

升麻葛根湯의 항히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향

김홍배, 김원일*, 이승연**

동의대학교 한의과대학 소아과학교실 *동의대학교 한의과대학 비계내과학교실
**동의대학교 한의과대학 소아과학교실, 동의대학교 임상연구센터

Anti-histamic Effect and IL-4 and GM-CSF mRNA Expression on *Sungmagalkuntang*

Kim Hong Bae, Kim Own Il*, Lee Seung Yeon**

Department of Pediatrics, College of Oriental medicine, Dongeui University

*Department of Internal medicine, College of Oriental medicine, Dongeui University

**Department of Pediatrics, College of Oriental medicine, Dongeui University,
Clinical Research Center of Oriental Medicine, Dongeui University

Objectives : We investigated the effect of *Sungmagalkuntang*(SGT) on the allergy.

Methods : We conformed compound 48/80-induced active systemic anaphylatic shock, anti-dinitrophenyl IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis and ovalbumin-induced anaphylatic shock. Also observed IL-4 and GM-CSF mRNA expression in ovalbumin-induced allergic lung tissue and RBL-2H3. Histamine release is measured in RBL-2H3.

Results : SGT inhibited active systemic anaphylatic shock, passive cutaneous anaphylaxis and ovalbumin-induced anaphylatic shock by oral administration. We observed that SGT was concentration-dependently reduced IL-4 and GM-CSF mRNA expression in ovalbumin-induced allergic lung tissue and RBL-2H3 by SGT. In addition, SGT reduced histamine release in RBL-2H3.

Conclusions : These results indicate that SGT has anti-histamic effect and controls IL-4 and GM-CSF mRNA expression on allergy.

Key words : *Sungmagalkun-tang*(SGT), Anti-histamic Effect, IL-4, GM-CS

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

교신저자 : 이승연, 부산시 부산진구 양정2동 산45-1 동의대학교 한의과대학 소아과학교실
(Tel. 051-850-8680, E-mail: synlee@deu.ac.kr)

I. 緒 論

아토피피부염은 만성적으로 재발하는 소양성 피부염으로 영유아기에 흔히 발생하고 환자나 가족 중에 아토피천식, 알레르기 비염 같은 아토피 질환을 동반하는 경우가 많다¹⁾.

아토피피부염의 발생기전이나 원인에 대해서는 아직까지도 확실치는 않으나 소아에서는 약 30%가 음식물 알레르기로 알려져 있고, 계란, 우유, 땅콩, 콩, 밀, 호두 등이 항원성이 강한 알러젠으로 알려져 있으며, 특히 계란은 아토피피부염과 음식물알레르기를 가진 소아의 2/3에서 반응을 보인다고 보고되고 있다^{2,3)}.

소아 아토피피부염과 음식물 알레르기의 치료에는 항히스타민제가 많이 사용되어지고 있으나, 진정작용, 중추신경장애, 식욕증가, 심각한 심혈관계의 부작용 등을 초래하는 것으로 알려져 있어 대체약 개발이 요구되는 실정이다.

升麻葛根湯은宋代 錢乙의 《小兒藥證直訣·閻氏小兒方論》⁴⁾에 최초로 수록된 이후 許浚의 《東醫寶鑑의 傷寒門》⁵⁾이나 《小兒癩疹 痘瘡門》⁶⁾ 등에 인용되어온 처방으로

傷寒溫病과 時令感冒, 瘡疹의 疾患에 사용되어 왔으며, 趙等⁷⁾은 本方이 解肌透疹之劑로써 癩疹이나 風疹을 치료하는 기본 方劑가 되며 感氣初期나 皮膚炎에 效能이 있다고 하였다.

이에 저자는 升麻葛根湯이 소양증을 주소로 하는 피부질환의 치료에 유효할 것이라 생각되었으며, 그 기전을 살펴보고자 항히스타민 효과 및 IL-4와 GM-CSF 발현에 미치는 영향을 실험적으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

본 실험에 사용된 약재는 동의대학교 부속 한방병원에서 구입(주, 광명제약, 부산) 정선하여 사용하였고, 升麻葛根湯의 처방 구성은 《東醫寶鑑》⁵⁾을 準하였으며 1貼 內容과 分量은 아래와 같다.

Table 1. Prescription of *Sungmaqalkuntang*

韓藥名	生藥名	重量(g)
葛根	<i>Puerariae Radix</i>	8 g
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	4 g
升麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	4 g
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4 g
生薑	<i>Zingibelis Rhizoma</i>	4 g(3片)
蔥白	<i>Allii Fistulosi Bulbus</i>	4 g(2本)
總量		28 g

2) 動物

Active systemic anaphylactic shock 및 passive cutaneous anaphylaxis 실험에 사용한 생쥐는 ICR 계통 웅성 (6주령, 30 g ± 2 g), ovalbumin 알레르기 유발실험에 사용한 생쥐는 Balb/c 계통 웅성 (6주령, 25 g ± 2 g) 은 각각 효창 사이언스에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22°C ± 2°C, 습도 55 ± 5%, dark/light (12시간) 조건 하에서 고품질 pellet 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였다.

3) 細胞

RBL-2H3 세포는 한국세포주은행 (KCLB, 서울)에서 분양받아서 배양하였다.

4) 經口注入器

Mouse용 철제 經口注入器(직경 1.5×70mm, Harvard apparatus, USA)를 70% ethanol에 12시간 침적하여 멸균 후 사용하였다.

2. 方法

1) 實驗群의 構成

Normal(정상군), Control(대조군), 升麻葛根湯 0.5 g/kg 投與群 및 升麻葛根湯 1 g/kg 投與群으로 대별되며, ICR mouse 및 Balb/c mouse를 사용하였다.

