

加味貝母湯이 보조 T 임파구 분화에 미치는 영향

신재호¹ · 고은정¹ · 홍무창¹ · 정승기² · 신민규¹ · 배현수^{1,3*}

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 3: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

Effect of Gamipaemo-tang Ethanol Extract on Helper T Cell Differentiation

Jae-ho Shin¹, Eun jung Ko¹, Moo chang Hong¹, Seung Gi Jung², Mink yu Shin¹, Hyun su Bae^{1,3*}

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, KyungHee University, 2: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, 3: Purimed R&D Institute

By recently study, GM (Gamipaemo-tang) treatment have worked well on the allergic asthma. The purpose of this study was effect of GM extract on helper T cell, major regulator of immune system. Splenic cells from 8-week BALB/c mice were cultured in GM containing media without activation for 48 hours. The MTS assay and flow cytometry study revealed that lymphocyte treated with GM were not effective on CD4+ T cells. Subsequently CD4+ T cells were isolated and cultured in GM containing media. Either GM were not effective on CD4+ T cell without APCs. By FACS scan analysis, the expression of INF- γ , IL-4 were down-regulated in the condition skewed Th1 and Th2 cells respectively. Using ELISA analysis, the expression of INF- γ is up-regulated and IL-4 is down-regulated in the condition skewed Th1, Th2 cells respectively. With RT-PCR analysis, the expression of mRNA for INF- γ is down-regulated and IL-4 is down-regulated in the condition skewed Th1 and Th2 cells respectively. The result suggests that GM inhibited the differetiation of Th2 cells significantly and indicates GM could enhance anti-allergic immune system.

Key words : Gamipaemo-tang, asthma, allergy, CD4+ T cell, Th1 cell, Th2 cell, Cytokine, RT-PCR, ELISA, anti-allergic effect

서 론

알려지성 喘息 (이하 喘息)은 여러 자극에 대한 기도의 과민 반응과 가역적인 기도폐색의 증상 및 기도의 염증성 반응을 나타내는 질환으로 정의된다¹⁾. 최근에는 전 세계적으로 소아 및 성인에서 그 유병률이 증가²⁾하고 있고, 특히 소아에서 입원율과 사망률이 증가한다는 보고³⁾가 있어 의학계의 많은 관심과 연구가 진행되고 있다.

韓醫學에서는 喘息을 呼吸促急, 喉中有聲響의 증상을 나타내는 哮喘, 哮喘의 범주에 속하는 질환으로 인식하고 있다⁴⁾. 葛 등⁵⁾은 문헌적으로 수많은 醫家들의 喘息에 대한 고찰을 정리하여 보고한 바 있으며, 임상적으로도 喘息의 치료에 유의한 많은 처방들이 보고되어 있다^{6,7)}.

이에 관련된 연구로는 定喘湯⁸⁾, 麥門冬湯⁹⁾, 小青龍湯¹⁰⁾, 清上

補下湯¹¹⁾, 加味解表二陳湯¹²⁾, 加味蘇子降氣湯¹³⁾으로 喘息 유발 실험동물에서의 이상호흡수 및 호산구 침윤의 감소에 유의성이 인정된 보고가 있고, 小青龍湯¹⁴⁾, 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯¹⁵⁾, 蒼耳子¹⁶⁾, 桑白皮¹⁷⁾가 면역세포인 CD4⁺ T cell을 선택적으로 억제하고 혈청 IgE를 감소시킴을 확인한 報告가 있다.

최근 西洋醫學에서는 喘息의 발생기전 및 치료에 대한 연구에 분자생물학적 방법을 도입하여 cytokine으로 염증반응이나 세포 단계에서의 조직손상 및 치유과정을 설명하고 있는데^{18,19)}, 이러한 특정 cytokine은 다시 Th1/Th2 분화발달에 중요한 역할을 하게되며, Th1 cell이 과도하게 많아지면 류마티스 관절염, 루푸스 등의 자가면역질환이 발생하고, Th2 cell이 과도하게 많아지면 기관지 천식, 알려지성 비염 등의 알려지 질환이 발생한다고 한다. 이러한 cytokine의 역할이 새로이 밝혀지면서 韓醫學에서도 哮喘에 임상적으로 효과가 인정된 處方과 개별 한약재를 이용하여 喘息에서 나타나는 기도염증반응에 관여하는 cytokine의 분비양상을 관찰한 연구가 활발하게 진행되고 있다²⁰⁻²⁸⁾. 그러나 기존의 논문들은 mast cell의 증식반응, histamine의 유리에 미치는 영향, IgE 생성량, T cell의 cytokine인 IL-4, IL-2, IFN- γ

* 교신저자 : 배현수, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : hbae@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0323

· 접수 : 2004/08/02 · 수정 : 2004/09/01 · 채택 : 2004/09/30

의 반응효과에 대한 연구를 중심으로 진행되었던 반면, 면역반응의 핵심적인 조절자인 helper T cell 자체에 대한 실험연구는 서등²⁹⁾의 小青龍湯에 대한 연구보고가 유일한 상태이다.

