료법을 보완할 수 있는, 보다 안전하고 효과적인 새로운 치료제의 개발이 필요한 상황이며, 이와 관련된 많은 관련 연구가 현재 진행되고 있다^{7,10}.

택사는 3세기 이전부터 한약재로 사용되어 왔으며, 小便不利, 水腫, 淋病, 濕瀉, 停飲眩暈, 및 遺精 등 다양한 질병의 치료에 사용되어 왔다¹¹. 최근 연구를 통해서서는 항균¹², 항산화¹³, 항염증¹⁴ 및 항알레르기 작용¹⁵이 있으며, 특히 lipopolysaccharide를 처리한 마우스에서 급성 폐손상을 완화시켜주는 효능도 보고된 바 있다¹⁶. Alisol acetate B는 택사의 지표 성분으로¹⁷, 택사와 유사한 항알레르기 작용이 확인된 바 있고¹⁸, 다양한 염증 및 대사 조절에 관여하는 pregnane X receptor에 작용하는 것으로 알려져 있다¹⁹.

본 연구에서는 혼합 알러젠으로 유발한 천식 동물 모델에서, 보다 명확한 항염증 및 항알레르기 작용을 관찰하고자 택사와 alisol acetate B를 함께 투여하고, 폐조직의 병리 소견과 천식 매개 인자들의 변화를 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약(Material)

Alisol acetate B는 Biopurify Phytochemical Co. Ltd (Chengdu, Sichuan, China)로부터 구매하였다. 천식 유발 알러젠으로 사용한 ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*), dust mite (*Dermatophagoides farinae*), 및 aspergillus (*Aspergillus fumigatus*)는 Greer Laboratories (Lenoir, NC, US)로부터 구매하였고, Imject alum은 Pierce (Rockford, IL, US)로부터 구매하였다. Hematoxylin and eosin (H&E) stain에 사용된 Harris hematoxylin-II은 YD Diagnostics CORP. (Yongin, Gyeonggi, Korea)로부터 구매하였고, Eosin Y는 Sigma-Aldrich Korea (Seoul, Korea)로부터 구매하였다. Periodic acid-Schiff (PAS) stain에 사용된 periodic acid solution, Schiff's reagent, 및 hematoxylin solution, Gill No. 3는 Sigma-Aldrich Korea (Seoul, Korea)로부터 구매하였다. Mouse IgE ELISA kit는 BD Biosciences (San Diego, CA, US)로부터 구매하였다. Mouse interleukin 4 (IL-4) ELISA kit와 mouse interleukin 5 (IL-5) ELISA kit는 Cusabio Biotech Co., Ltd (College Park, MD, US)로부터 구매하였다.

2. 택사 에탄올 추출물(ethanol extract of *Alismatis rhizoma*, EEAR) 제조

한약재로서의 택사는 질경이 택사(*Alisma orientale* Juzepzuk)의 덩이줄기 부분으로서, 본 실험에서는 음니허브(Yeongcheon, Gyeongbuk, Korea)로부터 구매한 국내산 택사를 사용하였다. 약재를 가루로 분쇄한 다음, 200 g을 1,000 mL의 80% 에탄올에 넣고 60 °C에서 8시간 동안 추출하였다. 0.2 µm 필터로 여과한 다음, 감압농축 후 동결건조하여 36 g의 추출물을 얻었다.

3. 천식 동물 모델(asthma animal model)

실험 동물은 7주령의 specific pathogen-free (SPF) C57BL/6 수컷 마우스들을 Samtaco Bio Korea,

Ltd.(Osan, Korea)로부터 구입하였다. 실험 동물을 5개의 그룹으로, 그룹 당 5마리씩 무작위 배정하였고, 표준 실험 케이지에서 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 첫 번째 그룹은 비교를 위해 아무런 처치를 하지 않았다. 두 번째 그룹은 EEAR 30 mg/kg과 Alisol acetate B 10^{-5} M만을 투여하였다. 세 번째 그룹은 ragweed, dust mite 및 aspergillus 혼합물을 이용하여 천식 상태를 유발하였다. 네 번째 그룹은 천식 상태를 유발하면서, EEAR 30 mg/kg과 Alisol acetate B 10^{-6} M을 함께 투여하였다. 다섯 번째 그룹은 천식 상태를 유발하면서, EEAR 30 mg/kg과 Alisol acetate B 10^{-5} M을 함께 투여하였다.