2) 檢液의 調製 및 投與

(1) 檢液의 調製

升麻葛根湯 10 첩 분량 280 g을 round flask에 넣고 蒸溜水 2,000 ml를 가하여 3 시간 동안 가열 추출하여 抽出液을 여과한 다음 동결 건조하여 52.99 g의 추출물을 얻어 생리 식염수에 녹여 실험에 사용하였다.

(2) 檢液의 投與

升麻葛根湯의 投與는 각각 經口注入器를 이용하여 投與하였다. 檢液投與群은 알레르기 유발 전 7 일간 1 일 1 회, 사람 복용량의 5 배와 10 배인 0.5 g/kg과 1 g/kg을 투여하였으며, 대조군은 동량의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하였다.

3) 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% penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 포함한 DMEM (Dulbecco's modification Eagle medium, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양한다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하고 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양한다.

4) Active systemic anaphylactic shock 반응

ICR mouse 10 마리를 1 군으로 하여 升麻葛根湯을 농도별로 7 일간 경구투여하고 대조군은 동량의 saline을 처치한 후 compound 48/80 (8 µg/g, sigma)을 복강 내에 투여하고 mouse의 치사율을 60분 동안 관찰하였다.

5) Passive cutaneous anaphylaxis 반응

IgE 의존형 피부과민반응에 대한 영향을 알아보기 위하여 Katayama 등⁸⁾의 방법에 준하여 ICR mice 7 마리를 1 군으로 하고 7 일간 升麻葛根湯을 0.5 g/kg 또는 1 g/kg로 경구

투여한 후 등 부위를 제모하고 anti-DNP IgE를 피하주사하여 감작시켰다. 48 시간 경과 후 DNP-HSA 1 mg과 4% evans blue를 1:1로 혼합하여 mouse의 미정맥에 주사하였다. CON은 동량의 생리식염수를 처치하였다. 30 분 후 mouse를 도살하고 청색으로 착색된 등 부위의 피부를 채취하여 1N KOH용액 100 μ l에 침적시켜 37°C에서 하룻밤 방치하였다. Acetone과 phosphoric acid (5:13) 혼합액 900 μ l를 첨가하여 원심분리한 후 상층액을 620 nm에서 흡광도를 측정하여 standard에 의해 정량하였다.

6) Ovalbumin을 이용한 알레르기 유발

Balb/c mice를 사용하여 50 μ g의 ovalbumin과 4mg의 aluminum hydroxide gel의 혼합액을 10일 간격으로 3회 복강 주사하여 감작하였다. 감작 10일 후 50 μ g의 ovalbumin을 생리식염수에 녹여 정맥 주사하여 알레르기를 유발하였다. 대조군은 동량의 aluminum hydroxide gel을 주사하여 감작하였으며 생리식염수를 정맥 주사하였다. 알레르기 유발 7일 전부터 1일 1회 升麻葛根湯을 0.5 g/kg 또는 1 g/kg을, 대조군은 생리식염수를 500 μ l씩 경구투여하였다.

7) Histamine 측정

RBL-2H3 세포 (2.5×10^6 cells)에 100 ng/ml anti-DNP IgE를 넣고 하루 동안 배양한 후 升麻葛根湯을 농도별로 15 분간 처리한다. 그 후 100 ng/ml DNP-HSA로 1시간 자극한 후 상층액을 얻어서 histamine kit (IBL immuno-biological Laboratories)으로 확인한다.

세포배양 상층액에 indicator buffer를 넣고 vortexing 후 acylation reagent를 넣고 30 분간 상온에서 방치한다. 2 ml의 assay buffer를

넣고 vortexing 후 microtiter plate에 각각 sample을 넣고 enzyme conjugate와 histamine antiserum을 각각의 well에 넣고 3 시간 상온에서 반응시킨다. 반응이 끝난 후 200 μ l의 TMB substrate solution을 넣고 다시 20 분간 상온에서 반응시킨다. 20 분 후에 반응을 종결시키는 TMB stop solution을 넣고 60 분 안에 450 nm의 흡광도에서 OD값을 측정한 후 standard에 의해 정량하였다.

8) 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

(1) total RNA 추출

① 조직에서 total RNA 추출

알레르기 유발 후 폐조직 0.1 g을 채취하여 Trizol 1 ml을 넣고 homogenization한 후 200 μ l chloroform을 넣은 후 10 초간 vortex mix한다. Ice에서 10 분간 방치한 후 microcentrifuge로 12,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 취하고 동량의 isopropanol을 혼합한 후 천천히 흔들어서 주었다. 그리고 microcentrifuge를 이용하여 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 pellet에 70% EtOH를 넣고 vortex한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW 20 μ l에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② 세포에서 total RNA 추출

RBL-2H3 세포 (2.5×10^6 cells)에 100 ng/ml anti-DNP IgE를 넣고 하루 동안 배양한 후 升麻葛根湯을 15 분간 처리한다. 그 후 100 ng/ml DNP-HSA를 1시간 처리 후 4°C PBS로 세척한 후 1 ml의 Trizol을 넣고 2 분간 방치한 후 chloroform을 넣고 10 초간 vortexing한다. 원심분리기로 12,000 rpm에서 15 분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량

의 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

Reverse transcription반응은 준비된 total RNA와 antisense primer를 RT-PCR kit (iNtRON Biotechnology, Inc.)에 넣고 70 °C에서 5 분간 반응시켜 cDNA를 얻는다. 이미 합성된 cDNA을 주형으로 각각 sense primer (IL-4, GM-CSF와 b-actin)를 premix에 넣고 최종부피가 20 μl되도록 멸균 증류수를 가하였다.

각 primer의 denaturation, annealing, extension과 cycle 조건은 다음과 같다.

