

산초유 효능 구명 및 산업화 기술개발

시험기간 : 2016년 ~2019년

담당자 : 강승미, 김소리, 정운중, 김승완, 박준호, 유재원

I. 서론

천식은 전 세계적으로 3억명 이상의 환자가 있는 중요한 보건학적인 문제이며, 우리나라에서도 만성질환 중 질병부담이 6번째로 큰 질환으로 조사되었다. 천식의 유병률은 아직 많은 국가에서 지속적으로 증가하는 추세이다. 국내에서도 소아 천식은 이전에 보였던 빠른 유병률 증가가 꺾이면서 증가추세가 완화되어가고 있지만, 성인 천식은 지속적으로 증가하고 있으며, 이는 빠르게 고령화 사회에 진입하고 있는 우리나라에서 향후 천식이 지금보다도 더 큰 사회적 부담으로 다가올 가능성을 시사한다고 볼 수 있다.

천식은 가장 흔한 만성 기도 질환 중 하나로 호흡곤란, 천명, 가슴답답함, 기침과 같은 증상이 가역적인 호기 기류제한과 함께 나타나는 것을 특징으로 한다. 천식은 유전적 요인과 환경적 요인이 복합적으로 작용해 생긴다. 환경적 요인으로는 집먼지 진드기, 꽃가루 등 원인 물질과 감기, 흡연, 공기오염, 황사 등이 있다. 완치가 어렵다고 알려진 천식은 반복적이고 발작적으로 증세가 나타나므로 지속적인 관리가 중요한 질환이다. 이런 천식은 계절 또는 악화인자 등에 따라 다양하게 변화하며, 천식의 악화인자로는 운동, 알레르겐(항원) 혹은 자극성 물질, 날씨 변화, 감기같은 호흡기 바이러스 감염 등이 있다. 천식 급성 악화는 생명을 위협할 수도 있다. 천식은 대부분 직/간접적인 자극에 대한 기도과민성이나 기도의 만성 염증과 관련이 있고, 유사한 임상양상을 보이지만, 서로 다른 병태생리를 가지고 있는 질환이 섞여 있는 균일하지 않은 질환으로, 병의 완치보다는 증상의 완화와 발현 횟수를 줄이는 약제가 대부분이며, 따라서 천식 치료제 개발이 시급하다.

산초유는 한국에 자생하는 식물로 산초나무 열매에서 착유된 산초기름이며, 이는 민간요법으로 폐혈관, 기관지, 천식질환 등의 치료제로 이용해 왔다. 하지만, 산초유에 대한 과학적 검증은 매우 미비한 실정이며, 과학적 검증을 통한 산초유의 유효성 규명이 요구되고 있어, 현재 현대의학계에서 산초의 효능에 대한 연구가 활발하게 진행 되고 있다. 본 연구는 기관지 천식의 실험동물모델에서 산초유를 대상으로 천식질환에서 효능을 확인하고 그 결과를 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. in vitro study

primary tracheal epithelial cells과 A549 cells에 DMSO로 1/10으로 희석한 산초유 시료를 최종 0.01%로 처리하고, 1시간 후, TNF- α (50 ng/ml)+LPS (100 μ g/ml)으로 11시간 동안 stimulation을 주었다. 산초유 시료 처리 후, 12시간째에 lysis buffer로 cell lysates를 얻었다. 그리고 bradford 방법으로 단백질 정량을 한 후, western blot방법으로 단백질 발현을 확인하였다.

2. in vitro의 시험군

총 15개의 시료이며, 시험군은 다음과 같다.

sample 1:조생종+유압압착 (껍질 10%)

sample 2:조생종+유압압착 (껍질 무)

sample 3:조생종+엑스펠라 착유 (껍질 무)

sample 4:만생종+유압압착 (껍질 10%)

sample 5:만생종+유압압착 (껍질 무)

sample 6:만생종+엑스펠라 착유 (껍질 무)

sample 7:한초+유압압착 (껍질 10%)

sample 8:한초+유압압착 (껍질 무)

sample 9:한초+엑스펠라 착유 (껍질 무)

- sample 10:혼합 (조생종+만생종+한초)+유압압착 (껍질 10%)
- sample 11:혼합 (조생종+만생종+한초)+유압압착 (껍질 무)
- sample 12:혼합 (조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유 (껍질 무)
- sample 13:혼합 (조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유 (원심분리 1차)
- sample 14:혼합 (조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유 (원심분리 미실시)
- sample 15:혼합 (조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유 (원심분리 하층액)

3. in vivo study

동물은 C57BL/6 계통의 6주령 된 암컷 마우스를 Orientbio Inc. (성남, 한국)에서 구입하여 실험을 수행하였다. 천식 마우스모델 유도를 위해 saline에 OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) 와 Alum 1mg을 총 200 μl volume으로 혼합하여, 0일과 14일에 복강투여로 감작시켰다. 첫 번째 감작 후, 21일, 22일, 23일째에 saline에 3% OVA (weight/volume)를 초음파분무기를 이용하여 30분간 흡입시켰다 (Challenge). 산초유 시료는 Corn oil(drug vehicle)을 넣어, 산초유 원액 100%를 각 시료의 0.2%와 2%으로 희석하여 사용하였다. Corn oil과 산초유 시료는 마지막 3% OVA challenge 하기 1시간 전과 마지막 3% OVA challenge 후, 6시간 때에 경구 투여하였으며, 총 2회를 진행하였다. 산초유의 효능을 확인하기 위해, 마우스는 마지막 OVA challenge 후, 48시간째에 마우스를 희생시켜 실험을 진행하였다. 실험 프로토콜은 Fig. 1과 같다.

