

# 升麻추출물이 RBL-2H3 Cell과 Mouse에 미치는 항알레르기 효과

정홍식 · 강경화 · 최영현<sup>1</sup> · 최병태<sup>2</sup> · 이용태\*

동의대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 생화학교실, 2: 해부학교실 · 동의대학교 한의학연구소

## Anti Allergic Effects of Cimicifuga Racemosa on Allergic Models

Heung Sik Jung, Kyung Hwa Kang, Young Hyun Choi<sup>1</sup>, Byung Tae Choi<sup>2</sup>, Yong Tae Lee\*

*Department of Physiology, 1: Biochemistry, 2: Anatomy, College of Oriental Medicine, Dongeui University*

Cimicifuga racemosa (Black cohosh) has been used as therapeutics for pain and inflammation in Korean folk medicine. The potential effects of cimicifuga racemosa extract on mast cell dependent allergy reaction, however, have not been well elucidated yet. In the present study, we investigated the effect of cimicifuga racemosa extract on the allergy reaction using mast cell dependent in vivo and in vitro models. The oral administration of cimicifuga racemosa extract showed inhibitory potential on the compound 48/80 induced active systemic anaphylactic shock. cimicifuga racemosa extract also significantly inhibited the anti DNP IgE induced passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction and acetic acid induced vascular permeability. In addition, cimicifuga racemosa extract inhibited the beta hexosaminidase release and TNF alpha and IL 4 mRNA induction by DNP HSA in rat leukemia mast cells, RBL 2H3. but cimicifuga racemosa extract didn't affected to RBL 2H3 cell viability. These results demonstrated that cimicifuga racemosa extract has an anti allergic potential and it may be due to the inhibition of histamine release and cytokine gene expression in the mast cells.

**Key words :** Cimicifuga racemosa, allergy, compound 48/80, anaphylaxis, cytokine

### 서 론

알레르기는 다양한 외부환경의 변화에 신체가 적응하지 못하고 과민한 면역반응을 일으키는 것으로 학습, 일 및 작업에 대한 능률을 떨어뜨리고 치료비 부담, 생산력의 감소로 인하여 개인 및 국가에 상당한 경제적 부담을 주는 21세기 최대의 만성질환이다. 또한 알레르기를 일으키는 원인물질은 매우 다양하여 음식물, 환경, 세균감염, 약물, 심한 운동, 물리적 자극, 심지어는 스트레스가 알레르기 반응을 유발할 수도 있다.

알레르기 질환을 한의학에서는 인체의 내부와 외부의 환경이 조화를 이루지 못한 결과 나타나는 정상적인 외부반응에 대한 신체의 과잉면역반응으로 보고 환자의 체질과 증상에 따라 알맞은 여러 가지 치료법으로 치료한다.

升麻 (Cimicifuga Rhizoma)는 Komarov 또는 기타 동속식물(미나리아재비과 Ranunculaceae)의 뿌리줄기이며<sup>1)</sup>, 『東醫寶鑑』

에 의하면 升麻는 성질이 平하고 맛이 甘苦無毒하며, 모든 毒을 풀어주고 온갖 혀것에 들린 것을 없애고 瘰瘍과 瘰氣를 물리친다. 驚毒과 風腫, 여러가지 毒으로 목 안이 아픈 것, 입이 허는 것 등을 치료한다고 되어있다<sup>2)</sup>.

한편 升麻는 북아메리카에서 black cohosh라 불리며, 여러가지 부인질환을 치료하기 위해 사용한 기록이 있으며, 1940년 초기부터는 독일에서 뇌하수체 장애치료, 월경 및 폐경과 관련된 자율신경증상의 치료제로 사용되어왔다<sup>3)</sup>.

하지만 升麻에 관한 약리학적 연구는 갱년기 증후군, 유방암, 간손상 등을 위주로 많이 시행되어 왔으나<sup>4-8)</sup>, 항 염증과 항알레르기에 관한 연구는 이에 비해 미비한 실정이다.

이에 升麻가 알레르기 질환에서의 효과를 살펴보기 위하여 본 실험을 시행하였는 바, rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cell과 mouse를 이용한 active systemic anaphylactic shock reaction, passive cutaneous anaphylaxis, vascular permeability, MTT assay, RT-PCR, b- hexosaminidase release assay를 통해 升麻추출물의 알레르기 억제효과를 조사하였다. 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

\* 교신저자 : 이용태, 부산시 부산진구 양정2 산45 동의대학교 한의과대학

· E-mail : ytlee@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8635

· 접수 : 2006/01/30 · 수정 : 2006/03/11 · 채택 : 2006/03/28

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험에 사용한 마우스는 ICR계통웅성 (6주령, 30g ± 2g)을 (주) 샘타코 바이오 코리아에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22°C ± 2°C, 습도 55 ± 5%, dark/light (12시간)조건 하에서 고형 pellet 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다.