IL-4는 94°C에서 60 초간 denaturation시키

고, 58°C에서 45 초간 annealing시킨 다음, 72°C에서 45 초간 extension시키는 cycle을 25 회 반복한 뒤에, 마지막 extension은 72°C에서 5 분간 PCR machine(GeneAmp, PCR System 9700, USA)으로 수행하였다. GM-CSF는 94°C에서 60 초간 denaturation시키고, 63°C에서 45 초간 annealing시킨 다음, 72°C에서 45 초간 extension시키는 cycle을 34 회 반복한 뒤에, 마지막 extension은 72°C에서 5 분간 수행하였다. b-actin은 94°C에서 60 초간 denaturation시키고, 58°C에서 45 초간 annealing시킨 다음, 72°C에서 45 초간 extension시키는 cycle을 18 회 반복한 뒤에, 마지막 extension은 72°C에서 5 분간 수행하였다.

각 PCR products는 10 μl씩 2% agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 20 분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다.

Table 2. Primer sequence

Cytokine		Sequence(mouse)	
IL-4	S	5'	-GAGCCATATCCACGGATGCGACAA-3'
	AS	5'	-CATGGTGGCTCAGTACTACGAGTA-3'
GM-CSF	S	5'	-GCACCCACCCGCTCACCCATCACTGTC-3'
	AS	5'	-CTCATTTTTTGGACTGGTTTTTTTGCATT-3
β-actin	S	5'	-GGACTCCTATGTGGGTGACGAGGCCCA-3'
	AS	5'	-GGGAGAGCATAGCCCTCGTAGATGGGC-3'

Cytokine		Sequence(rat)	
IL-4	S	5'	-ACCTTGCTGTCACCCTGTTC-3'
	AS	5'	-TTGTGAGCGTGGACTCATTC-3'
GM-CSF	S	5'	-GCATGTAGATGCCATCAAAGAAGC-3'
	AS	5'	-CATTTCTGGACCGGCTTCCAGC-3'
β-actin	S	5'	-TAACCAACTGGGACGATATG-3'
	AS	5'	-ATACAGGGACAGCACAGCCT-3'

9) 統計 處理

成績은 평균치±표준오차로 나타내었고 평균치간의 有意性은 Student's *t*-test를 이용하여 檢定하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 有意한 것으로 判定하였다. 통계처리는 sigma plot 9.0을 사용하였다.

였다 (Table 3).

2. Passive Cutaneous Anaphylaxis 반응에 미치는 영향

Anti-DNP IgE로 유도된 passive cutaneous anaphylaxis 반응은 피부청색반의 농도를 측정하였는데 그 결과 정상군은 2.24±0.44 μg/site이며, 대조군은 3.51±0.11 μg/site로 정상군에 비해 有意성 (*p*<0.005) 있게 증가를 하였다. 반면 0.5 g/kg와 1 g/kg의 SGT 처리군은 각각 3.08±0.10 μg/site와 3.07±0.09 μg/site로 대조군에 비하여 有意성 (*p*<0.05) 있게 감소하였다 (Fig. 1).

Ⅲ. 結 果

1. Active Systemic Anaphylatic Shock 반응에 미치는 효과

Compound48/80으로 유도한 active systemic anaphylatic shock 반응으로 10 마리의 ICR mice 중 대조군은 60분 이내에 anaphylatic shock으로 100%의 치사율을 나타내었고, 0.5 g/kg와 1 g/kg의 SGT을 7일간 경구 투여한 경우는 치사율이 각각 80%와 70%로 감소하

Table 3. Effect of SGT on the Compound 48/80 Induced Active Systemic Anaphylatic Shock

Sample	Concentration(g/kg)	Lethality (%)
NOR	saline	0
CON	saline	100
SGT	0.5	80
	1	70

The data represents the lethality from 10 mice.

NOR: Group only orally administrated with saline once a day for a week.

CON: Group orally administrated with saline once a day for a week before intraperitoneal injection of compound 48/80 (8 μg/g).

SGT: Group orally administrated with 0.5g/kg, 1g/kg of *Sungmagalkuntang* once a day for a week before intraperitoneal injection of compound 48/80 (8 μg/g).

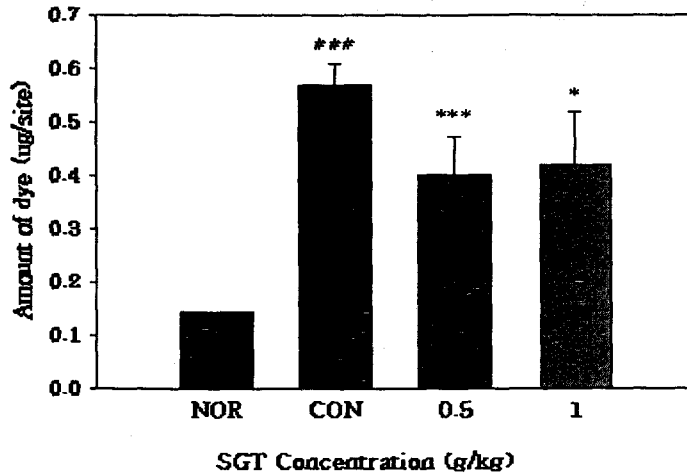


Fig. 1. Effect of SGT on the Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction.

Data represents the mean±SE from 6 mice.

NOR: Group only orally administrated with saline once a day for a week.

CON: Group orally administrated with saline once a day for a week before the challenge with antigen.

###: significantly different from NOR(p<0.005)

SGT: Group orally administrated with 0.5g/kg, 1g/kg of *Sungmagalkuntang* once a day for a week before the challenge with antigen.

*: significantly different from CON (***; P<0.005, *; P<0.05).

