

牛蒡子が 항알러지 염증반응에 미치는 영향

남지영, 김덕곤, 이진용

경희대학교 한의과대학 소아과학교실

Effects of *Woobangja* on Anti-allergic Inflammation

Nam Ji Young, Kim Deog Gon, Lee Jin Young

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objective: Allergic inflammation is related with secretion of Cytokine. This study was performed to examine the effects of *Woobangja* on anti-allergic inflammation.

Methods: While macrophage 264.7 cells was chosen as a normal group, a control group was classified into three groups. One was stimulated with LPS, and another was pretreated with *Woobangja* for 1 hour. The third was pretreated with hydrocortisone for 1 hour. After the pretreatment, macrophages were incubated with lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/ml for 12h and media collected and TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 concentrations in supernatants were measured each by Enzyme linked immunosorbent assay.

Woobangja were used 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1 mg/ml. Hydrocortisones were used respectively 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M.

Results: *Woobangja* showed inhibitory effect on TNF- α by LPS-stimulated macrophage 264.7. The inhibitory effect was most significant in 1mg/ml ($p < 0.01$), and has increased according to the number of doses. *Woobangja* also showed inhibitory effect on IL-10 by LPS-stimulated macrophage 264.7. The inhibitory effect was most significant in 100 μ g/ml ($p < 0.01$), and was not in a dose-dependent manner as Hydrocortisone group.

Woobangja and Hydrocortisone showed contrary effect on IL-1 β . *Woobangja* obviously increased the expression of IL-1 β in all five concentrations ($p < 0.01$), and at the lowest concentration (50 μ g/ml) the level of IL-1 β was the lowest. On the other hand hydrocortisone was observed to have inhibitory effect on IL-1 β in all five concentrations ($p < 0.01$).

IL-6 was inhibited by hydrocortisone in a roughly dose-dependent manner, but was not inhibited by *Woobangja*. On the contrary *Woobangja* obviously increased the expression of IL-6 in all five concentrations ($p < 0.01$), but it was not related with concentrations.

Conclusions:

1. *Woobangja* does significantly inhibit the expression of TNF- α by LPS-stimulated macrophage 264.7.
2. *Woobangja* does significantly increase the expression of IL-6 by LPS-stimulated macrophage 264.7.
3. *Woobangja* does significantly increase the expression of IL-1 β by LPS-stimulated macrophage 264.7.
4. *Woobangja* does significantly inhibit the expression of IL-10 by LPS-stimulated macrophage 264.7.
5. *Woobangja* is observed to have anti-allergic inflammatory effect through inhibiting inflammatory cytokine.

Key words: *Woobangja*, Allergic disease, inflammatory cytokine, TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10

접 수 : 2006년 3월 31일, 채택일자: 2006년 4월 22일

교신저자 : 남지영, 130-702 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원 한방병원 소아과

(Tel. 02-958-9172, Fax. 02-958-9171, E-mail: aokop@hanmail.net)

I. 서 론

외부 자극에 대한 생체의 반응을 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있는데, 하나는 생체에 유해한 물질을 약화하거나 중화시키려는 긍정적인 반응이고, 다른 하나는 개체에 해로운 과민염증 반응으로 나타나는 부정적인 반응이다. 전자를 면역이란 단어로, 후자를 알러지 반응으로 설명할 수 있다^{1,2)}.

면역의 기능에 대해 좀 더 상세히 살펴보자면 방어기능, 항상성 유지기능, 감독기능 등이 있는데³⁾, 먼저 방어기능은 외부로부터의 면역 자극에 대한 반응을 나타내는 것으로 비정상적으로 과도한 경우에는 알러지 반응이 나타나고, 비정상적으로 저하된 경우에는 기회감염을 일으키게 된다. 두 번째로 항상성 유지기능은 생체의 내부 환경을 항상 평형상태로 유지시켜 주는 기능인데, 어떤 종류의 면역 자극으로 인해 이 기능이 과항되면 '자기'와 '비자기'의 판별 능력을 잃게 되어 자가 면역성 질환을 일으

키게 된다. 셋째, 감독기능이란 면역자극에 대한 기능이 저하됨으로써 변이된 세포를 제거하는 기능인데 이 기능이 저하되면 변이 세포를 제거하지 못하여 악성종양이 발생할 수 있게 되는 것이다⁴⁾.

외래 항원의 자극을 받아 면역학적으로 활성화가 일어난 개체에 동일한 항원의 재침입이 있는 경우 면역반응이 일어난다. 그러나 과항원 상태이거나 체내의 체액성 면역 혹은 세포성 면역능이 항진되어 있을 경우에는 과잉반응이 일어나게 되고, 결국에는 조직 손상 등과 같은 역작용의 면역 반응이 일어나는데 이를 과민 반응 혹은 알러지라고 한다.

최근의 연구에서 알러지 반응에 있어 염증 반응이 중요한 기전으로 논의되고 있고, 치료제의 개발에 있어서도 염증반응의 조절이 그 목표로 설정되고 있는 경우가 많다⁵⁾.

염증이란 인체에서 흔히 일어나는 증상으로, 세포 상해를 유발하는 다양한 자극에 대해 생체 조직이 보이는 복합적인 반응이다. 혈관의 반응으로 이루어지며 혈관 밖 조직으로 백혈구

와 체액의 축적을 유도하는 것이 특징이고, 각종 유해한 손상에 대한 초기의 반응을 의미한다. 일반적으로 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애의 다섯 가지 증상을 나타낸다^{6,7)}.

우방자에 관한 연구로는 김⁸⁾과 유⁹⁾의 우방자의 항 알러지 작용에 관한 연구, 김¹⁰⁾에 의한 우방자 추출물의 compound 48/80 유도 비만세포 활성화와 혈관 투과성 억제효과, 조¹¹⁾의 우방자의 추출조건에 따른 linoleic acid의 정량 연구가 있었다.

