

# 荊防地黃湯의 항Allergy 및 항염증 효과

남현욱 · 박종현\*

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실

## Anti-Allergic Effect of Hyeongbangjiwang-Tang

Hyun Wook Nam, Jong Hyun Park\*

Department Pathology, College of Oriental Medicine, Deagu Haany University

The present study was conducted to investigate the anti-allergic activity of HBT. We investigated the anti-allergic effects of HBT in RBL-2H3 basophilic leukemia cells by compound 48/80, a mast cell degranulator. HBT significantly inhibited  $\beta$ -hexosaminidase and histamine release from compound 48/80 stimulated RBL-2H3 cells. The in vitro anti-inflammatory activities of HBT in LPS-stimulated RAW 264.7 cells were investigated. HBT inhibited NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and effectively downregulated the expression of iNOS mRNA and iNOS protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These result provide evidences that HBT may be beneficial in the treatment of allergic inflammtory disease.

Key words : Hyeongbangjiwang-Tang, compound 48/80, nitric oxide  $\beta$ -hexosaminidase, histamine release

### 서 론

현대 사회는 문명의 발달에 따른 환경오염의 증가, 아파트로 대변 되는 주거생활의 변화와 인스턴트식품의 다량 섭취 등으로 각종 알레르기 질환이 매년 증가 추세에 있다. 그 중 알레르기성 비염의 유병률은 우리나라의 경우 1.14%로 대부분 가족력을 가지고 있으며 주증상은 발작적인 재채기, 수양성 비루, 비폐색 등으로 알려져 있다. 이러한 알레르기성 비염의 치료에는 회피요법과 약물 요법이 있지만 아직까지도 병을 완치시킬 수 있는 약제가 알려져 있지 않으며 현재 사용되고 있는 약제 대부분은 장기간 사용할 경우 효과가 떨어진다는 점이 치료의 한계로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

한의학에서 알레르기성 비염은 鼻飢, 噴涕, 鼻涕 등의 범주에 속하는데<sup>2)</sup>, 최근에는 扶正祛邪라는 한의학적인 치료 방법이 알레르기 질환 치료에 시도되는 빈도가 높아지고 있으며 또한 체질과의 관련성을 중요하게 생각하는 경향이 높아져<sup>3)</sup> 체질처방의 임상활용은 물론 이들 처방의 항 allergy 효과에 대한 실험연구도 많이 보고되고 있다<sup>4,5)</sup>. 『東醫壽世保元』에 처음 기재된 荊防地黃湯은 六味地黃湯에서 유래된 처방으로 숙지황, 산수유, 복령, 택사, 차전자, 강활, 독활, 형개, 방풍으로 구성되어 少陽人의

補陰과 降陰의 효과를 강화 시킨 처방으로 볼 수 있으며, 少陽人에 있어 응용 범위가 가장 넓은 처방으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 荊防地黃湯은 『東醫壽世保元』에서 “凡虛弱者 數百貼用之”라고 한 것처럼 소양인 허약자의 만성질환에 다용되고 있고, 특히 알레르기성 비염에 사용할 수 있는 것으로 알려져 있어, 주로 기능이 저하되어 허약한 소양인의 알레르기성 비염 치료에 많이 사용되고 있으며<sup>7-9)</sup>, 본 연구자는 소양인 이외의 일반적인 소아 알레르기성 비염 환자에서도 효과를 얻은 바 있다.

이에 저자는 알레르기성 비염에 사용할 수 있는 荊防地黃湯의 항알레르기 효과에 관한 과학적인 증거를 제시하고자, 荊防地黃湯이 정상세포 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용한 알레르기 반응 시 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비면역자극제인 compound48/80 자극에 의한 Anaphylatic shock에 미치는 영향 및 RAW264.7 대식세포주를 이용하여 염증 반응과 관련된 Nitric Oxide 생성과 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

\* 교신저자 : 박종현, 대구시 수성구 상동 대구한의대학교 한의과대학

· E-mail : moguri@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2248

· 접수 : 2009/05/25 · 수정 : 2009/06/04 · 채택 : 2009/06/13

1) 檢液의 준비

실험에 사용한 藥材는 음니허브에서 구입하여 良質의 것을 精選하여 사용하였으며, 처방은 『東醫壽世保元<sup>10)</sup>』에 收載된 荊防地黃湯으로서 내용 및 1첩 분량은 Table 1과 같다. 荊防地黃湯의 10첩 분량 487.5 g을 증류식 약탕기 (CME 592, 미강기업, Korea)에 전탕 하였다. 전탕 후 얻어진 3 L를 rotary evaporator (Eyela N-11, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)를 이용하여 30℃에서 감압농축 하여 750 ml를 얻었다. 荊防地黃湯의 농축액은 -70℃에서 하루 동안 동결시킨 뒤 동결건조기 (VFDT0005-3085, Biocros, Korea)를 이용하여 -70℃에서 동결건조 시켰다. 농축시 당도는 19.51brix이고, 동결건조 후 무게는 85.6 g(수율 17.5%)으로 PBS에 녹여 2.5 μm와 0.45 μm의 membrane filter (Milipore Co., USA)로 여과하여 실험에 사용하였다.

