

# 防風葛根湯의 항알레르기효과에 관한 연구

이주은 · 박성하<sup>1</sup> · 강경화 · 이용태\*

동의대학교 한의과대학 생리학교실 · 한의학연구소, 1: 동강한방병원

## Study on Anti-allergic Effect and Safety of Bangpung-galgeun-tang

Joo Eun Lee, Seong Ha Park<sup>1</sup>, Kyung Hwa Kang, Yong Tae Lee\*

*Department of Physiology · Research Institute of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University,  
1: Donggang Oriental Hospital*

The purpose of this study was to examine the anti allergic effect in vivo and in vitro, and to observe single and four weeks repeated toxicity in mice of Bangpung-galgeun-tang (BGT). We investigated anti DNP IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis in rodents and compound 48/80-induced active systemic anaphylatic shock in mice after oral administration with BGT of 0.4 g/kg and 0.8 g/kg for 8 days, and also examined MTT assay,  $\beta$ -hexosaminidase activity, IL-4 and TNF- $\alpha$  from RBL-2H3 and TNF- $\alpha$  from Raw264.7 after pre-treatment with BGT of 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml and 2 mg/ml. To ascertain safety and toxicity of BGT, we divided into single and four weeks repeated administration test. In single test, three groups were administrated different dosages and routes (2 g/kg/i.p., 4 g/kg/i.p. and 15 g/kg /p.o.) of BGT, and in four weeks repeated test, 0.8 g/kg BGT was administrated. Control groups were administrated with only saline according to on Korean Food and Drug Administration, respectively. We observed attentively mortality, abnormal clinical sign, body weight change, organ weight, AST and ALT of mice after BGT administration. BGT inhibited passive cutaneous anaphylaxis and active systemic anaphylatic shock by oral administration. All the concentrations of BGT from 0.25 to 2 mg/ml didn't have an effect on cell viability and cytotoxicity. In RBL-2H3,  $\beta$ -hexosaminidase release, IL-4 and TNF- $\alpha$ , and in Raw264.7, TNF- $\alpha$  were significantly reduced by treated all concentrations of BGT. During toxicity experiment period, there was no difference in body weight change, organ weight, AST and ALT among different dose groups. Death were found 3 mice from day 2 to day 3 in single test i.p. group. (2 g/kg, 4 g/kg). Several individuals of single test i.p. group were observed that decreased locomotor activity, exophthalmos, bloodshot eyes, loss of eyesight and so on in early period after administration. But there was no difference in clinical signs among p.o. group. These results indicate that BGT have inhibition effects on allergy and suggest that no observable effect level of the test orally administration was considered to be more than 2 g/kg in mice under the conditions employed in this study.

**Key words :** Bangpung-galgeun-tang(防風葛根湯), allergy, IL-4, TNF- $\alpha$ , RBL-2H3

### 서 론

알레르기(allergy)는 1906년 오스트리아의 C. von Pirquet 가 처음 명명하였는데 외부 자극의 반복적인 노출에 대한 변화된 반응을 나타내는 동물이나 사람의 능력을 의미하며, 이를 '변화된 상태' 혹은 '이상반응'이라는 광범위한 의미로 받아 들

여져 왔다. 1923년 미국의 Cooke와 Coca 등은 천식과 같이 유전적 소인과 연관된 과민성 질환을 다른 과민성 질환과 구분하기 위하여 이들 질환에 이환되는 유전적 경향을 '아토피(atopy)'라고 명명하였으며, 이후 알레르기의 정의는 1964년 P.G. Gell and R.R. Coombes에 의해 '자극적이거나 해로운 작용을 일으키는 면역 반응'이라는 범위로 확대되었고, 임상적으로나 학술적으로는 알레르기는 용어가 가장 대표적이면서도 포괄적인 범위를 대변하고 있다<sup>1)</sup>. 한의학에서 알레르기란 용어는 없으나 알레르기 질환에 해당하는 한의학적인 병명은 기관지 천식은

\* 교신저자 : 이용태, 부산시 진구 진리1로 10 동의대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2007/08/08 · 채택 : 2007/08/31

哮喘, 咳嗽, 알레르기성 비염은 噴涕, 鼻塞, 鼻鼾, 각종 피부질환 (아토피성 피부염, 두드러기, 접촉성 피부염)은 內癬, 蕁麻疹, 癩疹, 癬, 경구 흡입물에 의한 알레르기(식품, 약물)는 癩疹, 食傷으로 접근이 가능하다. 유전적 소인에 대해서는 한의학에서는 胎氣不足이나 胎熱로 이해가 가능하고 체질적인 접근이 중요시되고 있다. 따라서 치료에 있어서도 개체의 특성을 중시한 치료법이 중요시되고 있다. 이와 함께 중요시되는 치료법은 扶正祛邪法이다. 서양의학적 약물치료는 빠른 시간 내에 증상을 완화시킬 수 있는 강점이 있으나 알려진 부작용이 많아 치료에 한계를 드러내고 있다. 따라서 강력한 효과를 보임에도 불구하고 많은 부작용을 나타내는 제제들에 대해 한의학적 치료의 대체효과를 기대할 수 있다.

防風葛根湯은 明의 의화학자 孫一奎의 저서인 《赤水玄珠》에 수록된 처방으로서 《閩氏小兒方論》의 升麻葛根湯에 防風을 加하여 이루어진 것으로 痘後餘毒發癩疹과 麻疹發熱 등의 치료에 응용하여 온 것으로 나타나 있다. 구성약물은 升麻, 葛根, 防風, 赤芍藥 및 甘草으로 升麻 防風은 解毒透疹하고 葛根은 輕揚發散 解肌除熱하며, 赤芍藥은 和營泄熱하고, 甘草는 和中解毒하는 효능을 가지고 있으므로<sup>2)</sup> 防風葛根湯은 解肌透疹, 汗出透疹과 解毒의 효능으로 알레르기 질환에 효과적일 것으로 판단된다.

이에 저자는 防風葛根湯이 알레르기 반응에 미치는 영향에 관한 연구를 실시하였다. 항알레르기 효과를 살펴보기 위하여 동물 실험모델로서 passive cutaneous anaphylaxis와 active systemic anaphylactic shock을 이용하였으며, RBL-2H3과 Raw264.7에 미치는 영향을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 약재는 다음과 같이 구입 정선하여 사용하였다(Table 1). 防風葛根湯(Bangpung-galgeun-tang, 이하 BGT)의 처방 구성은 《赤水玄珠》를 따랐으며, 각 處方の 1 貼 內容과 分量은 아래와 같다(Table 2).

