

# RBL-2H3 비만세포와 동물병태모델에서 小青龍湯의 항알레르기 효과

김경렬<sup>1</sup> · 이종화<sup>2</sup> · 김영준 · 최성열 · 김태헌 · 류영수 · 강형원\*

원광대학교 한의과대학 신경정신과교실, 1:비전한의원, 2:원광대학교 의과대학 소아과교실

## Anti-allergic Effects of Socheongyong-tang on RBL-2H3 Mast Cell and Mice-mediated Allergy Model

Kyung Yeol Kim<sup>1</sup>, Jong Hwa Lee<sup>2</sup>, Young Jun Kim, Sung Youl Choi, Tae Heon Kim, Yeoung Su Lyu, Hyung Won Kang\*

Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 1: Bijeon Oriental Medical Clinic, 2: Department of Pediatrics, College of Medicine, Wonkwang university

The discovery of drugs on the treatment of mast cell-mediated allergic disease is a very important subject in human health. The Socheongyong-tang(SCYT) has been used for centuries as a traditional medicine in Korea and is known to have an anti-inflammatory effect. However, its specific mechanism of action is still unknown. In this report, we investigated the effect of hot water extract from SCYT on RBL-2H3 mast cell-mediated allergic reaction and studied its possible mechanism of action. SCYT inhibited compound 48/80-induced systemic anaphylaxis and serum histamine release in mice. SCYT decreased the passive cutaneous anaphylaxis reaction activated by Anti-IgE antibody-HSA. SCYT dose-dependently reduced histamine release from mice peritoneal mast cells activated by Anti-IgE antibody-HSA. SCYT increased cAMP and decreased compound 48/80-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. Our findings provide evidence that SCYT inhibits mast-derived allergic reactions, and also demonstrate the involvement of cAMP and intracellular Ca<sup>2+</sup> in these effects.

Key words : Socheongyong-tang(SCYT), compound 48/80, cAMP, Anti-IgE antibody-HSA, allergy

### 서 론

알레르기 반응은 생체조직 세포와 결합되어 있는 항체와 외부에서 침입해온 항원과의 항원항체 반응을 이룬 결과 여러 가지 화학적 매개물질로 유리되는데 이와 같은 화학물질의 작용에 의해서 모세혈관벽의 기능 이상과 평활근 연속 등을 일으키게 되는 것이다<sup>1)</sup>. 알레르기 질환은 histamine, serotonin 등에 의해 혈관이 확장되거나 점액의 분비, 평활근이 수축되면서 염증을 일으키는 질환으로 가장 많은 비율을 차지하는 것이 알레르기성 비염, 아토피성 피부염이다<sup>2,3)</sup>.

한편 알레르기 반응을 일으키는 비만세포(mast cell)는 즉시형 과민성 반응을 유발하는 가장 강력한 생리 활성물질로 알려

져 있는 히스타민 분비에 중요한 역할을 하고, 활성화되면 탈과립, IL-6, TNL- $\alpha$ 등과 같은 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있다<sup>4,5)</sup>. 특히 비만세포의 탈과립 반응은 IgE 수용체를 통한 자극 이외에도 칼슘, compound 48/80과 같은 약리학적 복합물에 의한 자극이 있는데, Compound 48/80은 비만세포내의 칼슘 수준을 증가시켜 아나필락시스 반응을 일으키는데 가장 많이 사용되고 있다<sup>6)</sup>.

비만세포의 활성화 후 유발되는 탈과립 과정의 신호전달경로에 대해서는 지금까지 많은 연구가 진행되었는데, 특히 tyrosinase kinase의 인산화와 칼슘의 세포내 유입이 중요하다. 또한 비만세포에서의 히스타민의 유리에는 cAMP가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>7)</sup>.

韓藥은 체내에서 여러 가지 기능이 서로 협동하여 항원 항체 반응을 정상적인 면역반응으로 촉진시킬 뿐 아니라 호르몬계와 자율신경계의 기능조절을 나타내는 등 생체리듬의 항상성을 유지하기 위한 表裏, 寒熱, 虛實, 陰陽의 밸런스를 조절하는 치료수단

\* 교신저자 : 강형원, 경기도 군포시 산본동1126-1 산본한방병원 신경정신과

· E-mail : dskhw@wonkwang.ac.kr, · Tel : 031-390-2762

· 접수 : 2007/09/07 · 채택 : 2007/09/20

으로 前漢時代의 內經에서부터 임상적으로 널리 활용되어 왔다<sup>8)</sup>.

최근 한약의 알레르기 질환에 대한 효과를 증명하는 연구들이 많이 진행되고 있는데 항알레르기 효과를 실험한 유효한 연구 처방으로는 麗澤通氣湯<sup>9)</sup>, 辛夷散<sup>10)</sup>, 辛夷清肺陰<sup>11)</sup>, 葛根湯<sup>12)</sup>, 川椒散<sup>13)</sup> 등이 있으며, 이미 加味生料四物湯<sup>14)</sup>, 加味清鼻飲<sup>15)</sup>, 補中益氣湯<sup>16,17)</sup> 등과 단방으로 魚腥草<sup>18)</sup>, 薊<sup>19)</sup>, 黃芪<sup>20)</sup>, 紫草<sup>21)</sup>가 알레르기 질환을 치료하는 효과가 있다는 것이 실험적으로 검증되었다.

小青龍湯은 漢代의 張<sup>22)</sup>의 《傷寒論》에서 처음으로 수록된 처방으로 解表散寒하고 溫肺化飲하는 효능이 있어 外感風寒으로 水飲이 內停하게 되어 惡寒發熱하나 渴症이 나지 않고 無汗하며 浮腫, 身體疼痛, 胸痞, 乾嘔, 咳喘하고 脈浮한 증상을 치료하고 실제 임상에서도 類用하고 있는 처방이다<sup>23)</sup>. 선행연구로는 알레르기 천식에 대하여 유효한 실험적<sup>24-29)</sup>, 임상적 연구<sup>30)</sup>가 있었고, 알레르기 비염에 대한 유발백서의 과립구 및 조직학적 변화를 관찰하여 의미있는 결과를 보고하였다<sup>31)</sup>. 하지만 RBL-2H3 비만세포주와 흰쥐 복강비만세포(Rat Peritoneal Mast Cells: RPMC)을 이용한 in vitro, in vivo 알레르기 모델에서 분자생물학적인 연구의 시도는 아직 미흡한 실정이다.

이에 저자는 Anti-IgE antibody-HSA 또는 compound48/80으로 유도된 RBL-2H3 mast cell line과 흰쥐 복강비만세포에 小青龍湯을 농도별 및 복강투여한 후 히스타민 분비에 관여하는 β-hexosaminidase, NO, TNF-α와 IL-6의 Pro-inflammatory cytokine 양을 측정하고 분자생물학적으로 이들의 mRNA양을 Q-PCR로 정량화하여 분석하였으며 세포내 칼슘과 cAMP의 양을 측정하여 히스타민 유리에 대한 이들의 작용기전을 검토하여 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

ICR계 생쥐(♀, 6주령)는 대한 바이오링크(충북)에서 구입하여 실험에 사용할 때까지 온도 22℃, 상대습도 55.5%로 유지되는 항온, 항습 사육실에서 사육하였다.