貝母散은 明代 王肯堂의 『證治準繩』³⁰⁾에 처음 수록된 이래 여러 醫書에 인용되어 왔다. 王肯堂은 “治暴發咳嗽 多日不愈”라고 하였고 許濂은 “治火嗽久嗽”³¹⁾라고 하였다. 加味貝母湯은 貝母散에 金銀花를 가미한 처방으로 金銀花의 항염증 효과³²⁾를 喘患 치료에 응용하고자 하였고, 황 등³³⁾의 보고에 의하면 喘患 환자의 肺 機能을 호전시키고 전체적인 삶의 질을 개선하는데 효과가 있는 것으로 확인되었다.

이에 저자는 加味貝母湯이 면역기능 조절자인 helper T cell 중 분화된 Th1/Th2 cell의 cytokine 분비상 Th2 cell의 특이적인 cytokine 억제에 관여함으로써 알러지 반응을 조절하는지 확인한 바 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c 암컷 생쥐이며 멸균 상태로 관리되어 온 것을 샴타코 코리아(주)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였으며 飲用水는 멸균처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 飲用水는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

2. 사료의 제조

본 실험에 사용된 加味貝母湯의 약재는 한국생약협회로부터 구입하여 엄선하고 3차 증류수로 세척하여 사용하였다. 각 약재는 Table 1에 표기된 비율로 혼합하여 총 800 g을 분말 한 후 sonicator (Branson, U.S.A.)를 이용하여 70% 에탄올로 추출하고 침전물을 다시 80%, 90%, 100% 에탄올에서 같은 방법으로 추출하였다. 수집된 추출액은 60℃에서 감압농축 후 동결건조하여 97.68 g (yield: 12.21%)의 분말 시료를 얻었다.

加味貝母湯 추출물은 실험 전에 3차 증류수에 녹여 0.22 μm syringe filter로 여과하여 사용하였다.

Table 1. Contents of GM (means ethanol extract of Gamipaemo-tang)

Herbal Medicine	Amount (g)
Lonicerae Flos (金銀花)	20
Ansu Semen (杏仁)	12
Farfarae Flos (款冬花)	8
Anemarrhena Asphodelodes (知母)	6
Fritulariae Roszema (貝母)	6
Mor. Cortex (桑白皮)	6
Maxmowczizae Fructus (五味子)	6
Glycyrrhizae Radix (甘草)	6
total amounts	70.0

3. Antibody와 medium

본 실험에서는 anti-CD3e (clone:145-2C11), anti-CD28 (clone:37.51), anti-mouse IL-4 (BVD4-1D11), anti-mouse IL-12

(C17.8), FITC-conjugated anti-CD4 antibody, recombinant mouse IL-4 (rIL-4), recombinant mouse IL-12 (rIL-12), (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, U.S.A.). Magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads, mouse IL-4 secretion assay detection kit, mouse IFN-γ secretion assay detection kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), OptEIA mouse IFN-γ set, OptEIA mouse IL-4 set (BD Biosciences Pharmingen) 등이 사용되었다. 본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% defined FBS (Hyclone, Logan, U.S.A.), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen Life Technologies, Rockville, U.S.A.) 10 mM HEPES, 11 mM sodium bicarbonate (JRH Biosciences, Lenexa, U.S.A.)가 포함된 RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies)를 사용하였다.

4. 비장 임파구 준비

적출한 BALB/c 생쥐의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer (BD Biosciences Pharmingen)로 걸러내었다. 균질화된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 5 ml PharM Lyse (BD Biosciences Pharmingen)를 넣고 5분간 반응시킨 후 cell이 부유되어 있는 tube에 5 ml의 media를 첨가한 후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 남은 세포침전물은 1 ml의 media에 부유시킨 후 trypan blue로 염색하여 세포수를 측정하였다.

5. CD4+ T cell 분리

비장임파구 1×10^7 cells이 들어있는 90 μl media에 10 μl의 magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads (Miltenyi Biotec)를 첨가하여 15분간 4℃에서 반응시켰다. 300 ×g 에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 5 ml의 media로 세척하였다. 남은 세포침전물에 2×10^5 cells/μl의 농도가 되도록 media를 넣고 resuspension하고 Ls separation column (Miltenyi Biotec)을 varioMACS separator (Miltenyi Biotec)에 장치한 후 3 ml의 buffer (PBS with 2 mM EDTA and 0.5% BSA)로 column을 통과시키고 세포부유액을 column 안으로 주입하였다. 세포부유액이 column을 통하여 빠져나가면 다시 2 ml의 buffer로 column을 3번 헹구어 낸 뒤 column을 separator에서 분리해 5 ml의 buffer를 넣고 plunger를 눌러서 CD4+ T cell을 분리하였다.

6. 생존률 및 증식능 측정

Mitogen으로 자극 받지 않은 비장 임파구의 생존율을 측정하기 위해 CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, U.S.A.)의 protocol를 이용하여 5.의 방법을 이용하여 CD4+ T cell을 분리 한 후 4×10^5 cells/ml의 농도로 100 μl씩 flat bottomed 96-well plate에 seeding하였다. CD4+ T cell이 seeding 된 plate에 加味貝母湯 에탄올 추출물을 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μg/ml 농도로 첨가하고 10 μg/ml anti-CD3e (clone:145-2C11, BD Biosciences Pharmingen)가 coating된 plate에서 2 μg/ml anti-CD28

(clone:37.51, BD Biosciences Pharmingen)로 costimulation하였다. 이상의 혼합물을 48시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator (Nuair, Plymouth, U.S.A.)에서 배양하였다.