C57BL/6 마우스에 ragweed, dust mite, 및 aspergillus 혼합물을 이용하여 천식 상태를 유발하는 방법과 약물을 투여하는 방법은 다음과 같다. 우선, 실험 첫날과 여섯째 날에 ragweed 50 µg, dust mite 5 µg, 및 aspergillus 5 µg을 PBS 100 µl에 녹여, Imject alum 100 µl와 함께 복강 내 주입함으로써 항원에 대한 감각을 유도하였다. 실험 13, 14, 15일째 날에는 Zoletil(Virbac, Carros cedex, France)과 Rompun(Bayer Korea, Seoul, Korea)을 함께 복강 내 주입하여(1:1 ratio, 1.2 ml/kg body weight) 마취 상태를 유도한 다음, ragweed 50 µg, dust mite 5 µg, 및 aspergillus 5 µg을 PBS 25 µl에 녹여 micro-spray(Model IA-1C, Penn-Century Inc., USA)를 이용하여 기도 내 분무함으로써 천식 상태를 발현시켰다. EEAR와 Alisol acetate B를 투여하는 그룹에서는 실험 12, 13, 14, 15일째 날에 정해진 용량의 EEAR와 Alisol acetate B를 항원을 투입하는 방법과 동일한 방법으로 기도 내 투입하였고, 항원 투여가 함께 이루어지는 날에는 항원 투입 2시간 후 투여하였다. 16일째 날에 CO₂ 가스로 안락사시킨 후 필요한 검사를 시행하였다. 모든 실험 과정은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻었으며, 해당 규정을 준수하였다.

4. Bronchoalveolar lavage(BAL) fluid 채취 및 세포 수 측정

Tracheostomy를 시행한 후 24-gauge intravascular catheter를 통해 기도 내로 PBS 1 ml를 주입하고 다시 흡입하는 과정을 2회 시행하여 BAL fluid를 채취하고, hemocytometer를 이용하여 BAL fluid에 포함된 총 세포 수를 측정하였다. 다음으로 BAL fluid를 cytopsin으로 침전시킨 다음 Hemacolor(Merck, Darmstadt, Germany)로 염색하고, 대식세포(macrophage), 호중구(neutrophil), 및 호산구(eosinophil) 수를 각각 측정하였다.

5. 조직검사 방법(Histological assessment)

Bronchoalveolar lavage(BAL) fluid 채취 후, 10% formalin으로 고정하고, paraffin을 침투시켜 포매(embedding)하였다. 포매된 폐조직은 5 µm 두께로 절편한 후 Hematoxylin and eosin(H&E) stain 및 Periodic acid-Schiff(PAS) stain을 시행하였다. 염색 방법은 시약에 첨부된 프로토콜을 따랐으며, 요약하면 다음과 같다. H&E stain의 경우 deparaffinization 및 hydration 과정을 거친 후, 현미경으로 염색 정도를 확인하면서 Harris hematoxylin-II 용액에 2초 담근 후 세척하는 과정을 반복하였다. 이어서 Eosin Y 용액에서 1분간 염색하고 세척한 다음, 탈수 및 xylene 처리 후 슬라이드에 mounting 하였다. Periodic acid-Schiff(PAS) stain의 경우 deparaffinization 및 hydration 과정을 거친 후, 순차적으로 periodic acid solution에 5분간 처리 후 세척, Schiff's reagent에 15분간 처리 후 세척, 및 hematoxylin solution, Gill No. 3 90초간 처리 후 세척하고, 탈수 및 xylene 처리 후 슬라이드에 mounting 하였다.

6. 효소결합면역흡착측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

Allergen에 의한 asthma의 발현과 EEAR와 alisol acetate B에 의한 영향을 조사해보고자, ELISA로 IgE(in serum), IL-4(in lung tissue homogenate),

및 IL-5(in lung tissue homogenate)의 변화를 측정하였다.

Lung tissue homogenate 준비 과정은 다음과 같다. 우선 폐조직 100 mg을 PBS 1 ml에 넣고 homogenizer로 처리 후 -20 °C에서 하룻밤 동결시킨 후 해동시켰다. 동결과 해동 과정을 한 번 더 반복하여 세포막이 파괴되도록 한 다음 5,000×g, 4 °C에서 5분간 centrifuge하고, 상층액을 채취하여 사용하였다.