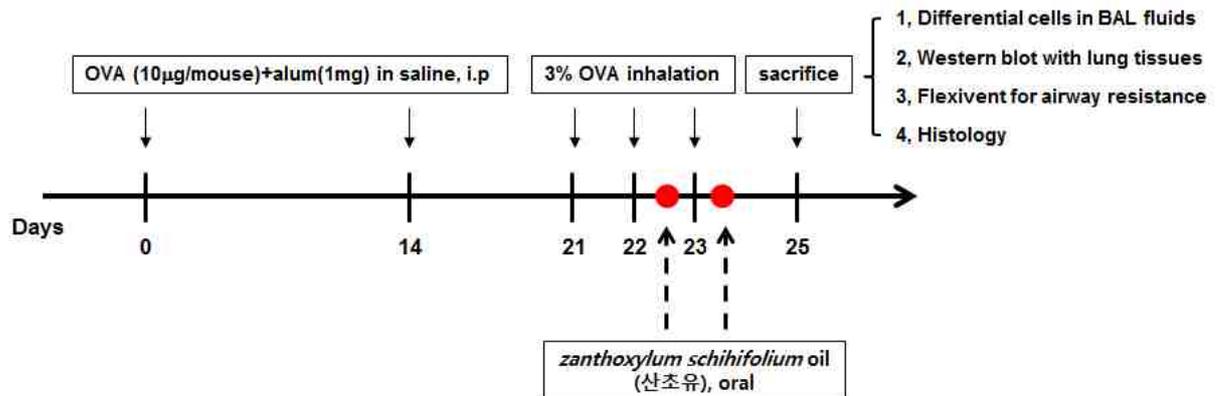


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental protocol

Mice were sensitized on days 1 and 14 by intraperitoneal injection of 10 µg ovalbumin (OVA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) emulsified in 1 mg of aluminum hydroxide (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) in a total volume of 200 µl. On days 21, 22, and 23 after the initial sensitization, the mice were challenged for 30 min with an aerosol of 3% (wt/vol) OVA in saline (or with saline as a control) using an ultrasonic nebulizer (NE-U17, Omron, Japan). Sancho seed oils (0.2 or 2 %) or vehicle control (Corn oil), was administered in a volume of 200 µl by oral gavage twice to each animal: once on day 21 (1 h before the last airway challenge with OVA) and the second time on day 23 (6 h after the last airway challenge with OVA).

4. in vivo의 시험군

마우스모델군은 총 8그룹으로 평가를 진행하였으며, 다음과 같다. Control군은 saline-sensitized and saline-inhaled mice administered with drug vehicle (SAL+VEH), OVA군은 OVA-sensitized and OVA-challenged mice administered with drug vehicle (OVA+VEH)으로 진행하였다. 약물군은 OVA-sensitized and OVA-challenged mice administered with 0.2 or 2% 만생종 (만생종 0.2 or 2%), OVA-sensitized and

OVA-challenged mice administered with 0.2 or 2% 한초 (한초 0.2 or 2%), 그리고 OVA-sensitized and OVA-challenged mice administered with 0.2 or 2% 혼합 (혼합 0.2 or 2%)으로 진행하였다.

5. 기관지 폐포 세척액(BAL fluids)에서 염증 세포 분석

마우스를 경추 탈골법으로 희생을 시키고, 기관에 1 ml의 PBS를 넣어 폐를 세척하여, 기관지 폐포 세척액을 얻었다. 전체 세포 수는 NucleoCounter (ChemoMetec, Allerod, Denmark)를 이용하여 측정하였고, BAL 세포 도말은 cytopsin (Thermo Electronm Waltham, MA)으로 준비하였다. 세포 감별을 위해서 Diff-Quik solution (Dade diagnostics of P.R. Inc.Aguada, Puerto Rico)으로 염색 후, 400개의 세포를 세어 분석하였으며, 염증세포 분석에서 효능을 보이는 시료를 선별하였다.

6. Western blot 및 densitometry analysis

염증세포 분석에서 선별된 시료의 마우스 폐 조직을 lysis buffer를 넣어, 균질화를 시키고, 폐 조직의 단백질 lysates를 얻는다. 동량의 단백질을 가지고 분석하기 위해, Bradford법으로 standard assay 후, 전기영동, transfer, 및 blocking 과정을 거쳐, IL-4, 5, 13 항체를 overnight으로 incubation 시킨다. 다음날 blot을 세척하고, 2차 항체를 반응시키고, ECL 반응을 시키고, LAS 장비로 이를 분석하였다.

7. 기도 저항성 측정

염증세포 분석에서 선별된 시료의 기도 과민성에 대한 효과를 평가하기 위하여 동물용 기도저항 측정기 Flexivent (Scientific Respiratory Equipment Inc., Montreal, Canada)을 이용하였다. 이는 Invasive method로 마우스의 마취상태에서, 메타콜린 (Methacholine) 농도(0, 5, 10, 25, 50 mg/ml)의 변화에 따른 airway resistance (Rrs) 값을 측정하였다. 마우스는 메타콜린을 흡입시키기 전에 0.9% 생리식염수를 10초간 분무시켜 기저(Basal control) 기도

과민성을 측정하였고, 메타콜린에 대한 기도 반응의 차이를 확인하기 위하여 각 마우스에게 초음파분무기를 이용하여 메타콜린의 농도를 증가시키며 측정하였다. 각 농도의 메타콜린 투여 후, 3분간 Rrs 값을 측정하여 평균값을 사용하였다. 기도 기능의 변화 정도는 0.9% 생리식염수 흡입 후 얻어진 기저 Rrs 값을 기준으로 그 차이를 백분율로 표현하였다.

8. 조직학적 분석

염증세포 분석에서 선별된 시료의 조직학적 분석을 하기 위해, 마지막 OVA challenge 후 48 시간째에 마우스에서 폐 조직을 떼어내어, 4% formalin에 고정시켰다. 검체를 탈수시키고, paraffin으로 고정하여, Leica model 2165 rotary microtome (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) 장비로 4- μ m 절편으로 슬라이드에 붙였다. 조직은 다시 탈파라핀 과정과 함수과정을 거쳐 hematoxylin 2 과 eosin-Y (Richard -Allan Scientific, Kalamazoo, MI)으로 염색하였고, 조직학적으로 폐의 염증정도를 평가하기 위해 inflammatory score를 진행하였다.