#### 2) 시약

Compound 48/80, Anti-IgE antibody-HSA, DNP-human serum albumin (HSA), α-minimal essential medium (α-MEM), o-phthaldialdehyde, calcium ionophore A23187는 Sigma사로부터 구입하였으며 (St Louis, MO). rTNF-α와 rIL-6 는 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN)에서 구입하였고 그 외 시약은 일급시약으로 구입하여 사용하였다.

#### 3) 사용약제

본 실험에 사용된 小青龍湯의 처방내용과 구성은 張<sup>22)</sup>의 《傷寒論》에 의거하였으며 1첩 분량은 Table 1과 같다. 원광대학교 산본한방병원에서 1 kg을 구입하여 정제수 20,000 mL로 수용상에서 5시간동안 약 50%의 수율인 1,000 mL로 감압 농축한 다음 동결 건조하여 약 450 g을 회수 하였다. 이 추출물인 Socheongyoug-tang<sup>\*</sup> (이하 SCYT라 명명)를 사용 직전에 생리식염

수에 희석하여 Tyrode buffer A(10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.6 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin)을 사용하여 일정농도로 조제하였다.

Table 1. Herb composition of Socheongyoug-tang(小青龍湯)

한약명	생약명	용량
麻黃	<i>Ephedrae Herba</i>	6 g
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6 g
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	6 g
半夏(法製)	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	6 g
細辛	<i>Asari Herba Cum Radix</i>	4 g
乾薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4 g
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	4 g
甘草(炙)	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4 g
總量		40 g

### 2. 방법

#### 1) RBL-2H3 세포주로부터 항알레르기 활성

RBL-2H3세포주로부터 β-hexosaminidase의 분비에 대한 小青龍湯의 저해활성을 알아보기 위해 Choi<sup>32)</sup>의 방법을 적용하여 분석하였는데 우선 RBL-2H3세포주를 5×10<sup>5</sup> 세포수로 24 well에 10% fetal bovine serum이 함유한 Dulbeccos modified Eagle's medium (DMEM)배지를 분주하고 3일간 배양하였다. 여기에 0.5 μg/ml mouse clonal IgE를 첨가하여 세포에 감작시키기 위해 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 세포주는 siraganian 완충액 (pH 7.2, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl, 25 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid), 40 mM NaOH)으로 세척하고 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 그리고 0.1% BSA가 함유한 siraganian 완충액 160 μl를 첨가하여 10분간 37℃에서 배양하였다. 이때 시료를 40 μl를 20분간 첨가하여 알레르기 반응을 유도하기 위해 항원 (Anti-IgE antibody-HSA 1μg/ml) 20 μl를 처리하고 10분간 37℃에서 배양하여 알레르기 반응을 유도하였다. 배양배지로부터 β-hexosaminidase와 TNF-α 분비분석을 측정하였는데 IgE 수용체의 Fcε R1높은 친화력을 최대로 늘리기 위해 (Anti-IgE antibody-HSA 1μg/ml) 20 μl를 처리하고 약물을 10분간 37℃에서 처리 한 후 on ice 수조에서 10분간 정지하여 반응을 정지시켰다. 반응물을 10분간 800× g에서 원심분리하여 degranulation의 마커인 β-hexosaminidase의 분비를 측정하여 Hide방법에 따라 측정하였다. 즉 96 well에 50μl의 배지시료와 기질 (0.2 M 구연산, pH4.5에 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide녹인 것)을 25 μl씩 분주하여 1시간동안 37℃에서 배양시킨다. 반응액은 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 200 μl씩 첨가하여 반응을 종결하고 chromophore, p-nitrophenol의 양을 ELISA reader의 흡광도 405 nm범위에서 측정하였다.

#### 2) 히스타민의 정량

세포배양액 및 혈청 중에 있는 히스타민은 Shore 등<sup>33)</sup>의 방법에 따라 정량하였다. 즉 에펜도프 튜브에 시료 500 μl를 취하여 0.1M HCl 450 μl과 60 % 과염소산 용액 50 μl를 혼합한 후 원심분리(400× g, 20분)하였다. 그 상등액 800 μl를 취해 5 M NaOH 용액 500 μl, 증류수 3 ml, n-butanol 10 ml, NaCl 1.2 g을 혼합한 시험관에 넣고 진탕 후 원심분리 (500× g, 10분)하였다.

Butanol층 8 ml를 취해 0.1 M HCl 3 ml, n-heptane 10 ml를 가하여 진탕한 원심분리 (500 g, 10분)하였다. 여기서 얻어진 수층 2 ml에 1 M NaOH 400  $\mu$ l, 1% o-phthaldialdehyde 용액 100  $\mu$ l를 가하여 혼합하고 2분 동안 방치한 다음 emission 438 nm, excitation 353 nm에서 형광강도를 측정하였다.

3) NO 생성도 측정

RBL-2H3세포주를  $1 \times 10^5$  세포수로 24 well에 10% fetal bovine serum이 함유한  $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM) 배지를 분주하고 3일간 배양하였다. 여기에 0.5  $\mu$ g/ml mouse clonal IgE를 첨가하여 세포에 감작시키기 위해 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 세포주는 siraganian 완충액 (pH 7.2, 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid), 40 mM NaOH)으로 세척하고 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 그리고 0.1% BSA가 함유한 siraganian 완충액 160  $\mu$ l를 첨가하여 10분간 37°C에서 배양하였다. 이때 시료를 40  $\mu$ l를 20분간 첨가하여 알레르기 반응을 유도하기 위해 항원 (Anti-IgE antibody-HSA 1 $\mu$ g/ml) 20  $\mu$ l를 처리하고 10분간 37°C에서 배양하여 알레르기 반응을 유도하여 NO (nitric oxide)생성도를 측정하기 위해 각 well의 배양액을 50  $\mu$ l를 새로운 96 well에 분주하고 여기에 Greiss reagent (2.5%v/v phosphoric acid, 0.1% w/v naphthylethylene, 1.0% w/v sulfanilamide) 50  $\mu$ l를 첨가하여 반응시킨 다음 ELISA reader에서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) TNF- $\alpha$  와 IL-6정량 측정

TNF- $\alpha$ 와 IL-6분비량을 측정하기 위해 RBL-2H3 세포주에서 배양한 배지시료 50  $\mu$ l를 ELISA kit를 이용하여 측정하였으며 측정은 제조사의 방법을 고려하여 측정하였는데 PMA(20 nM)와 A23187 (1  $\mu$ M)로 감작시켜 96 well plate당 6.25 ng/well monoclonal antibody로 흡착시킨 다음 0.05% Tween-20가 포함된 PBS로 2회 세척한 후 PBS로 다시 2회 세척하여 배지시료를 첨가한 다음 바이오틴화된 TNF- $\alpha$ 와 IL-6항체를 첨가하고 2,2'-azino-bis(3-ethybenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)기질을 첨가하여 발색반응을 유도 한 다음 10분 후에 ELISA reader의 흡광도 405 nm에서 측정하였다. 배양배지내의 양은 표준용액의 TNF- $\alpha$ 와 IL-6을 대상으로 표준곡선을 설정 후 이를 배양배지내의 양을 측정 한 다음 환산하여 측정하였다. 시료는 측정하기 전 까지 -80°C에 보관하여 사용하였다.

