

## 원저

## 靈芝 藥鍼과 靈芝 추출액의 항알레르기 효과에 대한 연구

• 강경화 · 윤현민

<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 생리학교실<sup>2</sup>동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

## Study on Anti-Allergic Effect of Ganoderma lucidum Herbal Acupuncture and Ganoderma lucidum Extract

Kang Kyung-Hwa<sup>1</sup> · Youn Hyoun-Min<sup>2</sup><sup>1</sup>Dept. of Oriental Physiology, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University<sup>2</sup>Dept. of Acupuncture, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

## ABSTRACT

- Objectives** We studied on anti-allergic effects of Ganoderma lucidum herbal acupuncture(GHA) and Ganoderma lucidum extract(GE).
- Methods** In vivo, Animals were herbal-acupunctured GHA at both B13s three times for 5 days. Then, we investigated compound 48/80-induced active systemic anaphylactic shock using ICR mice and anti-DNP IgE-induced passive cutaneous anaphylaxis using Sprague Dawley rat. In vitro, we measured cell viability, b-hexosaminidase release, IL-4 and TNF-a from RBL-2H3 cells, and nitric oxide from Raw264.7 cell after treatment of GE of various concentrations.
- Results** In vivo, GHA pretreatments at both B13s inhibited compound 48/80-induced active systemic anaphylactic shock. Passive cutaneous anaphylaxis were inhibited by GHA10 and OP. In vitro, 0.1 ~ 2% GE treatments were not affect on cell viability and inhibited b-hexosaminidase release, IL-4, TNF-a and nitric oxide.
- Conclusions** These results suggest that GHA and GE may be beneficial in the inhibition of allergic inflammatory response.

**key words** *Ganoderma lucidum herbal acupuncture(GHA), Ganoderma lucidum extract(GE), allergy, RBL-2H3, Raw264.7*

## 1. 서론

靈芝는 불로초, 만년버섯 등으로 불리우며 甘苦微溫하고 《神農本草經》, 《本草綱目》 등에 그 효능이 기록되어 있는데, 強壯, 鎮靜, 鎮咳, 消腫, 驅瘀血의 효능을 가지고 있으므로 虛勞, 神經衰弱, 咳嗽, 喘息, 不眠, 心臟病, 動脈硬化症, 高血壓, 각종 癰腫 등의 치료에 응용하였으며, 약리작용으로 중추신경억제작용, 근육이완, 수면시간 연장, 혈압강화작용, 진해거담작용, 중독성간염경감효과, 장관흥분작용 등이 보고 되었다<sup>1)</sup>.

약침요법은 한의학적 이론에 근거하여 본초의 약리작용과 경락과 경혈의 치료효과를 결합한 치료법<sup>2)</sup>으로 소량의 약물사용으로 치료효과가 뛰어나고 응용범위가 광범위하여 현재 임상에서 많이 사용되고 있으므로 靈芝藥鍼의 효능과 유용성에 대한 기초적인 근거마련이 필요하다고 판단된다.

알레르기 질환은 환경오염, 식생활의 변화와 유전적 영향 등의 복합적인 영향으로 현대에 연령을 불문하고 급증하고 있으며, 인체에 무해한 외부환경에 대해 민감한 반응을 보이며, 지속적인 호흡기계 또는 피부 증상 등으로 일

※ 본 연구는 2006년도 동의대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음.

※ 교신저자 : Kang Kyung-Hwa, College of Oriental Medicine, Dong-eui university, 100 Jilli 1(ii)lo, Busan jin-gu, Busan, 614-052, Korea.(Tel: 051-850-7423. E-mail: ghkang@deu.ac.kr)

상생활에서 불편함은 물론 정서적인 면에도 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>.

靈芝는 임상에서 만성기관지염과 기관지 천식 등의 호흡기질환에도 응용되고 있으므로 본 연구에서 靈芝藥鍼의 응용과 靈芝의 효능에 대한 근거를 마련하고자 알레르기 질환모델을 이용하여 靈芝藥鍼의 肺俞穴(B13) 처치에 대한 효과를 살펴보고, 靈芝추출액이 rat basophilic leukemia cell line(RBL-2H3)에서 b-hexosaminidase, interleukin(IL)-4와 tumor necrosis factor-alpha(TNF-a)의 매개인자의 생성과 유출에 미치는 영향과 mouse macrophage cell line(Raw264.7)에서 nitric oxide의 생성에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

## II. 실험방법

### 1. 시약 및 재료

#### 1) 靈芝 藥鍼液

본 실험에 사용된 靈芝는 우리나라 자연산 靈芝를 사용하였다. 300g을 증류수로 水洗하여 1ℓ 의 25% ethanol을 가하여 10시간 동안 실온에서 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200mℓ가 되도록 減壓濃縮하였다. 실온에서 냉각시킨 뒤 감압필터를 사용하여 불순물을 제거하고 고압멸균하여 -20℃에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 사용하였다.