7. CD4⁺ T cell을 Th1/Th2 cell로 분화

10 µg/ml anti-CD3e가 coating된 12-well plates에 CD4⁺ T cell을 2×10⁶ cells/ml의 농도로 seeding 후 2 µg/ml anti-CD28로 costimulation하였다. 加味貝母湯 추출물을 0, 1 ng/ml의 농도에서 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 Th1 cell plate는 50U rIL-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.)와 10 ng/ml rIL-12, 10 µg/ml anti-IL-4 (BD Biosciences Pharmingen)를 Th2 cell plate에는 50 U rIL-2와 10 ng/ml rIL-4, 10 µg/ml anti-IL-12 (BD Biosciences Pharmingen)를 첨가하고 3일 후에 1:2로 split하였다. 48시간 후 cell을 PBS로 세척한 후 10 µg/ml anti-CD3e와 2 µg/ml anti-CD28로 restimulation한 후 24시간 동안 배양하였다.

8. Secretion cytokine 측정

7.의 방법과 같이 분화한 cell을 harvest하기 위하여 wash buffer (PBS/0.5% BSA/2 mM EDTA) 2 ml로 300 ×g에서 5분간 원심분리한 후 wash buffer로 2번 washing하였다. cold medium으로 90 µl/10⁶cells 가 되도록 세포침전물을 resuspension 한 뒤 Catch Reagent (Miltenyi Biotec)를 20 µl/10⁶cells 첨가하고 4°C에서 5분간 incubation하고 warm medium으로 세포수가 1×10⁵이 되도록 희석하여 37°C에서 40분간 incubation 하였다. cold buffer 5 ml로 300 ×g에서 10분간 원심분리하여 washing하고 상층액을 제거한 뒤 cold buffer 90 µl/10⁶cells로 세포침전물을 resuspension하였다. 여기에 PE-conjugated Detection antibody, FITC-conjugated anti-CD4 antibody를 첨가한 후 4°C에서 10분간 incubation하고 cold wash buffer로 2번 washing한 뒤 FACScan (BD biosciences Becton Dickinson, Franklin Lakes, U.S.A.)으로 분석하였다.

9. ELISA를 이용한 Cytokine 발현량 측정

Flow cytometry에서와 같은 조건으로 분화한 Th1/Th2 cell의 상층액에서 IFN-γ, IL-4 발현량을 측정하기 위하여 OptEIA Mouse IFN-γ Set, OptEIA Mouse IL-4 Set (BD Biosciences Pharmingen)의 protocol을 이용하되 capture antibody (anti-mouse IFN-γ또는 IL-4)를 coating buffer (0.1 M carbonate, pH 9.5)로 희석하여 96-well plate에 100 µl 씩 분주한 후 4°C에 12시간 동안 coating 하였다. Coating한 plate를 wash buffer (PBS/Tween20, 0.05%)로 3번 세척한 후 Assay Diluent (BD Biosciences Pharmingen)를 200 µl/well 씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 다시 wash buffer로 3번 세척하고 Standard와 시료를 100 µl씩 분주한 후 실온에서 2시간 반응시켰다. Wash buffer로 5번 세척하고 Working Detector (Detection antibody + Avidin-HRP) 100 µl씩 각 well에 첨가한 후 실온에서 1시간 반응 뒤 wash buffer로 10번 세척한 후

Substrate Solution (TMB Substrate Reagent; BD Biosciences Pharmingen) set을 각 well 마다 100 µl씩 첨가하였다. 그 뒤 실온의 어두운 곳에서 30분 동안 반응 한 후 2 N H₂SO₄를 50 µl 첨가 한 후 30분 안에 Micropalte reader (Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)로 450 nm/570 nm에서 읽었다.

10. Real-time RT-PCR을 이용한 cytokine 발현 측정

1) Total RNA Isolation

상기 실험에서와 같은 조건으로 CD4⁺ T cell을 Th1/Th2 cell로 분화한 뒤 cell을 harvest하여 PBS로 세척하고 Trizol Solution (Invitrogen Life Technologies)을 이용, 제조사의 protocol에 준하여 total RNA를 분리하였다.

세포침전물은 pellet pestle을 이용하여 균질화하였다. 균질화된 용액에 500 µl의 Trizol Solution을 첨가하고 가볍게 vortex 한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100 µl의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4°C에서 12,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 250 µl의 Isopropanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4°C에서 12,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 침전물을 500 µl의 75% ethanol로 세척한 후 4°C에서 7,500 ×g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 건조하여 50 µl의 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Calbiochem, San Diego, U.S.A.) 처리 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectro photometer (DU500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, U.S.A.)를 이용하여 정량하였다.

