

감초가 천식모델 생쥐의 혈청내 Cytokine에 미치는 효과

곽상교 · 박양춘*

대전대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Gamcho on Cytokine Production in Asthma Model Mouse

Sang Kyo Kwak, Yang Chun Park*

Department of Oriental Medicine Daejeon University

This experiment was designed to investigate the effect of Gamcho(Glycyrrhiza uralensis Fisch, GLU) on Antiallergy in asthma. We measured IL-4, IL-5, IL-13, IgE in bronchoalveolar lavage fluid of ovalbumin induced asthmatic mouse and observed murine lung tissue. The results were obtained as follows: 1. GLU decreased the proliferation of IL-4, IL-5, IL-13, IgE significantly. According to the above results, it is suggested that GLU extract might be useful applied for prevention and treatment of allergic asthma.

Key words : Gamcho(Glycyrrhiza uralensis Fisch, 甘草), Antiallergy, asthmatic mouse, cytokine

서론

기관지 천식은 임상적으로 가역적인 기도폐쇄 증상을 보이면서, 병태생리학적으로 기도과민반응을 나타내고, 조직병리학적으로는 기도의 염증소견이 관찰되는 염증성 기도질환으로 정의되고 있다¹⁻². 기관지천식의 발병에는 여러 가지 위험인자들이 관여하고 있으며 경제성장에 따른 공업화, 도시화에 따라 실내생활의 확대, 대기오염의 증가, 흡연 인구의 증가 등에 의해 유발물질과 기여인자가 늘어남으로써 기관지천식의 유병률이 증가하고 있다³⁻⁵. 기관지천식은 한의학에서 呼吸急促하며 喉中有聲響한 증상을 나타내는 哮喘證의 범주에 속하는 질환으로 치료에 있어서는 實證과 虛證으로 나누어 치료하고 있다⁶.

甘草는 性味는 甘平하며 脾胃 肺經으로 歸經하고 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥의 效能이 있다⁶. 약리적으로 부신피질 호르몬양 작용, 항염증 및 항알레르기 작용, 소화계통에 대한 작용, 해독작용, 지질대사에 대한 영향, 실험성 황달에 대한 영향, 진해 작용, 진통 및 항경련 작용, 비뇨 생식기계통에 대한 영향, 항종양 작용 등이 있다고 하였다⁷. 김⁸은 감초가 호산구 및 호중구의 유착능을 억제하여 항염증작용이 있다고 하였고, Wang 등⁹은 천식환자의 기도 과민성을 감소시킨다고 하였고, Liu 등¹⁰은 histamine으로 유발된 기관 수축을 억제한다고 하였다.

이에 저자는 감초의 천식에 대한 항알레르기 효능을 실험적으로 규명하고자 감초를 구강투여한 천식모델 생쥐의 혈청에서 얻은 IL-4, IL-5, IL-13, IgE의 생성에 미치는 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 18~25g의 C57BL/6(한국화학연구소) 쥐로, 실험 당일까지 고형 사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4%이상 삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2. 약재

실험에 사용된 감초(*Glycyrrhiza uralensis*: 이하 GLU)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

3. 시약

본 실험에 사용된 시약은 diethyl pyrocarbonate (DEP: Sigma Co., U.S.A.), 3,4,5-dimethyl- thiazol-2,5-carboxymethoxy

* 교신저자 : 박양춘, 청주시상당구용담동, 대전대부속 청주한방병원 1내과
· E-mail : omdpyc@dju.ac.kr Tel : 043-229-3705
· 접수 : 2004/01/27 · 수정 : 2004/02/20 · 채택 : 2004/03/29