### 2. 세포 배양

RBL-2H3 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양받았으며 세포의 배양을 위하여 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 1% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 포함한 DMEM (Dulbecco's modification Eagle medium, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양한다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건 하에서 배양하고 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대배양한다.

### 3. 승마추출물의 조제와 투여

본 실험에 사용된 약재는 동의대학교 부속한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 升麻 300 g을 round flask에 넣고 증류수 2,000 ml를 가하여 3 시간 동안 가열추출하여 추출액을 여과한 다음 동결건조하여 32.41 g의 추출물을 얻어 냉동보관 (-20°C)하였다. 실험 직전에 생리식염수에 녹여 사용하였다. 승마추출물(Cimicifuga Rhizoma: CR)의 경구투여를 위해 mouse용 철제 經口注入器 (직경 1.5×70mm, Harvard apparatus, USA)를 70% ethanol에 12시간 침적하여 멸균 후 사용하였다. CR(승마추출물) 투여군은 알레르기 유발 전 5일간 1일 2회 투여하였으며, 투여량은 0.5 g/kg과 1 g/kg으로 대조군은 동량의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하였다.



Fig. 1. *Cimicifuga Rhizoma*



### 4. Active systemic anaphylactic shock

실험군(Sample)은 ICR mouse 10마리를 1군으로 하여 5일간 하루 2번씩 CR을 0.5 g/kg 또는 1 g/kg로 경구투여하고, 대조군 (Control: CON)은 동량의 saline을 처리한 후 compound 48/80 (8 mg/kg, sigma)을 복강 내에 투여하고 mouse의 치사율을 60 분 동안 관찰하였다.

### 5. Passive cutaneous anaphylaxis<sup>9)</sup>

IgE 의존형 피부과민반응에 대한 영향을 알아보기 위하여

Katayama 등의 방법에 준하여 ICR mouse 10마리를 1군으로 하고 5일간 하루 2번씩 CR을 0.5 g/kg 또는 1 g/kg로 경구투여한 후 등 부위를 제모하고 anti-DNP IgE를 피하주사하여 감작시켰다.

48시간 경과 후 DNP-HSA 1mg과 4% evans blue를 1:1로 혼합하여 mouse의 미정맥에 주사하였다. CON은 동량의 saline을 처리하였다. 30분 후 mouse를 도살하고 청색으로 착색된 등 부위의 피부를 체취하여 1N KOH용액 100 μl에 침적시켜 37°C에서 하룻밤 방치하였다. Acetone과 phosphoric acid (5:13) 혼합 약 900 μl를 첨가하여 원심분리한 후 상층액을 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. Acetic acid에 의한 모세혈관 투과성<sup>10,11)</sup>

Acetic acid에 의한 모세혈관 투과성은 Whuttle과 Shimomura의 방법에 준하여 ICR mouse 10마리를 1군으로 하여 CR을 투여하였으며, CON은 동량의 saline을 투여하였다.

1시간 후 1% evans blue 5 ml/kg를 미정맥에 주사 후 즉시 0.6% acetic acid 10 ml/kg를 복강 내에 주사하고 1시간 후에 생리식염수 10 ml로 복강액을 세척해서 회수한 다음 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 620 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량선에 의해 복강으로 누출된 evans blue의 양을 비색 정량하였다.

### 7. MTT assay

RBL-2H3 세포가 2 × 10<sup>4</sup>개 들어가도록 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, CR을 농도별로 처리한 다음 15분 동안 5% CO<sub>2</sub> 37°C incubator에서 배양한다. 5 mg/ml tetrazolium bromide salt (MTT; (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Amresco, Solon, Ohio, USA) 시약을 20 μl씩 각 well에 넣고 4시간 37°C incubator에서 배양한 후 media를 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 200 μl 씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 6회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

### 8. b-Hexosaminidase release assay<sup>12-14)</sup>

b-Hexosaminidase release assay는 Choi O. H의 방법에 준하여 실시하였다. b-Hexosaminidase는 basophil과 mast cell specific granule의 구성물질로 알려져 있으며, 탈과립에 의한 histamine의 분비는 b-hexosaminidase의 분비량과 비례한다. 따라서 b-hexosaminidase의 분비활성을 측정함으로써 RBL-2H3의 탈과립과 histamine의 분비 정도를 살펴보았다.