2) cDNA의 합성

cDNA의 합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies)을 이용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시하였다. 2.5 µg의 total RNA에 1.1 µl의 10× DNase I Reaction buffer, 1 µl의 1 U/µl DNase I (Invitrogen Life Technologies)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11 µl이 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었는지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1 µl의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다. 10 µl의 반응액에 1 µl의 0.5 µg/µl Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies)를 첨가한 후 70°C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4 µl의 5× first strand buffer, 1 µl의 10 mM each dNTPs, 2 µl의 0.1 M Dithiothreitol, 1 µl의 200 U/µl M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5 µl의 40 U/µl RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies), 5.5 µl DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 µl로 만들고 37°C에서 60 분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72°C에서 15분간 배양하여 enzyme을 불활성화 하였다.

3) cDNA의 Real-time PCR 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 Real-time PCR을 실시하였다. 1 µl의 cDNA에 12.5 µl의 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems,

Warrington, U.K.), 각각 1.5 μl 의 5 μM sense, antisense primer (Genotech Co., Daejeon, Korea), 8.5 μl 의 증류수를 넣어 25 μl 가 되게 한 후 GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, U.K.)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 최초 denaturation한 후 95 $^{\circ}\text{C}$ 15초, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60초를 40 cycle 반복하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-4 (IL-4) 유전자의 primer sequence는 Table 2 와 같다.

cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification이 threshold에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으로 standard curve를 그려서 정량하였고, 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization하였다. PCR 반응의 종료 후 60~95 $^{\circ}\text{C}$ 사이에서의 온도별 signal을 측정하여 dissociation curve를 작성하였다.

Table 2. Sequences of primer used for real-time RT-PCR

Gene		Oligonucleotide sequence
GAPDH	R/V	5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'
	FW	5'- TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3'
IL-4	FW	5'- ACA GGA GAA GGG ACG CCA T -3'
	R/V	5'- GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA -3'
IFN- γ	FW	5'- TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA -3'
	R/V	5'- TGG CTC TCG AGG ATT TTC ATG -3'
i-bet	FW	5'- GCC AGG GAA CCG CTT ATA TG -3'
	R/V	5'- GAC GAT CAT CTG GGT CAC ATT -3'
GATA 3	FW	5'- GAA GGC ATC CAG ACC CGA AAC -3'
	R/V	5'- ACC CAT GGC GGT GAC CAT GC -3'

실험결과

1. 加味貝母湯 추출물이 분리된 CD4 $^{+}$ T cell의 생존에 미치는 영향
 加味貝母湯 추출물이 주변의 APC (antigen presenting cell)가 없이도 직접적으로 CD4 $^{+}$ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하여 위해 CD4 $^{+}$ T cell을 분리한 후 추출물을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4 $^{+}$ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 다만 anti-CD3 ϵ /anti-CD28 antibody로 activation시켰을 때에는 1 ng/ μl 에서 CD4 $^{+}$ T cell의 생존율이 증가되었다.

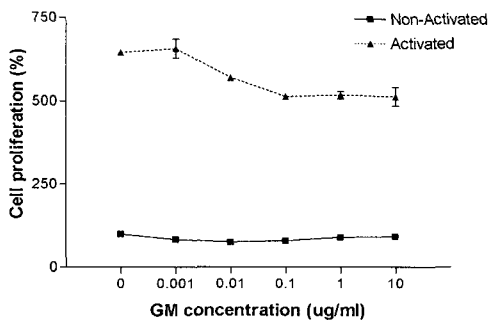


Fig. 1. Proliferation of CD4 $^{+}$ T cell in medium containing various concentration of GM extract after 48 hrs incubation. Sorted CD4 $^{+}$ T cells were treated with anti-CD3 ϵ /anti-CD28 antibodies to activate T cell, or not. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.V.

2. 加味貝母湯 추출물이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 secretion cytokine 발현량에 미치는 영향에 대한 Flow cytometry 측정

Naive CD4 $^{+}$ T cell에 加味貝母湯 추출물 1 ng/ μl 를 투여하고 50 U rIL-2, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-IL-4, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-IL-12, 10 ng/ μl rIL-12, 10 ng/ μl rIL-4을 이용하여 7일 동안 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization한 후 Th1/Th2 cell 그룹에서 분비되는 secretion cytokine 발현량을 flow cytometry로 확인한 결과, Th1 cell skewed 상황에서 IFN- γ 의 발현량이 3.9% 감소되었으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4의 발현량이 3.9% 감소된 것을 확인하였다 (Fig. 2).

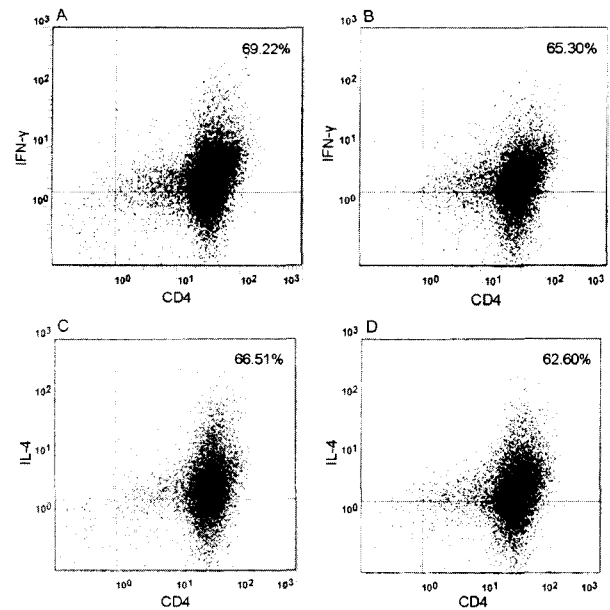


Fig. 2. Secretion cytokine expression of Th1 and Th2 cell polarized from Th0. Sorted CD4 $^{+}$ T cells were treated with rIL-12, rIL-4 antibodies to polarized CD4 $^{+}$ T cell for 7 days. Cells were stained with FITC-conjugated anti-IFN- γ , anti-IL-4 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A, C: Cells were incubated in medium without GM extract as control. B, D: Cells were incubated in medium containing 1 ng/ μl GM extract.