Table 1. The producing district/origin and dealership of herbs

한약명	생산지/원산지	판매원
葛根	경북 김천	옥천당
防風	경북 영천	옥천당
升麻	중국	옥천당
赤芍藥	중국	옥천당
甘草	중국	장생제약

Table 2. The prescription of BGT

한약명	학명	중량(g)
葛根	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	8 g
防風	<i>Cimicifuga davurica</i> MAX.	4 g
升麻	<i>Ledebourielia seseloides</i>	4 g
赤芍藥	<i>Paeonia albiflora pallas</i> var. <i>typica</i> Huth.	4 g
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	4 g
총량		24 g

### 2) 동물

알레르기 반응에 사용한 동물은 Passive cutaneous anaphylaxis에 SD (Sprague Dawley)계 rat (male, 200 g±20 g)과 Active systemic anaphylactic shock에 ICR계 mouse (male, 30 g±2 g)를 구입해서 사용하였다.

실험동물은 (주) 샘타코 바이오 코리아에서 구입해서 사용하였으며, 사육은 온도 22℃±2℃, 습도 55±5%, dark/light (12 시간) 조건 하에서 고품질 pellet 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였으며, 구입 후 2 주간 실험실 환경에 적응시켰다. 적응 기간 중 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 선정하여 체중범위에 따른 무작위법에 의해 균 분리를 실시한 후 본 실험에 사용하였다.

### 3) 세포

RBL-2H3와 Raw264.7 세포는 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아서 배양하였다.

### 4) 經口注入器

Rat 및 mouse용 철제 經口注入器 (Harvard apparatus, USA)를 70% ethanol에 12시간 침적하여 멸균 후 사용하였다.

### 5) 시약

본 실험에 사용된 anti-DNP (dinitrophenyl) IgE (immunoglobulin), DNP-HSA (human serum albumin), Evans blue, KOH, acetone, phosphoric acid, compound 48/80, PMA (phorbol 12-myristate) 및 A23187 (Calcium Ionophore)은 Sigma로부터, FBS (fetal bovine serum), penicillin, streptomycin, DMEM (Dulbecco's modification Eagle medium) 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, MTT (tetrazolium bromide salt) 및 DMSO (dimethylsulfoxide)는 Amresco로부터, IL (interleukin)-4 kit와 TNF-α kit는 BD (Biosciences Pharmingen)에서, AST (aspartate aminotransferase)와 ALT(alanine aminotransferase) kit는 Biotechnology For Human에서 구입하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제 및 투여

#### (1) 검액의 조제

BGT 10 첩 분량 240 g을 round flask에 넣고 蒸溜水 1,800 ml를 가하여 3 시간 동안 가열추출하여 抽出液을 여과한 다음 동결건조하여 42.3 g의 추출물을 얻어 -20℃에서 냉동보관하였다. 실험하기 직전 생리식염수 또는 PBS (phosphate-buffered saline)에 녹여 사용하였다.

#### (2) 검액의 투여

BGT 및 생리식염수의 投與는 經口注入器를 이용하여 8 일 동안 1 일 1 회 투여하였다. BGT의 투여량은 50 kg 성인의 하루 복용량을 기준으로 10 배와 20 배의 농도에 해당하는 0.4 g/kg과 0.8 g/kg를 2 ml (rat) 또는 0.5 ml (mouse)의 생리식염수에 녹여 경구투여하였으며, 대조군은 동량의 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하였다.

### 2) 알레르기 반응 시험

#### (1) Passive cutaneous anaphylaxis

IgE 의존형 피부과민반응에 대한 영향을 알아보기 위하여

Katayama 등<sup>3)</sup>의 방법에 준하여 SD계 rat 3 마리를 1 군으로 하고 실험군 별로 8 일간 BGT을 0.4 g/kg과 0.8 g/kg 농도로 경구 투여하였다. 대조군은 생리식염수를 동량으로 경구투여하였다. 처치 6 일째 되는 날 rat의 등 부위를 제모하고 0.5  $\mu$ g의 anti-DNP IgE를 네 군데 피내주사 (i.d.)한 후 감각된 부위를 표시하였다. 48 시간 경과 후 DNP-HSA 0.5 mg과 4% Evans blue를 1:1로 혼합하여 mouse의 미정맥에 주사 (i.v.)하였다. 30 분 후 mouse를 도살하고 청색으로 착색된 등 부위의 피부를 채취하여 1 N KOH용액 1 ml에 침적시켜 37°C에서 24 hour 방치하였다. Acetone과 phosphoric acid (5:13) 혼합액 9 ml를 첨가하여 원심 분리한 후 상층액을 620 nm에서 흡광도를 측정하였고 미리 측정 한 검량선에 따라 계산하여 Evans blue의 양을 비색 정량하였다.

#### (2) Active systemic anaphylactic shock

ICR mouse 10 마리를 1 군으로 하여 BGT을 0.4 g/kg과 0.8 g/kg 농도로 8 일간 경구투여하고 대조군은 동량의 saline을 처치한 후 compound 48/80 (8 g/kg)을 복강 내에 투여하고 mouse의 치사율을 40 분 동안 관찰하였다.

#### (3) Cell culture

Rat basophilic leukemia cell line인 RBL-2H3 cell과 mouse macrophage cell line인 Raw264.7 cell은 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양받았으며, 세포의 배양을 위하여 RBL-2H3는 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM (Gibco BRL, USA) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였으며, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다. Raw264.7 cell은 10% heat-inactivated FBS를 포함한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다.

#### (4) MTT assay

RBL-2H3 세포를 24 well plate에  $2 \times 10^5$  cell/well의 농도가 되도록 DMEM 배양액에 분주하여 24 시간 동안 안정화시킨 후, BGT를 농도별 (0, 0.25, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 처리한 후 1 시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 5 mg/ml MTT (Amresco, USA)를 200  $\mu$ l씩 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 최대 4 시간 37°C incubator에서 배양한 후 MTT를 제거하고 DMSO (Amresco, USA)를 200  $\mu$ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들여 모두 녹인 후 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 옮긴 후 ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (5) $\beta$ -hexosaminidase activity

$\beta$ -hexosaminidase의 activity는 Dastych 등<sup>4)</sup>과 Schwartz 등<sup>5)</sup>의 방법에 의해 측정하였다. RBL-2H3을 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate에  $3 \times 10^5$  cell/well의 농도로 분주한 다음 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 extracellular buffer (5 mM 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 2 번 세척한 다음 각 well 당

extracellular buffer와 BGT (0, 0.25, 0.5, 1 및 2 mg/ml)를 처리한 후 1 시간동안 반응시켰다. 이후 PMA (50 nM)와 A23187 (1  $\mu$ M)을 사용하여 세포를 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에 1 시간동안 반응시키고 ice bath에서 10 분간 incubation 시켜 반응을 종결시켰다. 상층액 20  $\mu$ l를 96 well plate에 옮기고, pellet은 triton X-100 (0.1%) 1 ml를 24 well에 넣고 녹인 후 96 well plate에 20  $\mu$ l 넣는다. 상층액과 pellet이 담긴 96 well plate에 substrate buffer (4-p-Nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 4.5) 100  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 1 시간동안 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution 200  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종결시키고 ELISA를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료와 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 net percent release (%)을 산출하였다.

$$\text{net percent release}(\%)$$

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

S : supernatant, P : pellet, Scontrol/(Scontrol+Pcontrol)(%)

is spontaneous release of mediator without a stimulus

#### (6) IL-4 assay

RBL-2H3 cell을 6 well plate에  $5 \times 10^5$  cell/well의 농도로 분주한 후 24 시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 BGT을 농도별 (0, 0.25, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 희석하여 세포에 처리하였다. 1 시간동안 배양한 후 A23187 (1  $\mu$ M)을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고 8 시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 2 분간 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다. IL-4 kit (BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 ELISA법으로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4의 양을 계산하였다.