Table 1. Components of Hyeongbangjiwang-Tang(HBT)

Oriental Crude Drug	Crud Drug	Scientific name	Dose (g)
熟地黃	Rehmannia glutinosa	Rehmanniae Radix Preparat	7.5
山茱萸	Cornus officinalis	Corni Fructus	7.5
茯苓	Poria cocos	Poria	7.5
澤瀉	Alisma platago-aquatica	Alismatis Rhizoma	7.5
車前子	Plantago asiatica	plantaginis Semen	3.75
荊芥	Schizonepeta tenuifolia	Schizonepetae Herba	3.75
防風	Angelica pubescens	Ledebouriellae Radix	3.75
羌活	Notopterygium incisum	Notopterygii Rhizoma	3.75
獨活	Ledebouriella divaricata	Angelicae pubescentis Radix	3.75
총량			48.75

2) 실험동물

무균 환경에서 사육된 5주령의 수컷 ICR 마우스와 6주령의 암컷 마우스를 (주)오리엔트 (경기도 가평, 한국)에서 구입하여 각 실험에 사용하였다. 마우스는 사료와 물을 무제한으로 공급하면서 실험 전 약 1주간 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2℃, 습도는 55±2%를 유지하였다.

2. 방법

1) 비장세포 분리

마우스를 경추 탈골시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 비장을 분쇄한 후 4℃ Hanks Balanced Salt Solution (GibcoBRL, NY, U.S.A)용액으로 2회 세척하였다. Ficoll-pague (Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 1,800rpm 에서 30분 원심 분리하여 임파구 층을 수거한 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A) media로 1회 더 세척하고 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI 1640에 현탁 시켰다. 현탁된 세포는 일정액을 취하여 0.4% trypan blue에 동량으로 혼합한 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다.

2) 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7 (America Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A)은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GibcoBRL, NY, U.S.A)에 10%

heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, NY, U.S.A)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin (GibcoBRL, NY, U.S.A)을 첨가하여 100 mm dish에 80% 세포의 밀도를 유지하면서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Rat의 basophilic 세포주인 RBL-2H3 세포주는 RPMI 1640 Medium (GibcoBRL, NY, U.S.A)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, NY, U.S.A)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin (GibcoBRL, NY, U.S.A)을 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

3) 비장세포의 증식능 측정

마우스 비장세포를 2×10<sup>6</sup>cells/ml 세포가 되게 세포수를 조정하여 96 well culture plate에 100 μl 분주한 다음 각 well에 시료를 농도별로 첨가한 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 48시간 배양하였다. 배양 후 배양액 100 μl에 세포 증식능 시약을 20 μl를 첨가한 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 1시간 30분 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96® AQueous one solution cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, U.S.A) 시약을 사용하였다.

4) β-hexosaminidase의 측정

RBL-2H3 세포를 수거하여 Tyroid buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, PH 7.2)로 1회 세척하였다. 5×10<sup>5</sup>cells/ml 로 조절한 후 Tyroid buffer에서 부유시켰다. 부유된 세포에 농도별로 荊防地黃湯을 첨가하여 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후 compound 48/80 (1 mg/ml, Sigma, U.S.A)을 첨가하고 37℃ 배양기에서 20분간 반응시켰다. 배양 후 RBL-2H3 세포주를 4℃에서 10분간 방치하여 반응을 종결시키고 상층액을 회수하였다. 상층액에 동량의 1 mM p-nitrophenyl-β-acetyl-glucosamide를 넣고 37℃ 배양기에서 1시간 동안 반응시킨 후 2배량의 sodium bicarbonate (PH 10.2)의 첨가로 반응을 종결시키고 407 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. β-hexosaminidase의 분비지표(release index)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\beta\text{-hexosaminidase release index} = \frac{(\text{O.D at 470nm of sample})}{(\text{O.D at 470nm of positive control})} \times 100$$

5) Histamine의 측정

RBL-2H3 세포를 수거하여 Tyroid buffer(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, pH 7.2)로 1회 세척하였다. 세포수를 5×10<sup>5</sup>cells/ml 로 조절한 후 Tyroid buffer에서 부유시켰다. 부유된 세포에 농도별 荊防地黃湯을 첨가하여, 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후 compound 48/80 (1 mg/ml, Sigma, U.S.A)를 첨가하고 37℃ 배양기에서 20분간 반응시켰다. 배양 후 RBL-2H3 세포주를 4℃에서 10분간 방치하여 반응을 종결시킨 후 상층액을 회수하였다. Histamine의 정량은 Shore가 보고한 fluorometer를 이용한 측정방법을 사용하였다. 간단히 설명하면, 회수한 상층액

1 ml에 0.2 ml의 1N NaOH, 0.1 ml의 1% OPA (o-phthalaldehyde)를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 1N HCl 0.2 ml 첨가하여 반응을 종결시킨 다음, fluorometer (Genios, Tecan, Austria)를 사용하여 360 nm의 excitation 파장과 450 nm의 emission 파장을 사용하여 측정하였다.

6) Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로서 Griess (Sigma)시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μl와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100 μl를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 sodium nitrite를 사용하여 만든 표준곡선에 의해 산출하였다.

7) RT-PCR을 이용한 iNOS 유전자 분석

RNA분리는 RNA-Bee (TEL-TEST, INC, U.S.A)를 이용하여 분리하였다. 마우스 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate)가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 RNA-Bee 900 μl를 첨가하여 균질화시켰다. 여기에 클로로포름 100 μl를 넣고 15분간 얼음에 정치시켰다. 그 후 4℃, 12,000rpm에서 15분간 원심 분리하고 상등액을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 45분간 정치한 후 원심 분리하여, 70% DEPC-Ethanol로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer로 농도를 측정하였다. 5× RT buffer 2 μl (10 mM dATP 0.25 μl, 10 mM dGTP 0.25 μl, 10 mM dTTP 0.25 μl, 10 mM dCTP 0.25 μl, MMLV reverse transcriptase (200 U/μl) 0.25 μl, RNase inhibitor (28 U/μl) 0.25 μl, 50 uM oligo dT primer 0.5 μl, DEPC-distilled water 4 μl)를 PCR tube에 넣어 42℃에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 10× PCR buffer 3 μl (25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.8 μl, 10 mM dATP 0.3 μl, 10 mM dGTP 0.3 μl, 10 mM dTTP 0.3 μl, 10 mM dCTP 0.3 μl, 50 uM sense 및 antisense primer 0.25 μl, Tag polymerase (5 U/μl, Promega Co.) 0.25 μl)를 혼합하고, 여기에 증류수로 최종 부피가 20 μl 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 산물을 5 μl 첨가하여 혼합한 뒤 PCR 장치에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94℃에 3분간 1 cycle 반응 후 94℃ 45초, 57℃ 45초, 72℃ 45초간 35 cycle 반응시켰으며, 72℃에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동하여 Gel Doc (Bio Lad, Italy)를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co, Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

8) Western blotting을 이용한 iNOS 단백질 발현 분석

세포를 차가운 PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 10 μg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 2 μg/ml aprotinin 10 μg/ml Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 μg/ml Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)를 가하

여 (100 μl/1×10<sup>6</sup>cells) 균질화하고 단백질을 추출한 다음 4℃에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, U.S.A)로 정량한 후 동일량의 단백질 (30 또는 40 μg)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC, Schleicher & Schuell BioScience, Germany)에 transfer하였다. 이 NC를 3% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (TBS-T; 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 anti-mouse IgG로 1시간 30분 반응시켰다. 각 반응 사이에 TBS-T로 10분씩 3회 30분 동안 수세하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 band를 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK) detection 방법으로 확인하였다.

Table 2. Primer sequences of iNOS gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5' -CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3'
	3' -CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-5'
iNOS	5' -GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3'
	3' -GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-5'

9) Compound 48/80 에 의한 전신성 아나필락시스 측정

비장세포의 탈과립제로 compound 48/80 8 mg/kg을 생쥐의 복강 내에 주사하였으며, 荊防地黃湯을 1, 20, 40 및 80 mg/mouse 용량으로 compound 48/80 주사 1시간 전에 경구 투여하였다. 치사를 실험은 아나필락시스 쇼크를 유발시킨 후 1시간 동안 관찰하였다.

결 과

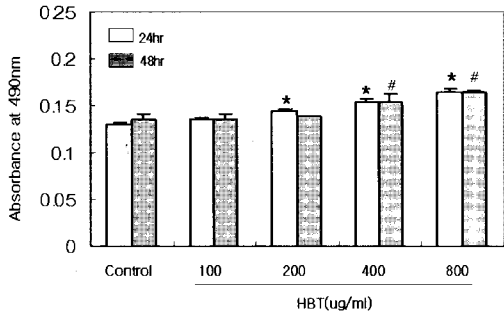
1. 비장세포 증식능에 미치는 영향

荊防地黃湯(HBT)이 정상 면역세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 마우스 비장세포를 이용 세포 증식능을 관찰하였다. HBT을 농도별(100, 200, 400, 800 μg/ml)로 처리하여 24시간, 48시간 세포 증식능을 관찰하였다. 그 결과, 24시간 배양 시 마우스 비장세포의 증식능은 HBT 처리 농도에 따라 0.136±0.002, 0.145±0.001, 0.153±0.004, 0.165±0.003 으로 대조군 0.13±0.003 에 비해 200, 400, 800 μg/ml에서 유의한 세포 증식능이 관찰되었다. 48시간 배양 시 마우스 비장세포의 증식능은 HBT 처리 농도 400 μg/ml에서 0.153±0.009, 800 μg/ml에서 0.164±0.002 으로 대조군에 비해 유의한 세포증식능이 관찰되었다(Fig. 1).