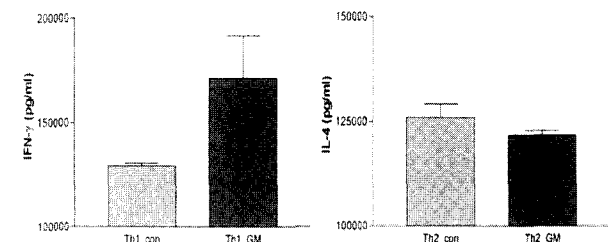


Fig. 3. Comparison of secreted cytokine from Th1 and Th2 cell. Sorted CD4 $^{+}$ T cells were treated with rIL-12, rIL-4 antibodies to polarized CD4 $^{+}$ T cell for 7 days. ELISA assay of the IFN- γ and IL-4 expression in polarizing condition on 7 days. Con: Cells were incubated in medium without GM extract as control. GM: Cells were incubated in medium containing 1 ng/ μl GM extract.

3. 加味貝母湯 추출물이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 cytokine 발현량에 미치는 영향에 대한 ELISA 측정

Naive CD4 $^{+}$ T cell에 加味貝母湯 추출물 1 ng/ μl 를 투여하고 50 U rIL-2, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-IL-4, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-IL-12, 10 ng/ μl rIL-12, 10 ng/ μl rIL-4을 이용하여 7일 동안 Th1 cell과 Th2 cell

로 분화 한 후 상층액에서 cytokine 발현량을 ELISA 방법을 이용하여 측정된 결과, Th1 cell skewed 상황에서 IFN- γ 의 발현량을 32% 증가시킨 반면 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4 발현량을 3% 감소시켰다.

4. 加味貝母湯 추출물이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 IFN- γ , IL-4, mRNA 발현량에 미치는 영향에 대한 RT-PCR 측정

加味貝母湯 추출물을 투여하여 7일 동안 배양한 Th1/Th2 cell에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 Real-time PCR함으로써 유전자의 발현량을 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 시료의 Ct 값을 기준으로 작성된 standard curve는 생략하였다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R2는 0.9966로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

2) IFN- γ

IFN- γ 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9928로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 시료별 IFN- γ 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 4). Th1 skewed 상황에서 加味貝母湯 추출물을 1 ng/ml 투여한 군이 대조군과 비교하여 13% 감소하였다.

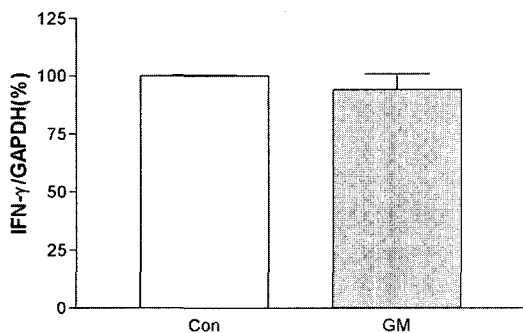


Fig. 4. Expression level of IFN- γ Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

3) IL-4

IL-4 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 보여주며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9992로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 시료별 IL-4 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 5). Th2 skewed 상황에서 加味貝母湯 추출물을 1 ng/ml 투

여한 군이 대조군과 비교하여 51% 감소하였다.

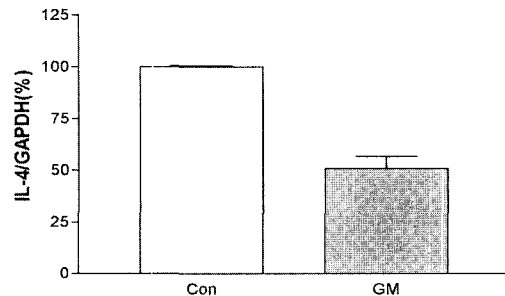


Fig. 5. Expression level of IL-4 Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

고찰

喘息은 가역적인 기도폐색과 기관지 과민성 및 만성적 기도의 염증질환으로 정의¹⁾된다. 알레르기성 염증반응에서 중요하게 세포는 T 림프구와 호산구로, T 림프구는 알러지성 염증반응의 양상을 결정하는 조정자의 역할을 담당하는데, 이러한 과민반응은 주로 T 림프구에서 방출하는 물질로서 다른 세포를 작용하게 하는 활성물질인 cytokine을 통해서 이루어지며, 활성화된 호산구에서는 여러가지 chemokine을 분비하여 기관지의 손상을 유도한다.