9. 통계 처리

모든 결과는 평균과 표준 오차로 표시하였다. 통계분석은 정규성 검증 후, 정규성 검증에 따르면, one-way ANOVA를 이용하여 scheffe's 사후 검증을 진행하였고, p value<0.05 인 경우를 통계적 의의가 있는 것으로 해석하였다. 정규성 검증에 따르지 않으면, Kruskal-Wallis ANOVA test 후, Mann Whitney U test를 진행하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. in vitro study 결과

LPS-stimulated A549 cells에서 산초유의 추출방법에 따른 효능을 보았을 때, LPS-stimulated A549 cells의 결과 분석에서 유압압착 방식보다 엑스펠라 착유

시, LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인(cytokines) 발현을 감소시켰으며, 그 중에서도 한초와 혼합시료의 효능이 뛰어난 것으로 관찰되었다. 게다가, LPS-stimulated Normal primary tracheal epithelial cells에서 한초와 혼합시료의 효능을 재확인 한 결과, 한초와 혼합의 엑스펠라 착유시료에서, LPS-stimulated Normal primary tracheal epithelial cells에서 증가된 사이토카인의 발현양을 감소시켰다.

1) A549 cells에서 Western blot 및 Densitometry 분석

조생종, 만생종, 그리고 한초의 유압압착 방식보다 엑스펠라 착유시료에서, 모두 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 사이토카인 발현양을 감소시켰으며, 그 중에서도 한초와 혼합시료의 효능이 뛰어난 것으로 관찰되었다. 또한, 각 품종을 혼합했을 경우에 효능은 좀 더 증가 되는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

A. 조생종 시료 결과

조생종+엑스펠라 착유시료에서 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

B. 만생종

만생종+엑스펠라 착유시료가 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

C. 한초

한초+엑스펠라 착유시료에서 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

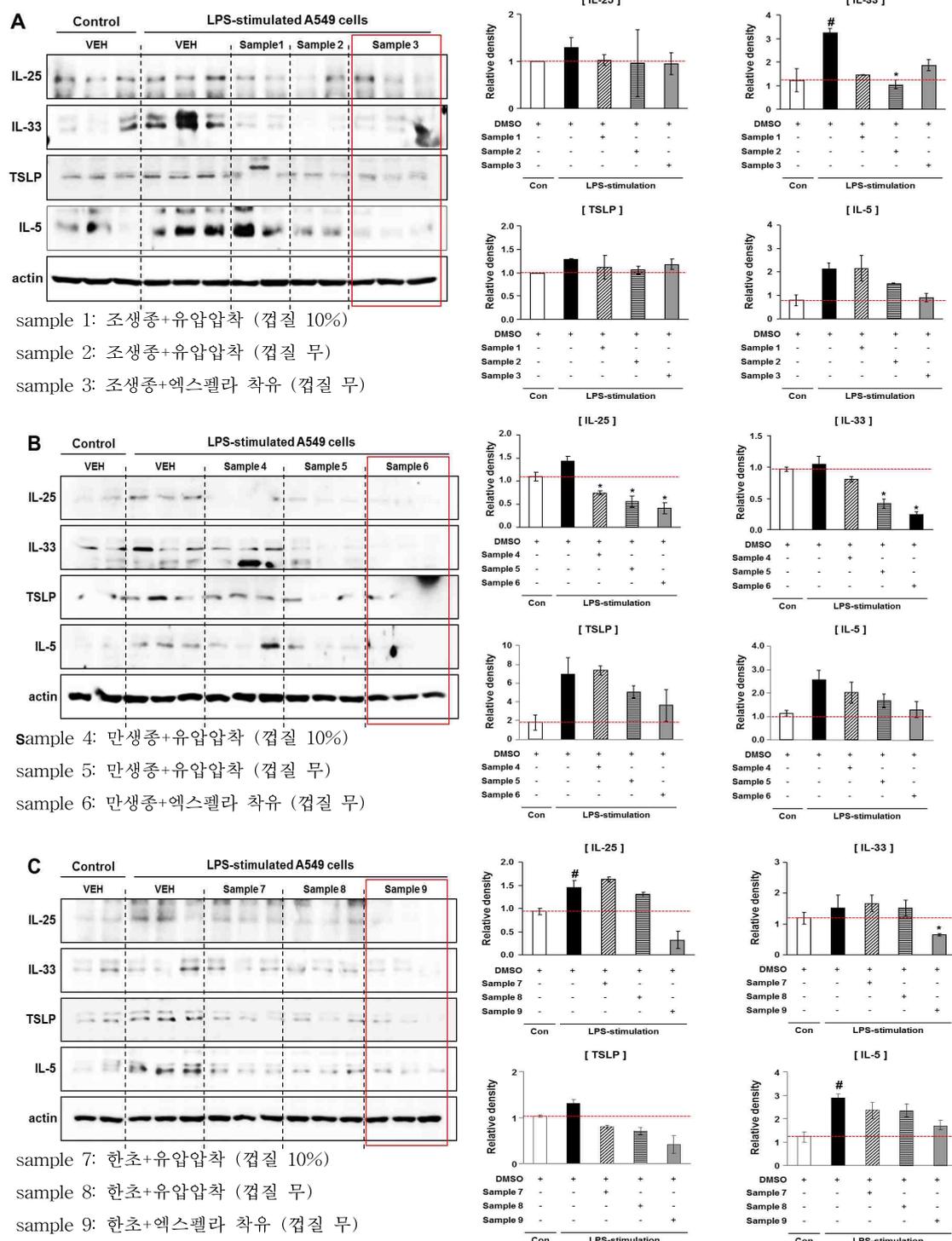


Fig. 2. Western blot and Densitometry analysis of LPS-stimulated A549 cells

D. 혼합 (조생종+만생종+한초)

혼합+엑스펠라 착유시료가 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

E. 혼합 (조생종+만생종+한초)

혼합+엑스펠라 착유시료가 원심분리 유무에 상관없이 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