ELISA 과정은 각 kit, 즉 mouse IgE ELISA kit (catalog number: 555248), mouse interleukin 4(IL-4) ELISA kit(catalog number: CSB-E04634m), 및 mouse interleukin 5(IL-5) ELISA kit(catalog number: CSB-E04637m)에 첨부된 각각의 프로토콜을 따랐으며, 요약하면 다음과 같다. 96 well plate의 각 well에 측정하고자 하는 각 단백질의 capture Ab를 투입하여 코팅하고, 표준 용액 및 검체를 각 well에 투입하여 측정하고자 하는 단백질이 결합되도록 하였다. 다음으로 detection antibody와 enzyme reagent를 처리하여 labeling하고, stop solution을 처리한 다음, 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

7. 반정량적 역전사 중합효소반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

Asthma 관련 유전자들의 발현을 반정량적 RT-PCR을 통해 측정하였다. Total RNA 추출에는 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였다. 추출된 total RNA로부터 cDNA 합성에는 M-MLV Reverse Transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. 합성된 cDNA를 증폭하는데에는 TaqPCRx DNA Polymerase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel에서 전기영동 및 ethidium bromide 염색 후 자외선으로 band를 확인하였다. 증폭 시 사용된 유전자

각각의 primer(Bioneer, Daejeon, Korea)는 다음과 같다. MUC5AC는 5'-TGA TCA TCC AGC AGC AGG GCT-3' 및 5'-CCG AGC TCA GAG GAC ATA TGG G-3'; IL-33은 5'-AGA GAT CCT TGC TTG GCA GT-3' 및 5'-AGC ACC TGG TCT TGC TCT TG-3'; IL-5는 5'-GAC CTT GAC ACA GCT GTC CG-3' 및 5'-AAT CCA GGA ACT GCC TCG TC-3'; GAPDH는 5'-GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT-3' 및 5'-GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT-3' 이다.

8. 통계 분석 방법

통계 분석에는 IBM SPSS statistics 23K(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 각각의 측정값은 평균±표준오차로 환산하여 그래프에 표기하였다. 그룹 간 평균값 비교에는 Student's t-test와 One-way analysis of variance(ANOVA) test를 이용하였으며, 통계적 유의성의 기준은 $P < 0.05$ 인 경우로 하였다.

III. 결 과

1. 택사추출물(EEAR)과 alisol acetate B 병용 투여에 의한 염증 세포 수의 변화

실험에 사용된 마우스들의 BAL fluid에서 염증 세포 수 변화를 조사하였다. Ragweed, dust mite 및 aspergillus 혼합물을 투입하여 천식 상태를 유도한 마우스들의 BAL fluid에서 총 염증 세포 수의 증가가 확인되었다. 알러젠 혼합물과 함께 EEAR와 alisol acetate B를 함께 투여한 마우스들에서는 총 염증 세포 수의 증가가 통계적으로 의미 있게 억제되었다(Fig. 1A). 특히, 염증 세포 중 대식세포와 호산구의 감소가 뚜렷하였다(Fig. 1B).

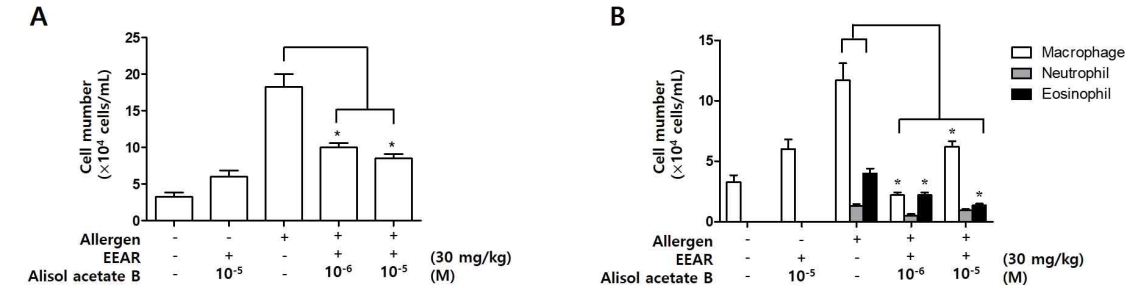


Fig. 1. Inflammatory cell count in BAL fluid.

Total (A) and differential (B) cell count were done. Data are presented as the mean \pm SEM of 5 mice per group. * means $P < 0.05$, compared to the allergen treated group (the 3rd bar).

2. 택사추출물(EEAR)과 alisol acetate B 병용 투여에 의한 폐조직의 변화

실험에 사용된 마우스 폐조직의 변화를 관찰하기 위해, Hematoxylin and eosin(H&E) stain 및 Periodic acid - Schiff(PAS) stain을 시행하였다. 폐조직에 H&E stain을 시행하고 관찰한 결과, 혼합 알러젠을 투여한 마우스들의 폐조직에서 뚜렷한 염증세포 침윤을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2 C), EEAR와 alisol acetate B를 함께 투여한 마우스들

의 폐조직에서는 염증세포 침윤이 완화됨을 시각적으로 확인할 수 있었다(Fig. 2 D, E). 폐조직에 PAS stain을 시행하고 관찰한 결과, 혼합 알러젠을 투여한 마우스들의 세기관지에서 술잔세포(goblet cell)의 비후와 점액이 증가한 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 3 C), EEAR와 alisol acetate B를 함께 투여한 마우스들에서는 술잔세포(goblet cell)의 비후 정도가 완화되고 세기관지내 점액이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3 D, E).