3. Ovalbumin 유발 Anaphylatic Shock 반응에 미치는 효과

Ovalbumin으로 유발한 알레르기 반응에서 대조군은 8마리의 Balb/c mouse가 anaphylatic

shock으로 100%, 0.5 g/kg의 SGT 을 7일간 경구투여한 경우 60%, 1 g/kg의 SGT을 7일간 경구투여한 경우 28.6%의 치사율을 나타내었다 (Table 4).

Table 4. Effect of SGT on the Ovalbumin Induced Active Systemic Anaphylatic Shock

Sample	Concentration(g/kg)	Lethality (%)
NOR	saline	0
CON	saline	100
SGT	0.5	60
	1	28.6

The data represents the lethality from 8 mice.

NOR: Group only orally administrated with saline once a day for a week.

CON: Group orally administrated with saline once a day for a week before the challenge with ovalbumin.

SGT: Group orally administrated with 0.5g/kg, 1g/kg of *Sungmagalkuntang* once a day for a week before the challenge with ovalbumin.

4. Ovalbumin 유발 알레르기 반응에서 IL-4와 GM-CSF의 발현에 미치는 영향

Ovalbumin으로 유발한 알레르기 반응에서 폐 조직에 발현된 IL-4 mRNA와 GM-CSF mRNA의 발현은 대조군이 정상군에 비해 증가하였으며, SGT은 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었고 농도 비례로 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

5. RBL-2H3에서 Histamine 농도에 미치는 영향

RBL-2H3에 anti-DNP IgE으로 24 시간 감작하고 DNP-HSA으로 탈과립을 유도하여 유출된 histamine 농도를 시간별로 측정된 결과 히스타민의 농도는 0, 0.5, 1, 3 및 6 시간에

각각 5.44±0.05 ng/ml, 5.74±0.05 ng/ml, 5.82±0.05 ng/ml, 5.93±0.05 ng/ml 및 6.12±0.05 ng/ml로 시간에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

RBL-2H3에 anti-DNP IgE으로 24시간 감작하고 升麻葛根湯을 농도별로 처리한 후 DNP-HSA으로 탈과립을 유도하여 히스타민의 유출량을 측정된 결과 정상군은 5.52±0.09 ng/ml으로 나타났고, 대조군은 6.04±0.06 ng/ml으로 정상군에 비해 히스타민의 농도가 유의성 (P<0.005) 있게 증가하였으나 升麻葛根湯을 0, 40, 80, 120 및 160 µg/ml 농도로 처리한 경우 각각 5.88±0.09 ng/ml, 5.95±0.08 ng/ml, 5.90±0.01 ng/ml 및 5.72±0.21 ng/ml으로 농도 비례적으로 억제하는 효과를 나타내었으나 유의성을 나타내지는 않았다 (Fig. 4).

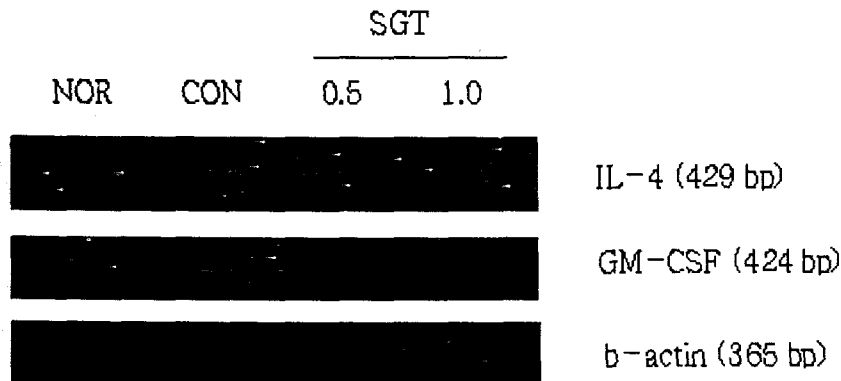


Fig. 2. Effect of SCB on the IL-4 and GM-CSF mRNA Expression from Ovalbumin induced Allergic Lung Tissue.

Balb/c mice were immunized 3 times, once the tenth for 30 days by mixture of ovalbumin and aluminum hydroxide gel. After 30 days we induced allergy by intravenous injection of ovalbumin.

NOR: Group immunized by only aluminum hydroxide gel and administrated with nothing before the challenge with ovalbumin.

CON: Group orally administrated with saline once a day for a week before the challenge with ovalbumin.

SGT: Group orally administrated with 0.5 g/kg, 1 g/kg of *Sungmagalkuntang* once a day for a week before the challenge with ovalbumin.

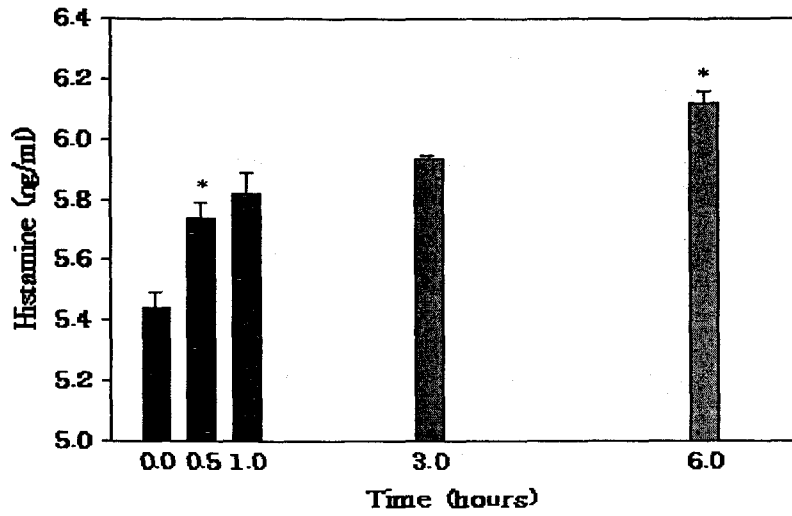


Fig. 3. Time-dependent histamine release induced by anti-DNP IgE in the RBL-2H3.