〈Table 1〉 Ganoderma lucidum

韓藥名	生藥名	重量(g)
靈芝	Ganoderma lucidum	300 g

#### 2) 실험동물

실험에 사용한 동물은 ICR계 mouse(male, 30 g ± 2 g)와 Sprague Dawley계 rat(male, 200g ± 20g)을 (주)샘타코 바이오 코리아에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22℃ ± 2℃, 습도 55 ± 5%, dark/light(12시간) 조건 하에서 고형 pellet 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였으며, 구입 후 2주간 실험실 환경에 적응 후 실험에 사용하였다.

#### 3) 세포주

RBL-2H3과 Raw264.7 cell은 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 배양하였다.

#### 4) 藥鍼器

藥鍼器는 30gauge 3/10mℓ insulin syringe(Becton Dickinson, USA)를 사용하였다.

#### 5) 시약

본 실험에 사용된 compound 48/80, anti-deoxynucleoprotein(DNP) immunoglobulin E(IgE), DNP-HSA, Evans blue, KOH, acetone, phosphoric acid, acetic acid, PMA(phorbol-12-myristate-13 acetate), A23187(calcium ionophore) 및 LPS(Lipopolysaccharide)는 Sigma로부터, FBS(fetal bovine serum), penicillin, streptomycin, DMEM(Dulbecco's modification Eagle medium) 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, tetrazolium bromide salt(MTT) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Amresco로부터, Interleukin(IL)-4와 Tumor Necrosis Factor alpha(TNF-a) kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 검액의 처치

검액은 人體의 第3 胸椎棘突起下 兩傍 1寸 5分處에相應하는 양쪽 肺俞(B13) 부위와 임의의 부위인 둔부(OP)에 각각 처치하였다.

#### 2) 실험군의 구성

실험군은 대조군(CON), 10% 靈芝 藥鍼 處置群(GHA10), 20% 靈芝 藥鍼 處置群(GHA20)과 20% 靈芝 藥鍼 任意穴群(OP)으로 구분하였다. CON은 양쪽 B13에 각각 25μℓ의 생리식염수를, GHA10과 GHA20은 양쪽 B13에 각각 25μℓ의 10%와 20%의 靈芝 藥鍼을, OP는 둔부에 동량의 20% 靈芝 藥鍼을 격일로 3회 처치하였다.

#### 3) Active systemic anaphylactic shock

ICR mouse 10마리를 1군으로 하여 실험군 별로 약침 처치 부위를 제모한 후 격일로 3회의 약침을 처치하였다. 마지막 처치 1시간 경과 후 compound 48/80(8mg/kg,

Sigma)을 복강 내에 투여하고 mouse의 치사율을 60분 동안 관찰하였다.

#### 4) Passive cutaneous anaphylaxis

IgE 의존형 피부과민반응에 대한 영향을 알아보기 위하여 Katayama 등<sup>5)</sup>의 방법에 준하여 Sprague Dawley 계 rat 3마리를 1군으로 하고 실험군 별로 5일간 격일로 총3회의 藥鍼을 처치하였다. 실험 3일째 되는 날 rat의 등 부위를 제모하고 0.5mg의 anti-DNP IgE를 네 군데 피하 주사한 후 감각된 부위를 표시하였다. 48시간 경과 후 DNP-HSA 0.5mg과 4% evans blue를 1:1로 혼합하여 mouse의 미정맥에 주사하였다. 30분 후 mouse를 도살하고 청색으로 착색된 등 부위의 피부를 채취하여 1N KOH 용액 100 $\mu$ l에 침적시켜 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치하였다. Acetone과 phosphoric acid(5:13) 혼합액 900 $\mu$ l를 첨가하여 원심분리한 후 상층액을 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) 세포 배양

RBL-2H3과 Raw264.7cell은 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받았으며 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS(Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM(Gibco BRL, USA) 배양액에서 배양하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution(Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

#### 6) MTT assay

RBL-2H3과 Raw264.7 cell을 24well plate (Corning, USA)에 2 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/ml의 세포수가 되도록 DMEM 배양액에 분주하여 24시간동안 안정화시킨 후, GE를 농도별(0%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2% 및 5%)로 처리한 후 1시간동안 반응시켰다. 배양액을 제거 한 후 5mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 최대 4시간 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 200 $\mu$ l 씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 96well plate에 100 $\mu$ l 씩 옮긴 후 ELISA(Molecular Devices, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를

구하였다.