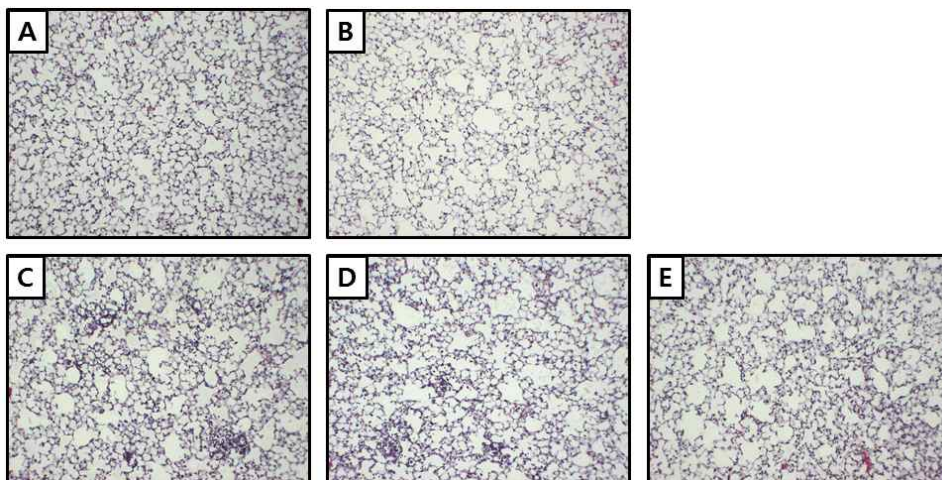


Fig. 2. H&E stain of lung tissue.

Each tissue was harvested from no treatment group (A), EEAR 30 mg/kg+Alisol acetate B 10^{-5} M treated group (B), allergen treated group (C), allergen+EEAR 30 mg/kg+Alisol acetate B 10^{-6} M treated group (D), and allergen+EEAR 30 mg/kg+Alisol acetate B 10^{-5} M treated group (E), magnification 100x

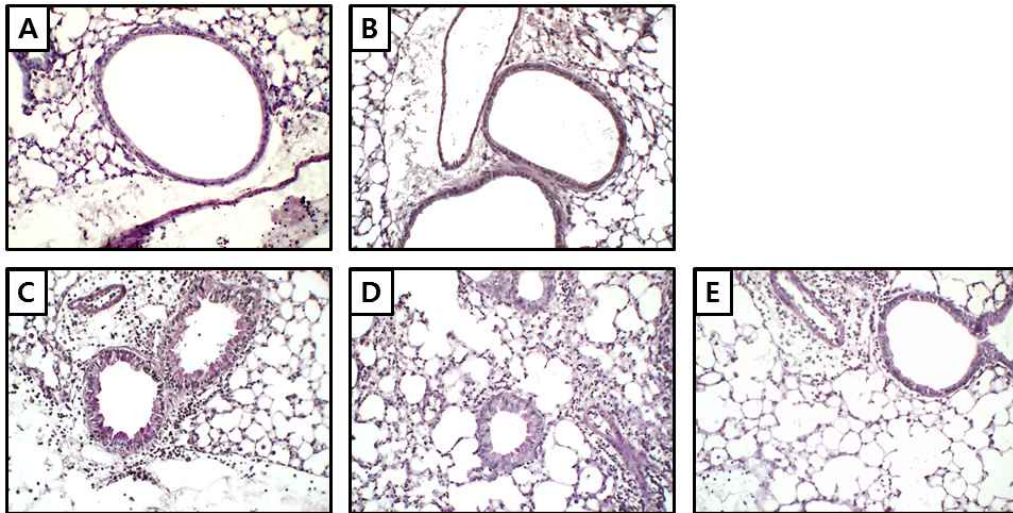


Fig. 3. PAS stain of lung tissue.