RBL-2H3 was immunized by anti-DNP IgE for 24 hours. After 24 hours induced degranulation by DNP-HSA. Released histamine was time-dependently measured with histamine kit.

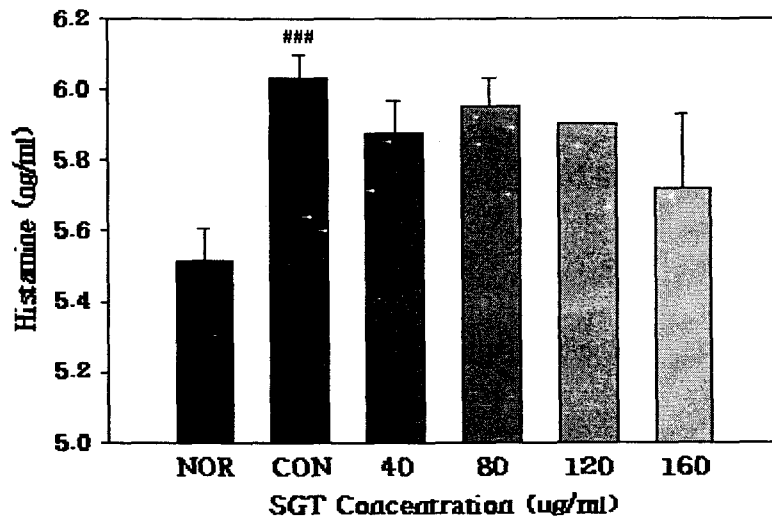


Fig. 4. Effect of SGT on the histamine release induced by anti-DNP IgE in the RBL-2H3.

RBL-2H3 was immunized by anti-DNP IgE for 24 hours. After 24 hours SGT was dose-dependently treated for 15 mins, and then RBL-2H3 was induced degranulation by DNP-HSA. Released histamine was measured with histamine kit.

###: significantly different from NOR($p < 0.005$)

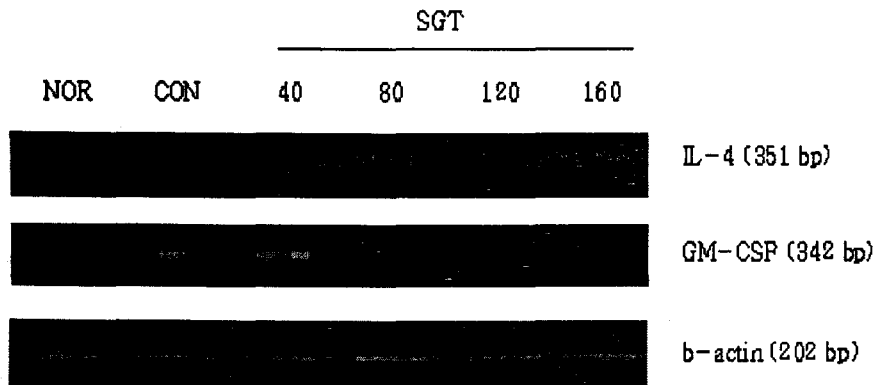


Fig. 5. Effect of SGT on the IL-4 and GM-CSF mRNA expression by anti-DNP IgE in the RBL-2H3. RBL-2H3 was immunized by anti-DNP IgE for 24 hours. After 24 hours SGT was dose-dependently treated for 15 mins, and then RBL-2H3 was induced degranulation by DNP-HSA.

6. RBL-2H3에서 IL-4와 GM-CSF의 발현에 미치는 영향

RBL-2H3에 anti-DNP IgE으로 24 시간 감작하고 升麻葛根湯을 0, 40, 80, 120 및 160 $\mu\text{g/ml}$ 농도별로 처리한 후 DNP-HSA으로 탈과립을 유도하여 IL-4 mRNA와 GM-CSF mRNA의 발현은 升麻葛根湯을 처리한 농도 비례적으로 감소하는 양상을 나타내었다 (Fig. 5).

IV. 考 察

알레르기는 비정상적으로 일어나는 면역반응 중 과민반응의 일종으로 외부에서 이물질들이 체내로 들어오면 이들로부터 우리 몸을 보호하려는 면역반응이 일어나는데 이를 정상 면역 반응이라고 하며, 이러한 면역반응이 지나

쳐서 과민반응을 유발하고 이것 때문에 신체에 이상이 생기는 경우 이를 알레르기라고 한다. 이러한 알레르기 질환은 유전적 소양을 지닌 사람에게 많이 나타나며, 원인이 되는 물질에 반복적인 접촉이 있어야 하므로 처음 접촉하는 물질에는 오히려 반응이 나타나지 않으나 장기간 아무런 문제가 없던 것들에 알레르기 반응이 생기게 되는 것이다¹⁾.

이렇게 생활 환경에 미량으로 존재하는 단백질(항원)물질에 대해서 IgE를 쉽게 생산하는 신체상태를 “아토피”라고 한다. 만들어진 IgE는 비만세포 또는 호염기성구의 표면수용체 (Fc ϵ RI)에 붙게 된다. 외부에서 알레르겐이 들어와서 비만세포에 붙어있는 IgE와 결합하게 되면 비만세포가 활성화되고 비만세포 내 과립 속에 들어 있던 히스타민 등의 일차 화학 매체가 분비된다. 또 이 때 세포막이 활성화되면 류코트리엔(leukotriene), 프로스타글란딘, 혈소판활성화인자(PAF)등의 이차화학매체가 분비된다. 또 비만세포로부터 IL-3, IL-4, IL-5등의 Th2 사이토카인이 분비된다. 알레르기 반

용은 분비된 화학매체의 약리작용으로 신속히 일차 반응이 일어나고, 화학매체와 사이토카인의 작용으로 호산구등의 염증 세포가 모여들고 이 세포들의 영향으로 알레르기 염증반응이 지속된다⁹⁾.