#### (7) TNF- $\alpha$ assay

RBL-2H3과 Raw264.7 cell을 6 well plate에  $5 \times 10^5$  cell/well의 농도로 분주한 후 24 시간동안 배양한 다음 새로운 DMEM배지에 BGT을 농도별 (0, 0.1 0.25 및 0.5 mg/ml 또는 0, 0.25, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 희석하여 세포에 처리하였다. 1~2 시간동안 배양한 후 자극제 A23187 (1  $\mu$ M) 또는 LPS (0.5  $\mu$ g/ml)를 각각 처리하고 8 시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5000 rpm에서 2 분간 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다. TNF- $\alpha$  kit (BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 ELISA법로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 TNF- $\alpha$ 의 양을 계산하였다.

#### (8) Nitric oxide assay

RAW264.7 cell을 24 well plate에  $2 \times 10^5$  cell/well로 분주한 후 24 시간동안 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 BGT을 농도별 (0, 0.25, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 희석하여 세포에 처리하였다. 2 시간 동안 전처리한 후 LPS (0.5  $\mu$ g/ml)를 20 시간 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% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 제조하여 냉암소에 보관하며, 사용직전에 두 용액을

1:1로 혼합하여 혼합용액을 사용하였다. 96 well plate에 세포배양액 100  $\mu$ l와 Griess 혼합용액 100  $\mu$ l를 분주한 뒤 ELISA (VERSA max, U.S.A.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 미리 작성한 NaNO<sub>2</sub>의 표준 검량곡선에 의해 nitric oxide의 양을 산정하였다.

4) 통계 분석

성적은 SPSS 12.0 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치±표준오차로 나타내었고 유의수준은 P<0.05로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Scheffe test 검정을 실시하였다.

결 과

1. 알레르기 반응 시험

1) Passive cutaneous anaphylaxis 반응에 미치는 영향

Anti-DNP IgE를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis 반응에서 정색반의 누출량은 saline 투여군은 103.0±6.55  $\mu$ g/g로 나타났다. 반면 BGT 0.4 g/kg 투여군은 101.8±7.78  $\mu$ g/g, 0.8 g/kg 투여군은 76.8± 3.68  $\mu$ g/g으로 saline 투여군에 비해 감소를 보였고, 특히 BGT 0.8 g/kg 투여군에서 saline 투여군에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 1).

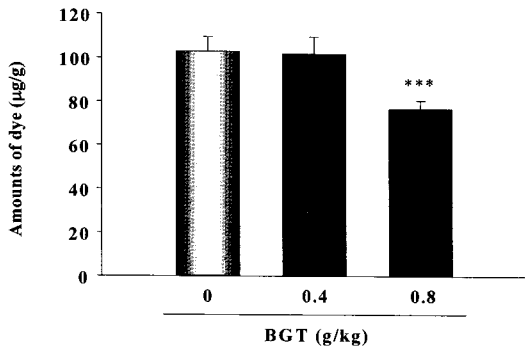


Fig. 1. Effect of BGT on passive cutaneous anaphylaxis. Rats orally administrated with 0 g/kg, 0.4 g/kg and 0.8 g/kg of BGT once a day for 8 days before the challenge with antigen. Each column represents mean±S.E. from 3 rats. \*\*\* p<0.005; significant as compared to saline group by Scheffe's multiple comparison.

2) Active systemic anaphylactic shock에 미치는 효과

Saline 투여군은 compound 48/80 주사 후 30 분 경과 후에 100%의 치사율을 보인 반면, BGT 0.4 g/kg 투여군은 compound 48/80 주사 후 30 분 경과 후에 90%의 치사율을 보였다. 0.8 g/kg 투여군은 30 분 경과 후 70%의 치사율을 보였으며, 40 분 경과 후에 80%의 치사율을 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of BGT on active systemic anaphylactic shock

Group	Treatment (dose/day)	Mortality(%)	
		30 min later	40 min later
Saline	-	100	100
BTG (g/kg)	0.4	90	90
	0.8	70	80

Mice were orally administrated for 8 days with saline or 0.5 g/kg, 1 g/kg, and 2 g/kg of BGT once a day prior to compound 48/80 (8 g/kg) injection. Each column represents mean±S.E. from 10 mice.

3) MTT assay

RBL-2H3 세포의 독성 및 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위한 MTT assay에서 아무런 처리를 하지 않은 세포의 흡광도는 1.40±0.04이었으며, BGT 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 및 2 mg/ml의 농도를 처리한 세포에서 각각 1.92±0.09, 1.93±0.02, 1.88±0.06, 2.06±0.04의 흡광도를 나타내어 BGT의 모든 농도 (P<0.005)에서 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 2).

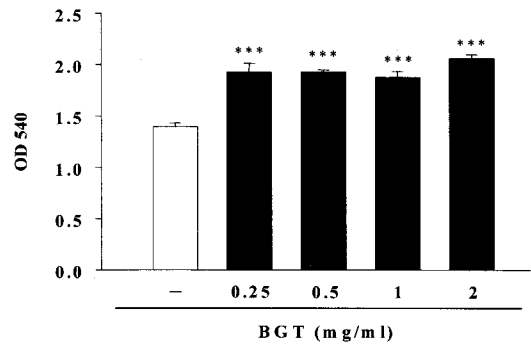


Fig. 2. Effect of BGT on cell viability and cytotoxicity of RBL-2H3 cell. Each column represents mean±S.E. of 3 independent samples. The absorbance was measured at 540 nm using ELISA. \*\*\* P<0.005; significant as compared to untreated sample by Scheffe's multiple comparison

4)  $\beta$ -hexosaminidase release

RBL-2H3 세포로부터의  $\beta$ -hexosaminidase의 누출량은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 6.64±0.57%이었으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서 60.87±1.38% (p<0.005)로 현저한 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187로 자극하기 1 시간 전 BGT를 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 및 2 mg/ml의 농도를 처리한 세포에서 각각 22.41±1.81%, 18.58±1.12%, 15.80±1.26%, 14.23±0.65%로 억제하였으며, PMA와 A23187로만 자극한 세포에 비하여 모든 BGT 농도에서 유의성(p<0.005) 있는 감소를 보였다(Fig. 3).