Each tissue was harvested from no treatment group (A), EEAR 30 mg/kg+Alisol acetate B 10^{-5} M treated group (B), allergen treated group (C), allergen+EEAR 30 mg/kg+Alisol acetate B 10^{-6} M treated group (D), and allergen+EEAR 30 mg/kg+Alisol acetate B 10^{-5} M treated group (E), magnification 200x

3. 텍사추출물(EEAR)과 alisol acetate B 병용 투여에 의한 혈청 IgE의 변화

실험에 사용된 마우스들에서 혈청 IgE의 변화를 효소결합면역흡착측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 통해 측정하였다. 혼합 알러젠을 투여한 마우스들의 혈청에서 IgE의 뚜렷한 증가가 관찰되었으며, EEAR와 alisol acetate B를 함께 투여한 마우스들에서는 IgE의 증가가 통계적으로 의미 있게 억제되었다(Fig. 4).

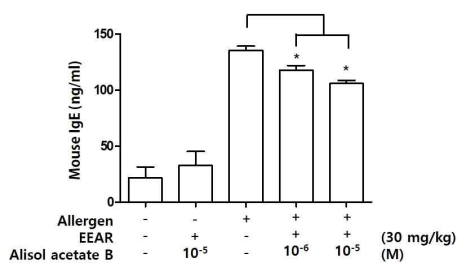


Fig. 4. IgE measurement in serum.

Serum IgE was measured with Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data are presented

as the mean±SEM of 5 mice per group.

* means $P < 0.05$, compared to the allergen treated group (the 3rd bar).

4. 텍사추출물(EEAR)과 alisol acetate B 병용 투여에 의한 IL-4, IL-5, IL-33, 및 MUC5AC의 변화

실험에 사용된 마우스 폐조직에서 천식 매개 인자들로 알려져 있는 IL-4, IL-5, IL-33, 및 MUC5AC의 변화를 관찰하였다. ELISA를 통해 IL-4, IL-5 단백질 발현 정도를 측정하였고, 반정량적 역전사 중합효소반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용하여 IL-5, IL-33, 및 MUC5AC의 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 혼합 알러젠을 투여한 마우스 폐조직에서는, IL-4, IL-5 단백질 발현량이 뚜렷하게 증가하였고 IL-5, IL-33, 및 MUC5AC의 mRNA 밴드도 명확히 관찰되었다. EEAR와 alisol acetate B를 함께 투여한 마우스 폐조직에서는 혼합 알러젠에 의한 IL-4, IL-5 증가가 통계적으로 의미 있게 완화되었고(Fig. 5), IL-5, IL-33, 및 MUC5AC의 mRNA 감소도 시각적으로

확인할 수 있었다(Fig. 6).

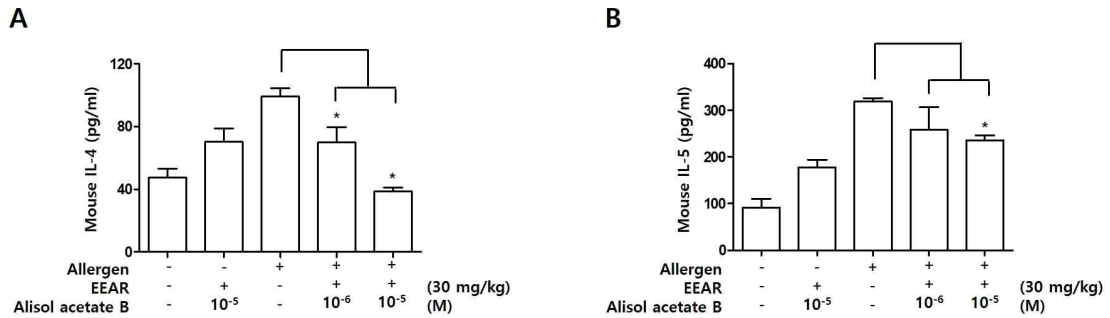


Fig. 5. IL-4 and IL-5 measurement in lung tissue.

IL-4 (A) and IL-5 (B) in lung tissue were measured with Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data are presented as the mean±SEM of 5 mice per group. * means $P<0.05$, compared to the allergen treated group (the 3rd bar).

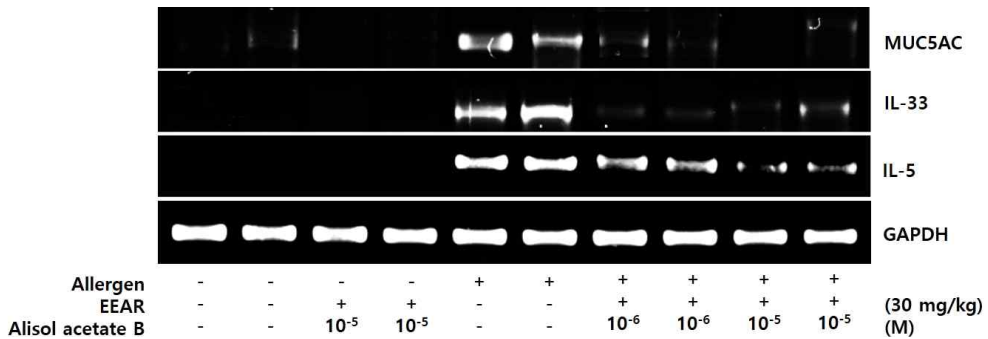


Fig. 6. Detection of IL-5, IL-33, and MUC5AC expression with RT-PCR.