5) Real time PCR에 의한 mRNA 발현량 측정

6 well에 RBL-2H3의  $2 \times 10^4$ 세포수를 분주하여 하룻밤 배양한 다음 comound 48/80을 처리하기 1시간 전에 SCYT를 처리하고 세포를 1PBS로 세척한 후 TRIzol (Invitrogen) 300  $\mu$ l를 첨가하고 클로로포름을 50  $\mu$ l를 가하여 total RNA를 분리하였는데 분리된 total RNA를 역전사과정을 통해 상보적 DNA를 합성하기 위해 RT-PCR를 수행하였다. 즉 RNA용액과 random primer, RNAase inhibitor, DEPC처리 증류수를 첨가하여 70°C에서 15분간 반응하여 on ice에 5분간 유지한 다음 cDNA를 합성하기 위해 MMTV RTase, DDT, dNTP, 5x RT-PCR용 buffer을 통해 37°C에서 60분간 반응하고 MMTV RTase작용을 억제하기 위해

70°C에서 15분간 처리하여 반응을 종결하였다. 합성된 cDNA를 다음과 같은 IL-6경우 5' -GAA ATG ATG GAT GCT TCC AAA CTG G-3', 5' -GGA TAT ATT TTC TGA CCA CAG TGA GG-3'; TNF- $\alpha$ , 5' -CAA GGA GGA GAA GTT CCC AA-3', 5' -CGG ACT CCG TGA TGT CTA AG-3' GM-CSF경우 5' -GCA TGT AGA TGC CAT CAA AGA AGC-3', 5' -CAT TTC TGG ACC GGC TTC CAG C-3', IL-13경우 5' -GCT CTC GCT TGC CTT GGT GGT C-3', 5' -CAT CCG AGG CCT TTT GGT TAC AG-3', IL-4경우 5' -ACC TTG CTG TCA CCC TGT TC-3', 5' -TTG TGA GCG TGG ACT CAT TC-3' primer를 사용하여 정량적 real-time PCR (Q-PCR)로 94°, 60 s, 63°, 45 s, 72°, 45 s의 반응 조건하에서 34 cycles동안 수행하였고 SYBR Green qPCR (FINNZYMES사)을 사용하여 정량하였다(Table 2).

Table 2. Primers for Q-PCR analysis and proccessure. Sequence of targetgene

Gene	primer	Real time PCR flow chart
IL-6	5'-GAAATGATGGATGCTTCCAACTGG-3' 5'-GGATATATTTTCTGACCACAGTGAGG-3'	RBL-2H3 cell에서 total RNA분리
TNF- $\alpha$	5'-CAAGGAGGAGAAGTCCCAa-3' 5'-CGGACTCCGTGATGTCTAAG-3'	
GM-CSF	5'-GCATGTAGATGCCATCAAAGAAGC-3' 5'-CATTTCGGACCGCTCCAGC-3'	total RNA에서 RT-PCR로 cDNA합성
IL-13	5'-GCTCTCGCTTCGCTTGGTCTC-3' 5'-CATCCGAGCCTTTCTCCTACAG-3'	cDNA에서 target gene을 PCR로 합성
IL-4	5'-ACCTTGCTGTCAACCCTGTT-3' 5'-TTGTGAGCGTGGACTATTC-3'	Target gene일 발현량을 Q-PCR 기기에서 정량화(C/T)

6) Compound 48/80에 의한 전신성 아나필락시스

신<sup>34)</sup> 등의 방법에 따라 실험하였다. 즉 비만세포의 탈과립제 로 compound 48/80 (8 mg/kg, 체중)을 생쥐의 복강내에 주사하였으며 SCYT를 또 시간의존 실험으로 주사 1시간 전에 복강내에 compound 48/80을 투여하고 5분, 10분, 20분 및 30분 그리고 1시간동안 관찰한 후에 생쥐의 심장에서 채혈하고 혈청을 분리하여 히스타민을 정량하였다.

7) 수동 피부 아나필락시스 (Passive Cutaneous Anaphylaxis)

Anti-IgE antibody-HSA 0.5 g을 함유한 생리식염수를 생쥐의 등의 털을 제거한 부위에 피하주사하여 감작시킨 다음 48시간 후에 꼬리정맥에 DNP-HSA 1 mg과 Evans blue를 1:4로 섞은 생리식염수를 주사하여 항원 항체반응을 유발하였다. Anti-DNP IgE로 감작시킨 비만세포를 Anti-IgE antibody-HSA로 탈감작시키기 1시간 전에 생리식염수로 조제한 다음 SCYT (0.01 ~ 1 g/kg)을 복강투여하고 30분 후에 치사시켰다. Evans blue로 염색된 피부 부위를 잘라 1 M KOH 1 ml를 가하고 하룻밤 동안 방치하여 피부조직을 용해시킨 다음 0.6 M의 인산과 아세트 (5:13)의 혼합액 9 ml를 가하여 진탕추출 한 후 620 nm에서 색소량을 정량하였다.

8) 흰쥐 복강 비만세포 (RPMC)의 분리

Kanemoto 등<sup>35)</sup>의 방법에 따라 분리하였다. 즉 흰쥐를 에테르로 마취 시킨후 실온에서 Tyrode buffer B (137 mM NaCl, 12

mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.7 mM KCl, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5.6 mM dextrose, 0.1% bovine serum albumin) 약 20 ml를 복강내에 주입하고 90 초간 복벽을 가볍게 마사지하였다. 복벽 중앙선을 주의 깊게 절개하고 복강 세척액을 채취하고 원심분리하여 상등액을 분리 제거한 후 비만세포 부유액을 tyrode buffer에 재 부유시켰다. 세포 부유액 1 ml를 22.5 w/v% metrizamide 2 ml에 가하여 원심분리 (400 g, 15분)하였다. 완충액과 metrizamide 접촉면에 남아있는 세포를 수집하여 제거하고 침전된 세포를 사용하였다. 고순도의 복강 비만세포를 얻기 위하여 이 과정을 반복하였고, Toluidine blue로 염색한 결과 95%이상의 비만세포 (약 5×10<sup>5</sup> 세포/개체)를 얻었다.

9) 세포내 cAMP 측정

Peachell 등<sup>36)</sup>의 방법에 따라 실험하였다. 즉 Tyrode buffer에 부유시킨 비만세포에 SCYT를 가하고 세포 배양기에서 배양하였다. 산성화 에탄올 (86% ethanol 0.9 ml:1 M HCl=99:1)을 가하고 혼합하여 반응을 정지시킨 후 액체질소에서 동결시켰다. 이 시료를 녹여서 혼합 후 원심분리 (400 g, 5분)하여 침전물을 제거하고 상등액 0.9 ml를 취해 감압 건조시켰다. 이 건조 시료중의 cAMP함량은 assay buffer 200 μl에 용해시킨 후 Amersham사의 cAMP 정량 kit를 사용하여 측정하였다.