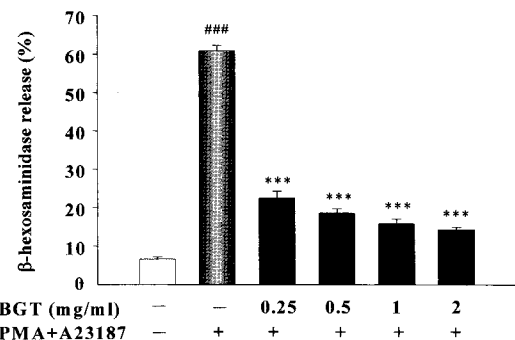
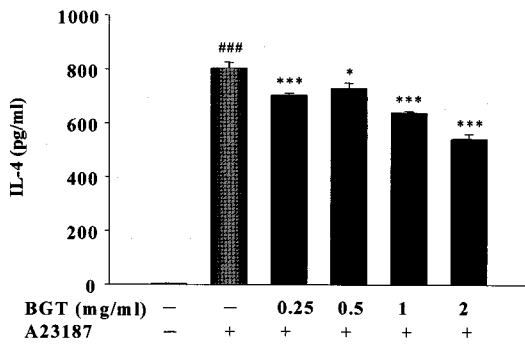


Fig. 3. Effect of BGT on  $\beta$ -hexosaminidase release from RBL-2H3 cell. Each column represents mean±S.E. of 3 independent samples. The absorbance was measured at 405 nm using ELISA. Release (%) = S/(S+P) × 100, S: supernatant, P: pellet. ### p<0.005; significant as compared to unstimulated sample by Scheffe's multiple comparison. \*\*\* p<0.005; significant as compared to PMA+A23187-stimulated sample by Scheffe's multiple comparison.

5) IL-4의 분비에 미치는 영향

RBL-2H3 세포로부터의 IL-4의 분비량은 아무런 처리를 하

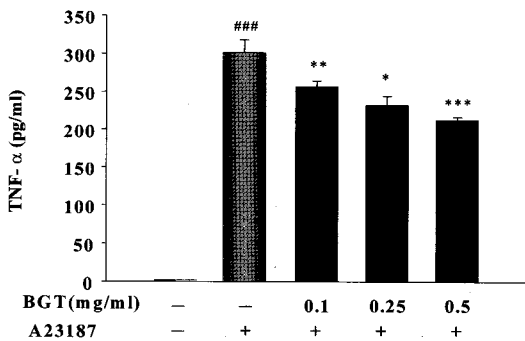
지 않은 세포에서  $3.27 \pm 1.30$  pg/ml, A23187로 자극한 세포에서  $804.14 \pm 21.62$  pg/ml, A23187 자극하기 1 시간 전 BGT 0.25 mg/ml 처리한 세포에서  $704.70 \pm 6.64$  pg/ml, 0.5 mg/ml 처리한 세포에서  $729.70 \pm 19.59$  pg/ml, 1 mg/ml 처리한 세포에서  $639.02 \pm 5.37$  pg/ml, 2 mg/ml 처리한 세포에서  $542.07 \pm 18.04$  pg/ml로 나타났다. A23187로만 자극한 세포에 비하여 모든 BGT 농도에서 유의성( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ ) 있는 감소를 보였다(Fig. 4).



**Fig. 4. Effect of BGT on IL-4 secretion from RBL-2H3 cell.** Each column represents mean±S.E. of 3 independent samples. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA. ###  $p < 0.005$ ; significant as compared to unstimulated sample by Scheffe's multiple comparison. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ; significant as compared to A23187-stimulated sample by Scheffe's multiple comparison.

6) TNF- $\alpha$ 의 분비에 미치는 영향

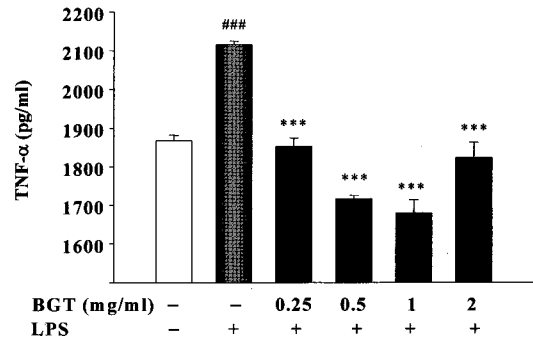
RBL-2H3로부터의 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 아무런 처리를 하지 않은 군에서는 측정이 불가능하였다. A23187로 자극한 세포에서  $301.05 \pm 16.69$  pg/ml, A23187 자극하기 1 시간 전 BGT 0.1 mg/ml 처리한 세포에서  $256.32 \pm 7.69$  pg/ml, 0.25 mg/ml 처리한 세포에서  $232.59 \pm 11.73$  pg/ml, 0.5 mg/ml 처리한 세포에서  $212.58 \pm 3.84$  pg/ml로 나타났다. A23187로만 자극한 세포에 비하여 모든 BGT 농도에서 유의성( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.005$ ) 있는 감소를 보였다(Fig. 5).



**Figure 5. Effect of BGT on TNF- $\alpha$  secretion from RBL-2H3 cell.** Each column represents mean±S.E. of 3 independent samples. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA. ###  $p < 0.005$ ; significant as compared to unstimulated sample by Scheffe's multiple comparison. \*  $p < 0.05$ ; significant as compared to A23187-stimulated sample by Scheffe's multiple comparison. \*\*\*  $p < 0.005$ ; significant as compared to A23187-stimulated sample by Scheffe's multiple comparison.

Raw264.7로부터의 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $1867.4 \pm 14.34$  pg/ml이었으며, LPS로 자극한 세포

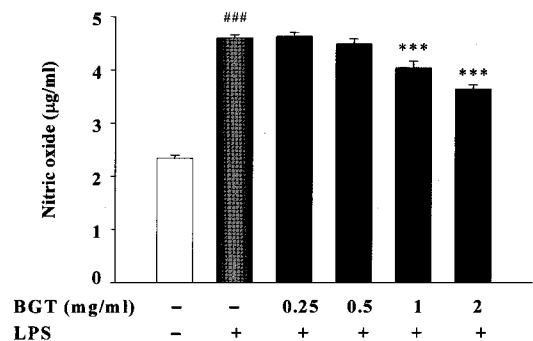
에서  $2115.8 \pm 8.39$  pg/ml, LPS 자극하기 2 시간 전 BGT 0.25 mg/ml 처리한 세포에서  $1852.8 \pm 21.66$  pg/ml, 0.5 mg/ml 처리한 세포에서  $1716.6 \pm 8.45$  pg/ml, 1 mg/ml 처리한 세포에서  $1679.5 \pm 34.03$  pg/ml, 2 mg/ml 처리한 세포에서  $1823.0 \pm 39.59$  pg/ml로 나타났다. LPS로만 자극한 세포에 비하여 모든 BGT 농도에서 유의성( $p < 0.005$ ) 있는 감소를 보였다(Fig. 6).