알레르기 질환은 나타나는 장기에 따라 기관지 천식, 알레르기 비염, 알레르기 결막염, 두드러기, 아토피 피부염, 위장관알레르기, 아나필락시스 등이 있다.

알레르기 비염은 전 인구의 20~30%가 앓고 있으며, 두드러기는 25%의 사람이 일생을 통하여 한번은 경험하게 된다. 20세기 후반에 들어 기관지 천식 등 호흡기 알레르기 질환이 전 세계적으로 발병율이 증가되고 있으며, 우리나라도 1960년대에 비하여 1990년대에 들어 3-5배 증가하였다. 1990년도 중반 조사에 의하면 우리나라 소아에서 기관지 천식의 과거력이 약 15%라고 보고된 바가 있으며 소아 및 성인 연령에서 기관지 천식의 유병율이 3-5%에 달하고 있으며 65세 이상의 노인층에서도 기관지 천식이 10번째로 흔한 병으로 조사·보고되는 등 호흡기 알레르기 질환이 흔한 질병 중의 하나이다. 아토피피부염은 세계적으로 증가추세에 있어 유병율이 인구의 20%라는 보고가 있으며, 국내의 보고에 의하면 6,070명의 초,고등학생을 대상으로 하는 유병율은 6%로 나타난다.

소아 알레르기 질환의 특징은 유전적인 요인이 많으며, 집먼지진드기, 꽃가루, 곰팡이 포자와 같은 생활주변에 흔한 항원에 쉽게 과민해지며, 여러 아토피 질환이 겹쳐서 나타난다^{10,11)}.

아토피란 용어는 1923년 천식과 고초열을 동반한 인체의 과민반응이란 의미로 처음 사용하였으며 후기에 Cocca와 Cooke이 소양성 피부발진도 포함하여 사용한 이래 1930년 Sul-

zburger등이 범발성 신경성 피부염을 아토피 피부염이란 병명으로 사용할 것을 제안하면서 아토피피부염이란 명명이 공식화하게 되었다^{2,3)}.

영유아기에 우유알레르기 및 영아습진(태열)을 시작으로 점차 자라면서 전형적인 아토피피부염, 천식, 알레르기 비염, 또는 알레르기성 결막염 등과 동반되어 나타난다.

임상경과는 영유아기부터 잦은 바이러스 호흡기 감염증상을 보이다가 보통 만 2세가 지나면서부터 전형적인 천식 증상이 나타나고, 학동기 후기에서 사춘기를 거치면서 약 반수에서 증상이 호전되는 경향이 있다. 그러나 일부 환아에서 지속적인 기도과민성이 내재되어 성인까지 천식증상이 이어진다³⁾.

아나필락시스는 즉시형 과민반응 중 가장 전격적이고 중한 반응으로 즉각적인 응급 처치가 필요한 질환으로¹²⁻¹⁵⁾ 원인 물질에 노출된 후 수분에서 20-30분 이내에 증상이 나타나며, 일반적으로 증상의 발생까지의 시간이 짧을수록 더 심한 반응이 일어난다¹⁶⁾. 증상발생의 초기에 국소적 혹은 전신적인 소양증, 피부발적이 생기거나 따끔거리는 느낌을 호소하다가 전신적인 담마진 및 혈관부종이 발생하며, 후두부종이나 기관지 수축으로 인한 심한 호흡곤란으로 이어져 있다. 심한 경우는 심혈관 허탈, 의식소실, 청색증, 경련, 치명적인 부정맥이 발생하고 사망할 수도 있다¹⁷⁾. 전신 아나필락시스는 신체의 어느 장기라도 영향을 줄 수 있으며, 특히 폐, 순환기, 피부, 신경계, 소화기에 빈번하게 증상이 발생한다.

아나필락시스는 비만세포의 세포질 과립 속에 미리 저장되어 있는 히스타민을 위시하여 비만세포의 세포막 인지질의 대사산물로서 새롭게 생산되는 prostaglandin과 leukotriene들이 세포 밖으로 유리되고, 이러한 화학적 전달

물질들에 의해 모세혈관투과성의 항진, 평활근 수축 및 분비항진 등으로 인한 조직장해가 일어난다^{18,19)}.

升麻葛根湯에 관한 실험연구로는 趙²⁰⁾가 tetracycline-HCL과 병용투여시에 抗菌 및 抗炎효과, 姜²¹⁾이 加味升麻葛根湯의 효능에 대한 실험적 연구, 金²²⁾은 升麻葛根湯加味이 마우스의 항 알레르기 및 면역반응에 미치는 영향을 보고하였다. 그러나 사이토카인 변화에 대한 연구는 없어서, 이에 본 실험에서는 升麻葛根湯이 compound 48/80으로 유도된 active systemic anaphylactic shock 반응에 미치는 효과를 살펴보았다.

그 결과 대조군에서는 60분 이내에 10마리의 mouse가 anaphylactic shock으로 100%의 치사율을 나타냈고, 0.5 g/kg와 1 g/kg의 SGT을 7일간 경구투여한 경우 치사율이 각각 80%와 70%로 감소하였다 (Table 3).

Anti-DNP IgE로 유도된 passive cutaneous anaphylaxis 반응에 미치는 영향은 피부에 청색반이 형성되는 것을 관찰하여 농도를 측정하였는데 그 결과 정상군은 $2.24 \pm 0.44 \mu\text{g}/\text{site}$ 이며, 대조군은 $3.51 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{site}$ 로 정상군에 비해 유의성 ($p < 0.005$) 있는 증가를 하였다. 반면 0.5 g/kg와 1 g/kg의 SGT처리군은 각각 $3.08 \pm 0.10 \mu\text{g}/\text{site}$ 와 $3.07 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{site}$ 로 대조군에 비하여 유의성 ($p < 0.005$, $p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 1).