-phenyl-2,4-sulfophenyl-2H-tetrazolium (MTS: Sigma Co., U.S.A.) 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA: Sigma Co., U.S.A.), complete adjuvant, chloroform (Sigma Co., U.S.A.), collagenase (Sigma Co., U.S.A.), RPMI-1640 배양액 (Sigma Co., U.S.A.), isopropanol (Sigma Co., U.S.A.), 적혈구용혈액 (RBC lysis solution: Sigma Co., U.S.A.), ethidium bromide (EtBr: Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS: Sigma Co., U.S.A.), formaldehyde (Sigma Co., U.S.A.), lamide (Sigma Co., U.S.A.), magnesium chloride (MgCl₂: Sigma Co., U.S.A.)를 사용하였으며, fetal bovine serum (FBS: Hyclone. Logan, U.S.A.)은 Hyclone사 제품을, propidium iodide (PI: Pharmingen. Torreyana, U.S.A.), RNase (Pharmingen. Torreyana, U.S.A.)는 Pharmingen사 제품을, rhIL-1 β , rhTNF- α (R & D system. Minneapolis, U.S.A.)는 R & D system사 제품을 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

4. 기기

본 실험에 사용된 기기는 열탕추출기(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A.), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, U.S.A.), plate shaker (Lab-Line, U.S.A) 등을 사용하였다.

5. 감초 추출물 분리

감초는 200g에 각각 증류수 2,000ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하였다. 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 감초를 냉동(-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

6. 기관지 천식 생쥐 모델

500 μ g/ml의 난알부민(OVA, chicken egg ovalbumin; Grade IV)과 10% (w/v) aluminum potassium sulfate(Alum; Sigma)를 PBS로 용해한 후 혼합하였다. 이 혼합물을 10N NaOH로 pH를 6.5로 조정하여 상온에서 1시간 동안 방치하고 750 \times g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 이 OVA/Alum 침전물(pellet)을 증류수를 가하여 원래의 양으로 용해한 후 100 μ g OVA를 0.2ml로 조정하여 복강 내로 주사하여 전신 감작을 시켰다. 이 후 2주째에 생쥐를 마취한 후 난알부민(500 μ g/ml) 100 μ l를 기도로 투여하였다. 실험군은 3주째부터 분무기를 이용하여 2.5mg/ml 난알부민 용액을 하루에 30분씩 일주일에 3회씩 6주 동안 비강 및 기도내로 흡입시켰으며, 대조군은 PBS 또는 Alum만을 흡입, 주사시켰다.

7. 감초 추출물 경구 투여

OVA/Alum로 전신 감작 시킨 후 3주째부터 감초 추출물 (150mg/kg)을 일주일에 5회 경구 투여하였다. 대조군은 증류수를 동량 경구투여 하였다.

8. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) analysis

6주 후 기관지 천식 생쥐에서 분리한 혈청에서 IL-4, IL-5, IgE의 양을 측정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA, Endogen, USA)를 실시하였고, IL-13은 ELISA kit(R&D system)로 생산량을 측정하였다.

성적

1. 혈청내 IL-4 양에 미치는 영향

천식유발에 따른 IL-4 양을 측정된 결과, 정상군은 3.2 \pm 0.07(pg/ml), 대조군은 43.2 \pm 5.2(pg/ml), GLU 투여군은 19.7 \pm 3.6(pg/ml)으로 대조군에 비해 GLU 투여군에서 유의성 (p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 1).

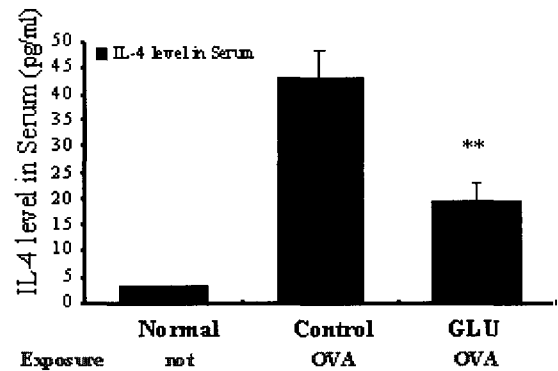


Fig. 1. Effect of GLU extract drug on IL-4 level in murine OVA-induced asthma of serum. WT : Normal C57BL/6 mice. OVA-control : Ovalbumin inhalation(control). OVA-GLU : OVA + GLU(150mg/kg). The results are expressed the mean \pm S.E(N=10). Statistically significant value compared group data by T test(*p <0.05, **p <0.01,***p <0.001).