**Fig. 6. Effect of BGT on TNF- $\alpha$  secretion from Raw264.7 cell.** Each column represents mean±S.E. of 3 independent samples. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA. ###  $p < 0.005$ ; significant as compared to unstimulated sample by Scheffe's multiple comparison. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.005$ ; significant as compared to LPS-stimulated sample by Scheffe's multiple comparison.

7) Nitric oxide의 분비에 미치는 영향

Raw264.7로부터 분비되는 nitric oxide의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $2.35 \pm 0.06$   $\mu$ g/ml, LPS로 자극한 세포에서  $4.60 \pm 0.06$   $\mu$ g/ml, LPS 자극 전 BGT를 0.25 mg/ml 처리한 세포에서  $4.63 \pm 0.07$   $\mu$ g/ml, 0.5 mg/ml 처리한 세포에서  $4.48 \pm 0.09$   $\mu$ g/ml, 1 mg/ml 처리한 세포에서  $4.04 \pm 0.12$   $\mu$ g/ml, 2 mg/ml 처리한 세포에서  $3.64 \pm 0.08$   $\mu$ g/ml로 나타나 LPS로만 자극한 세포에 비하여 1 mg/ml와 2 mg/ml 처리한 세포에서 유의성( $p < 0.005$ ) 있는 감소를 보였다(Fig. 7).



**Fig. 7. Effects of BGT on nitric oxide secretion from Raw264.7 cell.** Each column represents mean±S.E. of 3 independent samples. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA. ###  $p < 0.005$ ; significant as compared to unstimulated sample by Scheffe's multiple comparison. \*\*\*  $p < 0.005$ ; significant as compared to LPS-stimulated sample by Scheffe's multiple comparison.

고찰

알레르기 질환은 비정상적으로 일어나는 면역학적 기전에 의해 발생하는 과민반응의 일종으로 전신 면역의 영역과 더불어

피부 자체의 면역기능과 다양하게 관련되어 있다. 알레르기 질환은 유전적 소양을 지닌 사람에게 많이 나타나며, 원인 되는 물질에 반복적인 접촉이 발병의 조건이 되어 처음 접촉하는 물질에는 반응이 나타나지 않으나 장기간 아무런 문제가 없던 것들에 대해 알레르기 반응이 발생하게 된다<sup>9)</sup>. 이러한 알레르기 질환은 외부환경과 접촉이 많은 피부와 호흡기를 중심으로 많이 발생하는데, 역학적 연구에 의하면 20 세기 후반에 들어 기관지 천식 등 호흡기 알레르기 질환이 전세계적으로 발병율이 증가되고 있으며, 미국에서는 약 10 년간 6-16 세의 아동에서 조사한 결과 기관지 천식의 유병률이 28% 증가하였고<sup>9)</sup>, 뉴질랜드는 13 년간 약 2 배<sup>10)</sup>, 영국에서도 매년 증가추세를 보고하였고<sup>11)</sup>, 우리나라도 1960 년대에 비하여 1990 년대에 들어 3-5 배 증가하였다<sup>12)</sup>.

알레르기 질환은 단시일에 치료되지 않는 만성적인 질환으로 아직 많은 환자들이 완전한 조절이 이루어지지 못하고 있는 현실이므로 치료에 있어서도 환자의 건강상태와 체질을 고려한 지속적인 관리와 치료가 요구되어진다. 한의학에서 “皮膚는 내장의 거울이다”로 인식되며, “병의 반응은 체표에 나타난” 라고 했다. 한의학에서는 피부질환을 피부의 이상만으로 생각하지 않고 전신상태의 개선이라는 관점에서 접근한다. 알레르기질환의 가장 일반적인 증상은 염증과 가려움이다. 血虛하여 風燥를 끼고 염증이 생겼거나, 濕熱로 염증이 생겼거나 환자가 입상에서 가장 호소하는 증상은 가려움증이다. 따라서 가려움증은 환자의 체력 여하, 유병기간을 떠나서 일차적으로 치료해야 하는 핵심 사항으로 판단된다. 防風葛根湯은 明의 의학자 孫一奎의 저서인 《赤水玄珠》에 수록된 처방으로서 《閻氏小兒方論》의 升麻葛根湯에 防風을 加하여 이루어진 것으로 痘後餘毒發癩疹과 麻疹發熱 등의 치료에 응용하여 온 것으로 나타나 있다<sup>3)</sup>. 본 처방구성 중의 防風은 發散風寒藥으로 祛風解表의 效能이 있어서 治風通用之品이 된다. 따라서 風寒表證 風熱表證을 막론하고 皮膚瘙癢에 모두 應用할 수 있다. 升麻는 發散風熱藥으로 發表透疹, 清熱解毒, 升舉陽氣의 效能이 있다. 輕浮上行하여 升散發表, 解毒透疹하므로 麻疹透發不暢의 證이나 中氣가 虛한 各種 證狀에 要藥이 된다. 葛根은 發散風熱藥으로 解肌退熱, 發表透疹하므로 麻疹透發不暢의 證에 應用할 수 있으며, 赤芍藥은 清熱涼血藥으로 入肝經 善走血分, 清熱涼血하므로 血熱斑疹의 證에 常用할 수 있다. 甘草는 補氣藥으로 清熱解毒, 調和藥性하므로 熱毒瘡瘍에 좋은 解毒藥이 된다<sup>13)</sup>. 따라서 이상의 약재들로 구성된 防風葛根湯은 알레르기 질환 치료에 있어서 扶正法과 祛邪法을 동시에 충족시킬 수 있는 처방으로 사료된다.

防風葛根湯이 알레르기 질환에 효과적일 것으로 판단되나 실험적으로 검증된 보고는 아직 없다. 따라서 본 실험에서는 防風葛根湯이 여러 가지 실험모델을 이용하여 알레르기 반응에 미치는 영향과 안전성에 대한 조사를 실시하여 유의한 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

알레르기는 알레르기성 염증반응에 관계되는 많은 종류의 세포들 (비만세포, 호중성백혈구, 림프구, 호산성백혈구 등)로부터 여러 종류의 매개물질들 (히스타민, leukotriene, 혈소판 활성화 인자 등)과 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-13 등)이 유리되고,

adhesion molecules (ICAM-1, 2, VCAM-1 등)과 transcription factor (nuclear factor kappa B, AP-1, NF- $\kappa$ B, STAT 등)의 발현이 중요한 역할을 한다. 알레르기 질환의 발생에 중요한 역할을 하는 비만세포는 Ehrlich<sup>14)</sup>에 의해 처음 관찰, 명명된 이래 탈과립 유발 인자들과 억제인자들에 대한 연구를 통하여 아토피성 피부염, 기관지 천식 및 알러지 비염 등 여러 가지 알러지 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 적합한 약물을 개발하는데 많이 이용되고 있다.

비만세포는 결합조직에 널리 분포하고 있으며 다른 세포와 달리 크고 굵은 이염색성의 과립을 함유하고 있고, 면역학적 또는 비면역학적 자극에 의하여 세포질 과립에 저장된 매개물질들 (histamine, heparin, 프로테이즈, 가수분해효소 등)과 많은 사이토카인들을 분비하여 여러 면역반응과 염증반응 등에 관여한다<sup>15)</sup>.