RBL-2H3 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 혼탁 시킨 후 24 well plate에 각 well당 2 × 10<sup>5</sup>개의 세포가 들어가도록 한 다음 각 well당 0.5 μg/ml DNP-IgE로 감작시킨 후 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하룻밤 배양한다. 이후 각 well의 세포들을 Siragianian Buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25

mM PIPES, 40 mM NaOH, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2번 세척한 다음 37°C에서 10 분간 각 well 당 Siraganian Buffer로 전 반응시키고, 대조군과 CR을 농도별 (0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/ml)로 각각 첨가한 후 10 분간 다시 반응시켰다. 이후 세포를 37°C에서 30 분간 antigen (DNP-HSA, 10 µg/ml)을 처리하여 탈 과립상태로 만든 후 반응을 ice bath에서 10 분간 incubation 시켜 반응을 종결시키고 상층액을 취해 12,000 rpm에서 90 초간 원심분리한 뒤 다시 상층액 20 µl를 96 well plate에 옮긴 후 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide를 넣고 37°C에서 1 시간 동안 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>)을 넣은 다음 ELISA로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료와 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 억제율을 산출하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (T-B-N) / (C-N)] \times 100$$

N: DNP-HAS(-), test sample (-); C: DNP-HAS(+), test sample(+); T: DNP-HAS(+), test sample (+); B: DNP-HAS(-), test sample (+).

#### 9. 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

##### 1) 세포에서 total RNA 추출

RBL-2H3 세포 ( $2.5 \times 10^6$  cells)에 100 ng/ml anti-DNP-IgE를 넣고 하루 동안 배양한 후 CR을 15 분간 처리한다. 그 후 10 µg/ml DNP-HSA를 한 시간 처리 후 4°C PBS로 세척한 후 1 ml의 TRizol을 넣고 2분간 방치한 후 chloroform을 넣고 10초간 vortexing한다. 원심분리기로 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합한 후 천천히 흔들어 주었다. 그리고 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)- DW 20 µl에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

##### 2) RT-PCR

준비된 total RNA와 antisense primer와 sense primer를 RT-PCR kit (iNtRON Biotechnology, Inc.)에 넣고 최종 부피가 20 µl가 되도록 DEPC DW를 가하였다. Reverse transcription reaction은 45°C에서 30 min간 반응시킨 다음 94°C에서 5 분간 RNA를 denaturation하여 cDNA를 만든 후 94°C에서 1분간 denaturation 시키고, 50°C ~ 53°C에서 45초간 annealing 시킨 다음, 72°C에서 1분간 extension 시키는 cycle을 30회 반복 한 뒤에, 마지막 extension은 72°C에서 7분간 수행하였다. 각 PCR products는 20 µl 씩 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Primer sequence

Cytokine		Sequence (rat)	Length (bp)
TNF-a	sense	5'-CAAGGAGGAGAAGTTCCCAA-3'	501
	antisense	5'-CGGACTCCGTGATGCTAA-3'	
IL-4	sense	5'-ACCTTGCTGTCACCCGTGTC-3'	351
	antisense	5'-TTGTGAGCGTGGACTCATTC-3'	
$\beta$ -actin	sense	5'-TAACCAACTGGGACGATATG-3'	202
	antisense	5'-ATACAGGGACAGCACAGCCT-3'	

#### 10. 통계 분석

성績은 평균치±표준오차로 나타내었고 평균치간의有意性은 Student's t-test를 이용하여 검정하였으며 p 값이 0.05 미만일 때有意한 것으로 판정하였다.

## 결과

#### 1. Active Systemic Anaphylactic Shock 반응에 미치는 영향

Compound48/80으로 유도한 active systemic anaphylactic shock 반응으로 10 마리의 ICR mouse 중 CON은 60분 이내에 anaphylactic shock으로 100%의 치사율을 나타내었고, 0.5 g/kg과 1 g/kg의 CR을 하루 2회씩 5일간 투여한 경우 치사율이 각각 90%와 80%로 감소하였다. (Table 2).

Table 2. Effect of *Cimicifugae Rhizoma* on the compound 48/80 induced active systemic anaphylactic shock

Sample	Treatment	Lethality (%)
NOR		0
CON	saline	100
<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	0.5 (g/kg)	90
	1.0	80

The data represents the lethality from 10 mice. NOR: Non treated group, CON: Group treated with saline twice a day for 5 days before compound 48/80 injection (8 mg/kg, i.p.), *Cimicifugae Rhizoma*: Group i.p. treated with 0.5 g/kg and 1.0 g/kg of *Cimicifugae Rhizoma* twice a day for 5 days before compound 48/80 injection

#### 2. Passive Cutaneous Anaphylaxis 반응에 미치는 영향

Passive cutaneous anaphylaxis 반응에서 NOR은 2.45 ± 0.03 µg/site이었고, CON은 4.30 ± 0.15f µg/site로 NOR에 비해 유의성 있는 증가 (###; P<0.005)를 보였으며, 승마추출물 0.5 g/kg과 1 g/kg를 투여한 군은 각각 3.94 ± 0.05 µg/site와 3.71 ± 0.06 µg/site로 CON에 비해 유의성 있는 감소 (\*; P<0.05, \*\*; P<0.01)를 보였다 (Fig. 2).