#### 7) $\beta$ -Hexosaminidase release

$\beta$ -Hexosaminidase의 release는 Dastych 등<sup>5)</sup>과 Schwartz 등<sup>6)</sup>의 방법에 의해 측정하였다. 간략히 요약하면 RBL-2H3을 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate에 각 well당 2 $\times$ 10<sup>5</sup>개의 세포가 들어갈도록 한 다음 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하룻밤 배양한다. 각 well의 세포들을 extracellular buffer(5mM KCl, 12.5 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM dextros, pH 7.4) 로 2번 세척한 다음 각 well 당 extracellular buffer와 GE(0%, 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%)를 처리한 후 1시간동안 반응시켰다. 이후 PMA(50nM)와 A23187(1mM)을 사용하여 세포를 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> incubator에 1시간 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 배양한 후 반응을 종결시켰다. Supernatant 20 $\mu$ l를 96well plate에 옮기고, pellet은 Triton X-100(0.1%) 1ml을 24well에 넣고 녹인 후 96 well에 20 $\mu$ l 넣는다. supernatant와 pellet이 담긴 96well에 substrate buffer(4-*p*-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 4.5) 100 $\mu$ l을 넣고 37 $^{\circ}$ C 에서 1시간 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution 200 $\mu$ l을 첨가하여 반응을 종결시켰다. ELISA를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료와 대조구의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 net percent release(%) 을 산출하였다.

net percent release(%)

$$= [S/(S+P) - S_{\text{control}}/(S_{\text{control}}+P_{\text{control}})] \times 100$$

S : supernatant, P : pellet

$S_{\text{control}}/(S_{\text{control}}+P_{\text{control}})$ (%) is spontaneous release of mediator without a stimulus

#### 8) IL-4 assay

RBL-2H3 cell을 6well plate에 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/well의 농도로 분주한 후 24시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 GE를 농도별(0%, 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%)로 세포에 처리하였다. 1 시간동안 배양한 후 A23187(1 $\mu$ M)을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고 8시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000rpm에서 2분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 IL-4 kit(BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. ELISA를

사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4의 양을 계산하였다.

#### 9) TNF- $\alpha$ assay

RBL-2H3 cell을 6 well plate에  $5 \times 10^5$  cell/well의 농도로 분주한 후 24시간동안 배양한 다음 새로운 DMEM배지에 GE를 농도별(0%, 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%)로 세포에 처리하였다. 1시간동안 배양한 후 자극제 A23187(1 $\mu$ M)를 처리하고 8시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5000rpm에서 2분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 TNF- $\alpha$  kit(BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. ELISA를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 TNF- $\alpha$ 의 양을 계산하였다.

#### 10) Nitric oxide assay

Raw264.7 cell을 24 well plate에  $2 \times 10^5$  cell/well로 분주한 후 24시간동안 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 GE를 농도별(0%, 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%)로 세포에 처리하였다. 2시간 동안 전처리한 후 LPS(0.5 $\mu$ g/ml)를 20시간 동안 처리하여 세포 밖으로 생성, 분비되는 nitric oxide의 양을 Griess 방법으로 측정하였다. nitric oxide 생성량을 측정하기 위한 시약인 Griess 시약은 용액 A(0.2% Naphthylethylene diamine dihydrochloride in DDW)와 용액 B(2% Sulfonylamide in 5% H3PO4)를 제조하여 냉암소에 보관하며, 사용직전에 두 용액을 1:1로 혼합하여 혼합용액을 사용하였다. 96 well plate에 세포 배양액 100 $\mu$ l와 Griess 혼합용액 100 $\mu$ l를 분주한 뒤 ELISA를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였고, 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 표준 검량곡선에 의해 nitric oxide의 양을 계산하였다.

#### 11) 統計 분석

成績은 SPSS 12.0K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치  $\pm$  표준오차로 나타내었고 유의수준은 P<0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Scheffe test 검정을 실시하였다.

### III. 결과

#### 1. Active Systemic Anaphylactic Shock에 미치는 영향

Compound 48/80에 의한 active systemic anaphylactic shock에서 CON은 100%의 치사율을 보인데 비해, GHA10과 GHA20은 각각 70%와 80%의 치사율을 보였으며, OP는 90%의 치사율을 보였다 (Table 2).

<Table 2> Effect of GHA on the compound 48/80 induced active systemic anaphylactic shock in mice.

Group	Dose( $\mu$ l)	Treatment	Acupoint	Lehal rate(100%)
Con		Saline	B13	100
GHA 10	50	GHA 10%	B14	70
GHA 20		GHA 20%	B14	80
OP		GHA 20%	Optional Point	90

Data represents the mean  $\pm$  S.E. of 10 mice.

CON: Group treated at both sides of B13s with saline 1 hour before compound 48/80 injection(8 mg/kg, i.p.)

GHA10 and GHA20: Group treated at both sides of B13s with 10% and 20% Ganoderma lucidum herbal acupuncture 1 hour before compound 48/80 injection

OP: Group treated at optional points with 20% Ganoderma lucidum herbal acupuncture 1 hour before compound 48/80 injection

#### 2. Passive Cutaneous Anaphylaxis에 미치는 영향

Anti-DNP IgE를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis에서 청색박반의 누출량은 CON은  $136.3 \pm 16.51 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다. 반면 GHA10은  $95.65 \pm 7.06 \mu\text{g/ml}$ , GHA20은  $108.83 \pm 8.01 \mu\text{g/ml}$ , OP는  $89.11 \pm 6.45 \mu\text{g/ml}$ 로 GHA10과 OP는 CON에 비해 유의성(p<0.05)있는 감소를 보인 반면 GHA20은 CON에 비해 감소하였으나 유의성은 없었다 (Figure 1).