비만세포를 활성화 시키는 중요한 인자로는 항원, IgE 항체, IgE 수용체에 대한 항체, Con A, polyamine, compound 48/80, polylysine polypeptides, alpha-chymotrypsin, porcine pancreatic phospholipase A2 등의 효소들의 자극<sup>16)</sup> 및 Ca<sup>2+</sup> coupled stimulation secretion 기전에 의하여 분비되는 경우<sup>17)</sup>, cyclic nucleotide level에 의한 분비, protein kinase의 활성화에 따른 phosphorylation 증가, 비만세포의 세포골격인 액틴미세섬유와 중간미세섬유, 미세소관 등을 변형시키는 경우<sup>18)</sup> 등이 있다.

아나필락시스에 전신에 걸쳐 널리 존재하는 비만세포의 세포질 과립 속에 미리 저장되어 있는 histamine을 위시하여 비만세포의 세포막 인지질의 대사산물로서 새롭게 생산되는 prostaglandin과 leukotriene들이 세포 밖으로 유리되고, 이러한 화학적 전달물질들에 의해 모세혈관투과성의 항진, 평활근 수축 및 분비항진 등으로 인한 조직장애를 동반한 증상이다<sup>19)</sup>. 본 실험에서는 우선 anti-DNP IgE를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis 반응으로 누출된 Evans blue의 양을 측정하여 防風葛根湯의 억제효과를 조사하였다. 실험결과 청색반의 누출량은 saline 투여군은 103.0 $\pm$  6.55  $\mu$ g/g로 나타났다. 반면 BGT 0.4 g/kg 투여군은 101.8 $\pm$ 7.78  $\mu$ g/g, 0.8 g/kg 투여군은 76.8 $\pm$ 3.68  $\mu$ g/g으로 saline 투여군에 비해 감소를 보였고, 특히 BGT 0.8 g/kg 투여군에서 saline 투여군에 비해 유의한 감소를 나타내었다 (p<0.05)(Fig. 1).

이는 복강 비만세포의 탈과립과 히스타민 유리를 억제한 결과로 미루어 구강내로 투여한 防風葛根湯 추출물이 비만세포를 안정화시켜 anti-DNP IgE에 의한 혈관 투과성을 억제하여 Evans blue의 혈관 밖으로의 유출을 방지함으로써 피부로의 파란색 반점의 유출을 억제한 것으로 생각된다.

전신형 아나필락시스는 즉시형 과민반응 중 가장 전격적이고 중한 반응으로 즉각적인 응급 처치가 필요한 질환으로 원인 물질에 노출된 후 수분에서 20~30 분 이내에 증상이 나타나며, 증상발생의 초기에 국소적 혹은 전신적인 소양증, 피부발적, 답답한 및 혈관부종이 발생하며, 후두부종이나 기관지 수축으로 인한 심한 호흡곤란으로 이어져 심한 경우는 심혈관 허탈, 의식소실, 청색증, 경련, 치명적인 부정맥이 발생하고 사망할 수도 있다. 전신 아나필락시스는 신체의 어느 장기라도 영향을 줄 수 있으며, 특히

폐, 순환기, 피부, 신경계, 소화기에 빈번하게 증상이 발생한다<sup>20)</sup>.

본 실험에서는 비만세포의 탈과립을 유도하는 인자로 여러 가지 화학물질을 사용하였는데 active systemic anaphylactic shock을 유도하기 위해서 compound 48/80을 사용하였다. 이는 혼합 다당체 성분으로 세포내 칼슘을 증가 시키거나, 세포막을 통하여 세포밖으로부터 세포내로 칼슘의 이동을 자극하여 세포 질내 칼슘의 농도를 증가시키는 인자로서의 기능을 가지고 있으며, 비만세포막 수용체에 작용하여 세포내로의 칼슘 유입을 증가시키고 세포내 cAMP-phosphodiesterase의 파괴를 억제하여 세포내 cAMP 양을 증가시킨다고 알려졌다<sup>21)</sup>.

세포실험을 위한 탈과립제로서 PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) 및 calcium ionophore A23187를 사용하였는데 이는 phosphatidylinositol (PI) cycle과 protein kinase C (PKC) 활성화, 또는 calcium mobilization시키는 물질로 비만세포를 자극시켜 생리활성물질을 세포 밖으로 분비하게 한다<sup>15)</sup>.

이러한 비만세포 탈과립을 일으키는 여러 인자들의 대부분은 세포밖으로부터 세포안으로  $Ca^{2+}$  유입을 증가시킴으로써 비만세포내의  $Ca^{2+}$ 의 양을 증가시키며, 증가된 자유  $Ca^{2+}$ 이 세포내  $Ca^{2+}$  binding protein인 calmodulin과 결합하여  $Ca^{2+}$ -calmodulin 복합체를 형성하게 되고 이것이 세포내 myosin light chain kinase를 활성화 시킨다. 그 결과 세포내 골격 및 세포내 이동에 관여하는 미세소관과 미세섬유가 활성화되어 비만세포의 과립을 세포막 가까이로 이동시켜 결과적으로 세포막 융합을 일으키게 됨으로써 비만세포 탈과립 및 히스타민 유리현상이 일어난다고 알려졌다<sup>22)</sup>.

본 실험에서 조사한 active systemic anaphylactic shock에 미치는 BGT의 영향은 saline 투여군은 compound 48/80 주사 후 30 분 경과 후에 100%의 치사율을 보인 반면, BGT 0.4 g/kg 투여군은 compound 48/80 주사 후 30 분 경과 후에 90%의 치사율을 보였다. 0.8 g/kg 투여군은 30 분 경과 후 70%의 치사율을 보였으며, 40 분 경과 후에 80%의 치사율을 나타내었다(Table 3).

또한 본 실험에서는 RBL-2H3 세포를 사용하여 세포독성과 생존률에 영향을 미치지 않는 범위에서  $\beta$ -hexosaminidase의 activity, IL-4와 TNF- $\alpha$ 를 측정하여 mast cell 활성화에 대한 防風葛根湯의 영향을 관찰하였다.

RBL-2H3 세포의 독성 및 생존률에 미치는 BGT의 영향을 알아보기 위한 MTT assay에서 RBL-2H3 세포의 독성 및 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위해 아무런 처리를 하지 않은 세포의 흡광도는  $1.40 \pm 0.04$ 이었으며, BGT 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 및 2 mg/ml의 농도를 처리한 세포에서 각각  $1.92 \pm 0.09$ ,  $1.93 \pm 0.02$ ,  $1.48 \pm 0.03$ ,  $1.88 \pm 0.06$ ,  $2.06 \pm 0.04$ 의 흡광도를 나타내어 BGT의 모든 농도 ( $P < 0.005$ )에서 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 2).