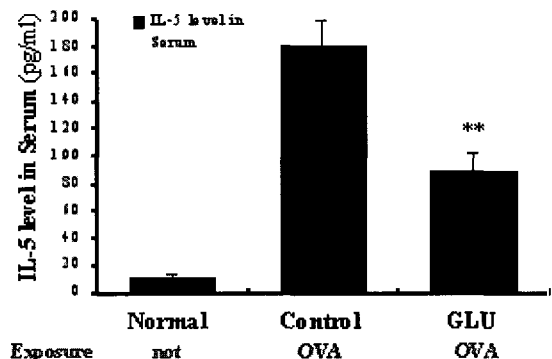


Fig. 2. Effect of GLU extract drug on IL-5 level in murine OVA-induced asthma of serum. WT : Normal C57BL/6 mice. OVA-control : Ovalbumin inhalation(control). OVA-GLU : OVA + GLU(150mg/kg). The results are expressed the mean \pm S.E(N=10). Statistically significant value compared group data by T test(*p <0.05, **p <0.01,***p <0.001).

2. 혈청내 IL-5 양에 미치는 영향

천식유발에 따른 IL-5 양을 측정된 결과, 정상군은 11.3±2.6(pg/ml), 대조군은 180.5±19.1pg/ml, GLU 투여군은 89.7±13.6(pg/ml)으로 대조군에 비해 GLU 투여군에서 유의성(p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 2).

3. 혈청내 IL-13 양에 미치는 영향

천식유발에 따른 IL-13 양을 측정된 결과 다음과 같은 효과를 나타내었다. 정상군은 12.4±3.2(pg/ml), 대조군은 48.9±28.1 (pg/ml), GLU 투여군은 196±15.4(pg/ml)으로 대조군에 비해 GLU 투여군에서 유의성(p<0.001) 있는 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

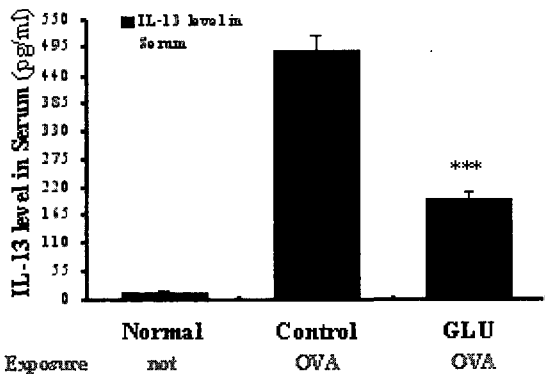


Fig. 3. Effect of GLU extract drug on IL-13 level in murine OVA-induced asthma of serum. WT : Normal C57BL/6 mice. OVA-control : Ovalbumin inhalation(control). OVA-GLU : OVA + GLU(150mg/kg). The results are expressed the mean±S.E(N=10). Statistically significant value compared group data by T test(*p <0.05, **p <0.01,***p <0.001).

4. 혈청내 Ig-E 양에 미치는 영향

천식유발에 따른 Ig-E 양을 측정된 결과, 정상군은 1.37±0.07 (pg/ml), 대조군은 4.09±0.86(pg/ml), GLU 투여군은 1.62±0.07 (pg/ml)으로 유의성(p<0.01) 있는 감소 효과를 나타내었다(Fig. 4).