#### 3. MTT assay

RBL-2H3과 Raw264.7 cell의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. RBL-2H3 cell의 경우 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 1.5의 흡광도를 나타내었으며, GE 0.25%, 0.5%, 1%, 2% 및 5%의 농도를 처리한 세포에서 각각  $1.49 \pm 0.04$ ,  $1.48 \pm 0.02$ ,  $1.51 \pm 0.02$ ,  $1.52 \pm 0.02$  및  $1.55 \pm 0.01$ 의 흡광도

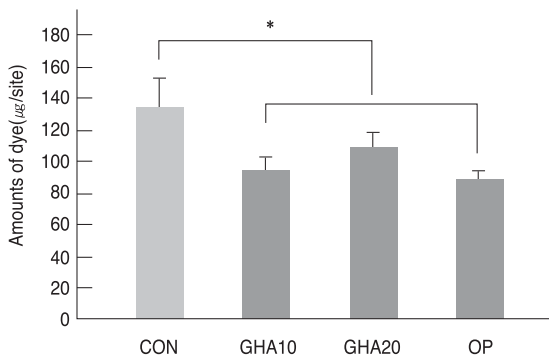


Fig.1 Effects of GHA on passive cutaneous anaphylaxis reaction in rats.

Rats were acupunctured at both sides of B13s or OP with saline or Ganoderma lucidum herbal acupuncture 3times for 5 days every other days. On day3, Rats were passively sensitized by i.d. injection of anti-DNP IgE(0.5mg), and challenged by DNP-HSA(0.5mg, i.v.) containing 4% Evans blue after 48hours. The areas of dye were measured after sacrificing the animals later 30minutes from antigen challenge. Each column represents the mean ± S.E. \* P<0.05; significant as compared to the CON

를 나타내어 5%를 제외한 모든 GE농도에서 정상세포에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다 그러나 5% GE를 처리한 세포에서 유의한(p<0.05) 증가를 나타내어 세포의 생존률을 증가시켰다 Raw264.7 cell의 경우 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.74의 흡광도를 나타내었으며, GE 0.25%, 0.5%, 1%, 2% 및 5%의 농도를 처리한 세포에서 각각 0.74, 0.76, 0.76±0.01, 0.74±0.01 및 0.63±0.01의 흡광도를 나타내어 0.5%와 5%를 제외한 모든 GE농도에서 유의한 영향을 보이지 않았다. 0.5% GE에서 유의한(p<0.05) 증가를 나타내어 생존률을 증가시켰으나, 5% GE에서 유의한(p<0.005) 감소를 나타내어 생존률을 감소시키는 것으로 나타났다 (Figure 2).

#### 4. β-Hexosaminidase release

RBL-2H3 cell에서 누출된 β-hexosaminidase의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 4.33 ± 0.56%이었으며, PMA 와 A23187로 자극한 세포에서 36.4±1.20%로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한(p<0.005) 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187로 자극한 후 GE를 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 처리한 세포에서 각각 28.28±0.30%, 26.37±1.47%, 18.75±0.55%,

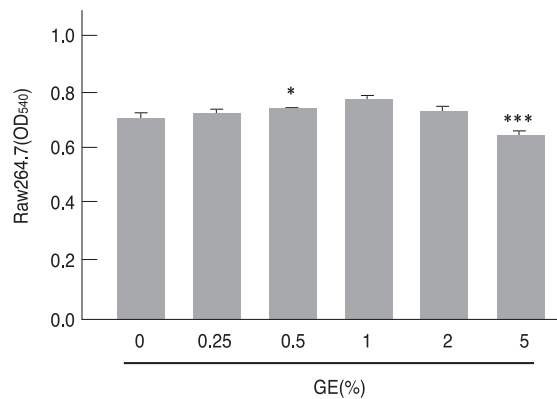
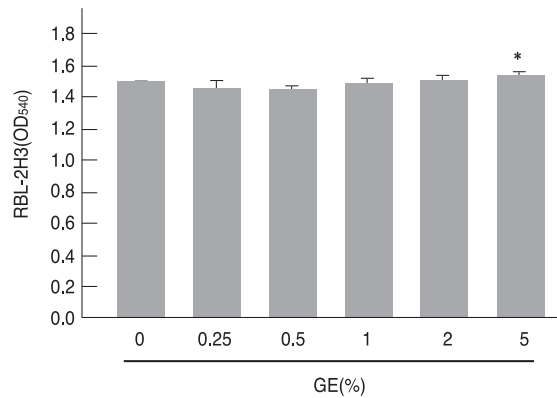


Fig. 2 Effects of GE on the cell viability of RBL-2H3 and Raw264.7 cell

Each column represents the mean±S.E. of 3 independent experiments.