The expression level of asthma related genes, IL-5, IL-33, and MUC5AC in lung tissue was measured by semi-quantitative RT-PCR. The relative expression level of each gene is proportional to the thickness of each band.

IV. 고찰

천식은 기도의 만성적 염증을 유발하는 과정에 다양한 인자들이 복합적으로 작용하는 특징이 있어, 발현되는 임상 양상도 변화의 폭이 크다²⁰. 발병 연령, 천식 발작의 빈도, 기도 제한의 정도, 및 치료에 대한 반응도에 차이가 있고²⁰, 유발 항원에도 차이가 있으며, 생리나 운동과 같은 신체적 변화가 유발 요인이 되기도 한다²¹. 조직학적으로는

호산구의 침윤이 뚜렷하게 나타나는 편이지만, 호중구나 과립구의 침윤이 두드러지기도 한다²².

이러한 질환 특성으로 인해, 천식의 병리 기전과 증상 특징들을 동물 실험 모델에서 구현하는 데에는 여러 가지 어려움이 따른다²³. 현재 사용되는 천식 동물 모델은 항원(allergen)의 종류, 감작(sensitization) 및 유발(challenge) 방법, 그리고 동물의 종류 등에 따라 다양한 방법이 있다²⁴. 실험동물로는 생쥐(mouse), 쥐(rat), 기니피그, 양, 개, 및 말 등에서 천식 증상을 유발할 수 있고²⁴, 항원으로는 난백알부민(ovalbumin),

집 먼지 진드기(house dust mite), 바퀴벌레(cockroach allergen), 돼지회충(*Ascaris suum*), 목화(cotton dust), 및 돼지풀(ragweed) 등을 사용할 수 있다²⁴. 생쥐는 많은 항원에 대해 쉽게 감각이 유발되고, 가격이 싸며, 천식 관련 인자를 검출하는 시약들이 잘 개발되어 있어 천식 동물 모델에 가장 널리 사용되고 있다²⁵. 유발 항원으로는 달걀흰자의 성분인 ovalbumin을 투여하는 방법이 가장 널리 사용되는데, 투여 경로, 투여 횟수, 투여 기간 등에 대해서는 매우 다양한 프로토콜이 있다²⁶.

한편, 단일 항원에 의해 유도된 실험 모델은 여러 항원에 의해 유발되는 인체 천식과는 차이가 있으며²⁷, 또한 단일 항원에 지속적으로 노출되는 경우에는 내성이 발생할 수도 있다²⁸. 이러한 이유로 복합 항원에 노출되는 실제 천식 발생 과정의 특징과 일정 시간이 지나도 항원에 대한 내성 없이 천식의 병리적 특징이 지속되는 동물 모델을 구현하고자, 본 실험에서는 C57BL/6 마우스에 항원으로 세 가지 물질, 즉 ragweed, dust mite, 및 aspergillus를 혼합하여 투여하여 천식을 유발하는 방법을 사용하였다²⁷.

천식은 기도의 염증성 질환으로, 천식 발현 과정에는 호산구, 림프구, 및 비만 세포 등의 염증세포들이 기도의 수축과 점액의 분비를 유발하는 여러 가지 cytokine 및 chemokine들을 분비한다²⁹. 림프구의 하나인 Th2 cell은 천식 및 알레르기 반응을 매개하는 주요 면역 세포로서 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 및 IL-13 등을 분비하여, 호산구, 호염구, 비만 세포, B cell, 및 CD4+ T cell 등의 작용을 촉발한다³⁰. Immunoglobulin E(IgE)는 B cell에서 분비되는 항체의 하나로, 천식 발현 과정에서 호염구로부터 IL-4, IL-13, 및 그 밖의 염증 매개 인자들의 분비를 유발하고, 비만세포로부터 histamine, serotonin, 및 leukotriene 등의 화학전달 물질이 방출되도록 한다³¹. IL-4는 Th2 cell의 분화를 촉진하기도 하며, Th2 cell에서 분비되어 B cell의 IgE을 생산을 유발한다³². IL-5는 호산구의 분화, 성숙, 이동, 및 생존