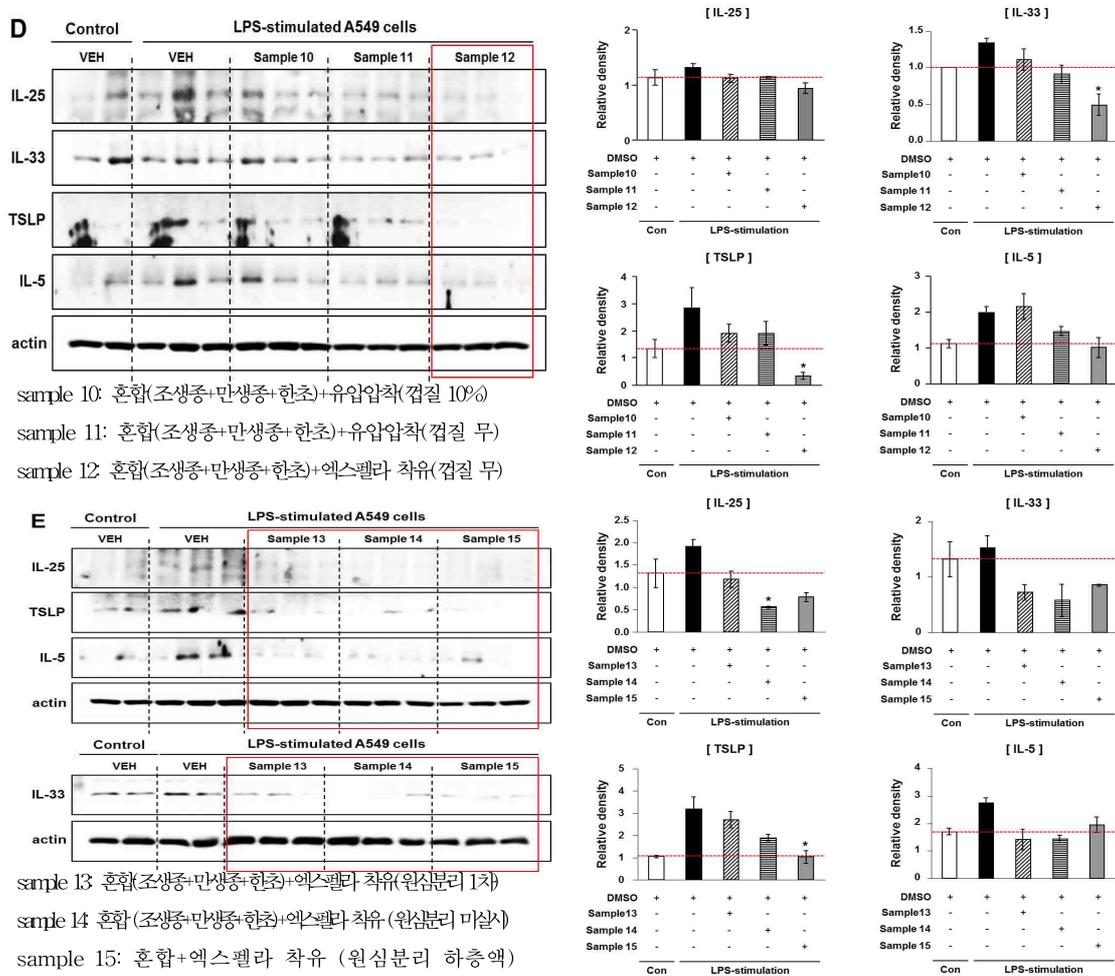


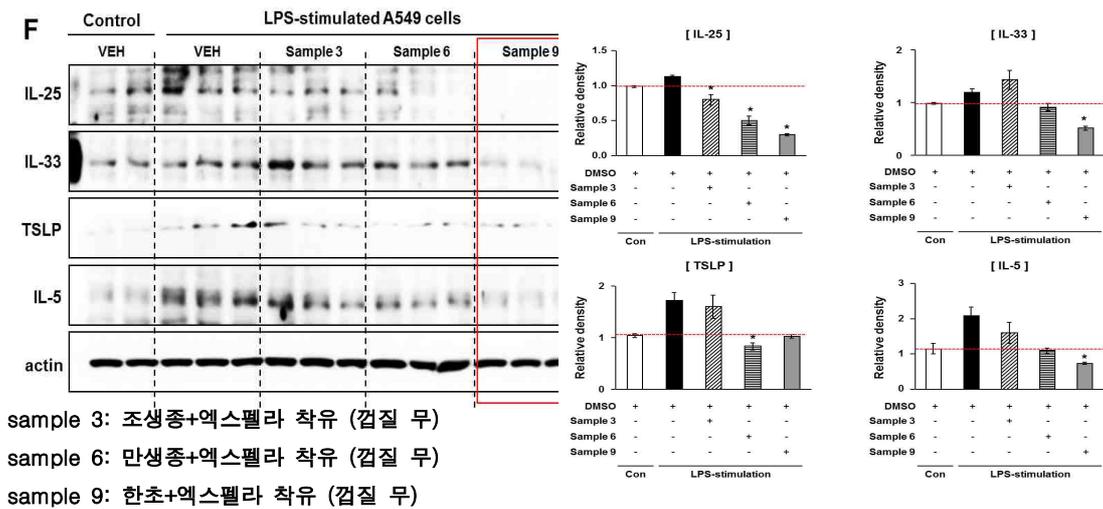
Fig. 3. Western blot and Densitometry analysis of LPS-stimulated A549 cells

F. 조생종, 만생종, 한초+엑스펠라 착유

A-E의 결과에서 각 품종의 엑스펠라 착유시료에서 항염증효능이 확인되어, 조생종, 만생종, 그리고 한초의 엑스펠라 착유시료를 선별하여, LPS-stimulated A549 cells에서의 염증 사이토카인의 발현양을 확인해 보았다. 시료는 다음과 같으며, 조생종, 만생종, 그리고 한초의 엑스펠라 착유시료에서 만생종과 한초시료가 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 염증 사이토카인의 발현양을 감소시키는 것으로 확인 되었으며, 특히 한초시료가 증가된 염증사이토카인 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

G. 한초, 혼합 (조생종+만생종+한초)+엑스펠라 착유

F의 결과, 각 품종의 엑스펠라 착유시료 중에서 한초 엑스펠라 착유시료의 항염증 효능이 확인되어, 한초와 혼합의 엑스펠라 착유 시료의 항염증정도를 비교하였다. 시료는 다음과 같으며, 한초와 혼합의 엑스펠라 착유시료 모두가 LPS-stimulated A549 cells에서 증가된 사이토카인의 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다. 특히 혼합시료는 증가된 TSLP의 발현을 현저히 감소시켰다.