한 번도 항원에 감작되지 않은 naive CD4⁺ T cell이 항원에 의해 자극 받으면 다양한 cytokine을 분비, 활성화시키는데 관여하므로 helper T cell이라고 부르며, naive CD4⁺ T cell은 APC의 MHC I 혹은 II와 결합하여 Th1, Th2 림프구로 분화하는데, 분화된 cell type에 따라 cytokine 분비 양상도 다르다고 알려져 있다. Th1 림프구는 주로 IL-2, IFN- γ 를 분비, IgG 항체합성을 돕고 세포용해성 T 림프구인 CD8⁺ T cell 림프구 분화에 관여하며 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 한다. Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 분비하는데 IL-4는 B 림프구에 작용하여 IgE와 같이 티탄세포와 결합하는 항체 생산을 돕고, IL-3, IL-9는 비만세포를 증식시키는데 관여한다고 알려져 있다. 총괄하면 Th2 cell은 면역반응 후 즉시형 과민반응, 기관지 천식과 같은 알러지성 질환, 기생충 감염에 대한 방어작용에 관여함으로써 알러지와 밀접한 관계가 있다는 것이 밝혀졌다. 또한 Th1 cell과 Th2 cell에서 분비하는 각종 cytokine은 서로 길항작용을 하며 서로 억제한다는 것이 정설로 여겨지고 있다. 즉 자가면역질환과 밀접한 Th1 cell이 활성화되면 Th2를 억제하게 되고 알러지에 관련된 Th2가 활성화되면 Th1이 억제되는 것이다. 특히 IgE는 T cell 림프구의 항체전환에 의해 생성되는데, 항원에 의한 IgE 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2 림프구는 naive CD4⁺ T cell이 IL-4의 영향으로 allergen과 반응시 분화되고 이때 IgE 생성을 방해하는 IFN- γ 를 분비하는 Th1 림프구는 그 발달이 저해된다. 이러한 이론을 기반으로 Th1 cell의 급격하고 광범위한 수적 감소 및 활성 저하는 전신의 면역체계를 저하시켜 감염질환을 일으킬 수 있는 한편, Th2 cell의 과잉항진은 allergy 질환을 유발할 수 있다는 보고가 발표되었다³⁴⁻³⁶⁾. 특히 알러지와 관련

하여 살펴보면, Th2가 분비한 IL-4의 작용으로 B cell이 활성화되어 IgE를 생성하고 IgE는 항체와 결합하여 mast cell의 탈과립 현상이 발생, histamine, serotonin 등의 화학물질이 유리되어 평활근수축, 점액부종 및 혈관확장을 일으켜 기관지천식, 알러지성 비염 등의 질환을 일으키는 원인이 된다³⁴⁻³⁶)고 알려져 있다.

喘息과 관련된 한의학적 연구로는 定喘湯⁸⁾, 麥門冬湯⁹⁾, 小青龍湯¹⁰⁾, 清上補下湯¹¹⁾, 加味解表二陳湯¹²⁾, 加味蘇子降氣湯¹³⁾으로 喘息 유발 실험동물에서의 이상호흡수 및 호산구 침윤의 감소에 유의성이 인정된 보고가 있고, 小青龍湯¹⁴⁾, 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯¹⁵⁾, 蒼耳子¹⁶⁾, 桑白皮¹⁷⁾가 면역세포인 CD4⁺ T cell을 선택적으로 억제하고 혈청 IgE를 감소시킴을 확인한 보고가 있다.

이 외에도 기도과민증의 매개체로 알려진 histamine이나 metacholine 등에 초점을 둔 연구 및 肺, 氣道 내의 염증변화에 관한 연구는 많았으나, 천식이 allergy에 대한 면역반응으로 이해되면서 Th1과 Th2 cell의 기능에 관심이 집중됨에도 불구하고 한의학적 처방과 관련된 연구보고가 없어 본 연구는 喘息 치료에 이용되는 加味貝母湯이 Th1과 Th2 cell에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

貝母散은 明代 王肯堂의 『證治準繩』³⁰⁾에 처음 수록된 이래 朱震亨³⁷⁾, 李樅³⁸⁾, 許浚³¹⁾ 등의 醫書에 인용되어 왔다. 貝母散의 主治는 王肯堂은 “治暴發咳嗽 多日不愈”라고 하였고 許浚은 “治火嗽久嗽”라고 하였다. 火嗽란 소리는 있고 痰은 적으며 얼굴이 붉고 或 頰渴引飲하고 脈洪數한 것이고, 久嗽는 積痰이 오래 肺腕에 머물러 粘滯하여 阿膠와 같고 氣가 升降하지 않으면 濕과 酒를 껴서 이루어지는 것³¹⁾이라고 하였다.