을 유도한다³³. IL-33은 항원에 반응하여 기도 내피 세포에서 분비되어 Th2 cell의 증식과 분화를 유도하고, B cell로부터 항체 생산을 촉진하고, 호산구, 호염구, 비만세포, 및 CD4+ T cell를 활성화시킨다³⁴. 천식에서 과다 분비되는 병적 점액의 유전자인 MUC5AC는 기도 과민성에도 관여하는 것으로 알려져 있다³⁵. 본 실험에서는 텍사추출물과 alisol acetate B의 병용 투여가 천식 동물 모델에서 폐조직의 염증과 기도 내 점액분비를 완화시켰으며, 이러한 효과가 천식을 매개하는 IgE, IL-4, IL-5, IL-33, 및 MUC5AC의 발현을 감소시켰으므로 유도되었음을 확인할 수 있었다.

앞서 기술한 바와 같이 최근 연구들에서 텍사는 항균¹², 항산화¹³, 항염증¹⁴ 및 항알레르기¹⁵, 및 급성 폐손상 완화 작용¹⁶이 확인된 바 있고, alisol acetate B는 텍사의 지표 성분으로¹⁷, 항알레르기¹⁸, 항염증 작용이 보고된 바 있다¹⁹. 본 연구에서는 이러한 기존 연구 결과들에 착안하여, 천식 동물 모델에서 텍사와 alisol acetate B가 각각 일정 정도의 효능이 확인될 것으로 가정하고 연구를 시작하였다. 그러나 실험 결과 텍사 또는 alisol acetate B 단일 투여로 뚜렷한 효능이 관찰되지 않았으며(각각 투여시의 실험 데이터는 본 논문에 제시되지 않았음), 함께 투여한 경우에서만 상기한 효능이 관찰되었다. 이러한 결과에 대해 현재로서는 명확한 이유를 설명할 수는 없지만 가능한 가설을 제시하자면, 우선 천식에 대한 치료 효과를 얻기 위해서는 본 실험에 사용된 텍사에 함유된 것 이상의 고농도의 alisol acetate B가 필요한 것으로 추정되며, 그렇기 때문에 텍사만으로는 효능이 나타나지 않은 것으로 생각된다. 다음으로 alisol acetate B의 작용을 위해서는 최소한 하나 이상의 다른 텍사 성분이 필요한 것으로 추정되며, 그렇기 때문에 alisol acetate B만으로는 효능이 나타나지 않은 것으로 생각된다. 천연물의 특성 상 계절이나 산지에 따른 개별 성분의 함량 차이가 큰 점을 고려하면, 아마도 alisol acetate B의 함량이 보다 더 높은 약제를 사용하였

다면 텍사 단독 투여가 동일한 효과를 나타내었을 것으로 생각할 수 있다. 이러한 문제는 천연물을 이용한 실험들이 때때로 잘 재현되지 않는 문제들과 같은 맥락으로 판단되며, 향후 한약재 및 한약재의 약리 성분들에 대한 연구들과 함께 한약재 생산 과정에서 약리 성분들의 함량을 재고할 수 있는 방법들에 대한 연구도 이루어지기를 희망한다.

V. 결 론

본 연구에서는 C57BL/6 마우스에 ragweed, dust mite, 및 aspergillus 혼합 알러젠을 투여하여 유도한 천식 동물 모델에 텍사 에탄올 추출물과 텍사의 주요성분인 alisol acetate B을 함께 투여하고 관찰한 결과, (1) BAL fluid에서의 총염증세포, 대식세포, 및 호산구의 감소; (2) 조직검사 상 염증세포 침윤완화, 점액선 및 점액 감소; (3) 천식 매개 인자들인 IgE, IL-4, 및 IL-5 단백질의 감소; (4) 천식 매개 인자들인 IL-5, IL-33, 및 MUC5AC의 mRNA 감소를 확인하였다.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (NRF-2014R1A1A1006076).

참고문헌

1. Available from: <http://cdc.go.kr/CDC/contents/CdcKrContentView.jsp?menuIds=HOME001-MNU1132-MNU1147-MNU0746-MNU2424&cid=69117>
2. James AL, Bai TR, Mauad T, Abramson MJ, Dolhnikoff M, McKay KO, et al. Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *Eur Respir J* 2009; 34(5):1040-5.
3. Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OC, Sheikh A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy* 2010;65(2):152-67.
4. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388(10053):1545-602.
5. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;388(10053):1459-544.
6. Korea Health Statistics 2015: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-3). Available from: https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04_03.do?classType=7
7. McCracken JL, Veeranki SP, Ameredes BT, Calhoun WJ. Diagnosis and management of asthma in adults: a review. *JAMA* 2017;318(3):279-90.
8. Donnelly LE, Rogers DF. Novel targets and drugs in inflammatory lung disease. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8(3):219-21.
9. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Corticosteroid#Adverse_effects
10. Thomson NC. New and developing non-adrenoreceptor small molecule drugs for the treatment of asthma. *Expert Opin Pharmacother* 2017;18(3)