10) 세포내 칼슘 측정

Kim 등<sup>37)</sup>의 방법에 따라 Fura-2/AM (2 μM, Molecular Probes 사)를 사용하여 세포내 칼슘량을 정량하였다. 생쥐 복강 비만세포에 Fura-2/AM를 가하고 37°C에서 30분간 반응시키고, 과량의 Fura-2/AM을 PBS로 세척하여 제거하였다. SCYT를 세포에 투여하고 난 후 10분에 compound 48/80으로 세포를 자극하였고, excitation of 340 nm, emission of 500 nm에서 형광강도를 측정하였다.

3. 통계학적 분석

실험결과는 mean±SEM으로 표시하였고 ANOVA와 Duncan's multiple range tests에 의해 유의성을 검정하여 p<0.05인 결과를 얻었으며 유의성이 있는 것으로 하였다.

성 적

1. 세포의 생태학적 변화 관찰

비만세포인 RBL-2H3 세포주에 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시킨 다음 비만세포가 활성화되면서 세포의 모양과 히스타민의 유리는 상호 밀접한 관계를 가진다. 이에 Anti-IgE antibody-HSA에 의한 세포 모양상의 변화로부터 小靑龍湯(SCYT)의 효과를 검토하기 위하여 RBL-2H3 rat mast 세포주에 미치는 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시키기 전에 SCYT를 농도별로 (1~1000 μg/ml)를 처리하여 감작시켰다. Fig. 1에서와 같이 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시키면 히스타민의 유리나 동시에 대조군에서의 세포모양은 다양하게 막대 내지 육각형이었으나 SCYT 처리군은 농도 의존적으로 정상군과 모양이 유사하거나 세포 사멸을 유도하는 세포수가 증가하였다. SCYT의 비만세포에 대한 독성은 100 μg/ml이상에서부터 나타났으나 그 이

하에서는 나타나지 않았다.

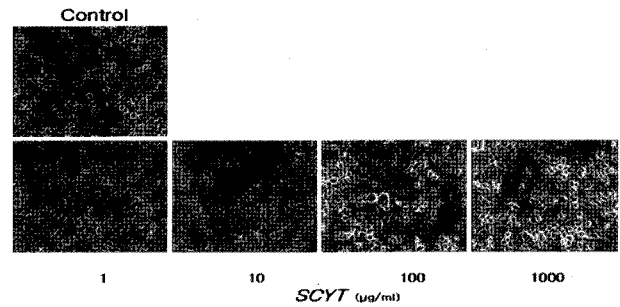


Fig. 1. Morphology of normal and various concentration of SCYT-treated RBL-2H3 mast cells before exposure to Anti-IgE antibody-HSA. Normal RBL-2H3 cells (upper panel), various concentration of SCYT-treated RBL-2H3 cells (lower panel) were evaluated before a thr exposure with Anti-IgE antibody-HSA at 37°C.

2. β-hexosaminidase에 대한 효과

Anti-IgE antibody-HSA로 감작시킨 비만세포에 histamine의 분비에 관여하는 과립체의 β-hexosaminidase 활성화에 대한 SCYT의 효과를 검토하기 위하여 Fig. 2에서처럼 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시키기 전에 SCYT를 세포독성이 없는 범위내에서 (0~100 μg/ml)를 처리하였다. 일반적으로 Ig-E에 의해 탈과립이 일어나는 것은 비만세포의 막표면에 FcεRI활성화로 인해 유도되기 때문에, 따라서 탈과립은 β-hexosaminidase의 활성화를 유도하는데 Fig. 2에서와 같이 정상군에서도 미미하게나마 활성화되고 SCYT만을 처리할 경우에서도 농도 의존적으로 β-hexosaminidase의 활성이 미미하게 나타났다. 대조군에서는 β-hexosaminidase가 약 32±2%인데 반해 0.1, 1, 10, 100 μg/ml SCYT 처리군에서는 각각 29.5±1.5, 20.5±3.5, 17.0±1.5 그리고 8±4.5%였다. 특히 100 μg/ml농도에서는 β-hexosaminidase가 약 8±4.5% 이하로 유의성 있게 억제되었다(p<0.05).

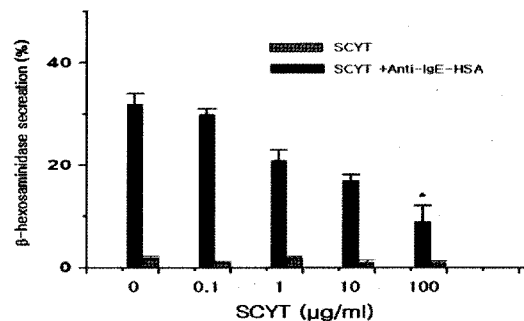


Fig. 2. Effect of SCYT on Anti-IgE antibody-HSA induced degranulation in RBL-2H3 cells. Cells were treated with SCYT and stimulated with antigen (red column) or not stimulated (green column). Error bars represent for SEM. Each data represent the mean±SEM of three independent experiments. \* p<0.05: significantly different from the saline value.

3. Histamine 분비에 대한 효과

RBL-2H3 세포주에 Anti-IgE antibody-HSA에 감작시킨 다음 활성화되면 세포내의 분비물질인 히스타민을 유리하게 되는 데 이때 RBL-2H3 rat mast 세포주의 histamine 분비에 미치는

SCYT의 효과를 검토하기 위하여 Fig. 3에서처럼 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시키고 항원으로 탈감작 시키기 전에 SCYT를 세포독성이 없는 범위내에서 (0~100 µg/ml)를 처리하였다. Fig. 3에서와 같이 정상군은 유리 histamine의 양이 배양 배지내로 약 11±2 ng/ml이고 대조군은 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시킬 경우 약 125±8 ng/ml정도였고 이에 비해 0.1, 1, 10, 100 µg/ml SCYT 처리군에서는 각각 100±10, 48±8.5, 43.0±2 그리고 31±0.5 ng/ml였다. 특히 100 µg/ml농도에서는 histamine의 분비가 약 31±0.5 ng/ml 이하로 유의성 있게 감소하였다(p<0.05).

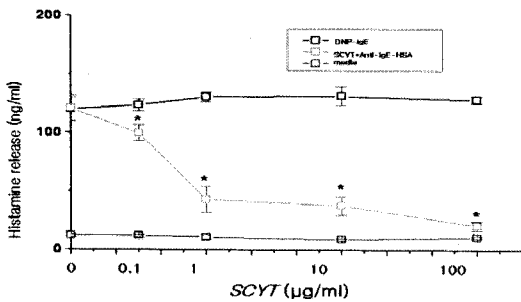


Fig. 3. Effect of SCYT on Anti-IgE antibody-HSA-induced histamine release from RBL-2H3 cells. The cell ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were pretreated with saline or SCYT at 37°C for 1hr prior to challenge with Anti-IgE antibody-HSA. Each data represent the mean±SEM of three independent experiments. \*, p<0.05; significantly different from the saline value.