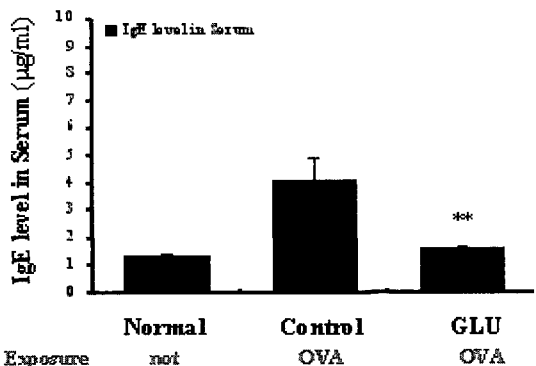


Fig. 4. Effect of GLU extract drug on IgE level in murine OVA-induced asthma of serum. WT : Normal C57BL/6 mice. OVA-control : Ovalbumin inhalation(control). OVA-GLU : OVA + GLU(150mg/kg). The results are expressed the mean±S.E(N=10). Statistically significant value compared group data by T test(*p <0.05, **p <0.01,***p <0.001).

고찰

기관지천식은 항원, 비만세포 및 IgE가 관여하여 분비되는 화학매체의 직접적인 약리작용에 의해서 그리고 화학매체와 cytokine, 유착분자가 관여하여 기관지로 모여온 염증세포에 의해서 발병하는 기도의 만성 알레르기 염증성 질환으로 이해되고 있다³⁾. 기관지천식의 특징적인 병리소견은 기관지속에 호산구의 수가 증가되어 있는 것인데 기도내로 유입된 호산구가 활성화되면, 세포막으로부터 생성되는 혈소판활성인자, leukotriens 등의 화학매체들은 기도 수축, 객담 생성, 혈관투과성 증가, 부종 등을 발생시키고, 더불어 화학주성이 있어 지속적으로 호산구를 비롯한 염증세포들을 기도내로 유입시킬 뿐 아니라 기도과민성을 생성하거나 증가시키며, 세포질로부터 유리된 세포독성단백은 기도상피를 박탈시킨다^{11,12)}.

기관지천식의 병인에 관여하는 세포 중 T조력(이하 Th) 림프구는 cytokine의 분비양상에 따라 Th1, Th2 림프구로 나눈다. Th1 림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN-γ를 생산하며 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여하고, Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 기관지천식과 같은 알레르기성 질환, 기생충감염에 대한 방어작용에 관여한다¹³⁻¹⁵⁾. Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 길항작용을 나타내어 기능이 억제되는 현상이 관찰되며 알레르기성 기관지천식환자의 기관지 폐포세척액에서는 Th2 림프구의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다¹⁶⁾. 즉 항원에 의한 IgE 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2 림프구는 naive CD4+ T세포가 IL-4의 영향으로 항원과 반응시 분화되고 이때 IgE 생성을 방해하는 IFN-γ를 분비하는 Th1 림프구는 그 발달이 저해된다¹⁷⁾.

甘草는 《神農本草經》에 처음 기재된 약물로 콩과식물이며 학명은 Glycyrrhiza uralensis Fisch이고, 그 性味는 甘平하며 脾胃 肺經으로 歸經하고 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥의 效能이 있다⁸⁾. 약리적으로 부신피질 호르몬양 작용, 항염증 및 항알레르기 작용, 소화계통에 대한 작용, 해독작용, 지질대사에 대한 영향, 실험성 황달에 대한 영향, 진해 작용, 진통 및 항경련 작용, 비뇨생식기계통에 대한 영향, 항종양 작용 등이 있다고 하였다⁷⁾.

감초의 효능에 대한 기존의 실험연구로 김⁸⁾은 감초가 호산구 및 호중구의 유착능을 억제하여 항염증작용이 있다고 하였고, Wang 등⁹⁾은 천식환자의 기도 과민성을 감소시킨다고 하였고, Liu 등¹⁰⁾은 histamine으로 유발된 기관 수축을 억제한다고 하였다.

이에 저자는 감초의 천식에 대한 항알레르기 작용에 대해 실험적으로 규명하기 위해서 생쥐의 혈청내 IL-4, IL-5, IL-13, IgE에 미치는 영향을 측정하였다.