이에 본인은 우방자의 항 알러지 염증 작용에 관한 효능을 규명하고자 macrophage 264.7 cell에서 lipopolysaccharide(LPS) 유발에 의한 TNF- α , IL-6, IL-10 및 IL-1 β 의 발현에 미치는 영향을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 검액의 제조

약재는 경희대학교 한의과대학 부속한방병원에서 구입하였다. 우방자 250g과 증류수 2500 ml를 3 L 등근 플라스크에 넣고 냉각기가 부착된 전탕기에서 2시간 동안 가열한 다음, 전탕액을 여과하여 동결건조 시켜서 Extract 47.6g을 얻었다.

2) 시약

본 실험에 사용한 시약인 lipopolysaccharide (LPS)와 hydrocortisone은 Sigma社(St. Louis, MO, U.S.A.)를 구입하였다.

3) 세포의 배양

macrophage 264.7 cell 배양은 Dulbecco's minimum Eagle's medium(DMEM, 10% Fetal bovine serum(FBS), penicillin;100 U/ml, streptomycin;100 U/ml)배지를 사용하였으며, macrophage 264.7 cell은 24 well plate에 2×10^5 /well을 주입하고 5 % CO₂, 37°C에서 배양하였다.

2. 방법

1) 실험군의 분류

macrophage 264.7 cell 만을 배양한 군, LPS (100 ng/ml)로 stimulation한 (-)대조군, hydrocortisone으로 전처리 후 LPS로 stimulation한 (+) 대조군, 그리고 우방자를 전처리한 후 LPS로 stimulation한 군으로 분류하였다. 우방자의 농도는 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml 로 hydrocortisone의 농도는 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M로 하였다.

2) cytokine의 정량 측정

macrophage 264.7 cell 2×10^5 /well을 24 well plate에 분주하여 overnight incubation한 후, medium을 갈아주었다. 그 후 먼저 우방자를 농도별로 처리한 1시간 후에 LPS (100 ng/ml)로 stimulation 하였다. 12시간 후 medium을 걸어내어 2000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 상층액만을 수거하였다.

TNF- α , IL-6, IL-10과 IL-1 β 의 정량은 Enzyme-Linked Immuno-sorbent Assay(ELISA) 방법을 사용하였다. Plate(Nunc Maxisorp)에 capture antibody를 25°C, overnight coating을 한 후, plate를 washing buffer로 washing 하였다. 1 % BSA, 5 % sucrose, 0.05 %

NaN₃를 포함하고 있는 Phosphate buffered saline (PBS)로 실온에서 blocking한 후, sample을 두 시간 동안 실온에서 배양하였다 (sample은 0.1 % BSA, 0.05 % Tween 20을 포함하고 있는 PBS로 희석하였다). Plate를 다시 washing한 후 detection Ab로 실온에서 두 시간 배양하고 plate를 washing, streptavidin-horseradish peroxidase로 20분간 실온 배양 후 다시 washing하였다. TMB substrate를 첨가한 후 실온서 20분간 반응시킨 후 stop solution (2N H₂SO₄)으로 반응을 정지, 450 nm에서 O.D값을 측정하였다.

3. 통계 처리

모든 지표는 mean±S.E.로 나타내었으며 Student's t-test를 행하여 p<0.05일 경우 유의성이 있다고 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. TNF-α 발현에 우방자가 미치는 영향

TNF-α는 우방자나 hydrocortisone 처리 군에서 모두 분비억제 효과를 보였고, 저농도보다 고농도에서 현저하게 나타났다. hydrocortisone의 농도가 각각 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M일 때 LPS로 자극한 군보다 유의한 감소를 보였다(p<0.01). 우방자의 농도와 분비억제 효과는 비례하여 나타났고, 우방자의 농도가 각각 250 μg/ml, 500 μg/ml, 1 mg/ml일 때 LPS로 자극한 (-) 대조군보다 유의한 감소를 보였다(p<0.01).

Table 1. Effects of *Woobangja* on LPS-induced TNF-α in macrophages 264.7

| Treatment of cells | TNF-α (pg/ml) |
|--|--------------------|
| Normal | 272.05 ± 5.72 |
| LPS | 2278.33 ± 52.47 |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁸ M) | 2208.00 ± 114.24 |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁷ M) | 1763.00 ± 106.67** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁶ M) | 1559.33 ± 84.99** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁵ M) | 1616.33 ± 55.03** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁴ M) | 1269.50 ± 101.43** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (50 μg/ml) | 2312.00 ± 20.17 |
| LPS + <i>Woobangja</i> (100 μg/ml) | 2240.17 ± 48.50 |
| LPS + <i>Woobangja</i> (250 μg/ml) | 1912.67 ± 56.62** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (500 μg/ml) | 1671.33 ± 23.79** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (1 mg/ml) | 1261.83 ± 38.72** |

Raw 264.7 macrophages were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 12h.

Cells were pretreated for 1 hour with drug. After pretreatment, macrophage were incubated with LPS 100 ng/ml for 12h and media collected and analyzed as described under material and methods. Drugs were used 50 μg/ml, 100 μg/ml, 250 μg/ml, 500 μg/ml, 1000 μg/ml. Hydrocortisones (+) were used 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M. Cytokines concentrations in supernatants were measured by Enzyme linked immuno-sorbent assay. Data are presented as means ± standard error. ** p<0.01 indicate statistically significant differences from the LPS-treated group.

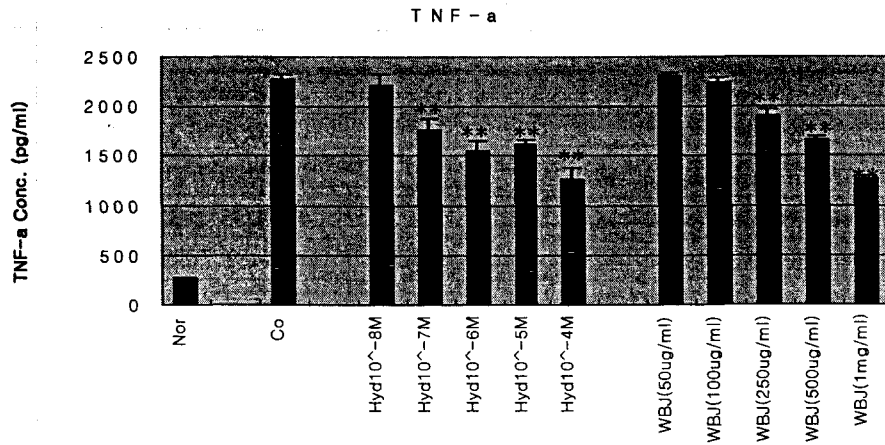


Fig. 1. Effects of Woobangja on TNF- α by LPS-stimulated macrophages 264.7 Cells were pretreated for 1 hour with drug. After pretreatment, macrophage were incubated with LPS 100 ng/ml for 12h and media collected and analyzed as described under material and methods. Drugs were used 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml. Hydrocortisones (+) were used 10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 10⁻⁵M, 10⁻⁴M. Cytokines concentrations in supernatants were measured by Enzyme linked immuno-sorbent assay. Data are presented as means \pm standard error. ** p<0.01 indicate statistically significant differences from the LPS-treated group.