#### 4. NO 생성에 대한 효과

β-hexosaminidase의 활성화로부터 histamine의 분비 시 세포내의 염증반응과도 연관성이 있으므로 RBL-2H3 rat mast 세포주에 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시킨 후 NO 생성에 대한 SCYT의 효과를 검토하기 위하여 Fig. 4에서처럼 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시키고 항원으로 탈감작 시키기 전에 SCYT를 세포독성이 없는 100 µg/ml를 처리하였다. 정상군은 유리 NO 생성이 배양 배지내로 미미하게 약 2~5%정도 유리되지만 대조군은 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시킬 경우 약 1시간 후에는 약 97±3%였고 이에 비해 SCYT군을 처리할 경우 1시간대부터 67±9.5%, 2시간대에는 40±1.5%, 3시간대에는 20±0.2%, 4시간대에서는 15±4.5%정도였다. 특히 1시간대부터 약 67±9.5%로 유의성 있게 감소하였다(p<0.05).

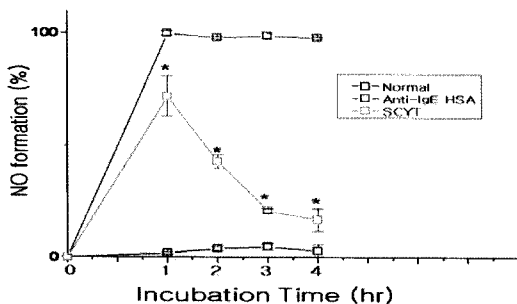


Fig. 4. Effect of various concentration of SCYT on NO formation by Anti-IgE antibody-HSA in RBL-2H3 cells. NO formation by Anti-IgE antibody-HSA was determined in vehicle or the presence and absence of SCYT. Each data represent the mean±SEM of three independent experiments. \*, p<0.05; significantly different from the saline value.

#### 5. cAMP 생성에 대한 효과

IgE의 자극으로 cAMP의 생성을 유도하여 히스타민의 유리를 조절하는지를 확인하기 위해 비만세포인 RBL-2H3 rat mast 세포주에 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시키기 전에 SCYT(100 µg/ml)를 일정농도로 처리한 다음 감작 후 세포내 cAMP 농도를 측정하여 비만세포에서의 히스타민 유리 억제 효과에 대한 기전을 검토하였다. 비만세포에 SCYT를 가하고 배양하였을 시 Fig. 5에서처럼 SCYT과 Anti-IgE antibody-HSA를 처리시 비만세포의 세포내 cAMP의 증가는 순간적으로 cAMP의 증가를 유도하는데 정상군의 배지내 존재하는 cAMP의 양은 대체적으로 약 4±0.5 fmol이었으나 실험군에서의 비만세포의 세포내 cAMP의 양은 0.5분대에 약 425±35 fmol, 1분대에는 약 275±6 fmol, 2분대에는 약 110±1 fmol, 그리고 3분대에는 약 65±1 fmol정도였다. 따라서 Anti-IgE antibody-HSA와 SCYT를 처리시 비만세포의 cAMP는 0.5분 후에 최고치였으며 약 1분대와 2분대에 감소하기 시작하여 3분대에는 유의성 있게 감소하였다(p<0.05).

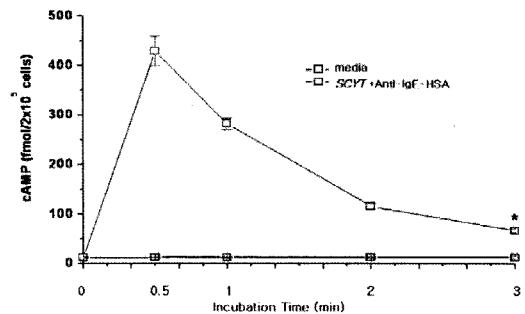


Fig. 5. Effect of SCYT on Anti-IgE antibody-HSA-induced cAMP content in RBL-2H3 cells. RBL-2H3 ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were pretreated with saline or SCYT at 37°C (0.5, 1, 2, 3 min). Each data represent the mean±SEM of three independent experiments. p<0.05; significantly different from the saline value.

#### 6. 칼슘(Ca<sup>2+</sup>) 농도에 대한 효과

다른 외부자극으로 비만세포인 RBL-2H3 rat mast 세포주에 compound 48/80로 감작시킨 후 SCYT에 의한 비만세포에서의 세포내 칼슘 농도를 측정하여 히스타민 유리 억제 효과에 대한 분석을 수행하였다. Fig. 6에서처럼 정상군에서는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 증가가 약 47±2인데 비해 compound 48/80만 처리한 대조군은 약 246±5이고 compound 48/80와 SCYT 처리시 약 52±4로 유의성 있게 감소하였다(p<0.05).

#### 7. Pro-inflammatory cytokine 분비에 대한 효과

세포내에 발현되는 염증반응 단백질인 TNF-α와 IL-6의 발현 양상을 알아보기 위해 Fig. 7에서처럼 비만세포인 RBL-2H3 rat mast 세포주에 SCYT와 PMA(20 nM) and A23187(1 µM)를 처리시 비만세포의 TNF-α와 IL-6분비량을 분석하였다. PMA(20 nM) and A23187(1 µM)로 감작시킨 대조군의 경우 TNF-α양은 약 2.4±0.5 ng/ml 정도였으나 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/ml SCYT 처리군에서는 각각 2.15±0.2, 1.4±0.2, 0.9±1.2 그리고 0.6±0.11 ng/ml로 농도 의존적으로 분비를 억제했다. 특히 0.1와 1 mg/ml 농도에서는 TNF-α양 분비를 유의성 있게 억제하였다(p<0.05). IL-6양

은 대조군에서는 약  $1.4 \pm 0.12$  ng/ml 정도였으나 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/ml SCYT 처리군에서는 각각  $1.3 \pm 0.05$ ,  $0.8 \pm 0.1$ ,  $0.6 \pm 0.1$  그리고  $0.4 \pm 0.01$  ng/ml 였다. 특히 0.1와 1 mg/ml SCYT 농도에서는 IL-6양 분비를 유의성 있게 억제하였다( $p < 0.05$ ).

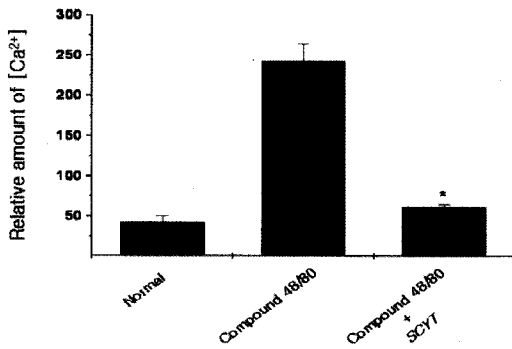


Fig. 6. Effect of SCYT on intracellular calcium in RPMC cells from mice. RPMC were pretreated for 10 min with SCYT (1 mg/ml) before adding compound 48/80, and then another 10 min with compound 48/80. Each data represents to the mean±SEM of three independent experiments. \* Significantly different from the compound 48/80 value. P<0.05: significantly different from the saline value.