본 연구를 수행하기 전에 加味貝母湯이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하는지 확인하고자 加味貝母湯을 농도별로 투여한 후 48시간 배양하여 세포 증식율을 측정할 결과 농도별 세포 증식율은 加味貝母湯을 투여하지 않은 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않는 것으로 확인 할 수 있었다. 이는 加味貝母湯이 mitogen으로서 비장 임파구를 자극하지 않는다는 것을 의미하는 것으로 이후 실험 결과에 의의를 갖게 하는 것이다. 한편 T cell specific mitogen인 anti-CD3e로 activation 했을 때는 加味貝母湯이 저농도에서는 T cell 증식을 다소 상승시키고 고농도에서는 저하시키는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. CD4⁺ T cell을 분리하여 Th1, Th2로 분화시킨 후 加味貝母湯 1 ng/ml을 투여하고 secretion cytokine의 분비량을 측정할 결과 IFN- γ 와 IL-4 모두 대조군에 비하여 감소하였다. 또한 CD4⁺ T cell을 rIL-2, rIL-12, rIL-4를 이용하여 5일 동안 배양하여 Th1, Th2 cell로 분화한 후, 상층액에서 ELISA를 이용하여 IFN- γ 와 IL-4 발현량을 측정할 결과 IFN- γ 는 증가하였으며, IL-4는 감소하는 경향을 보였다. 곧 IL-4의 감소는 加味貝母湯이 helper T cell의 Th2 cell로의 분화를 억제하는 것으로 이해할 수 있으며, 결국 Th2 cell 분화를 통한 알러지 반응에 대한 억제력을 가지고 있음을 입증한 것이라 하겠다. 그러나 IFN- γ 의 발현량에서 상반된 결과를 보인 것은 加味貝母湯이 정상 면역반응 과정에서 Th1 cell의 분화에 커다란 영향을 미치지 않은 결과라 유추할 수 있으며, 加味貝母湯의 Th1 cell 분화과정 및 cytokine의 분비에 미치는 영향에

대한 심도 있는 연구가 필요하다고 하겠다.

또한 Th1, Th2 cell에서 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 cytokine별로 Real-time RT-PCR을 시행한 결과 대조군에 비하여 IFN- γ 는 13%, IL-4는 51% 감소하는 경향을 보였다. 이는 상기 ELISA 실험 결과와 일치하는 결과로서 加味貝母湯이 Th2 cell 분화로 인한 알러지 반응에 중요한 조절능력이 있음을 RNA level에서 입증한 것이다.

이를 종합해 보면, 加味貝母湯이 Th2 cell 반응에 적극적으로 관여함으로써 알러지성 喘息의 염증반응을 억제하는 효능이 있음을 유추할 수 있다.

결론

加味貝母湯이 면역기능의 주된 역할을 하는 Helper T cell에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CD4⁺ T cell의 생존률과 cytokine 분비량을 secretion cytokine assay 및 ELISA를 통하여 알아보고, cytokine mRNA 발현량을 real-time RT-PCR을 통하여 측정할 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

加味貝母湯은 CD4⁺ T cell을 분리한 후 추출물을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4⁺ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 加味貝母湯이 Th1 cell과 Th2 cell로 분화 후 분비되는 secretion cytokine 발현량에 미치는 영향을 각각 Flow cytometry로 확인한 결과, Th1 cell skewed 상황에서 IFN- γ 의 발현량이 3.9% 감소되었으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4의 발현량이 3.9% 감소된 것을 확인하였다. 加味貝母湯이 Th1 cell과 Th2 cell로 분화 후 분비되는 secretion cytokine 발현량에 미치는 영향을 각각 ELISA로 확인한 결과, Th1 cell skewed 상황에서 IFN- γ 의 발현량을 32% 증가시킨 반면 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4 발현량을 3% 감소시켰다. 加味貝母湯은 real-time RT-PCR 결과 Th1 skewed 상황에서 대조군과 비교하여 IFN- γ 발현량을 13% 감소시켰으며, 동시에 Th2 skewed 상황에서 IL-4 발현량을 51% 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때, 加味貝母湯은 T cell의 면역능에 관여함에 있어 분화된 Th2 response를 억제하여 천식 등의 알러지 반응을 감소시키는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술 연구개발사업의 지원에 의한 것임 (00-PJ9-PG1-CO02-0003).

참고문헌

1. 한용철, 임상호흡기학, p.208, 일조각, 서울, 1995.
2. 홍수종, 천식의 역학조사에 관하여, 천식 및 알레르기, 22(1):64-66, 2002.
3. 이상일, 우리나라 어린이 청소년의 천식 유병률 변천과