2. IL-6 발현에 우방자가 미치는 영향

IL-6은 hydrocortisone 농도가 증가함에 따라 대체로 분비량이 감소하였는데, 농도가 10⁻⁸M일 때는 유의하게 증가하였고, 농도가 각각 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M일 때는 유의하게 감소하였다(p<0.01). 우방자군에서는 농도와 상관없이 모두 분비량이 증가하여 모든 농도에서 유의하게 증가하였다(p<0.01).

3. IL-1 β 발현에 우방자가 미치는 영향

IL-1 β 는 hydrocortisone의 분비억제 효과를 보였고, 농도에 비례하여 분비량이 감소하였다. 모든 농도에서 LPS로 자극한 (-) 대조군보다 유의한 감소를 보였다(p<0.01). 우방자군에서는 오히려 IL-1 β 분비량이 증가하여 농도와

관계없이 모두 LPS로 자극한 (-) 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(p<0.01).

4. IL-10 발현에 우방자가 미치는 영향

IL-10은 우방자나 hydrocortisone 처리군에서 모두 분비억제 효과를 보였다. hydrocortisone의 농도와는 대체로 비례하여 분비량이 감소하였고, 각각 농도가 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M일 때 LPS로 자극한 군보다 유의한 감소를 보였다(p<0.01). 우방자군에서도 모두 분비억제 효과를 보였으나, 분비량이 오히려 우방자 농도에 대체로 비례하여 증가했다. 우방자의 농도가 각각 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml일 때(p<0.01)와 500 μ g/ml일 때(p<0.05), LPS로 자극한 (-) 대조군보다 유의한 감소를 보였다.

Table 2. Effects of *Woobangja* on LPS-induced IL-6 in macrophages 264.7

| Treatment of cells | IL-6 (pg/ml) |
|--|-----------------|
| Normal | 8.14 ± 1.45 |
| LPS | 97.16 ± 2.09 |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁸ M) | 113.73 ± 2.48** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁷ M) | 90.77 ± 3.25 |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁶ M) | 74.88 ± 0.47** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁵ M) | 81.34 ± 2.23** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁴ M) | 40.34 ± 1.53** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (50 µg/ml) | 117.05 ± 4.35** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (100 µg/ml) | 118.45 ± 6.00** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (250 µg/ml) | 124.28 ± 2.61** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (500 µg/ml) | 125.10 ± 4.06** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (1 mg/ml) | 112.40 ± 2.99** |

Raw 264.7 macrophages were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 12h.

Cells were pretreated for 1hour with drug. After pretreatment, macrophage were incubated with LPS 100 ng/ml for 12h and media collected and analyzed as described under material and methods. Drugs were used 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml. Hydrocortisones (+) were used 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M. Cytokines concentrations in supernatants were measured by Enzyme linked immuno-sorbent assay. Data are presented as means ± standard error. ** p<0.01 and ++ p<0.01 indicate statistically significant differences from the LPS-treated group.

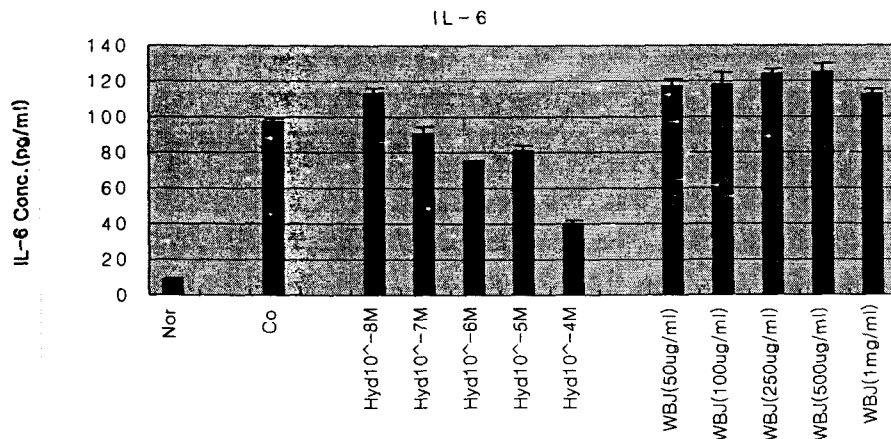


Fig. 2. Effects of *Woobangja* on IL-6 by LPS-stimulated macrophages 264.7

Cells were pretreated for 1hour with drug. After pretreatment, macrophage were incubated with LPS 100 ng/ml for 12h and media collected and analyzed as described under material and methods. Drugs were used 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml. Hydrocortisones (+) were used 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M. Cytokines concentrations in supernatants were measured by Enzyme linked immuno-sorbent assay. Data are presented as means ± standard error. ** p<0.01 and ++ p<0.01 indicate statistically significant differences from the LPS-treated group.