Histamine은 조직의 비만세포와 호염기구에서 합성되고 저장되며 다양한 반응에 의해 분비되어 혈류를 통하여 조직으로 빠르게 확산되고 혈관확장, 혈관투과성증가, 말초신경계와 상호작용 등의 급성염증반응에 많은 영향을 미친다.  $\beta$ -hexosaminidase는 histamine과 함께 mast cell 내에 존재하는 효소로서 탈과립에 의해 histamine의 누출량과 비례하여 분비되

는 것으로 알려져 있다<sup>45)</sup>. 이 효소의 측정은 mast cell의 탈과립을 측정하는 간접적인 방법으로 널리 사용되는 방법이다. RBL-2H3 세포의 생존률에 영향을 미치지 않는 0.25 ~ 2 mg/ml의 BGT 농도에서  $\beta$ -hexosaminidase의 activity에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 RBL-2H3 세포로부터의  $\beta$ -hexosaminidase의 누출량은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $6.64 \pm 0.57\%$ 이었으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서  $60.87 \pm 1.38\%$  ( $p < 0.005$ )로 현저한 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187로 자극하기 1 시간 전 BGT를 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 및 2 mg/ml의 농도를 처리한 세포에서 각각  $22.41 \pm 1.81\%$ ,  $18.58 \pm 1.12\%$ ,  $15.80 \pm 1.26\%$ ,  $14.23 \pm 0.65\%$ 로 억제하였으며, PMA와 A23187로만 자극한 세포에 비하여 모든 BGT 농도에서 유의성( $p < 0.005$ ) 있는 감소를 보였다(Fig. 3).

알레르기 질환에서는 병의 국소적 변화에서 IL-4, IL-5, IL-13 등의 cytokine이나 eotoxin이라는 chemokine의 발현상승이 확인된다. 면역학분야에서는 알레르기의 병태 형성에 cytokine이 깊이 관여하고 있다는 것을 계속 보고하고 있다<sup>23)</sup>. 인간의 mast cell은 TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 등의 cytokine을 만들어내는데, 이들 cytokine들은 궁극적으로 neutrophil과 eosinophil을 모으는 역할을 하며 염증반응을 일으키는 데 있어서 중요한 역할을 담당한다. 그 중에서 IL-4는 NK cell, mast cell, neutrophil과 eosinophil에서 분비되는 cytokine으로 알레르기에 매우 본질적인 역할을 맡고 있다. 알레르기 반응의 유발, B세포의 분화와 증식, IgE의 생성 등에 관여하여 염증 반응 분비 물질로 천식 유발과 아토피의 발생에 중요한 역할을 한다<sup>24)</sup>.

본 실험에서는 RBL-2H3 세포의 IL-4 생성에 미치는 BGT의 영향을 조사한 결과 RBL-2H3 세포로부터의 IL-4의 분비량은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $3.27 \pm 1.30$  pg/ml, A23187로 자극한 세포에서  $804.14 \pm 21.62$  pg/ml, A23187 자극하기 1 시간 전 BGT 0.25 mg/ml 처리군에서  $704.70 \pm 6.64$  pg/ml, 0.5 mg/ml 처리군에서  $729.70 \pm 19.59$  pg/ml, 1 mg/ml 처리군에서  $639.02 \pm 5.37$  pg/ml, 2 mg/ml 처리군에서  $542.07 \pm 18.04$  pg/ml로 나타났다. A23187로만 자극한 세포에 비하여 모든 BGT 농도에서 유의성( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ ) 있는 감소를 보였으며, 각 군을 다중 비교한 결과 무자극군과 나머지군 사이에 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 변화를 보였다(Fig. 4).

TNF- $\alpha$ 는 전구염증인자로서 비만세포와 대식세포 등에서 생성되어 많은 염증반응을 유발하는 인자로 알려져 있으며, 생체 내에서 단독으로 또는 다른 cytokine들과 협력 작용하여 몇몇 종양의 혈관을 손상시킴으로써 종양 괴사를 유발 시키거나 감염, 몇몇 바이러스 혹은 기생충에 의한 감염에 대하여 숙주의 저항성을 유도시키기도 한다. 비만세포에서 유리된 TNF- $\alpha$ 는 국소의 혈관내피세포에 작용하여 ELAM-1의 발현 및 백혈구의 혈관의 유주를 유도하는 것으로써 특히 알레르기 국소의 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다<sup>25)</sup>. 본 실험에서 RBL-2H3과 Raw264.7 cell의 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 BGT의 영향에 대해 조사한 결과 RBL-2H3 세포로부터의 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 아무런 처리를 하지 않은 군에서는 측정이 불가능하였다. A23187로 자극한 세포에서  $301.05 \pm 16.69$  pg/ml, A23187 자극하기 1 시간 전 BGT 0.05 mg/

mL 처리군에서 224.55±2.85 pg/mL, 0.1 mg/mL 처리군에서 256.32±7.69 pg/mL, 0.25 mg/mL 처리군에서 232.59±11.73 pg/mL, 0.5 mg/mL 처리군에서 212.58±3.84 pg/mL로 나타났다. A23187로만 자극한 세포에 비하여 모든 BGT 농도에서 유의성(p<0.05, p<0.01, p<0.005) 있는 감소를 보였다(Fig. 5). Raw264.7 세포로부터의 TNF-α의 분비량은 아무런 처리를 하지 않은 군에서 1867.4±14.34 pg/mL이었으며, LPS로 자극한 세포에서 2115.8±8.39 pg/mL, LPS 자극하기 2 시간 전 BGT 0.25 mg/mL 처리군에서 1852.8±21.66 pg/mL, 0.5 mg/mL 처리군에서 1716.6±8.45 pg/mL, 1 mg/mL 처리군에서 1679.5±34.03 pg/mL, 2 mg/mL 처리군에서 1823.0±39.59 pg/mL로 나타났다. LPS로만 자극한 세포에 비하여 모든 BGT 농도에서 유의성(p<0.005) 있는 감소를 보였다(Fig. 6).

이번 실험에서는 防風葛根湯 추출물이 TNF-α 생산에 미치는 영향을 관찰하기 위해 in vitro 실험을 진행한 결과 RBL-2H3을 A23187로 단독 자극한 군과 Raw264.7 세포를 LPS로 자극한 군에서 모두 TNF-α 분비가 현저하게 증가되었고, 防風葛根湯 추출물 전처리로 인하여 A23187과 LPS로 유발된 TNF-α의 분비가 유의하게 억제되었다. 따라서 防風葛根湯 추출물이 TNF-α의 발현을 억제하여 염증을 억제하는 기전을 가지고 있음을 알 수 있다.