- ISSAC 활동, 천식 및 알레르기 16(2):172-174, 1996.
4. 李珩九, 鄭昇杞, 東醫肺系內科學, pp.162-202, 아트동방, 서울, 1999.
 5. 吉村永星, 黃義玉, 鄭昇杞, 李珩九, 알레르기성喘息에 관한 文獻的 考察 (東西醫學의 비교 考察), 大韓韓醫學會誌 11(1):39-70, 1990.
 6. 吉村永星, 崔錫鳳, 鄭昇杞, 李珩九, 哮喘證에 관한 臨床的 研究, 大韓韓醫學會誌 8(2):32, 1987.
 7. 趙英敏, 李京機, 趙一賢, 車恩秀, 鄭熙才, 鄭昇杞, 李珩九, 哮喘證에 관한 臨床的 研究, 제19회 全國韓醫學 學術大會 發表 論文集 141-151, 1997.
 8. 王中權, 鄭昇杞, 定喘湯이 알레르기성 喘息의 호흡 樣相과 氣管粘膜炎의 好酸球浸潤에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 1999.
 9. 柳旭相, 李珩九, 麥門冬湯이 알레르기 喘息의 호흡 樣相과 氣管組織에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 1999.
 10. 趙英敏, 李珩九, 小青龍湯이 알레르기 喘息의 호흡 樣相과 氣管組織에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 1999.
 11. 李珩九, 鄭昇杞, 鄭熙才, 權赫星, 淸上補下湯이 알레르기 喘息의 呼吸樣相과 氣管粘膜炎의 好酸球變化에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集 22(1):203-215, 1999.
 12. 金玟秀, 朴東一, 加味解表二陳湯이 알레르기 喘息 白鼠의 呼吸樣相과 氣管組織에 미치는 影響, 동의생리병리학회지 16(3):557-562, 2002.
 13. 姜洛遠, 朴東一, 加味蘇子降氣湯이 알레르기 喘息의 呼吸樣相 및 氣管組織에 미치는 影響, 동의대학교 석사학위논문, 2001.
 14. 李俊雨, 李珩九, 小青龍湯이 알레르기 喘息 모델 흰쥐의 BALF 內 免疫細胞에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 2001.
 15. 金珍珠, 李珩九, 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 喘息 모델 흰쥐의 BALF 內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 影響, 경희대학교 박사학위논문, 2001.
 16. 李秉熙, 金光湖, 蒼耳子が 제1형 알레르기 喘息 모델 흰쥐의 BALF 內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 영향, 경희대학교 석사학위논문, 2002.
 17. 金大謙, 金光湖, 桑白皮가 제1형 알레르기 喘息 모델 흰쥐의 BALF 內 免疫細胞 및 血清 IgE에 미치는 영향, 경희대학교 석사학위논문, 2002.
 18. Carlos, A. G., Carlos, M. L., Conceisao, S. M., Alcinda, M. Cytokines and asthma, J Invest Allerg Clin 7(5):270-273, 1997.
 19. Griffiths-Johnson D. A., Collins P. D., Jose P. T. and Williams T. J. Animal models of asthma, role of chemokines, Method. Enzymol. 288:241-266, 1997.
 20. 金永佑, 鄭昇杞, 定喘湯과 淸上補下湯이 asthma model 內의 cytokine에 미치는 影響, 경희대학교 박사학위논문, 2001.
 21. 趙一賢, 鄭昇杞, 瀉白散이 喘息에 미치는 效能에 관한 分子生物學的 研究, 경희대학교 석사학위논문, 2001.
 22. 朱昌葉, 李珩九, 六味地黃湯合瀉白散과 桑白皮가 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA level에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 2001.
 23. 金東鎰, 李珩九, 五味子, 黃連이 BEAS-2B 人間 氣管支上皮細胞의 IL-6, IL-8, GM-CSF mRNA level에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 2001.
 24. 李同生, 鄭昇杞, 麥門冬과 五味子が Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 2000.
 25. 白東鎮, 鄭昇杞, 解表二陳湯加減方이 Asthma model 內의 Cytokine에 미치는 影響, 경희대학교 박사학위논문, 2000.
 26. 鄭旭, 鄭昇杞, 杏仁과 桔梗이 Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 2000.
 27. 車恩秀, 鄭昇杞, 小青龍湯이 Asthma model 內의 Cytokine에 미치는 影響, 경희대학교 박사학위논문, 2000.
 28. 許泰哲, 鄭昇杞, 瀉白散과 甘草가 Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響, 경희대학교 석사학위논문, 2000.
 29. 서영호, 배현수, 홍무창, 신민규, 소청룡탕이 helper T-cell의 활성화에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 16(4):693-700, 2002.
 30. 王肯堂, 六科準繩(二), p.171, 台北新文豐出版社, 1978.
 31. 許浚, 東醫寶鑑, p.711, pp.717-718, 南山堂, 서울, 2000.
 32. Tae J., Han S. W., Yoo J. Y., Kim J. A., Kang O. H., Baek O. S., Lim J. P., Kim D. K., Kim Y. H., Bae K. H. and Lee Y. M. Anti-inflammatory effect of Lonicera japonica in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. Clin Chim Acta. 330(1-2):165-171, 2003.
 33. 황우석, 이재성, 최준용, 정희재, 정승기, 이형구, 加味貝母湯은 實驗的 喘息에서 더 유효한가, 2003년도 대한한방내과학회 추계학술대회 초록집 49-58, 2003.
 34. Hultner L., Kolsch S., Stassen M., Kaspers U., Kremer J. P., Mailhammer R., Moeller J., Broszeit H. and Schmitt E. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. J. Immunol. 164(11):5556-5563, 2000.
 35. Abbas A. K., Lichtman A. H. and Pober J. S., Cellular and molecular immunology, pp.250-277, W.B. Saunders company, Philadelphia, 1997.
 36. Hogan S. P., Koskinen A., Matthaai K. L., Young I. G. and Foster P. S., Interleukin-5-producing CD4+ T cells plays a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity and lung damage in mice, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157(1):210-8, 1998.
 37. 朱震亨, 丹溪心法附錄, p.238, 대성문화사, 서울, 1982.
 38. 李梴, 編註 醫學入門, p.666, 대성문화사, 서울, 1994.