Table 3. Effects of *Woobangja* on LPS-induced IL-1 β in macrophages 264.7

| Treatment of cells | IL-1 β (pg/ml) |
|--|----------------------|
| Normal | 1.91 \pm 0.11 |
| LPS | 4.07 \pm 0.21 |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁸ M) | 3.31 \pm 0.09** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁷ M) | 2.27 \pm 0.19** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁶ M) | 1.98 \pm 0.15** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁵ M) | 2.09 \pm 0.04** |
| LPS +hydrocortisone (10 ⁻⁴ M) | 1.63 \pm 0.10** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (50 μ g/ml) | 5.32 \pm 0.18** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (100 μ g/ml) | 5.64 \pm 0.25** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (250 μ g/ml) | 6.82 \pm 0.18** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (500 μ g/ml) | 7.38 \pm 0.29** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (1 mg/ml) | 6.90 \pm 0.36** |

Raw 264.7 macrophages were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 12h. Cells were pretreated for 1hour with drug. After pretreatment, macrophage were incubated with LPS 100 ng/ml for 12h and media collected and analyzed as described under material and methods. Drugs were used 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml. Hydrocortisones (+) were used 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M. Cytokines concentrations in supernatants were measured by Enzyme linked immuno-sorbent assay. Data are presented as means \pm standard error. ** p<0.01 and ++ p<0.01 indicate statistically significant differences from the LPS-treated group.

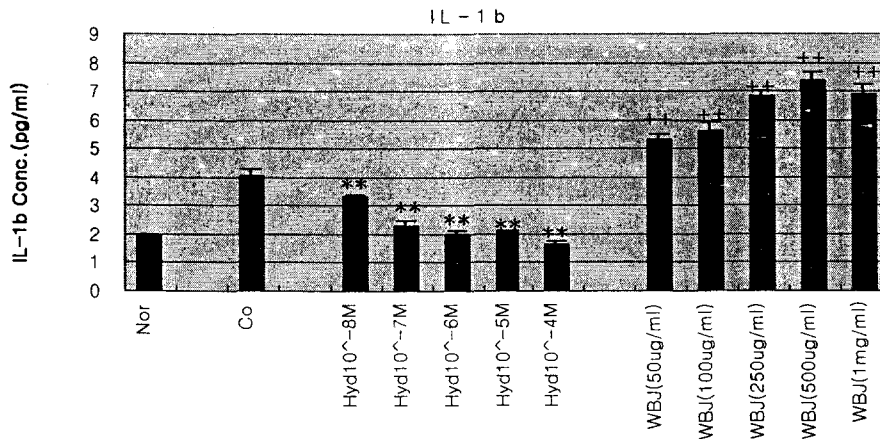


Fig. 3. Effects of *Woobangja* on IL-1 β by LPS-stimulated macrophages 264.7

Cells were pretreated for 1hour with drug. After pretreatment, macrophage were incubated with LPS 100 ng/ml for 12h and media collected and analyzed as described under material and methods. Drugs were used 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml. Hydrocortisones (+) were used 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁴ M. Cytokines concentrations in supernatants were measured by Enzyme linked immuno-sorbent assay. Data are presented as means \pm standard error. ** p<0.01 and ++ p<0.01 indicate statistically significant differences from the LPS-treated group.

Table 4. Effects of *Woobangja* on LPS-induced IL-10 in macrophages 264.7

| Treatment of cells | IL-10 (pg/ml) |
|--|------------------|
| Normal | 339.87 ± 13.43 |
| LPS | 902.27 ± 64.36 |
| LPS +hydrocortisone (10^{-8} M) | 797.43 ± 46.94 |
| LPS +hydrocortisone (10^{-7} M) | 591.37 ± 18.31** |
| LPS +hydrocortisone (10^{-6} M) | 471.45 ± 8.16** |
| LPS +hydrocortisone (10^{-5} M) | 546.62 ± 12.66** |
| LPS +hydrocortisone (10^{-4} M) | 370.83 ± 3.85** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (50 $\mu\text{g/ml}$) | 618.55 ± 15.22** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (100 $\mu\text{g/ml}$) | 567.97 ± 38.91** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (250 $\mu\text{g/ml}$) | 671.58 ± 20.67** |
| LPS + <i>Woobangja</i> (500 $\mu\text{g/ml}$) | 664.72 ± 39.74* |
| LPS + <i>Woobangja</i> (1 mg/ml) | 802.67 ± 6.34 |

Raw 264.7 macrophages were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 12h.

Cells were pretreated for 1hour with drug. After pretreatment, macrophage were incubated with LPS 100 ng/ml for 12h and media collected and analyzed as described under material and methods. Drugs were used 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$. Hydrocortisones (+) were used 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M. Cytokines concentrations in supernatants were measured by Enzyme linked immuno-sorbent assay. Data are presented as means \pm standard error. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate statistically significant differences from the LPS-treated group.

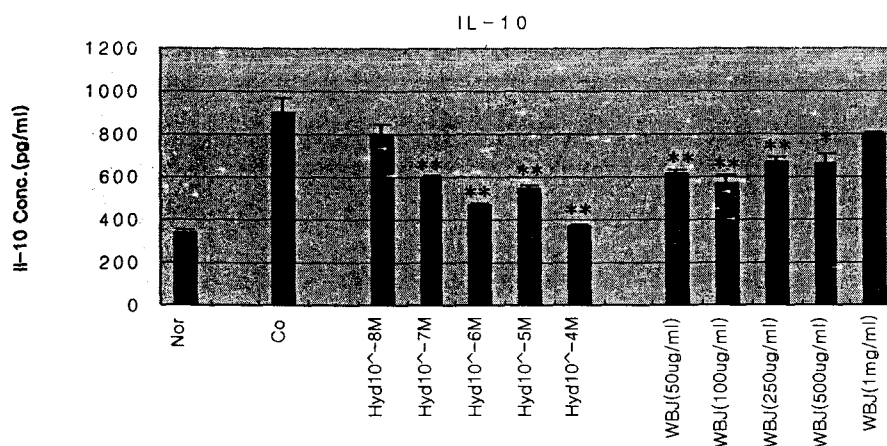


Fig. 4. Effects of *Woobangja* on IL-10 by LPS-stimulated macrophages 264.7

Cells were pretreated for 1hour with drug. After pretreatment, macrophage were incubated with LPS 100 ng/ml for 12h and media collected and analyzed as described under material and methods. Drugs were used 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$. Hydrocortisones (+) were used 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M. Cytokines concentrations in supernatants were measured by Enzyme linked immuno-sorbent assay. Data are presented as means \pm standard error. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate statistically significant differences from the LPS-treated group.