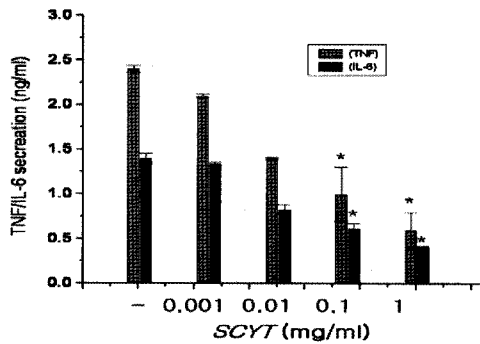


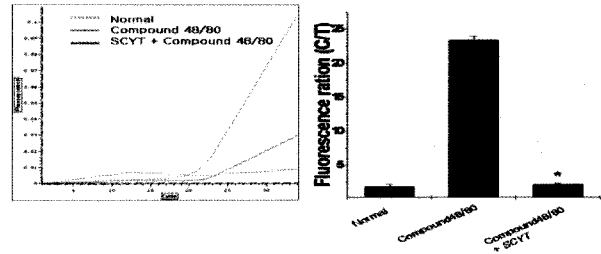
Fig. 7. Effect of SCYT on the pro-inflammatory cytokine secretion. PMA(20 nM) and A23187(1 μM)-induced RBL-2H3 cells incubated for 24 hr in the absence or presence of SCYT. TNF-α and IL-6 secreted into medium are presented as the mean±S.E.M of the three independent experiments. \* p<0.05: significantly different from the saline value.

### 8. mRNA 발현량 분석을 위한 Q-PCR에서의 효과분석

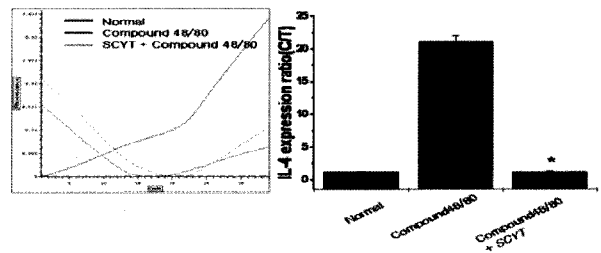
비만세포인 RBL-2H3 rat mast 세포주에 compound 48/80을 1hr동안 자극하여 세포내에 발현되는 알레르기 반응에 관여하는 IL-4, IL-13, 그리고 염증반응에 관여하는 TNF-α, IL-6 그리고 GM-CSF의 mRNA 발현량을 분석하기 위해 Fig. 8에서처럼 SYBR Green qPCR (FINNZYMES사)의 kit를 적용하여 real time PCR를 수행하였다. 우선 알레르기 반응에 관여하는 IL-4는 대조군에서는 상대적인 발현량(C/T)값이 약  $23 \pm 2$ 인데 비해 SCYT 처리군은 약 10배정도 감소하는 경향을 보였고 IL-13는 대조군에서는 상대적인 발현량(C/T)값이 약  $22 \pm 4$ 인데 비해 SCYT 처리군은 약 11배정도 감소하는 경향을 보였다. 또한 염증반응에 관여하는 TNF-α는 대조군에 비해 SCYT는 15배, IL-6에서는 대조군에 비해 SCYT는 12배가 그리고 GM-CSF에서는 대조군에 비해 SCYT가 약 17배정도 감소하였다. 따라서 SCYT가 비만세포인 RBL-2H3 rat mast 세포주에 compound 48/80을 감작시키고 발현되는 mRNA의 양을 모두 억제하는 경향을 보였는

데 이는 염증반응 단백질인 TNF-α와 IL-6의 발현하는 비만세포인 RBL-2H3 rat mast 세포주에 SCYT가 강하게 억제하여 비만세포의 TNF-α와 IL-6분비량을 감소시키는 전자의 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 특히 SCYT가 0.1 mg/ml농도 범위에서 유의성을 보였다(P<0.05).

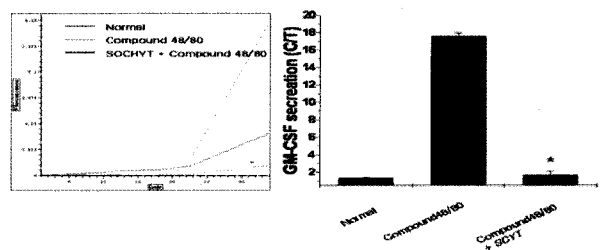
#### a) IL4



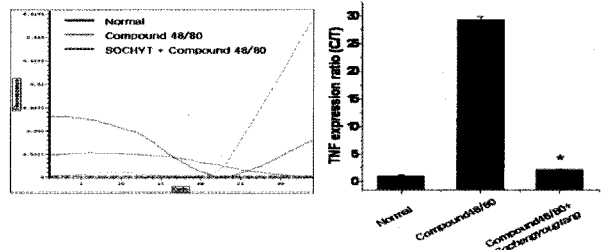
#### b) IL13



#### c) GM-CSF



#### d) TNF



#### e) IL6

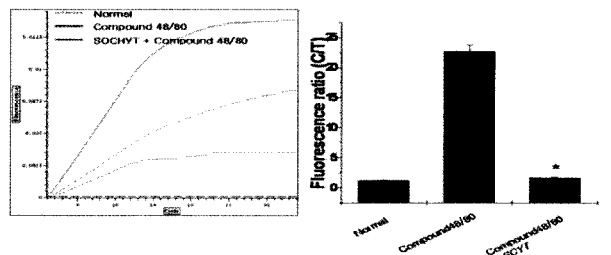


Fig. 8. Q-PCR analysis of transcript levels of compound 48/80 induced genes. RBL-2H3 mast cells were exposed to an compound 48/80 for 1hr, and RNA was isolated. A, target genes include (a) IL4, (b) IL-13, (c) GM-CSF, (d) TNF and (e) IL-6.

9. Compound 48/80로 유도된 전신성 아나필락시스(Systematic anaphylaxis)에 대한 효과

즉시형 과민반응에 대한 SCYT의 효과를 검토하기 위하여 비면역학적 자극물질인 compound 48/80을 사용하여 전신성 아나필락시스를 유도하였는데 치사율은 compound 48/80 (8 mg/kg)을 생쥐에 투여한 후 1시간 동안 관찰하여 결정하였다. Fig. 9a에서처럼 생리식염수를 투여한 대조군은 100% 치사율을 나타낸 반면, compound 48/80을 투여하기 1시간 전에 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/kg SCYT 처리군에서는 각각 100, 100, 99±1, 85±3, 68±2, 55±2, 그리고 22±1%로 농도 의존적으로 치사율이 감소하였다. 특히 0.5 mg/kg 농도에서는 치사율이 50~55% 이하이므로 치사율이 유의성 있게 감소하였다(p<0.05). 그리고 SCYT의 투여에 의한 전신성 아나필락시가 억제됨으로 혈청 중 히스타민의 양을 측정하여 SCYT의 효과를 검토하기 위하여 Compound 48/80을 투여하고 치사율 실험이 끝난 후 심장에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 히스타민 양을 측정하였다. Fig. 9b에서처럼 SCYT에 의한 혈청 중 히스타민의 유리는 compound 48/80에 의해 유도된 아나필락시스 반응과 유사한 양상으로 대조군에서는 histamine 분비량이 약 97±3 ng/ml인데 비해 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/Kg SCYT 처리군에서는 각각 71±4, 50±2, 30±1, 18±1 그리고 7±3 ng/ml로 특히 1 mg/Kg SCYT 처리시 유의성 있게 감소하였다(p<0.05).