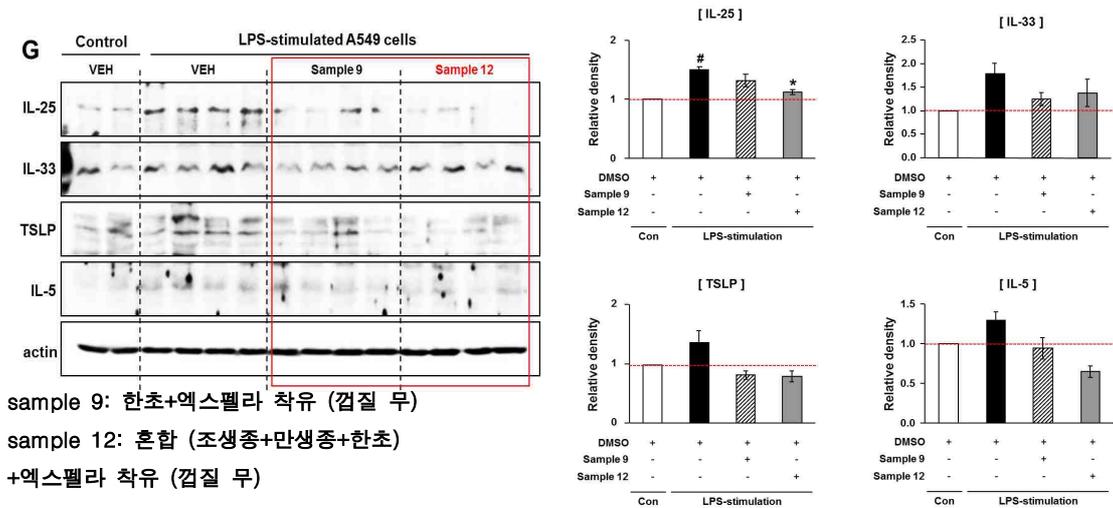


Fig. 4. Western blot and Densitometry analysis of LPS-stimulated A549 cells

2) LPS-stimulated Normal primary tracheal epithelial cells에서 Western blot 및 Densitometry 분석

LPS-stimulated A549 cells의 결과를 토대로, LPS-stimulated Normal primary tracheal epithelial cells에서 한초와 혼합의 유압압착 방식으로 얻어진 시료와 엑스펠라 착유시료의 항염증 효능을 재확인해 보았다.

G. 한초와 혼합시료

한초+엑스펠라 착유시료가 LPS-stimulated Normal primary tracheal epithelial cells에서 증가된 염증 사이토카인의 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다. 혼합+엑스펠라 착유시료가 LPS-stimulated Normal primary tracheal epithelial cells에서 증가된 염증 사이토카인의 발현양을 감소시키는 것으로 확인되었다.

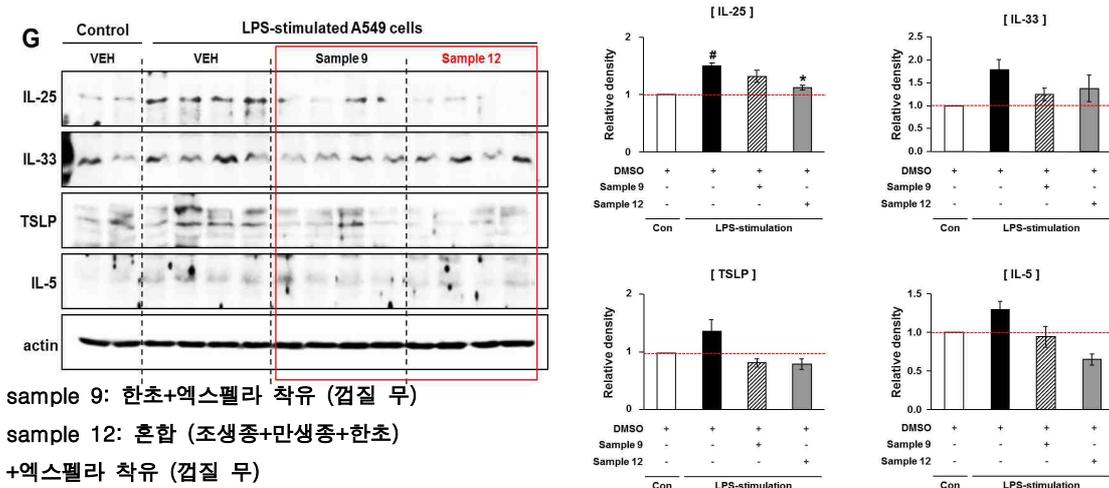


Fig. 5. Western blot and Densitometry analysis of LPS-stimulated A549 cells

2. in vivo study 결과

in vitro 실험 결과를 토대로 15개의 산초유 시료 중에서 3개의 시료를 선정하여 in vivo 실험을 진행하였다. 선정된 시료는 엑스펠라 방식으로 착유된 만생종, 한초, 그리고 혼합시료이며, 선정된 각 시료는 두개의 농도 (0.2% 와 2%)로 진행되었으며, 시료는 OVA로 유도된 천식동물모델에 경구 투여하였다. 그 결과, 염증 세포수, 염증에 관여하는 단백질 발현, 기도 과민반응 및 조직학적 분석에서 한초 2%, 혼합 0.2%, 그리고 혼합 2%의 시료가 천식동물모델에서 효능이 있는 것으로 관찰되었다.

1) 기관지 폐포 세척액 (BAL fluids)에서 염증 세포 분석

BAL Fluids에서의 염증반응을 확인한 결과, 천식동물모델에서 총 세포수, eosinophils, 및 lymphocytes를 포함한 염증 세포가 유의하게 증가되었으며, 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%를 투여한 실험군에서 총 세포수와 eosinophils의 세포 수가 감소되는 것을 확인하였다. 특히, 한초 2%와 혼합 2%은 유의성있게 총 세포수와 eosinophils의 세포 수가 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 6).