IV. 고 찰

염증은 인체에 발생하는 가장 흔한 생체반응 중의 하나로서 생체 조직이 손상에 대해 반응하는 능동적인 과정으로 설명된다. 생체의 세포나 조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받으면 이에 대한 반응을 일으켜 손상을 극소화시키고 손상된 부위를 복구시키려는 일련의 국소적 반응을 일으키게 된다¹²⁾.

염증은 급작스럽게 시작하여 단기간 내에 끝나는 급성염증과, 서서히 시작하든지 혹은 급작스럽게 시작하더라도 장기간 동안 지속되는 만성염증이 있다. 일반적으로 급성염증은 손상에 대한 즉각적이고도 비 특이적인 반응이며 다핵 백혈구의 침윤이 특징인데 비하여, 만성염증은 지연된 반응이며 대부분이 면역학적 요소나 이물에 대한 특이적 반응으로 림프구, 단핵구 등이 주동이 되는 염증반응이다¹³⁾.

일반적으로 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애의 다섯 가지 증상을 염증의 5대 증상이라고 한다. 발적 및 발열은 모세순환의 확장에 의한 것이고, 종창은 혈관의 투과성 변동에 의한 것이며, 종창은 혈관의 투과성 변동에 의한 체액 성분과 백혈구의 삼출에 의하며, 동통의 원인은 말단신경에 대한 삼출물의 압박이나 유리된 화학물질의 직접 자극에 의한 것으로 생각되며, 기능장애는 동통에 의한 것으로 보고 있다⁶⁾.

염증에서 일어나는 조직반응의 기전은 혈관 변동, 세포성분 변동, 화학적 매개체, 림프관 림프절 및 망내계의 역할 등으로 설명할 수 있다. 우선 혈관 변동은 세동맥의 일시적인 수축, 혈관확장 및 혈류량의 증가, 혈류속도의 감소, 혈관벽 투과성의 증가, 백혈구의 변연추향 및 유주의 순서로 나타난다. 세포성분의 변동은 백혈구 삼출, 탐식 작용, 단핵 식세포계와 백혈

구 생성물의 세포외 방출, 백혈구 기능장애 등으로 나타난다. 염증의 화학적 매개체로는 저장된 매개체(비만세포, 호염기성 세포, 혈소판에서 분비되는 히스타민), 합성된 매개체(아라기돈 산 대사물, Cytokine), 보체계, 키닌계(브라디키닌), 응고계(피브리노 펩타이드, 트롬빈), 섬유소 용해계 등이 있다^{12,13)}.

면역이란 생체로부터 출현하는 각종 병원체 등의 공격으로부터 개체를 효과적으로 방어하는 생체 방어체계로서, 외부로부터 침입하는 미생물이나 동종의 조직 및 체내에서 발생된 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 만들고, 이것을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하려는 반응을 말한다. 면역의 종류는 호중구와 대식세포, NK 세포 등이 주된 임무를 담당하는 선천적 면역과, T임파구와 B임파구 등이 작용하는 후천적 면역으로 크게 나뉘어진다. 후천적 면역은 또한 T임파구 등의 면역세포가 반응을 담당하는 세포성 면역과, 항체와 각종 세포의 신호 전달물질인 Cytokine 등의 면역분자들이 담당하는 체액성 면역으로 구분할 수 있다²⁾.

이러한 면역반응이 정상적으로 이루어지지 못하고 과항원 상태나 체내 면역능의 향진이 있을 경우, 오히려 조직 손상 등의 역작용을 동반한 과민 반응이 일어나는데 이를 알러지라고 한다.

알러지는 1963년 Gell과 Coombs가 처음 제시한 이래 점차 증가하는 추세로 현재는 전 인구의 20% 이상이 각종 알러지 질환을 앓고 있다고 보고되고 있다. 알러지 반응은 생체가 동일한 항원에 반복적으로 접촉함으로써 그 항원에 대해 처음에는 인정되지 않았던 이상반응, 즉 과민반응이 나타나는 것으로 여기에는 4가지의 유형이 있다¹⁴⁾.

제 1형 과민반응은 anaphylaxis type 또는

IgE 의존형이라 하고, 제 2형은 cytolytic (cytotoxic) type 또는 조직특이형이라 하며, 제 3형은 Arthus type 또는 면역복합체형이라 하고, 제 4형은 tuberculin (cell mediated) type 또는 지연형이라 한다. 이 중 제 1, 2, 3형은 체액성 항체, 즉 혈청의 면역 글로블린에 의한 것으로 반응이 약 30분 이내에 시작하여 약 1-2시간 후에 소실되기 때문에 즉시형 알러지 반응이라 하고, 제 4형은 세포성 항체에 의한 반응으로 반응이 나타날 때까지 약 24-48시간이 소요되고 지속기간도 수일-수주일 동안 계속되어 지연형 알러지 반응이라고 한다¹⁵⁾.

대부분의 알러지 질환들은 제 1형 과민반응에 해당하는 것으로 IgE 의존형이라 하는데, 여기에는 비만세포와 IgE 항체가 특히 중요한 역할을 한다. 비만세포에 항원이 접촉되면 세포표면 IgE 수용체의 상호 결합이 일어나며, 이를 통해 비만세포 활성화가 일어난다. 이러한 세포 활성화로 인해 비만세포 내에 이미 형성되어 있거나 또는 새로 합성되는 여러 종류의 매개체들이 세포 밖으로 방출되는 것이다. 특히 Cytokine이 중요하는데, 그 종류로는 interleukins(IL) -1,3,4,5,6,10,13,16과 TNF- α , granulocyte macrophage-colony stimulating factor, transforming growth factor- α , platelet derived growth factor, nerve growth factor, macrophage chemotactic protein-1, macrophage inhibitor protein-1 α , β 그리고 lymphotactin 등이 있다. 이 들은 급성염증에서 혈관투과성을 증가시키고, 혈관 확장, 통증 유발, 백혈구 부착, 백혈구 화학주성, 급성기 반응, 조직손상 등을 유발 시킨다^{8,16)}. 그리고, 만성 재발성 염증성 질환인 아토피 소인을 가진 사람들에게 흔히 나타나서 소양감, 발적, 혈관부종 등의 증상을 일으키는 원인이 된다^{17,18)}.