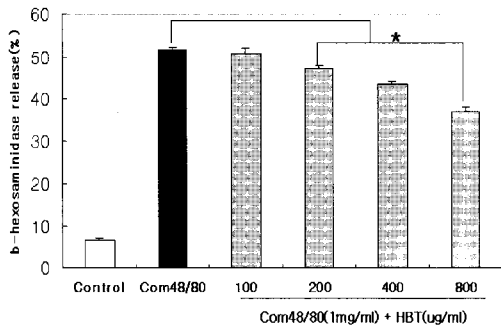
2. RBL-2H3 세포에서 β-hexosaminidase 분비억제에 미치는 영향

HBT의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 비장세포나 호염구 세포의 분비과립에 초래하는 β-hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주를 이용하여 관찰하였다. RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위하여 compound 48/80을

사용하였다. compound 48/80를 RBL-2H3 세포주에 단독처리 시  $\beta$ -hexosaminidase 분비가  $51.6 \pm 0.7\%$ 로 관찰되었으나 HBT를 농도별로 처리 시  $50.9 \pm 0.7$ ,  $47.1 \pm 0.6$ ,  $43.4 \pm 0.7$ ,  $36.9 \pm 1.0$  으로 HBT 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의하게  $\beta$ -hexosaminidase 분비가 억제되었다(Fig. 2).



**Fig. 1. Effect of HBT on the cell proliferation in mouse spleen cells.** Mouse spleen cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured with 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of HBT for 24hr and 48hr. Control group was incubated with RPMI1640 medium only. Results are expressed as means + S.D in triplicate cultures. \*, # significant difference from control ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2. Inhibitory effect of HBT on the  $\beta$ -hexosaminidase released from RBL-2H3 cells by compound 48/80.**  $\beta$ -hexosaminidase release (%) induced by compound 48/80. All values are means  $\pm$  S.D from three experiments. \* significant difference from compound 48/80 alone ( $P < 0.05$ ).

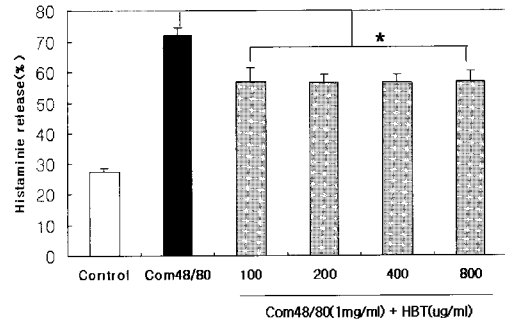
### 3. RBL-2H3 세포에서 Histamine 분비억제에 미치는 영향

HBT의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 compound 48/80로 RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하여 분비 과립에 존재하는 histamine의 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. compound 48/80 단독처리 시 histamine 분비는  $71.7 \pm 3\%$ 로 관찰되었으나 HBT를 농도별로 처리 시  $56.8 \pm 4.6$ ,  $56.3 \pm 2.8$ ,  $56.6 \pm 2.4$ ,  $56.7 \pm 3.5\%$ 로 나타나 관찰 모든 농도에서 histamine 분비가 유의하게 억제되었다(Fig. 3).

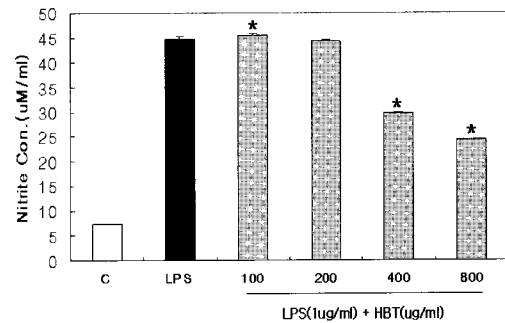
### 4. LPS로 자극된 RAW 264.7 마우스 대식세포에서 NO 생성 억제에 미치는 영향

HBT의 항염증성 효과를 관찰하기 위해 LPS로 자극된 RAW 264.7 마우스 대식세포주를 이용하여 NO 생성 조절에 미치는 영향을 조사하였다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성은  $44.7 \pm 0.48 (\mu\text{M}/\text{ml})$ 였으나 HBT의 처리 농도별에 따라

$45.5 \pm 0.43$ ,  $44.2 \pm 0.2$ ,  $29.8 \pm 0.15$ ,  $24.4 \pm 0.08 (\mu\text{M}/\text{ml})$ 로 HBT 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 NO 생성이 유의하게 억제 되었다(Fig. 4).



**Fig. 3. Inhibitory effect of HBT on the Histamine released from RBL-2H3 cells by compound 48/80.** Results were expressed as % release of histamine. All values are means  $\pm$  S.D from three experiments. \* significant difference from compound 48/80 alone ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4. Effect of HBT on production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS; 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24hr in the presence or absence of HBT at indicated doses. The amount of NO released by cells were measured by the method of Griess. All values are means  $\pm$  S.D from three experiments. \* significant difference from LPS alone ( $P < 0.05$ ).