IL-4는 Th2에서 방출되어 여러 종류의 면역세포에 작용하여 다양한 면역조절기능을 나타내고 있는데 활성화된 B 세포, T 세포 및 thymocyte의 증식을 유도하며, monocyte의 증식을 유도하며, monocyte의 활성화 및 비만세포의 증식과 성숙을 촉진한다. 특히 B 세포의 분화에 관한 작용으로 IgE의 생성과 분비를 유도하고, II형 IgE 수용체인 FcεR2의 발현을 증가시킨

다. 이러한 IL-4의 기능은 알레르기 반응의 주요조절인자로서 중요하다^{19,20}. 천식 유발 생쥐의 혈청내에서 IL-4의 양을 관찰한 결과 대조군에 비해 GLU 투여군에서 유의성 있는 감소 효과가 나타났다(Fig. 1).

IL-5는 IL-4와 유사하게 B 세포의 증식과 분화를 자극하는 기능을 가진 분자량 20kD의 사이토카인으로 활성화된 CD4+ T 세포와 비만세포가 분비한다. IL-5는 IL-2 또는 IL-4의 B 세포 분화 성장작용을 상승시키며 성숙 B 세포에 작용하여 IgA 생성을 향진시킨다. 또한 호산구의 분화증식을 향진시켜 호산구매개염 증반을 조절에 관여하므로 IL-5의 억제제가 알레르기성 호흡기질환의 치료에 유용할 것으로 보고되고 있다^{21,22}.

천식 유발 생쥐의 혈청내에서 IL-5의 양을 관찰한 결과 대조군에 비해 GLU 투여군에서 유의성 있는 감소 효과가 나타났다(Fig. 2). IL-13은 Th2에서 분비되는 사이토카인으로 IgE의 생성을 유도하여 알레르기성 염증 반응의 병인에 관여한다고 하였다²³. 천식 유발 생쥐의 혈청내에서 IL-13의 양을 관찰한 결과 대조군에 비해 GLU 투여군에서 유의성 있는 감소 효과가 나타났다(Fig. 3). IgE 항체는 제1형 과민반응의 중심역할을 한다. 항원에 노출되어 생산된 IgE 항체는 비만세포 표면에 결합하게 되고 같은 항원에 재노출하게 되면 비만세포 표면에서 부착된 IgE 항체와 항원이 결합하여 비만세포로부터 여러 화학매체들을 분비하게 된다²⁴. 천식 유발 생쥐의 혈청내에서 IgE의 양을 관찰한 결과 대조군에 비해 GLU 투여군에서 유의성 있는 감소 효과가 나타났다(Fig. 4).

이상의 혈청내 실험결과 대조군에 비해 GLU 투여군에서 IL-4, IL-5, IL-13은 유의성 있는 감소를 보여 감초가 Th2 관련 cytokine의 생산을 줄이고, 알레르기 반응이 활발할 때 증가하는 IgE를 감소시키므로 항알레르기 효과가 있어 기관지천식에 유효한 것으로 사료된다.

결론

감초의 천식에 대한 항알레르기 작용을 규명하기 위해 혈청내 IL-4, IL-5, IL-13, IgE의 분비 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 감초는 IL-4, IL-5, IL-13의 생성을 유의성 있게 감소시켰고, IgE의 생성을 유의성 있게 감소시켰다.

以上の結果로 보아 甘草는 allergy 반응을 억제시키는 효과가 있는 것으로 사료되며 앞으로 이에 대한 持續的인 研究가 필요하리가 사료된다.