한 번도 감작되지 않은 Naive CD4+T cell 이 항원에 의해 자극을 받으면 다양한 Cytokine을 분비활성화 시키는 데 관여하므로 Helper T cell이라 부른다. Naive CD4+T cell 은 APC(Antigen presenting cell)의 MHC I 혹은 II와 결합하여 Th1, Th2 임파구로 분화하며 각각 Cytokine 분비 양상도 달라진다. Th1 임파구는 주로 IL-2, INF- γ 를 분비하여 IgG 항체합성을 돕고 세포용해성 T임파구의 Naive CD8+T cell 임파구 분화에 관여하며 기도의 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 한다. Th1 임파구는 면역반응 후 수일 안에 시작되는 지연성 과민반응, 결핵균, 바이러스 작용에 대한 방어 작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여한다. Th2 임파구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 분비한다. 이 들은 면역반응 후 즉시형 과민반응, 기관지 천식과 같은 알러지성 질환, 기생충 감염에 대한 방어 작용 등에 관여한다. Th1과 Th2에서 분비되는 각종 Cytokine들은 서로 길항작용을 하여 억제한다. 즉 Th1이 활성화하면 Th2를 억제하고, 알러지에 관련되는 Th2가 활성화되면 Th1이 억제된다. 특히 IL-4는 Th1 임파구의 반응을 억제하고, INF- γ 는 Th2 임파구의 반응을 억제한다. 따라서 Th1의 수적 감소 및 활성 저하는 전신의 면역체계를 저하시켜 감염 질환을 일으킬 수 있는 한편, Th2 임파구의 과잉항진으로 알러지 질환을 유발할 수 있는 것이다^{2,19)}.

염증이란 단어가 한의학에 직접적으로 등장하지는 않지만, 증상으로 살펴볼 때 발열, 동통, 종창 등과 연관하여 瘡이나 癰疽 등의 표현과 연관해 볼 수 있을 듯하다. 이는 주로 肺熱壅盛의 증과 유관하다²⁰⁾. 염증성 부종에 관한 기전으로 黃帝內經에서 '榮衛稽於經脈之中即 血泣而不行, 不行即衛氣從而不通壅而不得行, 故戾, 大熱不止, 熱勝則肉腐 肉腐

則爲膿'이라고 나와 있으며, 부종과 동통에 관해 '寒傷血熱傷氣, 氣傷痛血傷腫 故先痛而後腫者 氣傷形也, 先腫而後痛者 形傷氣也'라는 내용도 등장한다^{21,22)}.

알러지에 관한 한의학적 내용을 살펴보자면 黃帝內經에서는 肺病者 喘咳氣逆²³⁾이라 하여 천식과 유사한 질환에 관해 언급하였다. 치료에 있어서도 肺主皮毛, 혹은 肺開竅於鼻의 이론에 근거하여 肺熱을 다스리는 쪽으로 임상적 접근이 이루어져왔다. 또한 諸病源候論에서 漆有毒 人有稟性畏毒 但見漆便中毒 亦有性者耐者 終日燒者 境不爲害也²⁴⁾라 하여 漆에 대한 과민 반응을 언급했고, 證治要訣에 有人一 不可食 鷄肉及 獐魚等物 才食 則丹隨發이라 하여 음식에 대한 과민 반응과 개인차를 말하기도 했다.

우방자는 악실(惡實) 또는 서점자(鼠黏子)라고도 하는데²⁵⁾, 국화과 식물 우영(Arctium lappa L.)의 열매이다. 性味는 辛苦寒無毒하고, 疏散風熱, 宣肺透疹, 解毒利咽하는 효능이 있어 風熱感冒, 癩疹, 風疹, 咽喉腫痛, 癰腫瘡毒을 치료 한다^{26,5)}. 名醫別錄에서는 主明目 補中 除風傷이라 하였는데, 이는 木氣가 왕성하여 肝氣를 위로 끌어올리는 승발작용이 우수함을 의미한다. 東醫寶鑑에서는 癰疫을 치료하는 普濟消毒飲子, 牛蒡芩連湯 등에 포함되었고, 咽喉腫痛, 咽喉生瘡을 치료하는 牛蒡子湯, 利膈湯 등에 사용되었다²⁷⁾.

약리작용으로는 사상균, 폐렴구균, 연쇄상균에 대한 항염 작용과 사람의 자궁경부 암세포에 대한 항균 작용, 우방자에서 추출한 알칼로이드인 arctiin의 항 피부 작용 및 혈당강하 작용과 경도의 항 응고 작용, 그리고 가벼운 이노 작용 및 사하 작용 등이 보고된 바 있다^{28,29)}.

우방자에 관한 연구로는 김⁸⁾과 유⁹⁾의 우방자의 항 알러지 작용에 관한 연구, 김¹⁰⁾에 의

한 우방자 추출물의 compound 48/80 유도 비만세포 활성화와 혈관 투과성 억제효과, 조⁵⁾의 우방자의 추출조건에 따른 linoleic acid의 정량 연구, 한³⁰⁾의 우방자가 아토피 피부염에 미치는 영향 등이 있다. 이들 연구에서 우방자가 생체내의 비만세포 막을 안정화시켜 Cytokine 등의 탈과립을 유의성 있게 억제하고, 히스타민의 방출을 억제하여 compound 48/80으로 유도된 즉시형 알러지를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다.