The absorbance was measured at 540nm using ELISA reader.

15.41±0.98%로 모든 농도에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한(p<0.005) 감소를 보였다 (Figure 3).

#### 5. IL-4

RBL-2H3 cell에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 2.87±0.11 pg/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 1654.81±28.41pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한(p<0.005) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 GE를 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 처리한 세포에서 각각 1294.93 ± 75.8pg/ml, 1334.02±16.59pg/ml, 1117.05±57.44

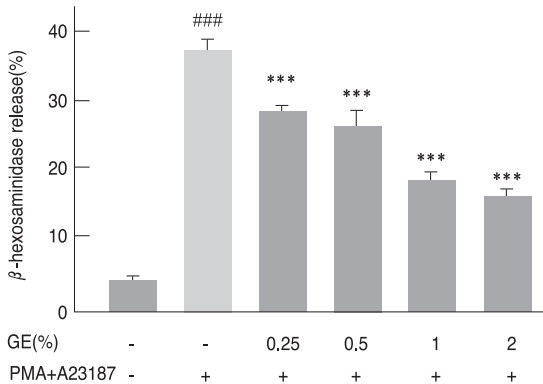


Fig. 3 Effects of GE on b-hexosaminidase release from RBL-2H3 cell.  
 Each column represents the mean ± S.E. of 3 independent experiments.  
 The absorbance was measured at 405 nm using ELISA reader.  
 Release (%) = S/(S+P) x 100  
 S : supernant, P : pellet

pg/ml, 1391.42±30.60pg/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한(p<0.005) 감소를 보였다 (Figure 4).

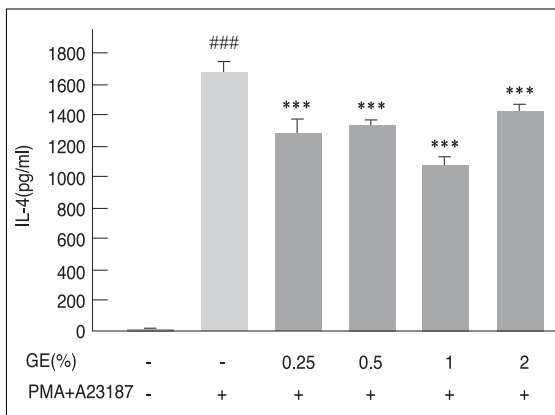


Fig. 4 Effects of GE on IL-4 release from RBL-2H3 cell.  
 Each column represents the mean ± S.E. of 3 independent experiments.  
 The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader.

### 6. TNF-α

RBL-2H3 cell에서 분비된 TNF-α의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 1.4±0.24pg/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 299.93±5.03pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한(p<0.005) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 GE를 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 처리한 세포에서 각각 280.98±6.39pg/ml(p<0.05), 268.39±3.74pg/ml(p<0.005), 225.59±4.94pg/ml(p<0.005), 235.81±4.20pg/ml(p<0.005)로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 감소를 보였다 (Figure 5).

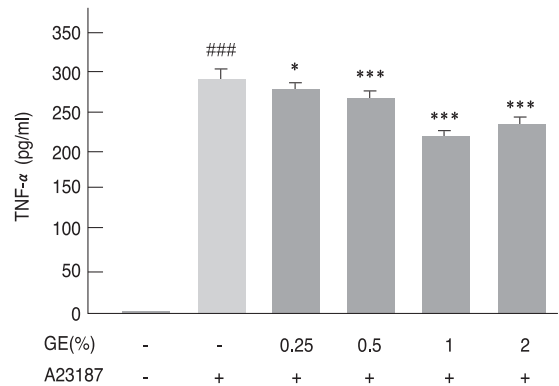


Fig. 5 Effects of GE on TNF-α release from RBL-2H3 cell.  
 Each column represents the mean ± S.E. of 3 independent experiments.  
 The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader.

### 7. Nitric oxide

Raw264.7 cell에서 분비된 nitric oxide의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 1.45±0.05μg/ml이었으며, LPS로 자극한 세포에서 4.03±0.05μg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한(p<0.005) 증가를 나타내었다. 반면 LPS로 자극한 후 GE를 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 처리한 세포에서 각각 3.64±0.04μg/ml, 3.38±0.07μg/ml, 3.25±0.05μg/ml, 2.92±0.07μg/ml로 모든 농도에서 LPS로 자극한 세포에 비해 유의한(p<0.005) 감소를 보였다 (Figure 6).

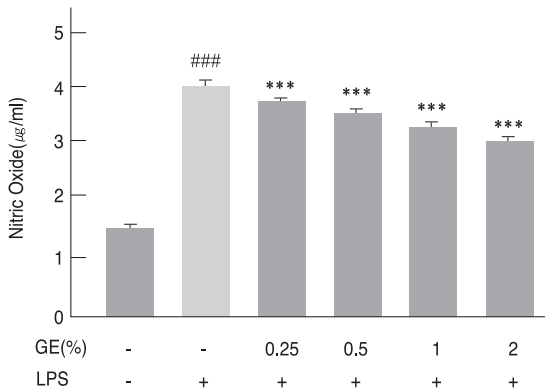


Fig. 6 Effects of GE on nitric oxide from Raw264.7 cell. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 independent experiments. The absorbance was measured at 540 nm using ELISA reader.