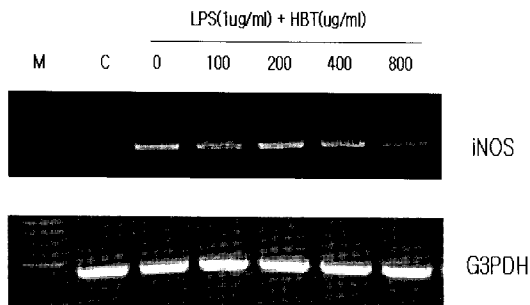
### 5. LPS로 자극된 RAW 264.7에서 iNOS mRNA 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

HBT에 의한 RAW 264.7 마우스 대식세포에서 NO 생성의 억제가 iNOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현과의 관련성을 조사하기 위해 RAW 264.7 마우스 대식세포주에 LPS와 HBT를 처리한 후 iNOS mRNA 유전자 발현과 iNOS 단백질 발현을 RT-PCR 과 Western blotting 으로 관찰하였다. LPS 단독 처리시 iNOS mRNA 유전자 발현이 강하게 유도됨이 관찰되었으며, 이러한 유전자 발현은 HBT 처리에 의해 감소됨이 관찰되었으며, iNOS 단백질 발현 또한 HBT 처리에 의해 감소됨이 관찰되었다(Fig. 5, 6).

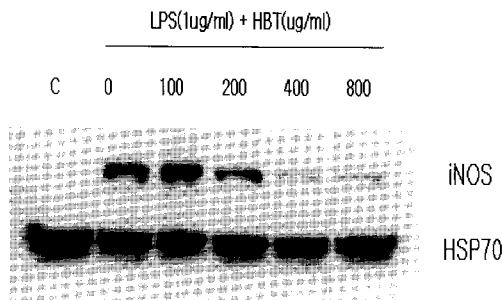
### 6. Compound 48/80 에 의해 유도된 아나필락시스 반응에 미치는 영향

HBT의 즉시형 과민반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 비면역학적 자극물질인 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도 후 치사율을 관찰하였다. compound 48/80을 복강에 투여 후 치사율을 관찰한 결과, 생리식염수를 경구 투여

한 대조군과 HBT를 경구 투여한 군 모두에서 100% 치사율이 관찰되었다(Table 3).



**Fig. 5.** Effect of HBT on iNOS mRNA expression by LPS-stimulated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence or absence of various concentration of HBT for 24hr. After stimulation, total RNA was isolated from cultured cells using RNA-Bee and RT-PCR performed. G3PDH was used control genes. M: 100bp site marker.



**Fig. 6.** Effect of HBT on iNOS protein expression by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence or absence of various concentration of HBT for 24hr. The protein extracts were prepared, and the samples analyzed for iNOS expression by western blotting as described in the method. HSP70 was a control protein.

**Table 3.** Compound 48/80-induced systemic anaphylaxis

Dose(mg/mouse)	Compound 48/80(8 mg/kg)	Mortality(%)
Saline	+	100
HBT	+	100
1	+	100
20	+	100
40	+	100
80	+	100
80	-	0

Saline or HBT was orally administrated at various doses 1hr before the compound 48/80 i.p. injection. Mortality (%) within 2hr following compound 48/80 injection was represented as the number of dead mice/total mice of experimental mice. Each group consists of 10 mice.

## 고찰

최근에 들어 소아 알레르기질환은 점차 증가 추세에 있으며, 소아 인구의 약 15-20%가 알레르기질환에 걸리는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 이처럼 Allergy 환자가 증가 하는 이유는 구체적으로 밝혀 지지 않고 있지만 심각한 대기오염이나, 가정의 난방보급으로 인한 집 먼지 속의 진드기 증가, 고칼로리, 고지방식의 영향 등 여러 가지 요인이 지적 되고 있다<sup>4)</sup>. 특히 성인의 통년성 알레르기성 비염에 있어서 알레르기 기전이 관여 하는 것은 약 30%에 불과하나, 소아의 통년성 알레르기성 비염에서는 약 80%에서 알레르기

가 관여하는 것으로 알려져 있다. 치료는 성인의 경우와 크게 다를 바 없이 약물 요법에서는 진정 작용이 없는 항히스타민제가 기본 약제로서 사용하고 일반적인 치료방법으로 조절이 불가능한 경우 면역 요법을 사용 할 수 있다. 그러나 항히스타민제 치료는 일반적인 대증요법에 불과하며 완치는 시킬 수 없고 장기간 사용할 경우 그 효과가 떨어진다는 점이 치료의 한계로 여겨지고 있다. 또한 면역요법도 치료 효과에 논란이 많으며 그 작용기전 및 효과에 있어서도 현재까지는 정확히 밝혀진 바가 없다<sup>11)</sup>.