먼저 TNF- α 는 면역반응의 초기에 분비되는 전염증기 Cytokine으로 주로 활성화된 단구와 대식세포에서 합성되며, 이 외에 Th2세포와 Th0세포에서도 생산되는 것이 증명되었다³¹⁾. 과량의 TNF- α 는 endocrine hormone의 작용을 나타내어, 체온 상승(endogenous pyrogen)을 유발할 수 있으며, 간세포(hepatocyte)에 작용하여 급성기반응단백질(acute phase reactant protein)들을 혈액 내로 만들게 하며 또한 골수전구세포의 분열을 억제하여 림프구감소증(lymphopenia)이나 면역결핍(immunodeficiency)을 유도할 수도 있으며, 근육세포의 대사작용을 촉진하여 저혈당 상태를 유도할 수도 있다. 반면에 낮은 양의 TNF- α 는 염증반응에서 백혈구들이 혈관내피세포에 부착하는 것을 촉진하며, 염증세포들의 미생물 살해능력을 증가시키며, mononuclear phagocytes에 작용하여 여러 가지 염증반응에 관여하는 Cytokine을 생산하게 만들어 염증반응을 촉진 한다³²⁾. 또한 T와 B cell의 활성화에 co-stimulator로 작용하기도 하며, 종양세포에 작용하여 세포자살(apoptosis)을 유도하기도 한다. LPS의 양이 적은 경우는 TNF- α 가 적은 양 생성되어, 백혈구나 혈관세포에 작용하여 국소적인 염증반응이 나타나 항원이 제거된다. 그러나 패혈증(septicemia)과 같이 LPS가 다량 존재하게 되

면 TNF- α 가 너무 많이 만들어져 조직의 손상이나 전신혈관응고(DIC, systemic Shwartzman reaction)와 같은 심각한 결과를 초래할 수 있다³²⁾.

IL-6은 T세포, 대식세포, B세포, 섬유아세포, 내피세포에서 만들어진다. 모든 세포에 작용하나 특히 B세포가 항체형성세포로의 분화를 유발하며, 다발성 골수종세포와 혈장세포의 악성종양에 중요한 성장인자로 생각되어 진다³³⁾.

IL-1은 활성화된 단핵식균세포, 상피세포(epithelial cells), 혈관내피세포(endothelial cell)등에 의해 만들어져 염증반응을 매개하는 Cytokine이다. IL-1에는 IL-1 α 와 IL-1 β 의 두 가지 형이 있는데, 적은 양에서는 CD4+T cell과 B cell의 활성화하며, 염증세포를 자극할 수 있다. 그러나 IL-1이 과량 만들어지면 호르몬으로 작용하여 발열, 급성기 반응(acute phases response)등이 나타난다^{24,32)}.

IL-10은 B세포의 증식을 유도하고 immunoglobulin(Ig) M, IgG, IgA의 합성에 중요한 역할을 하지만 IgE의 생산에 직접적으로 영향을 미치지 않는다. 또한 알러지 반응에 필수적인 비만세포의 성장을 유도하고, T세포 매개성 면역반응과 병원성 세균에 대한 세포 매개성 면역을 억제하며, TNF- α 를 포함한 수종의 염증성 Cytokine의 생성에 억제 효과를 나타내기도 한다³¹⁾.

이 중 TNF- α , IL-1, IL-6은 염증성 Cytokine(proinflammatory cytokine)이고, IL-10은 항 염증성 Cytokine(antiinflammatory cytokine)이다¹⁵⁾. 즉, 우리 몸에 염증이나 면역반응이 생기면 이런 항염증성 Cytokine들이 증가하게 되고, 항 염증성 Cytokine은 염증반응을 억제하는 역할을 하는 것이다.

그리고, (+) 대조군에 사용된 hydrocortisone은 아토피 피부염을 비롯한 피부질환에 가장

뛰어난 대증요법제로서 작용기전이 완전히 알려져 있지는 않으나 일반적으로 소염 작용과 면역억제 작용을 한다고 생각된다. 소염 작용은 백혈구의 축적과 기능, 단핵세포와 호산구의 수, 보체성분 등을 감소시키며 히스타민 매개 반응을 억제한다. 면역억제 작용은 혈장 내의 면역 글로불린과 보체의 양을 감소시키고 임파구와 단핵세포의 기능을 감소시킨다¹⁸⁾.

실험결과 Cytokine 분비에 대한 우방자와 hydrocortisone의 사이에는 뚜렷한 차이를 보였다. 우방자는 TNF- α 와 IL-10은 억제시켰고, IL-6와 IL-1 β 는 오히려 증가시키는 이중적 작용을 보인 반면, hydrocortisone은 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 모두 억제시켰다.

TNF- α 의 경우 대체로 hydrocortisone 전처리한 (+) 대조군과 비슷한 양상으로 나타났는데, 우방자의 농도가 각각 250 ug/ml, 500 ug/ml, 1 mg/ml일 때 LPS로 자극한 (-) 대조군에 비해 통계적으로 의미 있게 감소하였다($p < 0.01$). 또한 우방자의 농도에 비례하여 TNF- α 분비량이 감소하는 것으로 보아 기대한 항 알러지 염증작용을 보이는 것이라 생각할 수 있다.

IL-6의 경우, hydrocortisone 전처리군은 hydrocortisone의 농도가 증가함에 따라 분비량이 감소하였으나, 우방자 처리군은 모든 농도에서 LPS에 의해 상승된 IL-6의 발현을 억제하지 않았고, 오히려 LPS 처리 군에 비해 통계적으로 의미있는 상승을 나타내었다($p < 0.01$)

IL-1 β 의 경우도 hydrocortisone 전처리군은 마찬가지로 hydrocortisone의 농도가 증가함에 따라 분비량이 감소하였으나, 우방자 처리군은 LPS 처리 군에 비해 IL-1 β 의 분비량이 통계적으로 유의미하게 상승하였고($p < 0.01$), 우방자의 농도가 증가함에 따라 분비량은 오히려 증가하는 양상을 보였다.

마지막으로 IL-10의 경우, 우방자 처리군은 1 mg/ml인 경우를 제외하고는 LPS 처리군에 비해 유의미한 감소를 보여(우방자 농도 50, 100, 250 ug/ml인 경우 $p < 0.01$, 우방자 농도 500 ug/ml인 경우 $p < 0.05$) 기대한 항염증 혹은 항알러지 효과를 보인다고 생각된다. 그러나 농도별로 IL-10의 분비량에는 큰 변화가 없이 거의 비슷하게 나타난다.