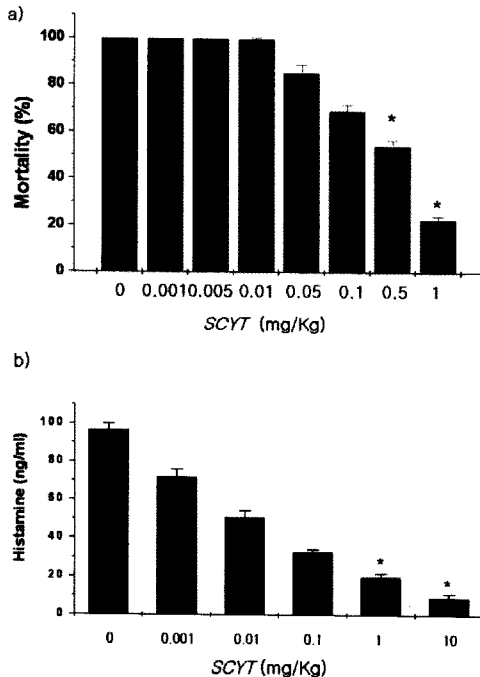
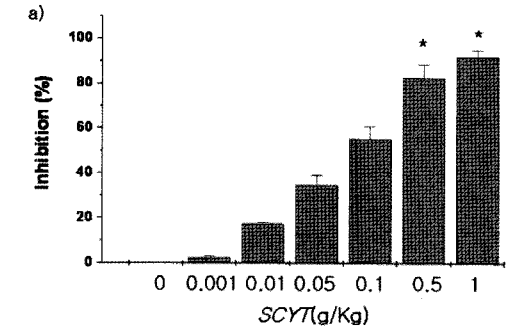


Fig. 9. Effect of SCYT on the compound 48/80-induced Systematic anaphylaxis. (a) Groups of mice (n=6/group) were intraperitoneally pretreated with 200  $\mu$ l saline or SCYT. SCYT was given with various doses 1 hr before the compound 48/80 injection. The compound 48/80 solution was intraperitoneally given to the group of mice. Mortality (%) within 1 h following compound 48/80 injection is represented as the number of dead Mice  $\times$ 100/total number of experimental mice. (b) The blood was obtained from the heart of each mouse of each mouse and histamine content was measured by spectrofluorometer.

10. 24시간 PCA(수동 피부 아나필락시스)에 대한 효과

수동 피부 아나필락시스 반응에 미치는 SCYT의 영향을 알아보기 위해 Anti-IgE antibody-HSA와 Evans blue의 혼합액을 투여하기 1시간 전에 SCYT를 복강 투여하였다. Fig. 10a에서처럼 수동 피부아나필락시스 반응은 대조군에 비해 0, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/Kg의 SCYT 처리시 2±0.5, 17.5±2.5, 35±4, 55±6.5, 82.5±7, 92±3%로 농도 의존적으로 억제하였는데, 특히 0.5 mg/Kg SCYT 처리군에서 유의성 있게 억제하였다(p<0.05). 또한 Fig. 10b에서처럼 수동피부 아나필락시스반응(PCA)는 파랑색의 반응을 나타낸 대조군에 비해 월등히 녹색 내지 파랑색의 반응이 감소하였다.



b)

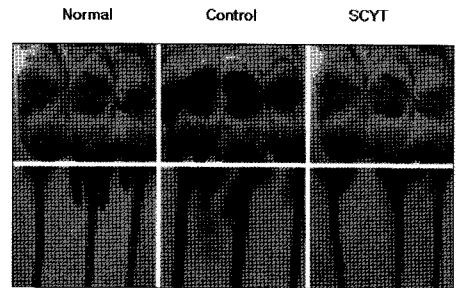


Fig. 10. Effect of SCYT on 24 h passive cutaneous anaphylaxis. SCYT was orally administered 1 h prior to the challenge with antigen. (a) Inhibitory effect of various concentration of SCYT on the passive cutaneous anaphylaxis by antigen and (b) Effect of SCYT on the 24 hr PCA response. Each data represents to the mean±SEM of three independent experiments. \* p<0.05: significantly different from the saline value.

11. 생쥐의 복강 비만세포(RPMC)에서 히스타민 분비에 대한 효과

생쥐의 복강 비만세포에 미치는 SCYT의 효과를 검토하기 위하여 Anti-IgE antibody-HSA를 투여하기 10분전에 SCYT를 0.001~1 mg/ml의 농도로 처리하였다. Fig. 11에서처럼 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 그리고 1 mg/ml SCYT 농도로 처리시 각각 3±0.5, 110.5±9, 96±4, 80±6.5, 38±2, 16.5±2.5, 10.5±1, 3.1±0.5ng/ml 으로 비만세포에서의 Anti-IgE antibody-HSA에 의한 히스타민의 유리는 농도 의존적으로 억제하였다. 즉, 0.1 mg/ml의 SCYT 농도 이상에서 유의성 있는 억제효과를 나타내었다(P<0.05).

12. 생쥐의 복강 비만세포(RPMC)에서 cAMP에 대한 효과

생쥐의 복강 비만세포에 SCYT를 가하고 배양하였을 시 Table 3에서처럼 cAMP의 증가는 순간적이었으며 최고치가 0.5

분대에서 SCYT를 처리 전에 비해 약 3배정도였으나 처리 후에 약 2분대 이상에서 최저치로 감소하였는데, 특히 SCYT을 첨가한 후 30초 후에 정점에 이르다가 5분대에서 가장 유의성 있는 감소하는 경향을 보였다.

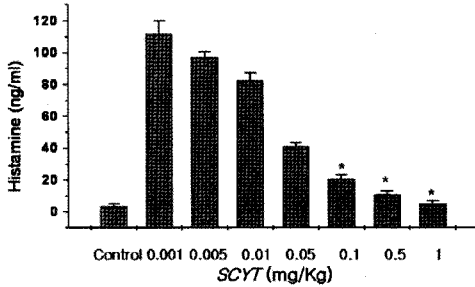


Fig. 11. Effect of SCYT on IgE-induced histamine release in RPMC cells from mice. Plasma histamine during passive cutaneous anaphylaxis by Anti-IgE antibody-HSA was evaluated as described under "Experimental Procedures". SCYT was orally administered 1 h prior to the challenge with antigen. Each data represents to the mean±SEM of three independent experiments. \* p<0.05: significantly different from the saline value.

Table 3. Effect of SCYT on cAMP in RPMC. Cells were treated with SCYT(1mg/ml) for indicated time at 37°C

SCYT treatment(mg/ml)	Incubation time(min)	cAMP content(p mol)
None(saline)	0	2.553±0.213
1	0.5	7.125±1.436
	1	4.231±0.533
	2	3.556±0.376
	5	3.314±0.345*

Each data represents to the mean±SEM of three independent experiments. \* p<0.05: significantly different from the saline value.

## 고찰

인간은 자연환경에 따라 영향을 받으며 생활하기 때문에 서로가 불가분의 관계에 있다. 그러므로 외부 변화에 따라 생체 반응이 일으키게 된다. 그중 간단하고 미세한 물질일 때는 생화학적인 반응에 의하여 처리되지만 보다 큰 세포와 같은 물질일 경우 면역반응에 의하여 처리되는데, 면역반응의 결과가 숙주에 대하여 유익할 때를 면역성이라 하고 해로운 때를 과민성(hypersensitivity) 혹은 알레르기라 한다<sup>38,39</sup>.