음식물 알레르기의 증상은 1차 접촉기관인 소화기와 2차 접촉기관인 피부, 코, 폐 및 혈관 등 모든 기관에서 급성 또는 만성으로 나타날 수 있으며 그 양상도 매우 다양하다. 음식물 알레르기 반응을 일으키는 원인으로 자주 지적되는 음식물인 계란중의 ovalbumin은 주요항원으로 알려져 있다²³⁾.

본 실험에서 升麻葛根湯이 ovalbumin 유발

알레르기 반응에서 anaphylactic shock 반응에 미치는 효과를 살펴본 결과 ovalbumin으로 유발한 알레르기 반응에서 대조군은 8마리의 Balb/c mouse가 anaphylactic shock으로 100%의 치사율을 나타내었고, 0.5 g/kg의 SGT을 7일간 경구투여한 경우 60%의 치사율을 나타내었고 1 g/kg의 SGT을 7일간 경구투여한 경우 28.6%의 치사율을 나타내었다 (Table 4).

사이토카인은 면역응답, 염증 반응 및 조혈 반응 등의 생체 방어에 중요한 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라 내분비계나 신경계에도 작용할 수 있는 생리활성인자이며, 생체의 고차기능을 유지하기위한 중요한 인자이다²³⁾.

실제 생체내의 사이토카인의 반응은 복잡하게 복수의 사이토카인이 조합된 것으로, 어떤 사이토카인은 촉진적으로 작용하고 어떤 사이토카인은 억제적으로 작용하는 것이지만, 알레르기 질환에서는 그 균형이 무너져 알레르기에 촉진적으로 작용하는 Th2세포 사이토카인이 우위가 되어 있다. Th2세포는 IL-4, IL-5, IL-13 등을 분비하며 이 중 IL-4는 IgE의 생성과 Th2세포의 분화를 촉진한다. 아토피 환자에서 알레르겐 특이성 T세포에서는 주로 IL-4를 분비하며 Th2세포의 기능을 갖는 것으로 알려져 있고, 천식환자의 기관지 생검, 아토피 환자의 피부생검, 알레르기 비염 환자의 비점막에서도 Th2세포가 분비하는 사이토카인의 양상이 관찰된다²⁴⁻²⁶⁾. 또한 알레르기 염증 반응을 유발하는 주요 염증세포인 호산구는 IL-5, IL-3, GM-CSF에 의해 증식된다^{27,28)}.

IL-4는 T세포, NK세포, 비만세포, 호염기구, 호산구에서 분비되며, 알레르기에 매우 본질적인 역할을 하는 사이토카인이다. B세포에 대해서는 IgE유전자의 전사 유도, B세포의 증식유도, 항원제시에 의한 클래스II 항원의 발현 증식, 클래스스위치에 관한 CD40의 발현의 증

감효과를 나타내며, T세포에 대해서는 Th2우위의 T세포 분화를 유도하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

또한 GM-CSF는 호산구의 증식과 활성화를 유도하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

그러므로 본 실험에서 升麻葛根湯이 ovalbumin 유도 알레르기 반응에서 IL-4와 GM-CSF의 발현의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 Balb/c mouse의 폐 조직에 발현된 IL-4, GM-CSF mRNA의 발현을 살펴 보았다.

실험 결과 ovalbumin으로 유발한 알레르기 반응에서 폐 조직에 발현된 IL-4 mRNA와 GM-CSF mRNA의 발현은 대조군은 정상군에 비해 증가하였으며, 승마갈근탕은 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었고 0.5 g/kg와 1g/kg의 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

알레르기 염증반응에는 수많은 매체들이 관여하며 이들 화학매체들의 대표적인 물질은 히스타민이다. 히스타민은 조직의 비만세포와 호염기구에서 합성되고 저장되며 다양한 반응에 의해 분비된다. 히스타민은 혈류를 통하여 조직으로 빠르게 확산되어 혈관확장, 혈관투과성 증가, 말초신경계와 상호작용 등의 급성염증반응에 많은 영향을 미친다²⁹⁾.

따라서 본 실험에서 RBL-2H3에서 升麻葛根湯의 항히스타민 효과를 살펴보고자 RBL-2H3에 anti-DNP IgE으로 24시간 감작하고 DNP-HSA으로 탈과립을 유도하여 유출된 histamine 농도를 시간별로 측정된 결과 히스타민의 농도는 0, 0.5, 1, 3 및 6 시간에 각각 5.44±0.05 ng/ml, 5.74±0.05 ng/ml, 5.82±0.05 ng/ml, 5.93±0.05 ng/ml 및 6.12±0.05 ng/ml로 시간에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

그 후에 RBL-2H3에 anti-DNP IgE으로 24시간 감작하고 升麻葛根湯을 농도별로 처리한 후 DNP-HSA으로 탈과립을 유도하여 히스타민의 유출량을 측정된 결과 정상군은 5.52±0.09 ng/ml으로 나타났고, 대조군은 6.04±0.06 ng/ml으로 정상군에 비해 히스타민의 농도가 유의성 있게 (P<0.005) 증가하였으나 升麻葛根湯을 0, 40, 80, 120 및 160 µg/ml 농도로 처리한 경우 각각 5.88±0.09 ng/ml, 5.95±0.08 ng/ml, 5.90±0.01 ng/ml 및 5.72±0.21 ng/ml으로 농도 의존적으로 억제하는 효과를 나타내었으나 유의성을 나타내지는 않았다 (Fig. 4).