Nitric oxide는 신경전달물질과 혈액학적 안정성을 유지하는 물질로서의 기능과 더불어 급만성 염증과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 실험모델에서 NOS 저해제는 급성염증에 대해 용량 의존적인 보호효과를 나타낸다. 호중구와 대식세포가 활성화에 의해 nitric oxide의 과다한 분비가 유도 되면 염증을 유발하고 부종을 촉진시키고 혈관투과성을 증가시키는 등 정상숙주조직을 손상시킬 수 있다<sup>26)</sup>. Mouse에서는 다양한 cytokine (TNF-α, GM-CSF, INF-g 등)에 의해 대식세포에서 산화질소를 생성하는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 mouse 유래 대식세포, Raw264.7 cell의 nitric oxide 생성에 미치는 BGT의 영향에 대해 살펴보았다. 실험 결과 Raw264.7로부터 분비되는 nitric oxide의 양은 아무런 처리를 하지 않은 군에서 2.35±0.06 μg/mL, LPS로 자극한 군에서 4.60±0.06 μg/mL, LPS 자극 전 BGT 0.25 mg/mL 처리군에서 4.63±0.07 μg/mL, BGT 0.5 mg/mL 처리군에서 4.48±0.09 μg/mL, BGT 1 mg/mL 처리군에서 4.04±0.12 μg/mL, BGT 2 mg/mL 처리군에서 3.64±0.08 μg/mL로 나타나 LPS로만 자극한 군에 비하여 BGT 1 mg/mL와 2 mg/mL 처리군에서 유의성 (p<0.005) 있는 감소를 보였다(Fig. 7). 이상의 실험결과에서 防風葛根湯은 알레르기 반응에 유의한 억제효과가 있는 것을 알 수 있다.

## 결 론

알레르기 반응에 미치는 防風葛根湯의 영향을 연구한 결과 동물실험에서 PCA 반응과 active systemic anaphylactic shock 반응을 억제하는 효과를 나타내었고 세포실험에서 RBL-2H3의 경우 β-hexosaminidase, IL-4와 TNF-α의 생성과 분비를 저해하는 효과가 있음을 확인하였으며 Raw264.7의 경우 TNF-α와 nitric oxide의 분비를 억제하는 효과를 확인하였다. 이와 같은 결과는

mast cell 및 basophil 등의 면역세포의 탈과립을 억제하고 알레르기 염증반응과 관련된 cytokine등을 억제하는 기전에 의한 결과로 판단되며, 防風葛根湯이 알레르기의 발병을 예방하고 억제하는 효과가 있을 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. 대한 천식 및 알레르기 학회. 천식과 알레르기 질환. 군자출판사, 66: 431-433, 2002.
2. 彭懷仁 主編. 中華醫方精選辭典. 上海, 上海科學技術文獻出版社, p 931, 1998.
3. S. Katayama, H. Shionoya, S. Ohtake. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous allergy in guinea pigs and rats. Microbiol. Immunol. 22: 89-101, 1978.
4. Dastyh, J., Walczak-Drzewiecka, A., Wyczolkowska, J, Metcalfe, D.D. 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. 103: 1108-1114, 1999.
5. Schwartz, L.B., Austen, K.F., Wasserman, S.I. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. J Immunol. 123: 1445-1450, 1979.
6. 식품의약품안전청. 의약품등의 독성시험기준. 식품의약품안전청 고시 2005-60호, 서울, 식품의약품안전청, 1999.
7. 국립독성연구원. 표준작업지침서. 서울, 국립독성연구원, 2007.
8. 은희철 외. 피부면역학. 서울대학교출판부, pp 1-2, 1999.
9. Halfon, N., Newacheck, P.W. Trends in the hospitalization for acute childhood asthma, 1970-84. Am J Public Health. 76(11):1308-1311, 1986.
10. Mitchell, E.A. Increasing prevalence of asthma in children. N Z Med J. 96(734):463-464, 1983.
11. Smith, J.M., Harding, L.K., Cumming, G. The changing prevalence of asthma in school children. Clin Allergy. 1(1):57-61, 1971.
12. 김유영, 조상현, 김우경, 박재경, 김윤근, 송숙희, 지영구, 하미나, 안윤옥, 이상일, 장석일, 민경업. 설문지와 메타폴린 기관지유발시험을 이용하여 조사한 한국의 소아 천식 유병률. 대한알레르기학회지 16(2):175-184, 1996.
13. 黃兆勝 主編. 中藥學. 北京, 人民衛生出版社, p 42, 58, 59, 124, 426, 2005.
14. Ehrlich, P. Beitrage zur kenntnis der Anilinfarbungen und ihrer Verwendung in drmikroskopischen Technik. Arch Mikrosk Anast 13: 263-277, 1877.
15. Moon, P.D., Na, J.J., Jeong, H.J., Hong, S.H., Kim, S.J., Chae, H.J., Kim, H.R., Choi, J.O., Lee, S.H., Shin, J.Y., Kim, H.M. Inhibitory effect of Gamibojungikaitang extract on



- mast cell-mediated allergic reaction in murine Model. *J Pharm Pharm Sci* 8(1):94-101, 2005.
16. Ennis, M., Pearce, F.L., Weston, P.M. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br. J. Pharmacol* 70: 329-334, 1980.
  17. 강경진, 전병득, 채옥희, 이무삼. 상백피가 흰쥐 복강 비만세포의 히스타민 유리와 Calcium uptake에 미치는 영향. *대한면역학회지* 15: 91-99, 1993.
  18. 채옥희, 이종인, 이무삼. 상백피의 colchicine 유도 비만세포 활성화 억제효과. *대한해부학회지* 32: 735-747, 1999.
  19. B.S. Bochner, L.M. Lichtenstein. Anaphylaxis. *N. Engl. J. Med.* 324: 1785-1790, 1991.
  20. Sheffer, A.L. Anaphylaxis: clinical aspects. *Allergy Asthma Proc.* 25(1):31-32, 2004.
  21. 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.* 35(21):3739-3744, 1986.
  22. Lane, S.J., Lee, T.H. Mast cell effector mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 98(5 Pt 2):S67-71, 1996.
  23. Jirapongsananuruk, O., Leung, D.Y. Clinical applications of cytokines: new directions in the therapy of atopic diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 79(1):5-20, 1997.
  24. 정해영. 생명과학 · 분자의학을 위한 사이토카인 분자생물학. 월드사이언스, pp 117-124, 2002.
  25. 이종달. 그림으로 설명한 병리학. 서울, 고려의학, p 29, 1991.
  26. 강재성 외. 세포분자면역학. 서울, 범문사, p 283, 435, 2002.
  27. Kim, J.C., Kim, S.H., Shin, D.H., Ahn, T.H., Kim, H.C., Kim, Y.B., Jiang, C.Z., Han, J., Chung, M.K. Effects of prenatal exposure to the environmental pollutant 2-bromopropane on embryo-fetal development in rats. *Toxicology.* 196(1-2): 77-86, 2004.
  28. Kim, J.C., Shin, D.H., Kim, S.H., Kim, J.K., Park, S.C., Son, W.C., Lee, H.S., Suh, J.E., Kim, C.Y., Ha, C.S., Chung, M.K. Subacute toxicity evaluation of a new camptothecin anticancer agent CKD-602 administered by intravenous injection to rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 40(3):356-369, 2004.