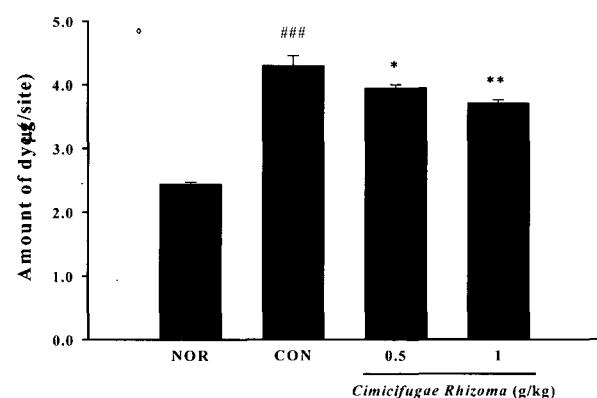


Fig. 2. Effect of *Cimicifugae Rhizoma* on the passive cutaneous anaphylaxis reaction Data represents the mean±SE from 10 mice. #, significantly different from NOR (###; P<0.005). \*, significantly different from CON (\*; P<0.05, \*\*; P<0.01). NOR: Group orally administrated with saline twice a day for 5 days. CON: Group orally administrated with saline twice a day for 5 days before the challenge with antigen. *Cimicifugae Rhizoma*: Group orally administrated with 0.5 g/kg and 1 g/kg of *Cimicifugae Rhizoma* twice a day for 5 days before the challenge with antigen

#### 3. Vascular Permeability에 미치는 영향

Acetic acid induced vascular permeability에서 NOR은 2.60

$\pm 0.03 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고, CON은  $2.75 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 NOR에 비해 유의성 있는 증가 (###;  $P<0.005$ )를 보였으며, CR 0.5 g/kg 과 1 g/kg를 투여한 군은 각각  $2.67 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ 와  $2.67 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 CON에 비해 유의성 있는 감소 (\*;  $P<0.05$ )를 보였다 (Fig. 3).

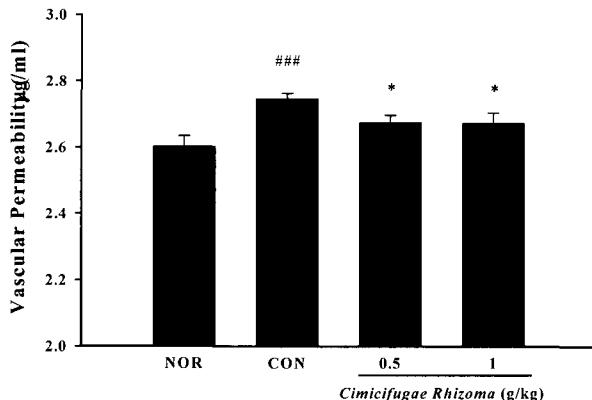


Figure 3. Effect of *Cimicifugae Rhizoma* on the acetic acid-induced vascular permeability. Data represents the mean  $\pm$  SE from 10 mice. #: significantly different from NOR (###;  $P<0.005$ ). \*: significantly different from CON (\*;  $P<0.05$ ). NOR: Group only orally administrated with saline twice a day for 5 days. CON: Group orally administrated with saline twice a day before the challenge with antigen. *Cimicifugae Rhizoma*: Group orally administrated with 0.5g/kg and 1g/kg of *Cimicifugae Rhizoma* twice a day for 5 days before the challenge with antigen.

#### 4. RBL-2H3에서 Cell Viability에 미치는 영향

RBL-2H3에서 cell viability에 미치는 영향은 CON은  $2.80 \pm 0.20$ 이었고, CR 처리군은 농도별(0.001, 0.01, 0.1, 1.0 및 3 mg/ml)로 각각  $2.69 \pm 0.06$ ,  $2.48 \pm 0.08$ ,  $2.29 \pm 0.07$ ,  $2.33 \pm 0.09$  및  $2.36 \pm 0.08$ 으로 0.1 mg/ml 처리군을 제외하고 CR이 RBL-2H3의 cell viability에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