또한 RBL-2H3에서 升麻葛根湯이 IL-4와 GM-CSF의 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RBL-2H3에 anti-DNP IgE으로 48시간 감작하고 升麻葛根湯을 0, 40, 80, 120 및 160 µg/ml 농도별로 처리한 후 DNP-HSA으로 탈과립을 유도하여 IL-4 mRNA와 GM-CSF mRNA의 발현은 升麻葛根湯을 처리한 농도 의존적으로 감소하는 양상을 나타냈다 (Fig. 5).

따라서 실험결과 RBL-2H3에서 히스타민 농도와 IL-4 mRNA와 GM-CSF mRNA의 발현은 처리 시간별로 증가하는 양상을 나타내었으며, 升麻葛根湯을 처리한 경우 농도 의존적으로 감소하는 양상을 나타냈다.

이상과 같은 결과로 볼 때 升麻葛根湯은 비만세포의 탈과립을 억제하는 효과와 급성아나필락시스 반응 및 PCA 반응을 억제시키는 효과가 있는 것으로 생각되며, ovalbumin 유도 알레르기 반응에서 폐 조직의 IL-4와 GM-CSF mRNA의 발현과 RBL-2H3에서 히스타민의 유리를 억제하고 IL-4와 GM-CSF mRNA의 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

V. 結 論

升麻葛根湯의 항히스타민 작용과 IL-4와 GM-CSF의 발현에 미치는 영향에 관하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 升麻葛根湯은 Active systemic c shock을 억제하는 효과를 나타내었다.
2. 升麻葛根湯은 PCA 반응을 억제하는 효과를 나타내었다.
3. 升麻葛根湯은 Ovalbumin 유도 알레르기 반응에서 anaphylatic shock을 억제하는 효과를 나타내었다.
4. 升麻葛根湯은 Ovalbumin 유도 알레르기 반응에서 폐 조직의 IL-4와 GM-CSF mRNA의 발현을 감소시키는 효과를 나타내었다.
5. 升麻葛根湯은 RBL-2H3에서 histamine 농도를 억제하는 효과를 나타내었다.
6. 升麻葛根湯은 RBL-2H3에서 IL-4와 GM-CSF mRNA의 발현을 감소시키는 효과를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 升麻葛根湯은 알레르기 반응을 억제하는 효과가 있는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Kay, A.B. Allergy and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* 2001;344:30-7.
2. Werfel T, Breuer K. Role of food

- allergy in atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4(5):379-85. Review.
3. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(5):805-19; quiz 820. Review.
4. 錢乙. 小兒藥證直訣. 北京:人民衛生出版社. 1991:110-1.
5. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1998:405.
6. 孟華燮. 方藥指鍼講座. 서울:大星醫學社. 1999:824.
7. 趙蘊坤等編譯. 中醫方劑病症圖解. 山西:山西科學技術出版社. 1991:20-1,169-71.
8. S. Katayama, H. Shionoya and 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.* 1978;22:89-101.
9. Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedon JC. Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005;5(2):161-6.
10. Upham JW, Holt PG. Environment and development of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005;5(2):167-72.
11. Arruda LK, Sole D, Baena-Cagnani CE, Naspitz CK. Risk factors for asthma and atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005;5(2):153-9.
12. S.F. Kemp, R.F. Lockey, B.L. Wolf, and P. Lieberman. Anaphylaxis. A review of 266 cases. *Arch. Intern.*

- Med.* 1995;155:1749-54.
13. HC. Oettgen, T.R. Martin, A. Wynshaw Boris, C. Deng, J.M. Drazen, and P. Leder. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 1994;370:367-70.
 14. Noone MC, Osguthorpe JD. Anaphylaxis. *Otolaryngol Clin North Am* 2003;36(5):1009-20.
 15. Mistovich JJ, Limmer D, Krost WS. Anaphylactic and anaphylactoid reactions. *Emerg Med Serv.* 2004;33(6):48-9,142.
 16. T.R. Martin, S.J. Galli, I.M. Katona, and J.M. Drazen. Role of mast cells in anaphylaxis. Evidence for the importance of mast cells in the cardiopulmonary alterations and death induced by anti-IgE in mice *J. Clin. Invest.* 1989;83:1375-83.
 17. Sheffer AL. Anaphylaxis: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc.* 2004; 25(1):31-2.
 18. Pietrkowicz M, Grzelewska-Rzymowska I. Histamine as a mediator of allergic inflammation. *Pol Merkuriusz Lek.* 1999;6(35):232-5.
 19. Lane SJ, Lee TH. Mast cell effector mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98:S67-71
 20. 趙貞實. 升麻葛根湯과 tetracycline-HCL과 병용투여시 抗菌 및 抗炎효과에 관한 연구. 중앙대학교 석사학위논문. 1983.
 21. 姜暲竣. 加味升麻葛根湯의 효능에 관한 실험적 연구. 경희대학교 석사학위논문. 1992.
 22. 金南權. 升麻葛根湯加味方이 마우스의 항 알레르기 및 면역반응에 미치는 영향. 원광대학교 석사학위논문. 1994.
 23. Robinson, D.S. Th-2 cytokines in allergic disease. *Br. Med. Bull.* 2000; 56:956-68.
 24. Robinson DS, Larche M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest.* 2004;114(10):1389-97. Review.
 25. O'Byrne PM, Inman MD, Adelroth E. Reassessing the Th2 cytokine basis of asthma. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(5):244-8. Review.
 26. Martin JG, Suzuki M, Ramos-Barbon D, Isogai S. T cell cytokines: animal models. *Paediatr Respir Rev.* 2004; 5:S47-51. Review
 27. Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* 2004;59(8):793-805. Review.
 28. Martinez-Moczygemba M, Huston D P. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(4):653-65; quiz 666. Review.
 29. Goldsby, Kindt, and Osborne. *Kuby Immunology.* W.H Freeman. New York. 4th Edition, 2000:287-91.