#### IV. 고찰 및 결론

靈芝에는 polysaccharide, triterpene, nucleoside, steroid, fatty acid, alkaloid, 단백질, 아미노산, 무기염류 등이 포함되어 있으며, 이들 성분 중에서 polysaccharide 등의 고분자 물질과 triterpene 등의 저분자물질이 다양하고 유망한 약리활성을 나타내서 많은 주목을 받고 있다. 저분자물질은 항염증, 항산화, 간세포보호, 항알레르기, 항고혈압, 콜레스테롤 저하, 혈소판 응집 저해 등의 활성이 있으며 고분자물질은 혈압강하, 정혈, 고지혈증 개선, 혈당강하, 면역, 항종양 등의 효과가 보고되었다<sup>7)</sup>. 특히 polysaccharide의 면역조절 작용에 대한 연구가 많이 이루어졌는데, polysaccharide는 ConA나 LPS로 자극한 lymphocytes에서 INF- $\gamma$ 와 IL-12의 생산을 증가시키고 IL-4의 생산에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다<sup>8)</sup>.

영지 polysaccharide추출물은 복강 대식세포를 이용한 실험에서 IL-1, TNF- $\alpha$ , nitric oxide 생산을 현저히 증가시켜, Th1 반응을 유도하는 효과가 있음을 보고하였다<sup>9, 10)</sup>. 그러나 알레르기 질환에 대한 연구보고는 활발하지 못한 실정이다<sup>12)</sup>.

본 연구의 목적은 알레르기 질환에 대한 靈芝의 효능과 藥鍼응용의 가능성을 검증하고자 알레르기 동물모델과 RBL-2H3과 Raw264.7 cell을 사용하여 靈芝추출액과 B13에 靈芝藥鍼의 처치가 알레르기 반응을 효과적으로 억제할 수 있는지 조사하였다.

Active systemic anaphylactic shock은 즉시형 전신

성 아나필락시스 반응으로 알레르기 반응 개시 수 분 이내에 발생하여 심하면 사망에 까지 이르는 것으로 알레르기 실험모델로 많이 사용되고 있다. Passive cutaneous anaphylaxis는 수동피부면역반응으로 특정 원인물질에 대한 알레르기 소인의 유무를 검사하는 방법으로 임상에서 많이 사용되고 있는 방법이다. 이미 생성된 IgE 항체를 피부에 주입하여 48시간동안 감각한 후 원인물질에 노출시켜 알레르기 증상의 발현 정도를 살펴보는 방법이다. 따라서 본 연구에서는 이 두 가지 동물모델을 사용하여 알레르기 반응에 대한 억제효과를 조사하였다.

Active systemic anaphylactic shock을 유도하기 위해 사용된 compound 48/80은 혼합 다당체 성분으로 세포내 Ca<sup>2+</sup>을 증가시키거나, 비만세포의 세포막 및 수용체에 작용하여 세포내로의 Ca<sup>2+</sup> 유입을 증가시켜 비만세포의 탈과립을 유도한다<sup>13)</sup>.

Compound 48/80에 의한 active systemic anaphylactic shock을 실시한 결과 CON은 100%의 치사율을 보인데 비해, GHA10과 GHA20은 각각 70%와 80%의 치사율을 보였으며, OP는 90%의 치사율을 보였다 (Table 2).

Anti-DNP IgE를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis에서 청색반의 누출량은 CON은 136.3 $\pm$ 16.51  $\mu$ g/ml로 나타났다. 반면 GHA10은 95.65 $\pm$ 7.06 $\mu$ g/ml, GHA20은 108.83 $\pm$ 8.01 $\mu$ g/ml, OP는 89.11 $\pm$ 6.45  $\mu$ g/ml로 GHA10과 OP는 CON에 비해 유의성(p<0.05)있는 감소를 보인 반면 GHA20은 CON에 비해 감소하였으나 유의성은 없었으며, GHA10과 OP에 비해서도 유의성있는 차이를 보이지 않았다(Figure 1).

이러한 결과는 B13에 대한 10% GHA의 처치가 알레르기 반응을 억제하는 효과가 다른 군에 비해 우수하다는 것을 나타낸다. 또한 OP가 CON에 비해 유의한 억제효과를 나타내는 것으로 볼 때 靈芝의 본초학적 약리효과에 기인한 결과로 판단된다. 한편 10% GHA의 처치가 20% GHA에 비해 효과가 높은 결과를 나타내었으나 두 군간에 유의성있는 차이는 없었다. 이는 낮은 농도의 靈芝藥鍼에서도 알레르기 반응의 억제효과를 기대할 수 있음을 나타내는 결과로 볼 수 있다. 이러한 결과는 靈芝藥鍼이 compound 48/80과 IgE 면역반응에 의한 비만세포의 탈과립을 억제하고 혈관 투과성을 억제한 결과라고 생각된다.