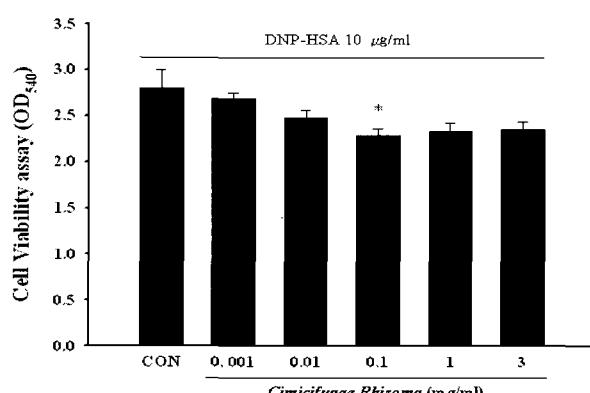


Fig. 4. Effect of *Cimicifugae Rhizoma* treatment on cell viability in RBL-2H3 cells. \*: significantly different from CON (\*;  $P<0.05$ ). CON: *Cimicifugae Rhizoma* non treated group. Cytotoxicity was measured, after 24 hours, by the MTT assay described in the Methods.

#### 5. RBL-2H3에서 b-Hexosaminidase Release에 미치는 영향

RBL-2H3의 b-hexosaminidase release에 미치는 영향은 CR의 농도별 (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 및 10)로 각각  $21.1 \pm 3.6\%$ ,  $24.6 \pm 5.2\%$ ,  $29.8 \pm 3.5\%$ ,  $45.6 \pm 10.5\%$ , 및  $56.1 \pm 7.0\%$ 의 억제률을 보였으며 농도비례적으로 b-hexosaminidase release를 억제하는 것으로 나타났다 (Table 3).

Table 3. Inhibition effects of *Cimicifugae Rhizoma* on b-hexosaminidase release from RBL-2H3

<i>Cimicifugae Rhizoma</i> (mg/ml)	Inhibition (%) <sup>1,2)</sup>
0.001	$21.1 \pm 3.6$
0.01	$24.6 \pm 5.2$
0.1	$29.8 \pm 3.5$
1.0	$45.6 \pm 10.5$
10	$56.1 \pm 7.0$

1) Inhibition (%) =  $[1-(T-B-N)] / (C-N) \times 100$ . N: DNP-HAS(-), test sample (-); C: DNP-HAS(+), test sample(-); T: DNP-HAS(+), test sample (+); B: DNP-HAS(+), test sample (+). 2) Data represents the mean  $\pm$  SE of 3 independent experiments.

#### 6. RBL-2H3에서 TNF-a와 IL-4 mRNA의 발현에 미치는 영향

RBL-2H3에 10 mg/ml 의 anti-DNP-IgE으로 48시간 감작하고 CR을 0.001, 0.01, 0.1, 및 1 μg/ml의 농도 별로 처리한 후 DNP-HSA으로 탈과립을 유도한 결과 TNF-a mRNA의 발현은 처리한 CR의 농도에 비례적으로 감소하는 양상을 나타내었다. IL-4 mRNA의 발현은 CR의 농도 1 mg/ml 처리에서 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5).

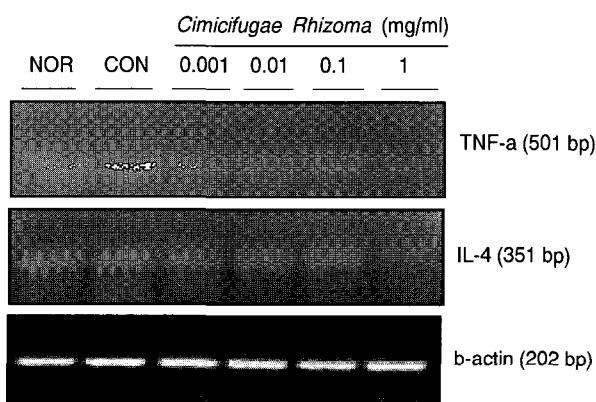


Fig. 5. Effects of *Cimicifugae Rhizoma* on expression of TNF-a and IL-4 in anti DNP-IgE sensitized RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were stimulated with 10 mg/ml DNP - HSA with or without *Cimicifugae Rhizoma* for 4 hrs. Total RNA was extracted, and the levels of TNF-a, IL-4 and b-actin mRNA were determined by RT-PCR.

## 고찰

승마 (black cohosh, 학명: *Cimicifuga Racemosa*)는 아메리카 원주민이 여러 가지 부인질환을 치료하기 위해 사용한 기록이 있으며, 1940년대 초부터 독일에서는 뇌하수체 장애의 치료, 그리고 월경 또는 폐경과 관련된 자율신경 증상을 치료하기 위한 자연 생약제제로 사용되어 왔다.<sup>3)</sup> 또한 CR(승마추출물)은 인간과 동물 연구에서 보고된 독성이 없어 현재까지 알려진 금기사항이 없을 정도로 안정성이 확립되어 있으나, 가벼운 일과성 위장장애가 보고되어 있으며, 임신과 수유시에는 사용이 권장되지 않고 있다.