참고문헌

1. 김유영 : 기관지천식, 한용철, 임상호흡기학, 서울, 일조각, p.208, 215, 1990.
2. 박성학 : 기관지천식-진단, 결핵 및 호흡기 질환, 42(5):635~645, 1995.
3. 홍천수, 김규언 : 기관지천식-병인 및 역학, 대한 천식 및 알레르기학회, 천식과 알레르기 질환, 서울, 군자출판사,

- pp.237~256, 2002.
4. Lee SI : Prevalences of Symptoms of Asthma and Other Allergic Diseases in Korean Children: A Nationwide Questionnaire Survey, *J Korea Med Sci*, 16(2):155~164, 2001.
5. 전국한의과대학폐계내과학교실 편저 : 동의폐계내과학, 서울, 한문회사, p.162~202, 2002.
6. 전국한의과대학 본초학교수 공편 : 본초학, 서울, 영림사, p.540~541, 1991.
7. 과학백과사전출판사 엮음 : 약초의 성분과 이용, 서울, 일월서각, p.387~393, 1999.
8. 김미경 : 감초가 selectin-매개성 호산구 및 호중구의 유착에 미치는 길항능, 천식 및 알레르기, 18(1):61~68, 1998.
9. Wang H, Chang B, Wang B : The effect of herbal medicine including astragalus membranaceus (fisch) bge, codonopsis pilosula and glycyrrhiza uralensis fisch on airway responsiveness. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 21(5):287~288, 1998.
10. Liu LM, Yu ZF, Wu CY : Studies of the spasm-relieving effect of Glycyrrhiza uralensis Fisch.--Aster tataricus L.F. pulvis mixture on the trachea in guinea pigs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 18(9):566~567, 575, 1993.
11. Frigas E, Gleich GJ : The eosinophil and pathology of asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 77:527~537, 1986.
12. 이양근 : 호산구와 천식, 결핵 및 호흡기질환, 46(1):5~16, 1999.
13. 조상헌, 송숙희, 김윤근, 지영구, 최동철, 윤호주 등. : 아토피환자에서의 IgE항체 생성조절기전:말초혈액림프구의 IL-4, IFN- γ 생성의 불균형, 알레르기, 15(2):210~212, 1995.
14. 어수택, 정성환, 이상우, 김현태, 김용훈, 박춘식 : 천식환자의 기도내 cytokines표현에 대한 연구, 결핵 및 호흡기질환, 42(1):2~3,1995.
15. 박수영, 조영주 : 내인성 천식 및 외인성 천식환자의 CD8양 성세포에서 interleukin4 및 interferon gamma 생산, 천식 및 알레르기, 21(1):66~67, 2001.
16. Kasakura S : A role for T helper type 1 and type 2 cytokine in the pathogenesis of various human diseases, *Rinsho Byori, Symp*, 46(9):915~921, 1998.
17. Hultner L, Kolsch S, Stassen M, Kaspers U, Kremer JP, Mailhammer R, Moeller J, Broszeit H, 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.
18. 임숙정, 임난영, 이성원, 곽근신, 안성훈, 문연자, 우원홍 : 감초수추출물이 HM3KO 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 17(2):368~373, 2003.
19. 김세종 : IMMUNOLOGY, 서울, 고려의학, p.1, 65, pp.154~156, 260~265, 2000.
20. 강세용, 심재정, 조재연, 권영환, 이승룡, 김제형, 이상엽, 이소라, 한선애, 김한겸, 강경호, 유세화, 인광호 : 천식 환자에

- 서 증상의 정도에 따른 IL-4 유전자 다형에 관한 연구, 결핵 및 호흡기질환, 46(3):529~535, 1998.
21. 이숙영, 송정섭, 김영균, 김관형, 문화식, 박성학 : 기관지천식의 기도과민반응과 기관지폐포세척액 소견, 대한내과학회지, 48(2): 171~180, 1995.
 22. 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*, 2(2):71~79, 2001.
 23. 이수중, 이준성, 이경수: 아토피성 천식환자에서 특이적 면역요법이 말초혈액 단핵구의 IL-10과 IL-13 mRNA 발현에 미치는 영향, 소아알레르기 및 호흡기, 9(1):41~55, 1999.