이상과 같이 염증 반응에 관여하는 대표적인 Cytokine인 TNF- α 와 IL-1 β , 그리고 Th2 임파구에서 분비되어 알러지 반응을 일으키는 IL-6과 IL-10의 분비량이 우방자의 농도에 따라 어떻게 달라지는지 살펴보았다. 4가지 Cytokine에서 전부 우방자 처리군은 LPS 처리군과 유의미한 차이를 나타내었고, TNF- α 와 IL-10에 대해서는 분명한 억제 효과를 나타낸다고 보여 진다. 한편 IL-1 β 와 IL-6에 대해서는 억제 효과를 나타낸다고 보기가 어려우며, 오히려 LPS에 의한 상승보다 높은 발현을 보여 임상에서도 초기 염증반응에서 우방자의 응용에 신중을 가해야 할 것으로 생각된다. 따라서 초기뿐만 아닌 만성적인 알러지 반응에 대한 우방자의 연구도 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

우방자의 항 알러지 염증 효과를 알아보기 위해, macrophage 264.7 cell을 이용하여 분비되는 Cytokine의 양을 관찰하여 비교한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 우방자는 TNF- α 의 분비량을 유의하게

억제시켰다.

2. 우방자는 IL-6의 분비량을 유의하게 증가시켰다.
3. 우방자는 IL-1 β 의 분비량을 유의하게 증가시켰다.
4. 우방자는 IL-10의 분비량을 억제시켰으나, 농도별 효과는 없었다.

이상의 결과로 보아 우방자는 항알러지 염증에 효과가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 서정민, 김진수, 이광규, 육상원. 현삼청폐음의 항염 및 항알러지 작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지 2002;16(1):165-71.
2. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Poper, J.S. Cellular and molecular immunology, W.B. Sanders Co. USA 2. 1994:241-60.
3. 노진우, 이광규, 이창현, 육상원. 용각산의 항알러지 작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지 2002;16(5):1009-15.
4. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. Immunology. 4th Ed. 1.1-2.18. Mosby Publishing. U.K. 1998.
5. Venge P. Monitoring the allergic inflammation. Allergy 2004;59(1):26-32.
6. 대한병리학회 대구·경북지부학회. 간추린 병리학. 서울:정문각. 1998:56-8.
7. 소문연구집성간행위원회. 소문연구집성. 서울:금성인쇄사. 2001:80,319.
8. 김홍진, 최정화, 김종한. 우방자 추출물 및 분획층이 항 알러지에 미치는 실험적 연구.

- 대한안이비인후과학회지 2002;15(2):33-52.
9. 유한철, 김성훈, 김동희. 우방자의 항 알러지 효과에 대한 연구. 대한본초학회지 2001;16(1):111-28.
 10. 김은경. 우방자 추출물의 compound 48/80 유도 비만세포 활성화와 혈관 투과성 억제 효과. 대한체질인류학회지 2004;17(1):55-66.
 11. 조윤희. 우방자의 추출조건에 따른 Lipoic acid의 정량 연구. 대한본초학회지 2003;17(2):11-7.
 12. A.D.T.Govan, P.S. Macferlanne, R. Callander. Pathology illustrated. 서울:고려의학. 1992:29-43.
 13. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1991:71-115.
 14. 강병수. 한방임상알러지. 서울:정보사. 2002:22-3, 64, 68.
 15. 서울대학교의과대학. 면역학. 서울:서울대학교출판부. 1994:1-3, 135-42, 165-9, 229-41.
 16. Saimah Arif, Arjmand Mufti. Immune, blood, and lymphati system. 서울:한우리. 2000:431-36.
 17. 허충립. 피부알러지. 경희의학. 1996;12(2):108-16.
 18. 피부과학회. 피부과학. 서울:여문각. 1990:29-35,67,72-82,133-8.
 19. Lothar Hultner, Stephan Kolsh, Michal Stassen, Uwe Kaspers, Jean-Pierre Kremer, Reinhard Mailhammer, Jochen Moeller, Hannelore Broszeit, Edgar Schmitt. In activated mast cells, IL-1 Up-regulates the production of several Th2 related Th2 cytokines including IL-9. J Immunol 2000;164(11):5556-63.
 20. 전국한의과대학 병리학교실. 한방병리학. 서울:한의학사. 2001:335-6.
 21. 양유걸. 황제소문영추직해. 서울:정보사. 1980:3,266.
 22. 홍원식 편역. 황제내경. 서울:고문사. 1974:236,358.
 23. 양기. 황제내경소문금석. 서울:정보사. 1985:125,146,412.
 24. 소원방. 제병원후론. 서울:소인출판사. 1974:18-20.
 25. 임진석 역. 본경소증. 서울:대성의학사. 2001:633-4.
 26. 황궁. 본초구진. 서울:일중사. 1992:260.
 27. 허준. 동의보감. 서울:여강출판사. 1994:802-6.
 28. 김호철. 한약리학. 서울:김문당. 2001:90-1.
 29. 윤화정. 아토피 피부염 환자의 한의학적인 임상유형 분석에 대한 연구. 동의대학교 대학원. 2001.
 30. 한규철. 우방자가 아토피 피부염에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2004.
 31. 박종갑, 이현정, 이호표, 김진우. 아토피 피부염 말초혈액 단핵구에서의 IL-10, GM-CSF 및 TNF- α mRNA의 자발적 발현. 천식 및 알러지 1999;19(6):912-9.
 32. 김종운. 면역학. 서울:서울대학교출판부. 1986:33-6.
 33. 하대유. 그림으로 본 면역학. 서울:고문사. 1992:103.
 34. 정경연, 김갑성, 윤중화. 牛黃, 熊膽, 麝香 複合製劑 藥針刺戟이 LPS 誘發關節炎의 免疫反應에 미치는 영향. 대한침구학회지 2001;18(1):113-128.
 35. 정규만. 알러지와 한방. 서울:제일로. 1993:15-55,98-107,120-1,292-8.

36. 조영주, 홍수종, 문희범. IL-4와 hydrocortisone에 의한 아토피 환자 말초혈액 단핵구의 IgE 생산 조절. 알러지학회지 1997;17(4):566-73.
37. 왕본상. 현대중약약리학. 천진:천진과학기술출판사. 1997:172-5.