《中藥大辭典》에 升麻는 發表, 透疹, 解毒, 頭痛, 寒熱, 喉痛, 口瘡, 斑疹, 久瀉久痢, 脫肛, 婦女崩帶, 痛腫瘡毒 등의 치료에 사용되었고 淸熱, 解毒, 祥風의 효능이 있으므로 熱이 있는 질환이나 咽喉痛, 口瘡 등에 효과가 있는 것으로 기재되어 있다.<sup>15)</sup>

알레르기는 다양한 외부환경의 변화에 신체가 적응하지 못하고 과민한 면역반응을 일으키는 것으로 한의학에서는 환자의 체질과 증상에 따라 알맞은 여러 가지 치료법들이 존재한다. 한

의학적 관점에서 알레르기의 치료는 正氣의 강화, 즉 면역의 정상화를 꾀하여 외부의 자극과 변화에 대해 신체의 방어력과 적응력을 높임으로써 인체의 正氣, 생리기능을 항상 일정하게 유지해주는 효과를 갖는다. 그 중에서 승마는 청열해독거품의 효과<sup>15)</sup>를 가지고 있으므로 임상에서도 알레르기 증상에 많이 활용되고 있는 약재이다. 승마에 관한 약리학적 연구로는 갱년기 증상, 유방암, 골다공증, 간 손상, 치주염 등에 관한 연구가 주로 활발히 이루어지고 있으나<sup>16)</sup> 알레르기에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

알레르기질환에서 일어나는 면역반응은 외부로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 생산하며 생체가 이에 대처하여 처리하는 연쇄적인 반응인데, 생체에 유리해야만 할 면역 현상의 과정에서 反逆反應이 일어나 도리어 생체에 불리하게 작용한다. 이처럼 면역체계의 부조화로 인해 발생하는 알레르기성 질환은 기생충 등에 감염률이 적은 선진국에서 높은 발생률을 보이고 있다<sup>16)</sup>.

이에 본 실험에서는 RBL-2H3 rat leukemia mast cell과 mouse를 이용하여 active systemic anaphylactic shock reaction, passive cutaneous anaphylaxis, vascular permeability, MTT assay, RT-PCR, b-hexosaminidase release assay를 통해 升麻추출물의 알레르기 억제효과를 조사하였다.

천식과 아토피 같은 알레르기 질환은 mast cell과 basophil에 IgE 매개 병리적 기전에 원인이 있으며<sup>17)</sup>, Antigen crosslink 된 IgE는 mast cell과 basophil의 탈파립을 일으켜 anaphylaxis를 유발한다.<sup>18,19)</sup> anaphylaxis는 즉시형 과민반응 중 가장 전격적이고 중한 반응으로 이중 전신 anaphylaxis는 신체의 어느 장기라도 영향을 줄 수 있으며, 특히 폐, 순환기, 피부, 신경계, 소화기 등에 빈번하게 증상이 발생한다.<sup>17)</sup> anaphylaxis는 mast cell의 세포질 과립 속에 저장되어 있는 histamine을 위시하여 mast cell의 세포막 인지질의 대사산물로서 새롭게 생산되는 prostaglandin과 leukotriene들이 세포 밖으로 유리되고, 이러한 화학적 전달물질들에 의해 모세혈관투과성의 항진, 평활근 수축 및 분비항진 등으로 인한 조직장애가 일어난다.<sup>20)</sup> mast cell의 과립들에는 histamine, serotonin, heparin 등이 주로 함유되어 있으며 이러한 과립들이 탈파립 인자에 의하여 세포 밖으로 방출되어 면역반응, 혈관운동 및 신경조절 물질로서 작용하는 것으로 알려져 있다. mast cell의 탈파립에 의해 분비된 히스타민 등의 화학적 매개물질에 의해 알레르기성 염증반응이 나타나며 염증성 cytokine의 발현이 활성화된다. 알레르기성 질환의 西醫學의 치료로는 抗原의 접촉을 피하는 회피요법, 항히스타민제, corticosteroid, sodium cromoglycate, 혈관수축제 등의 약물을 요법, 원인이 되는 항원을 낮은 농도부터 점차로 양을 증가시키면서 피해주사함으로써 외부에서 抗原이 유입되어도 알레르기 반응이 일어나지 않도록 면역관용을 유도하는 면역요법 등이 있다.<sup>21,22)</sup>