알레르기 반응의 유발에서 가장 핵심적인 역할을 하는 세포는 호염기구와 비만세포이며 IgE항체가 세포막 표면에는 Fc $\epsilon$ RI이 수용체와 교차결합하고 비만세포의 활성화

가 시작되면 세포질 내 과립의 팽창과 탈과립이 발생한다. 이 외에 호염기구와 비만세포를 활성화시키는 기전이 존재하는데 외부자극과 약물 등에 의한  $Ca^{2+}$ 의 세포내 유입에 의해 탈과립이 발생한다. 본 연구에서 in vitro 실험에 사용된 PMA 및 A23187는 비만세포를 자극하여 세포내  $Ca^{2+}$  유입과 증가를 유도하는데 증가된  $Ca^{2+}$ 은 비만세포를 활성화시키는 필수적인 매개인자로 여겨지고 있다<sup>14)</sup>.

비만세포의 탈과립에 의해 유출되거나 세포막지질에서 새로 합성되는 대표적인 물질은 histamine, leukotriene, IL-3, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  등으로 IgE 항체생산, 기관지 평활근의 수축, 점막 표면에 대한 선세포의 분비 항진 작용 등을 나타내어 즉시형 알레르기 및 염증반응을 일으켜 알레르기 초기 반응을 유도한다<sup>15)</sup>. RBL-2H3 cell은 mucosal type mast cell과 유사한 특징들을 나타내고, 세포표면에 수십만 개의 IgE수용체가 존재한다. IgE에 감작된 후에 이 세포는 항원에 반응하고 histamine을 방출하는데  $\beta$ -hexosaminidase는 비만세포의 분비과립에 저장되어 있다가, 비만세포가 면역학적으로 활성화될 때 histamine과 함께 부수적으로 분비되므로  $\beta$ -hexosaminidase의 활성화는 비만세포 탈과립의 표지인자로서 사용된다<sup>16, 17)</sup>. 따라서 RBL-2H3 cell은 histamine과  $\beta$ -hexosaminidase 분비에 알려지지 않은 약물의 효과를 연구하는데 좋은 실험모델로 알려져 있다.

본 실험에서 靈芝추출물이 RBL-2H3과 Raw264.7 cell의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과, RBL-2H3 cell의 경우 5%( $p < 0.05$ )를 제외한 모든 GE농도에서 정상세포에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다. Raw264.7 cell의 경우 0.5%와 5%를 제외한 모든 GE농도에서 유의한 영향을 보이지 않았다. 0.5% GE에서 유의한( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내어 생존률을 증가시켰으나, 5% GE에서 유의한( $p < 0.005$ ) 감소를 나타내어 생존률을 감소시키는 것으로 나타났다(Figure 2). 따라서 본 실험에 사용한 GE의 농도는 생존률 감소에 영향을 미치는 범위를 제외한 2%이내의 농도에서 실시하였다.

RBL-2H3 cell에서 분비된  $\beta$ -hexosaminidase의 양은 PMA와 A23187로 자극한 세포에서 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한( $p < 0.005$ ) 증가를 나타내었으며, PMA와 A23187로 자극한 후 GE를 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 처리한 세포에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한( $p < 0.005$ ) 감소를 보였다(Figure 3).

비만세포 및 알레르기 면역반응과 관련된 세포에서 분

비되는 cytokine의 조절을 통해 알레르기 반응을 억제할 수 있다. IL-4는 즉시형 과민반응의 매개자인 IgE와 비만세포 매개성 면역반응의 조절자로 IL-4의 생산 증가는 알레르기의 발생에 중추적인 것으로 알려져 있다. 또한 IL-4는 내피세포상에 있는 혈관세포부착분자(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 등과 같은 일부 부착분자의 발현을 자극하여 lymphocyte, 단핵구, 그리고 호산구의 결합을 증가시켜 염증반응을 유발한다<sup>18)</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 면역반응의 초기에 분비되는 pro-inflammatory cytokine으로 천식이나 류마티스관절염 등 여러 가지 질환에서의 염증반응 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>19)</sup>. 비만세포에서 유리된 TNF- $\alpha$ 는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 ELAM-1의 발현 및 백혈구의 혈관의 유주를 유도하는 것으로서 특히 알레르기 국소의 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다<sup>20)</sup>. 비만세포에서 nitric oxide의 생성과 역할에 대해서는 이견이 있으나<sup>21, 22)</sup> 알레르기 염증반응에서 대식세포의 활성화와 염증반응의 매개인자로서의 nitric oxide에 대한 영향을 살펴보았다.