Allergy질환에 있어서 한의학적 연구는 다량면에서 이루어지고 있는데, 정은 allergy 질환으로 볼 수 있는 한방 질환들을喘, 咳嗽, 鼻軌, 鼻淵, 噴嚏, 癢疹, 泄瀉, 便秘, 腹痛 등으로 분류하여 病因 病理에서 치료에 이르기까지 상세하게 기술하고 있다<sup>11)</sup>. 또한 최근에는 사상의학적인 병리관과 치료 개념으로 allergy 질환을 해결하려는 시도가 많으며, 임상이나 학술적인 분야에서 일정한 성과를 내고 있다. 조<sup>4)</sup>는 소음인 藿香正氣散의 항allergy 작용을, 서<sup>12)</sup>는 소양인 荊防地黃湯의 항allergy 작용을 보고 하였다.

본 연구에서는 荊防地黃湯의 항allergy 효과를 알아보기 위해 정상 면역세포에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포 및 호염구에서 알레르기 반응 시 탈과립 지표로 알려진  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비 면역자극제인 compound 48/80 자극에 의한 Anaphylatic shock에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 Nitric Oxide 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰 하였다.

비장세포는 2차 면역장기로 대식세포와 많은 적혈구로 구성되어 있고 노화된 적혈구가 파괴되고 제거되는 곳으로 면역반응에 중요한 역할을 하는 곳으로 알려져 있다<sup>20)</sup>. 따라서 본 실험에서는 소아 알레르기성 비염에 대응되는 荊防地黃湯을 시간별(24시간, 48시간) 및 농도별(100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 처리하여 마우스 비장세포에 증식에 미치는 영향을 관찰하였다. 실험 결과 처리시간 24시간에서는 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 세포증식능이 유의성 있게 증가하였고, 48시간 배양 시 마우스 비장세포의 증식능은 400, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  에서 유의한 세포증식이 관찰되었다. 이는 荊防地黃湯이 면역 세포를 활성화하여 주로 기능이 저하되고 허약한 소양인에게 사용됨으로 저하된 기능을 강화 시켜 줄 수 있음을 알 수 있었다.

염증반응에 관여하는 면역세포로는 대식세포, 비만세포, 호염구등이 알려져 있지만 특히 알레르기 염증반응의 대표적인 세포로는 비만세포와 호염구가 알려져 있다<sup>13,16,31)</sup>. 비만세포는 즉시형 과민 반응에서 일어나는 염증 반응에서 핵심적인 역할을 수행할 뿐 아니라 그 외에 다른 염증 과정이나 생리적인 면역의 진행과 조절에 주도적인 역할을 하고 있음이 알려져 있다<sup>14,15,17,31)</sup>. Histamine 과  $\beta$ -hexosaminidase는 이들 세포에서 탈과립의 지표로 알려져 있어 알레르기 억제물질의 생물활성 측정에도 유용하게 사용되고 있다<sup>13,17,28,30)</sup>. 본 연구에서는 흰쥐 점막 비만세포와 상동성이 높은 흰쥐 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주인 RBL-2H3 세포주를 지시세포로 사용하여 비만세포의 탈과립을 유도하는 compound 48/80을 사용하여 탈과립을 유도 하였다.

compound 48/80 은 비만세포내로 칼슘 유입을 증가시켜 세포 내 칼슘 수준을 증가시키고 세포내 cAMP phosphodiesterase를 활성화시켜 세포내 cAMP 수준을 감소시킴으로써 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제로 알려져 있다<sup>15,16</sup>. compound 48/80 은 고농도에서 비만세포로부터 약 90%의 히스타민을 유리시키는 것으로 알려져 있으며 적당량의 compound 48/80은 아나필락시스의 기전을 연구하기 위한 히스타민 유리 촉진제로서 사용되고 있다<sup>15,25,31</sup>). 따라서 본 실험에서는 荊防地黃湯의 항알레르기 효과를 알아보기 위해 RBL-2H3 세포주에 비면역 자극제인 compound 48/80로 자극 후 이들 세포의 분비과립에 존재하는  $\beta$ -hexosaminidase와 histamine 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과,  $\beta$ -hexosaminidase 분비가 荊防地黃湯 처리 시 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 유의하게 억제됨이 관찰 되었으며, Histamine 분비 또한 처리 농도 모두에서 유의하게 억제됨이 관찰 되었다. 이러한 결과는 荊防地黃湯이 비만세포의 탈과립으로 촉발되는 알레르기 염증질환에 매우 효과적일 것이라는 것을 시사 하였다.

대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 생체내에서 감염, 염증 등의 반응에 중요한 역할을 하는데, 선천면역 뿐만 아니라 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여 하는 것으로 알려져 있다<sup>21-23,26,29</sup>). 대식세포는 superoxide, hydrogen peroxide 및 NO와 같은 중간물질을 생산하며, 탐식된 이 물질을 분해 시킬 때 생성되는 IL-1, TNF- $\alpha$  및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고 되고 있다. 그 중 산화질소 (nitric oxide; NO)는 주로 대식세포에서 생성되는 작고 불안정한 무기가스로 이중적 생물학적 성질을 가지고 있어서, 저농도의 NO는 신경전달물질 등과 같은 작용을 하나, 과도한 NO 생성은 급·만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고 되어 있다. 이렇듯 NO는 상황에 따라서 세포, 조직 혹은 개체에 이로운 수도 있고 해로운 수도 있어서 상황에 맞게 NO 분비를 촉진시키거나 억제시킴으로써 인체 생리현상을 조절 할 수 있으므로, NO 생성을 조절할 수 있는 물질을 찾고자 하는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>18,19,24</sup>). 따라서 본 실험에서 荊防地黃湯의 항염증성 효과를 관찰하기 위해 LPS로 RAW 264.7 마우스 대식세포주를 자극하여 과도한 NO 생성을 유도한 후 荊防地黃湯의 NO 생성 조절에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성은 荊防地黃湯의 처리 농도별에 400, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 유의하게 억제됨이 관찰되었으며 NOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현이 감소됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 荊防地黃湯이 염증성 질환의 예방 및 치료에 효과적일 것으로 생각된다.