알레르기 반응에 의해 활성화된 비만세포는 히스타민 외에 TNF-α와 IL-4 같은 cytokine을 분비하고, TNF-α와 IL-4는 다른 proinflammatory signal molecule들의 발현을 촉진시켜 알레르기 염증반응을 일으킨다. Compound 48/80은 알레르기 동물 실험모델에 많이 사용되는 약물로 N-methyl-p-methoxyphenylethylamine

과 formaldehyde에 의하여 cross-link 된 phenethylamine의 mixed polymer로서 비만세포의 세포막내로의 Ca<sup>++</sup>의 유입을 증가시키고, cAMP-phosphodiesterase를 활성화시켜 세포 내 cAMP 수준을 감소시킴으로써 비만세포의 탈파립을 증가시키는 강력한 약물로 알려져 있다.<sup>23,24)</sup> Compound 48/80으로 유도한 active systemic anaphylactic shock 반응에 미치는 영향은 10 마리의 ICR mouse 중 CON은 60분 이내에 anaphylactic shock으로 100%의 치사율을 나타내었고, 0.5 g/kg과 1 g/kg의 CR을 하루 2회씩 5일간 경구 투여한 경우 치사율이 각각 90%와 80%로 감소하였다.(Table 2). Passive cutaneous anaphylaxis 반응은 항원과 항체가 반응하고 있는 곳에서 histamine 등의 생리활성물질이 유리되어 혈관벽의 투과성이 증가하고 혈장과 염색물질이 누출되어 피부에 청색반인 형성되는 것을 관찰하는데 있다. Passive cutaneous anaphylaxis 반응에서 NOR은 2.45 ± 0.03 mg/site이었고, CON은 4.30 ± 0.15 mg/site로 NOR에 비해 유의성 있는 증가 (###; P<0.005)를 보였으며, CR 0.5 g/kg과 1 g/kg를 투여한 군은 각각 3.94 ± 0.05 mg/site와 3.71 ± 0.06 mg/site로 CON에 비해 유의성 있는 감소 (\*; P<0.05, \*\*; P<0.01)를 보였다 (Fig. 2). Acetic acid induced vascular permeability에서 NOR은 2.60 ± 0.03 mg/ml이었고, CON은 2.75 ± 0.02 mg/ml로 NOR에 비해 유의성 있는 증가 (###; P<0.005)를 보였으며, CR 0.5 g/kg과 1 g/kg를 투여한 군은 각각 2.67 ± 0.02 mg/ml와 2.67 ± 0.03 mg/ml로 CON에 비해 유의성 있는 감소 (\*; P<0.05)를 보였다 (Fig. 3). RBL-2H3에서 cell viability에 미치는 영향은 CON은 2.80 ± 0.20이었고, 승마추출물 처리군은 농도별(0.001, 0.01, 0.1, 1.0 및 3 mg/ml)로 각각 2.69 ± 0.06, 2.48 ± 0.08, 2.29 ± 0.07, 2.33 ± 0.09 및 2.36 ± 0.08으로 0.1 mg/ml 처리군을 제외하고 CRO의 RBL-2H3의 cell viability에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 4). b-Hexosaminidase는 basophil과 mast cell specific granule의 구성물질로 알려져 있으며, 탈파립에 의한 histamine의 분비는 b-hexosaminidase의 분비량과 비례 한다.<sup>25,26)</sup> 따라서 b-hexosaminidase의 분비활성을 측정함으로써 RBL-2H3의 탈파립과 histamine의 분비 정도를 살펴보았다. RBL-2H3의 b-hexosaminidase release에 미치는 영향은 CR의 농도별 (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 및 10)로 각각 21.1 ± 3.6%, 24.6 ± 5.2%, 29.8 ± 3.5%, 45.6 ± 10.5%, 및 56.1 ± 7.0%의 억제률을 보였으며 농도비례적으로 b-hexosaminidase release를 억제하는 것으로 나타났다(Table 3). RBL-2H3에 10 mg/ml의 anti DNP-IgE으로 48시간 감작하고 CR을 0.001, 0.01, 0.1, 및 1 μg/ml의 농도 별로 처리한 후 DNP-HSA으로 탈파립을 유도한 결과 TNF-a mRNA의 발현은 처리한 승마추출물의 농도에 비례적으로 감소하는 양상을 나타내었다. IL-4 mRNA의 발현은 CR의 농도 1 mg/ml 처리에서 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5).