- :283-93.
11. Wu JN. An illustrated Chinese materia medica. New York: Oxford University Press: 2005, p. 706.
 12. Jin HG, Jin Q, Ryun Kim A, Choi H, Lee JH, Kim YS, et al. A new triterpenoid from *Alisma orientale* and their antibacterial effect. *Arch Pharm Res* 2012;35(11):1919-26.
 13. Han CW, Kang ES, Ham SA, Woo HJ, Lee JH, Seo HG. Antioxidative effects of *Alisma orientale* extract in palmitate-induced cellular injury. *Pharm Biol* 2012;50(10):1281-8.
 14. Dai Y, Hang B, Huang Z, Li P. Anti-inflammatory activities and effect of rhizoma *Alismatis* on immune system. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1991;16(10):622-5
 15. Kubo M, Matsuda H, Tomohiro N, Yoshikawa M. Studies on *Alismatis* rhizoma. I. Anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from *Alismatis* rhizoma (dried rhizome of *Alisma orientale*). *Biol Pharm Bull* 1997; 20(5):511-6.
 16. Kim KH, Kwun MJ, Choi JY, Ahn KS, Oh SR, Lee YG, et al. Therapeutic Effect of the Tuber of *Alisma orientale* on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:863892.
 17. Park JC, Hur JM, Kim SE. Isolation and quantitative analysis of alisol B 23-acetate from the rhizome of *Alisma orientale*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005;34(2):243-6.
 18. Lee JH, Kwon OS, Jin HG, Woo ER, Kim YS, Kim HP. The rhizomes of *Alisma orientale* and alisol derivatives inhibit allergic response and experimental atopic dermatitis. *Biol Pharm Bull* 2012;35(9):1581-7.
 19. Kanno Y, Yatsu T, Yamashita N, Zhao S, Li W, Imai M, et al. Alisol B 23-acetate from the rhizomes of *Alisma orientale* is a natural agonist of the human pregnane X receptor. *Phytomedicine* 2017;26:22-7.
 20. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006;368(9537):804-13.
 21. Hesselmar B, Enelund AC, Eriksson B, Padyukov L, Hanson LÅ, Aberg N. The heterogeneity of asthma phenotypes in children and young adults. *J Allergy (Cairo)* 2012;2012:163089.
 22. Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(5):559-65.
 23. Sagar S, Akbarshahi H, Uller L. Translational value of animal models of asthma: Challenges and promises. *Eur J Pharmacol* 2015;759:272-7.
 24. Kianmeher M, Ghorani V, Boskabady MH. Animal model of asthma, various methods and measured parameters: a methodological review. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2016;15(6): 445-65.
 25. Zosky G, Sly P. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 2007;37(7):973-88.
 26. Fuchs B, Braun A. Improved mouse models of allergy and allergic asthma-chances beyond ovalbumin. *Curr Drug Targets* 2008;9(6):495-502.
 27. Goplen N, Karim MZ, Liang Q, Gorska MM, Rozario S, Guo L, et al. Combined sensitization of mice to extracts of dust mite, ragweed, and *Aspergillus* species breaks through tolerance and establishes chronic features of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(4):925-32.
 28. Van Hove CL, Maes T, Joos GF, Tournoy KG. Prolonged inhaled allergen exposure can induce persistent tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36(5):573-84.

29. Nemeth K, Keane-Myers A, Brown JM, Metcalfe DD, Gorham JD, Bundoc VG, et al. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(12):5652-7.
30. Wan YY. GATA3: a master of many trades in immune regulation. *Trends Immunol* 2014; 35(6):233-42.
31. Novak N, Kraft S, Bieber T. IgE receptors. *Curr Opin Immunol* 2001;13(6):721-6.
32. Webb DC, Cai Y, Matthaei KI, Foster PS. Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4+ Th2 cell function. *J Immunol* 2007;178(1):219-27.
33. Leckie MJ. Anti-interleukin-5 monoclonal antibodies: preclinical and clinical evidence in asthma models. *Am J Respir Med* 2003;2(3):245-59.
34. Drake LY, Kita H. IL-33: biological properties, functions, and roles in airway disease. *Immunol Rev* 2017;278(1):173-84.
35. Evans CM, Raclawska DS, Ttofali F, Liptzin DR, Fletcher AA, Harper DN, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. *Nat Commun* 2015;6: 6281.