알레르기는 발생기전에 따라 I-IV 형으로 나누는데 제 I형 과민 면역반응의 특징은 감작된 개체가 동일한 항원에 다시 노출되면 즉시 알레르기 반응이 일어나는데 이러한 반응을 아나필락시스라 한다<sup>16,27</sup>). I형 알레르기의 대표적 반응인 전신 아나필락시스 쇼크는 비만세포의 세포질에 칼슘농도를 증가시켜 histamine을 유리하는 물질인 compound 48/80를 복강 내 주입

하여 비만세포의 탈과립을 유도하면 제 I형 알레르기는 순간적인 histamine 방출에 의해서 혈관 확장되어 저혈압 등으로 사망을 유발시키는 것으로 알려져 있다. In vivo에서 荊防地黃湯의 아나필락시스 쇼크에 미치는 효과를 살펴보기 위해 비면역학적 자극물질인 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도 후 치사율을 관찰한 결과, 荊防地黃湯을 경구 투여군한 모든 그룹에서 대조군과 같이 모두 사망되었음이 관찰되었다. 이는 사용된 in vitro의 결과를 지지하지 못하는 결과로 이러한 결과는 in vivo 실험에서 마우스 경구용 荊防地黃湯을 조제시 탕의 특징상 사용농도 이상으로 荊防地黃湯을 녹이지 못하여 사용된 荊防地黃湯의 양이 생체 내 반응을 보이기에 부족한 투여 양의 결과로 생각된다.

이상의 결과는 荊防地黃湯이 항알레르기 및 항염증효과가 알레르기 반응 시 비만세포 세포의 탈과립 지표로 알려진  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제, 염증반응과 관련된 NO 생성 조절등이 관여됨이 관찰되었으며 추후 荊防地黃湯의 항알레르기 및 항염증에 효과적인 활성물질의 분리 정체가 수행된다면 새로운 항알레르기성, 항염증성 기능 물질로 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

## 결론

荊防地黃湯의 항알레르기 효과를 관찰하기위하여, 荊防地黃湯이 정상세포의 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용하여 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, 비면역 자극제인 compound 48/80 자극에 의한 Anaphylactic shock에 미치는 영향, RAW 264.7 대식세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 NO 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

荊防地黃湯이 정상면역세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 2차 면역장기인 비장의 세포증식능을 조사한 결과, 荊防地黃湯을 처리에 의해 비장세포증식능이 유의성 있게 증가되었다. 荊防地黃湯의 항알레르기 효과를 측정하기위하여 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제인 compound 48/80을 사용  $\beta$ -hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, 荊防地黃湯의 처리에 의해  $\beta$ -hexosaminidase 분비가 유의하게 억제되었다. 荊防地黃湯의 항알레르기 효과를 측정하기위하여 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제인 compound 48/80을 사용 Histamine 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, 荊防地黃湯의 처리에 의해 Histamine 분비가 유의하게 억제되었다. 荊防地黃湯의 항염증 효과를 관찰하기위해 급·만성 염증시 과도한 생성되는 NO 조절에 미치는 영향을 조사한 결과 荊防地黃湯이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성을 유의하게 감소시킴이 관찰되었으며 iNOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현 또한 억제시킴이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 荊防地黃湯은 알레르기 반응 세포의 탈

과립 지표인  $\beta$ -hexosaminidase 및 histamine 분비 억제와 염증 반응과 관련된 NO 생성 억제를 통해 염증과 관련된 알레르기 질환에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각되며 추후 荊防地黃湯의 항알레르기 및 항염증에 효과적인 활성물질의 분리 정체가 수행된다면 새로운 항알레르기성, 항염증성 기능 물질로 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