## 결 론

升麻의 알레르기 질환에서의 효과를 살펴보기 위하여 rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cell과 mouse를 이용한 CR(승마

추출물)의 알레르기 억제효과를 조사한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

Compound 48/80으로 유도한 active systemic anaphylactic shock 반응에서 90%와 80%의 치사율 감소를 보였다. (Table 2). Passive cutaneous anaphylaxis 반응에서 유의성 있는 감소 (\*; P<0.05, \*\*; P<0.01)를 보였다 (Fig. 2). Acetic acid induced vascular permeability에서 유의성 있는 감소 (\*; P<0.05)를 보였다(Fig. 3). RBL-2H3의 cell viability에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4). RBL-2H3의 b-hexosaminidase release는 농도비례적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Table 3). RBL-2H3에서 TNF-a mRNA의 발현은 처리한 CR의 농도에 비례적으로 감소하는 양상을 나타내었다. IL-4 mRNA의 발현은 CR의 농도 1 mg/ml 처리에서 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5).

### 참고문헌

1. 신민교. 원색임상본초학. 서울, 남산당, pp 540-541, 1996
2. 허준. 대역동의보감. 서울, 법인문화사, pp 1918-1919, 1999
3. Foster, S. Black cohosh (*Cimicifuga heracleifolia*): a literature review. *Herbalgram*. 45, 35-49, 1999.
4. McKenna, D.J., Jones, K., Humphrey, S., Hughes, K. Black cohosh: efficacy, safety, and use in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med*. 7(3):93-100, 2001.
5. Lieberman, S. A review of the effectiveness of *Cimicifuga racemosa*(black cohosh) for the symptoms of menopause. *J Womens Health*. 7(5):525-529, 1998.
6. 박지현 외. Comparative study on Treatment of postmenopausal Symtoms with Black Cohosh Extract and Hormone Replacement Therapy. 대한산부인과학회지 45권 8호, p 1330.
7. Duker, E.M., Kopanski, L., Jarry, H., Wuttke, W. Effects of extracts form cimafuga racemosa on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Planta Med* 57(1):420-424, 1991.
8. Liske, E. Therapeutic efficacy and safety of *Cimicifuga racemosa* for gynecologic disorders, *Adv Ther* pp 45-53, 1998.
9. S. Katayama, H. Shionoya, S. Ohtake. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous allergy in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* 22, 89-101, 1978.
10. Whittle, B.A. *Brit J. Pharmacol.* 22, 246, 1964.
11. Shimomura, K. *Japan J. Pharmacol.* 24, 837, 1972.
12. Teshima, R., Saito, Y., Ikebuchi, H., De Silva, N.R., Morita, Y., Nakanishi, M., Sawada, J., Kitani S., *J. Immunol.*, 159, 964-969, 1997.
13. Aketani, S., Teshima, R., Umezawa, Y., Sawada, J., *Immunol. Lett.* 75, 185-189, 2001.
14. Choi, O.H., Kim, J.H., Kinet, J.P. Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the FcepsilonRI antigen receptor, *Nature (London)*, 380, 634-635, 1996.
15. 강소선의학원 편, 안덕균, 이경순, 신민교, 김창민 역. 중약대 사전. 서울, 도서출판 정담, p 2594, 2004
16. 김태규 외. 免疫生物學. 서울, 라이프사이언스, pp 31, 40, 81, 493-520, 1998.
17. Mistovich, J.J., Limmer, D., Kroft, W.S. Anaphylactic and anaphylactoid reactions. *Emerg Med Serv.* 33(6):48-49, 142, 2004.
18. Stevens, R.L., Austen, K.F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells., *Immunol. Today*, 10, 381-386, 1989.
19. Ohmori, H., Hikida, M., Takai, T. Prostaglandin E2 as a selective stimulator of antigen-specific IgE response in murine lymphocytes., *Eur. J. Immunol.* 20(11):2499-2503, 1990.
20. Sheffer, A.L. Anaphylaxis: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc.* 25(1):31-32, 2004.
21. 盧寬澤. 耳鼻咽喉科學. 서울, 一潮閣, pp 204-208, 1999.
22. 白萬基. 最新耳鼻咽喉科學. 서울, 一潮閣, pp 207-215, 1995.
23. Kim, H.M. Antiallergy drugs from Oriental medicines. *Int. J. Orient. Med.* 1, 1-7, 2000.
24. M.R. Allansmith, R.S. Baird, R.N. Ross, N.P. Barney, K.J. Bloch. Ocular anaphylaxis induced in the rat by topical application of compound 48/80. Dose response and time course study. *Acta Ophthalmol.* 192, 145-153, 1989.
25. Teshima, R., Saito Y., Ikebuchi, H., De Silva, N.R., Morita, Y., Nakanishi, M., Sawada, J., Kitani, S. *J. Immunol.* 159, 964-969, 1997.
26. Aketani, S., Teshima, R., Umezawa, Y., Sawada, J., *Immunol. Lett.*, 75, 185-189, 2001.