RBL-2H3 cell에서 분비된 IL-4의 양은 A23187로 자극한 세포에서 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한( $p < 0.005$ ) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 GE를 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 처리한 세포의 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한( $p < 0.005$ ) 감소를 보였다(Figure 4).

RBL-2H3 cell에서 분비된 TNF- $\alpha$ 의 양은 A23187로 자극한 세포에서 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한( $p < 0.005$ ) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 GE를 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 처리한 세포의 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 감소를 보였다(Figure 5).

Raw264.7 cell에서 분비된 nitric oxide의 양은 LPS로 자극한 세포에서 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한( $p < 0.005$ ) 증가를 나타내었다. 반면 LPS로 자극한 후 GE를 0.25%, 0.5%, 1% 및 2%의 농도로 처리한 세포의 모든 농도에서 LPS로 자극한 세포에 비해 유의한( $p < 0.005$ ) 감소를 보였다(Figure 6).

이러한 결과는 靈芝추출물이 PMA 및 A23187로 자극한 RBL-2H3 cell에서 IL-4와 TNF- $\alpha$ 의 발현을 억제하였고, LPS로 자극한 Raw264.7 cell에서 nitric oxide의 발현을 억제하여 靈芝추출물이 염증을 억제하는 기전을 가지고 있음을 알 수 있다.



따라서 이번 연구결과를 요약하면 靈芝藥鍼의 B13처치와 RBL-2H3과 Raw264.7 cell에 靈芝추출물의 전처치가 알레르기반응을 억제하며, 알레르기 질환치료에 응용 가능 할 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. 김창민 외. 중약대사전. 서울. 정담. 1999:3009-3012
2. 大韓藥鍼學會. 약침요법 시술 지침서. 서울. 한성인쇄. 1999:13.
3. 丁奎萬. 알레르기와 韓方. 서울. 圖書出版 第一路. 1993:59.
4. 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.
5. Dastyeh J, Walczak-Drzewiecka A, Wyczolkowska J, Metcalfe DD. Murine mast cells exposed to mercuric chloride release granule-associated N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and secrete IL-4 and TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1108-1114.
6. Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol* 1979;123:1445-1450
7. Shiao, M.S., K.R Lee, J.J. Lin, and C.T. Wang, 1994. Phytochemicals for Cancer Prevention II, p.342. In C.T. Ho(eds), *Teas, Spices and Herbs*. American Chemical Society, Washington.
8. Kohguchi M, Kunikata T, Watanabe H, Kudo N, Shibuya T, Ishihara T, et al. Immunopotentiating effects of the antlershaped fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Rokkaku-Reishi). *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68:881-887.
9. Jiang ZY, Lin C. Study of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on effects of cellular immune function in mice. *J Microbiol.* 2003;23:51-54.
10. Zhang QH, Lin ZB. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides B on TNF $\alpha$  and INF $\gamma$  production and their mRNA expression. *J Beijing Med Univ.* 1999;31:179-183.
11. Tang QJ, Zhang JS, Pan YJ, Werner R, Fan H. Activation of mouse macrophages by the alkali-extracted polysaccharide from spore of *Ganoderma lucidum*. *Chin J Cell Mol Immunol.* 2004;20:142-144.
12. Liu YH, Tsai CF, Kao MC, Lai YL, Tsai JJ. Effectiveness of Dp2 nasal therapy for Dp2-induced airway inflammation in mice: using oral *Ganoderma lucidum* as an immunomodulator. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003;36(4):236-242.
13. Dainaka J, Ichikawa A, Koibuchi Y, Nakagawa M, Tomita K. Effect of the tridecamer of compound 48/80, a Ca $^{2+}$ -dependent histamine releaser, on phospholipid metabolism during the early stage of histamine release from rat mast cells. *Biochem Pharmacol* 1986;35(21):3739-3744.
14. White, D.H., K. Pluzmik and T. Ishizaka. Antigen-induced increase in protein kinase C activity in plasma membrane of mast cells. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1986;82:8139-8197.
15. 김형민. 면역과 알레르기. 서울, 신일상사. 1998:159-173.
16. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. *J Immunol.* 1983;131(2):934-939.
17. Mastuda H, Morikawa T, Ueda K, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-Induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production from RBL-2H3 cells. *Bioorg Med Chem.* 2002;10(10):3123-3128.
18. Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Miyamasu M, Yamada H, Nakajima T, Fujisawa T, Ra C,

- Morita Y, Yamamoto K. Regulation of surface FcεRI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;124(4):470-477.
19. Stankiewicz W, Dabrowski MP, Chcialowski A, Plusa T. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Mediators Inflamm* 2002;11(5):307-312.
20. 이중달. 그림으로 설명한 병리학. 서울, 고려의학. 1991:29.
21. Gilchrist, M., Savoie, M., Nohara, O., Wills, F. L., Wallace, J. L., and Befus, A. D. *J. Leukocyte Biol*. 2002;71:618-624.
22. Careau E, Sirois J, Bissonnette EY. Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(5):579-586.
-