### 참고문헌

1. 盧寬澤. 이비인후과학. 일조각, p 203, 1996.
2. 민양기. 임상비과학. 일조각, pp 229-240, 2004.
3. 김경준, 채병윤. 계지탕가미방의알레르기비염에대한치험보고. 대한외관과학회지 10(1):99-106, 1989.
4. 안보국, 송승모. 소음인 콧물정기산의 항 Allergy 작용. 대한외관과학회지 13(3):75-88, 2001.
5. 박승찬. 태음인 침선연자탕의 항 Allergy 작용에 관한 실험적 연구. 사상체질의학회지 15(2):166-179, 2003.
6. 전국 한의과대학 사상의학교실. 사상의학. 서울, 집문당, 1997.
7. 전병렬. 荊防地黃湯 연구. 사상의학회지 7(1):295-297, 1995.
8. 홍영욱. 荊防地黃湯의 항스트레스효과에 관한 실험적 연구. 경희대 석사학위논문, 1992.
9. 이재혁. 荊防地黃湯이 흰쥐의 Morric 수증미로 학습과 기억에 미치는 영향. 경희대 석사학위논문, 1997.
10. 이재마 원저, 홍순용 의 역. 사상의학원론. 서울, 행림출판, 1985.
11. 정규만. 알레르기와 한방. 서울, 제일로, pp 15-38, 1993.
12. 서용. 소양인 荊防地黃湯의 항 Allergy 작용. 박사학위논문, 2003.
13. 최선필, 강미영, 남석현. 생화학, 분자생물학. 호림구세포주와 북강 비만세포에서 유색미 겨 추출물의 알레르기 염증 억제 활성. 한국응용생명화학회지(구 한국농화학회지) 48(4):315-321, 2005.
14. 조정제, 임강현. 사람 비만세포주에서 사이토카인발현에 대한 다엽 주성분 Epigallocatechin - 3 - Gallate 의 억제효과. 대한분초학회지(분초분과학회지) 16(2):57-63, 2001.
15. 김성화, 김대근, 채병숙, 신태용. 원보. 비만세포 매개 즉시형 알레르기 반응에 대한 연명초의 억제 효과. 생약학회지 34(2):132-137, 2003.
16. 박은수, 신민교, 송호준. 자작나무 및 벗나무 껍질추출물이 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 대한분초학회지(분초분과학회지) 13(2):57-68, 1998.
17. Eun-Kyung Park, Min-Kyung Choo, Myung Joo Han, Dong-Hyun Kim. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities. Arch Allergy Immunol. 133(2):113-120, 2004.
18. 황광진. 산화질소(Nitric Oxide) 이로운가? 해로운가? : 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39: 52-63, 1999.
19. Chiou, W.F., Chou, C.J., Chen, C.F. Camptothecin suppresses nitric oxide iosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life Sci. 69: 625-635, 2001.
20. Roitt, 김주덕 외 譯. 로이트 필수면역학. 서울, 고문사, pp 35-62, 1991.
21. 류혜숙, 김현숙. 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포활성에 미치는 영향. 한국영양학회지 37(1):23-30, 2004.
22. Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Chan Woo Park, Tae Won Jeon, Wang Keun Yoo, Seong Ho Kim, Hyo Jung Kim. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted Astragali radix in RAW 264.7 macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology. 100: 289-294, 2005.
23. 이영선, 이금홍, 김상찬, 권영규, 신상우. 건강 열수추출액이 Methotrexate에 의해 유도된 마우스 면역억제 조절에 미치는 영향. 대한동의생리병리학회지 20(4):896-901, 2006.
24. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two b-carboline alkaloids extracted from Melia azedarach. Eur J Pharmacol 406: 301-309, 2000.
25. Ikarashi, Y., Yuzurihara, M., Sakakibara, I., Takahashi, A., Ishimaru, H. and Maruyama, Y. Effects of an oriental herbal medicine, "Saiboku-to", and its constituent herbs on compound 48/80-induced histamine release from peritoneal mast cells in rats. Phytomedicine 8: 8-15, 2001.
26. Seo, W.G., Pae, H.O., Oh, G.S., Chai, K.Y., Kwon, T.O., Yun, Y.G., Kim, N.Y., Chung, H.T. Inhibitory effects of methanol extract of Cyperus rotundus rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol 76: 59-64, 2001.
27. Shin, H.Y., Yun, Y.B., Kim, J.Y., Moon, G., Shin, T.Y., Kim, H.S. and Kim, H.M. Inhibitory effect of mast cell-mediated acute and chronic allergic reactions by Dodutang. Immunopharmacol Immunotoxicol 24: 583-594, 2002.
28. Shin, T.Y. and Lee, J.K. Effect of Phlomis umbrosa root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. Immunopharmacol Immunotoxicol 25: 73-85, 2003.
29. Daikonya, A., Katsuki, S. and Kitanaka, S. Antiallergic Agents from Natural Sources 9. Inhibition of Nitric Oxide Production by Novel Chalcone Derivatives from Mallotus philippinensis (Euphorbiaceae). Chem Pharm Bull. 52: 1326-1329, 2004.
30. C. JcFowler, M. Sandberg and G. Tiger. Effect of water-soluble cigarette smoke extracts upon the release of  $\beta$ -hexosaminidase from RBL-2H3 basophilic leukaemia cells in response to substance P, compound 48/80, concanavalin A and antigen stimulation. Infalamm. res. 52: 461-469, 2003.
31. Venarske, D., deShazo, R.D. Molecular mechanisms of allergic disease. South Med J. 96(11):1049-1054, 2003.