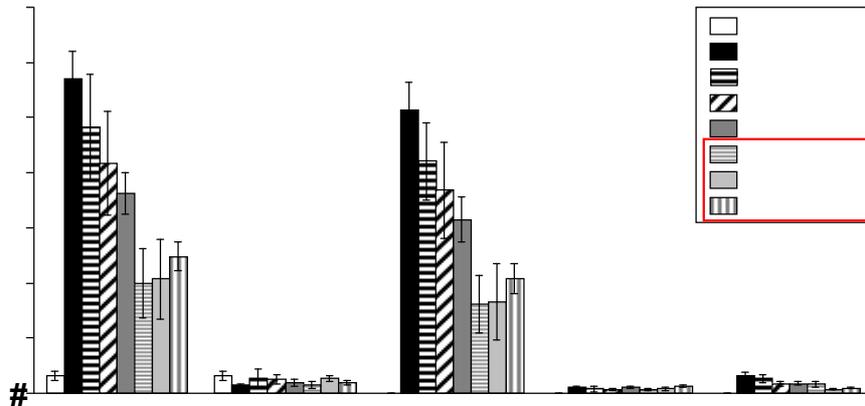


Fig. 6. Effect of sancho seed oils on total and differential cellular components in BAL. Sampling was performed at 48 h after the last OVA challenge in OVA-induced mice. Bars represent the means \pm SEM of n=6 mice per group. Nonnormally distributed data were analyzed by using the Kruskal-Wallis ANOVA test followed by Mann Whitney U test with Bonferroni correction and statistical comparisons between two groups were used Mann Whitney U test. SPSS statistical software (version 19.0, SPSS, Chicago, IL, USA) was used. Data are expressed as mean \pm SEM. #p < 0.00835 versus SAL+VEH; *p < 0.0083 versus OVA+VEH.

2) Western blot 및 Densitometry 분석

천식동물모델의 BAL Fluids에서 염증반응에 효능이 보이는 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%의 폐 조직에서 염증 매개물질인 사이토카인을 확인하기 위하여 Western blot과 Densitometry 분석을 진행하였다. 천식동물모델의 폐 조직에서 IL-4, IL-5, 및 IL-13 단백질이 모두 유의하게 증가되는 것을 확인하였으며, IL-4의 발현에서는 혼합 0.2%과 혼합 2%를 투여한 실험군에서 유의하게 감소되는 것을 확인하였으며, IL-5의 발현에서는 혼합 0.2%와 혼합 2%를 투여한 실험군에서 감소하는 경향을 보였다. IL-13의 발현에서는 한초 2%와 혼합 0.2%를 투여한 실험군에서 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 7).

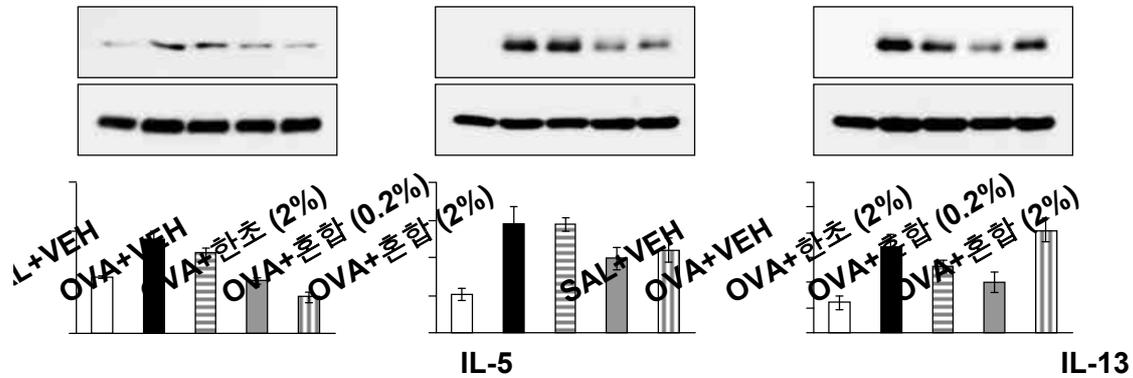


Fig. 7. Effect of sancho seed oils on protein levels of cytokines from OVA-induced mice.

Sampling was performed at 48 h after the last OVA challenge in OVA-induced mice. Bars represent the means \pm SEM from $n=6$ mice per group. Normally distributed data were analyzed by using one-way ANOVA followed by the Scheffe's test (IL-4 and IL-13; $p < 0.05$ versus SAL+VEH, $*p < 0.05$ versus OVA+VEH). Nonnormally distributed data were analyzed by using the Kruskal-Wallis ANOVA test followed by Mann Whitney U test with Bonferroni correction and statistical comparisons between two groups were used Mann Whitney U test (IL-5; $^{\#}p < 0.0083$ versus SAL+VEH). SPSS statistical software (version 19.0, SPSS, Chicago, IL, USA) was used.

3) 기도 과민성에 대한 분석

천식동물모델의 BAL Fluids에서 염증반응에 효능이 보이는 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%에서의 기도 과민성에 대한 평가를 위하여 메타콜린의 농도에 따른 airway resistance (Rrs)값을 측정하였다. 실험 결과, 천식동물모델은 SAL+VEH군과 비교하였을 때, 메타콜린 10, 25, 및 50 mg/ml 농도에서 유의하게 기도 과민성의 증가를 보였으며, 증가된 기도 과민성은 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%를 투여한 실험군에서 감소되는 것을 확인하였다. 특히, 메타콜린 10과 25

mg/ml에서는 혼합 0.2%의 시료가 기도과민성에서 감소시키는 것으로 확인하였고, 50 mg/ml의 메타콜린 농도에서 혼합 2%에 의해 기도 과민성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

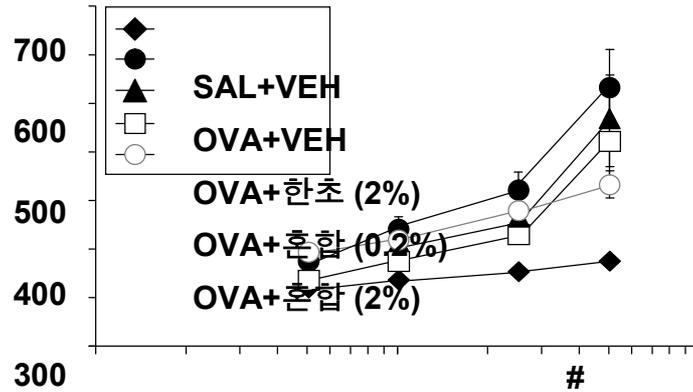


Fig. 8. Effect of sancho seed oils on airway hyper-responsiveness in OVA-induced mice.

Airway hyper-responsiveness was measured at 48 h after the last OVA challenge in OVA-induced mice. Bars represent the means \pm SEM of n=5 mice per group. Normally distributed data were analyzed by using one-way ANOVA followed by the Scheffe's test (5, 10, and 50 mg/ml of methacholine; #p < 0.05 versus SAL+VEH). Nonnormally distributed data were analyzed by using the Kruskal-Wallis ANOVA test followed by Mann Whitney U test with Bonferroni correction and statistical comparisons between two groups were used Mann Whitney U test (25 mg/ml of methacholine; #p < 0.0083 versus SAL+VEH). SPSS statistical software (version 19.0, SPSS, Chicago, IL, USA) was used.

4) 폐 조직의 조직형태학적 분석

천식동물모델의 BAL Fluids에서 염증반응에 효능이 보이는 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%에서의 병리학적 분석을 한 결과, 천식동물모델의 병리조직 검사에서 상피세포층이 두꺼워졌으며 기관지와 혈관 주위에 염증세포의 침윤의 증가

가 유의하게 나타났으며, 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2% 시료를 처리한 실험군에서 병리적 변화가 유의하게 호전되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 9).

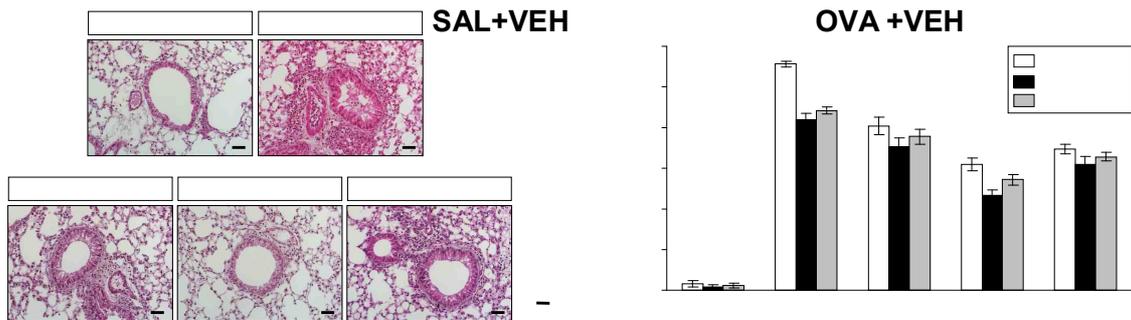


Fig. 9. Effect of sancho seed oils on pathologic changes in lung tissues of OVA-induced mice.

Representative H&E-stained sections of the lungs. Sampling was performed at 48 h after the last OVA challenge in OVA-induced mice. Scale bars indicate 50 μ m. Nonnormally distributed data were analyzed by using the Kruskal-Wallis ANOVA test followed by Mann Whitney U test with Bonferroni correction and statistical comparisons between two groups were used Mann Whitney U test. SPSS statistical software (version 19.0, SPSS, Chicago, IL, USA) was used. Data are expressed as mean \pm SEM. #p < 0.00835 versus SAL+VEH; *p < 0.0083 versus OVA+VEH.

IV. 적요

기관지 천식은 기도의 만성 염증과 기도과민증, 간헐적인 기도 수축이 특징이며, 이 질환은 환자들의 일상생활에 상당한 장애를 줄 뿐 아니라, 심한 경우에는 사망을 초래할 수 있는 질병으로 알려져 있다. 지금까지 천식을 치료하기 위해 다양한 약물들이 개발되어 임상에서 사용되고 있지만, 고용량의 약물로 치료를 하는데도 불구하고 증상이 호전되지 않고, 지속적인 천식 악화와 폐 기능 감소가 진행되는 환자군이 많다. 따라서, 천식의 치료제 개발이 시급한 실정이다.

산초나무는 전통적으로 음식 향신료로 사용되었을 뿐만 아니라, 비염, 천식, 위

장 장애 등에 효능을 가져, 이들의 치료제로도 사용되어져 왔다. 하지만, 산초나무는 민간요법으로 널리 이용되어 왔지만, 과학적으로 검증은 미비하다. 현재 진행된 산초나무 및 산초유 연구로는 *in vitro* 방법에서의 생리활성 연구나 물리화학적 연구가 대부분이며, 관련 기작 등에 대한 연구는 거의 없다. 최근에 산초나무에 대한 과학적 규명 및 사업기반 연구를 활성화함으로써 산초유의 효능 평가에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 본 연구에서는 천식동물모델에서 다양한 산초나무의 열매에서 얻은 산초유의 기도 염증 반응 및 기도 과민성에 대한 효과를 알아보았다. 연구 결과는 다음과 같다.

1. LPS-stimulated A549 cells에 조생종, 만생종, 한초, 그리고 혼합시료를 처리함으로써, 산초유의 추출방법에 따른 효능을 평가하였다. 그 결과, 대부분의 시료에서 유압압착방식보다 껍질이 없는 엑스펠라 착유로 얻은 시료에서 LPS에 의해 증가된 염증반응에 관여하는 단백질의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 다음은 껍질이 없는 엑스펠라 착유로 얻은 시료들만 비교해 보았다. 조생종, 만생종, 그리고 한초의 시료를 비교 하였을 때, 조생종보다는 만생종과 한초가 LPS에 의해 증가된 염증반응에 관여하는 단백질 발현을 감소시켰으며, 그 중에서도 한초의 효능이 가장 좋은 것으로 확인이 되었다. 또한, 한초와 혼합의 엑스펠라 착유시료를 비교 해 보았을 때, LPS로 인해 증가된 염증반응에 관여하는 단백질 발현양은 일부 단백질발현에서는 비슷하게 감소시키거나, 혹은 혼합시료에서 좀 더 효능이 좋은 것으로 확인이 되었다. 마지막으로 원심분리 유무에 따른 혼합시료의 효능에는 큰 차이가 없었으며, 원심분리 유무와 상관없이 엑스펠라방식으로 착유된 모든 혼합시료는 LPS에 의해 증가된 염증단백질 발현양을 감소시켰다.

2, LPS-stimulated A549 cells에서 도출된 결과에 따라, LPS-stimulated Normal primary tracheal epithelial cells에서 한초와 혼합시료의 효능을 확인하였다. 결과는 A549 cells에서의 결과와 유사하게, 한초와 혼합의 엑스펠라 착유 시료에서 LPS로 증가된 염증단백질 발현양이 감소되는 것을 재확인하였다.

3, in vitro 실험으로 LPS-stimulated A549 cells과 LPS-stimulated Norma primary tracheal epithelial cells의 결과에 따라, in vivo 실험에 효능을 평가할 시료를 선정하였으며, 선정된 시료는 엑스펠라 착유로 얻어진 만생종, 한초, 그리고 혼합시료이며, 농도는 in vitro 실험에 사용된 농도의 10배 (0.2%) 와 100배 (2%) 진행하였다.

먼저, 기관지 폐포 세척액 세포(BAL cells)에서의 염증세포를 분석하기 위해, 기관지세척액(BAL fluids)에 유입된 총 세포 수와 세포분포의 변화를 보았다. 그 결과, 천식동물모델 경우, 총 세포 수, eosinophils, 그리고 lymphocytes를 포함한 염증 세포의 유의한 증가를 보였으며, 한초 2%, 혼합 0.2%, 그리고 혼합 2% 시료에서 총 세포수, eosinophils, 그리고 lymphocytes의 수가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 천식동물모델에서 증가된 총 세포수와 eosinophils의 수는 한초 2%와 혼합 2%군에 유의하게 감소되는 것으로 확인되었고, 천식동물모델에서 증가된 lymphocytes의 수는 혼합 0.2%와 혼합 2%군에서 유의하게 감소되는 것을 확인하였다.

다음은 폐 조직에서 염증 매개물질인 cytokine들을 확인하기 위하여 Western blot과 Densitometry 분석을 진행하였으며, 천식동물모델의 BAL cells에서 증가된 염증세포 수를 감소시킨 한초 2%, 혼합 0.2% 및 혼합 2%의 시료를 비교하였다. 그 결과, IL-4, IL-15, 그리고 IL-13의 단백질 양이 천식동물모델에서 유의하게 증가되는 것을 확인하였고, 혼합 0.2%와 혼합 2%시료가 IL-4 단백질 발현양을 유의성있게 감소시키는 것이 확인되었다. IL-5와 IL-13의 단백질 발현에서는 혼합 0.2%의 시료에서 감소시키는 경향으로 확인되었지만, 통계적 유의성은 없었다.

메타콜린의 농도 증가에 따른 기도 과민반응 분석 결과는 천식동물모델에서의 기도 과민반응은 메타콜린 농도(10, 25, 50 mg/ml)에서 유의하게 증가가 되었고, 한초 2%, 혼합 0.2%, 그리고 혼합 2% 시료는 메타콜린 농도 (10, 25, 50 mg/ml)에서 기도 과민반응이 감소되는 경향을 보였다. 특히, 혼합 0.2% 경우, 5, 10, 그리고 25 mg/ml의 메타콜린 농도에서 기도과민반응이 감소되는 것으로 확인이 되었었고, 50 mg/ml의 메타콜린 농도에서는 혼합 2%에서 기도과민반응이

감소되는 것으로 나타났다.

마지막으로 병리적 분석에서 확인한 결과, 천식동물모델에서 전형적인 특징으로 상피세포가 두꺼워지고, 기관지와 혈관 주변의 염증세포의 침윤을 보였고, 한초 2%, 혼합 0.2%, 그리고 혼합 2%에서 천식의 병리학적인 변화가 호전이 되는 것을 확인하였다. 또한, 이를 inflammatory score를 진행 해 보았을 때도, 3개 시료 모두에서 천식동물모델에서 증가된 inflammatory score가 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

이러한 연구 결과는 산초유의 추출 방식에 따라 항염증효과가 다르며, 특히, 엑스펠라 착유로 얻은 산초유 시료의 항염증 효과를 관찰할 수 있었으며, 천식동물모델에서 엑스펠라 착유로 얻은 한초와 혼합시료가 천식증상을 완화시키는 것으로 확인이 되었다. 따라서 산초유에 대한 더 많은 연구가 필요하겠지만, 본 연구 결과는 한초와 혼합시료의 산초유가 천식질환에 대한 예방 및 치료효과를 가질 수 있다는 하나의 근거를 제시한다고 할 수 있다.

V. 참고문헌

1. Zhao ZF, Zhu RX, Zhong K, He Q, Luo AM, Gao H. Characterization and comparison of the pungent components in commercial *Zanthoxylum bungeanum* oil and *Zanthoxylum schinifolium* oil. *J Food Sci.* 2013 Oct;78(10):C1516-22.
2. Wang CF, Fan L, Tian M, Qi XS, Liu JX, Feng JB, Du SS, Su X, Wang YY. Radiosensitizing effect of schinifoline from *Zanthoxylum schinifolium* Sieb et Zucc on human non-small cell lung cancer A549 cells: a preliminary in vitro investigation. *Molecules.* 2014;19(12):20128-38.
3. Mi Seun Jung, Yeon Mi Shin, Myeong Kyu Kim, Chul Ho Kim, Jine Shang Choi. Physicochemical properties of Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*) seeds oil base extracts from different method. *Korean J Food Preserv.* 2013;20(6); 827-833

4. L-2-Oxothiazolidine-4-carboxylic acid or α -lipoic acid attenuates airway remodeling: involvement of nuclear factor- κ B (NF- κ B), nuclear factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2), and hypoxia-inducible factor (HIF). Park SJ, Lee KS, Lee SJ, Kim SR, Park SY, Jeon MS, Lee HB, Lee YC. *Int J Mol Sci*. 2012;13(7):7915-37.
5. Inhibition of p38 MAPK reduces expression of vascular endothelial growth factor in allergic airway disease. Kim SR, Lee KS, Park SJ, Jeon MS, Lee YC. *J Clin Immunol*. 2012 Jun;32(3):574-86.
6. HIF-1 α inhibition ameliorates an allergic airway disease via VEGF suppression in bronchial epithelium. Kim SR, Lee KS, Park HS, Park SJ, Min KH, Moon H, Puri KD, Lee YC. *Eur J Immunol*. 2010 Oct;40(10):2858-69.
7. Involvement of sirtuin 1 in airway inflammation and hyperresponsiveness of allergic airway disease. Kim SR, Lee KS, Park SJ, Min KH, Choe YH, Moon H, Yoo WH, Chae HJ, Han MK, Lee YC. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2):449-460.