알레르기 반응은 시간적 경과와 초기의 주요한 양상에 따라 즉시형, 면역 복합체형 및 지연형 반응 등 몇가지로 분류되며, 보통 알레르기라고 불리는 제 I형 anaphylaxis는 일정한 항원에 대하여 이미 감작된 개체에 부착되어 있는 항체에 항원이 결합한 후 수분 내에 일어나는 즉시형 반응이다<sup>40</sup>.

알레르기 반응으로 발병되는 질환으로는 알레르기 비염, 두드러기, 식품알레르기, 곤충알레르기, 접촉성 피부염, 아토피 피부염, 알레르기 안질환 등이 대표적이며, 가장 많은 비율을 차지하는 것이 알레르기성 비염, 아토피성 피부염이다<sup>3</sup>. 알레르기 반응에 영향을 주는 요인으로는 유전 및 특이체질, 자율신경, 호르몬, 심리적요인, 연령, 대기오염과 기후 및 계절 등이 있으며<sup>41,42</sup>, 우리나라 인구의 약 12~20% 정도가 알레르기 반응을 보이는 것으

로 알려져 있다<sup>19</sup>.

알레르기성 비염은 비폐색, 수양성 비루, 재채기 및 코나 눈의 소양감을 특징으로 하는 면역질환으로 흡인성 항원과 식이성 항원에 대한 민감한 반응이 주된 원인이며 온도나 습도 중의 외부 기후조건, 비강내의 해부학적 구조 및 정신적 스트레스 등이 중요한 유발인자로 작용하고 있다<sup>43</sup>. 이러한 알레르기성 비염은 IgE에 의해 유발되는 면역반응으로 생각되고 계절성 알레르기성 비염과 통년성 알레르기성 비염으로 분류되며 세계적으로 증가되는 추세이다<sup>44</sup>.

알레르기 비염은 한의학적 병명으로 鼻飢, 噴嚏, 鼻涕 등에 해당하며<sup>8,45</sup> 《東醫寶鑑》<sup>46</sup>에서의 개념규정을 보면 “飢者 鼻流涕也”, “傷風, 則決然鼻流涕也”, “鼻流涕者, 屬肺寒也”라 하여 맑은 콧물이 나오는 병을 鼻飢라 하였고 이는 風邪에 傷하거나, 肺가 차기 때문이라 하였으며, 처방으로는 二陳湯 加味方, 川椒散, 細辛膏 등을 소개하였다. 한의학적 병인을 보면 肺氣가 허약하여 痰理가 不暢한 상태에서 寒邪가 침범하여 內鬱되었거나 生冷한 음식물에 손상을 받아 寒邪가 속에 쌓여서 유발되는 것이다<sup>41</sup>.

아토피 피부염은 흥반, 부종, 심한 소양증, 삼출과 부스럼 딱지를 특징으로 하고 급성기에는 표피 내에 수포를 형성하며 만성기에는 인설과 피부의 비후가 생기는 피부염증을 말하는 것으로<sup>47,48</sup>, 한의학에서는 胎熱, 奶癩, 小兒濕疹, 胎敏瘡, 四彎風이 속한다<sup>8</sup>.

본 실험에 사용된 小青龍湯은 漢代의 張<sup>22</sup>의 《傷寒論》에서 처음으로 수록된 처방으로 解表散寒하고 溫肺化飲하는 효능이 있어 外感風寒으로 水飲이 內停하게 되어 惡寒發熱하나 渴症이 나지 않고 無汗하며 浮腫, 身體疼重, 胸痞, 乾嘔, 咳喘하고 脈浮한 증상을 치료한다<sup>23</sup>. 또한 小青龍湯 方中 麻黃, 桂枝는 發汗解表, 宣肺平喘하며 白芍藥은 桂枝와 합하여 調和營衛하고 細辛, 乾薑은 內로는 溫肺化飲하고 外로는 辛散風寒하며 五味子是 溫斂肺氣하여 止咳하고 아울러 肺氣의 耗散을 防止 하며 半夏는 燥濕化痰蠲飲降濁하고 炙甘草는 調和諸藥하며 芍藥과 배합하여 酸甘으로 化陰하고 麻黃, 桂枝의 辛酸太過를 緩和시켜주는 작용이 있다<sup>49-51</sup>.

한편 비만세포(mast cell)는 피부, 호흡기, 림프관 주위, 혈관 주위, 위장관의 점막, 뇌 등 전신의 장기에 분포하고 있으며 천식이나 알레르기성 비염과 같은 알레르기 반응을 매개하는 중요한 세포이다. 비만세포로부터 히스타민의 유리는 즉시형 알레르기 반응의 병리학적 진행과정에서 필수적인 단계인데 비만세포 표면에 존재하는 면역글로블린 E (IgE)의 수용체인 FcεRI에 항원이 결합하여 유발되는 비만세포 활성화에 의해 히스타민이 유리된다.

비만세포가 활성화되면 비만세포는 탈과립 되고 또한 아라키돈산 대사물질과 염증반응을 유발하는 다양한 사이토카인이 분비된다<sup>3</sup>. 비만세포에서 분비되는 다양한 염증 유발물질 중 히스타민은 즉시형 과민성 반응을 유발하는 가장 강력한 생리 활성물질로 알려져 있다<sup>3</sup>. 특히 비만세포의 탈과립 반응은 IgE 수용체를 통한 자극 이외에도 칼슘 ionophore, codeine, 합성 부신 피질호르몬, compound 48/80과 같은 약리학적 복합물에 의한 자극 등이 있다<sup>3</sup>.

Compound 48/80은 비만세포내의 칼슘 수준을 증가시켜 아



나필라시 반응을 일으키는데 가장 많이 사용되고 있으며<sup>6)</sup>, 이러한 비만세포의 탈과립을 유도하는 자극에 의해 세포내 과립에 저장되어 있는 히스타민 등의 화학적 매개물질이 유리되고 그 결과 말초혈관에 대한 투과성 항진과 확장작용, 점막작용에 대한 선세포의 분비 항진작용, 기관지 평활근에 대한 수축작용 등을 일으켜 알레르기 반응이 발현된다<sup>52)</sup>. 비만세포의 활성화 후 유발되는 탈과립 과정의 신호전달경로에 대해서는 지금까지 많은 연구가 진행되었는데 특히 tyrosinase kinase의 인산화와 칼슘의 세포내 유입이 중요하다. 또한 비만세포에서의 히스타민의 유리에는 cAMP가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>7)</sup>.

아나필라시는 비만세포로부터 히스타민, 헤파린, 염증 유발성 사이토카인과 같은 염증 매개물질이 급격하게 전신적으로 유리됨으로써 발생하는 증상이다. Compound 48/80이나 IgE에 의한 비만세포가 활성화되면 다음 단계의 신호전달 경로가 활성화되어 과립내에 저장되어 있는 히스타민이 유리된다. Compound 48/80 및 다염기성 화합물들은 직접적으로 G-protein을 활성화시킬 수 있으며 이 활성화는 benzalkonium chloride에 의해 억제될 수 있다. 최근의 연구는 비만세포가 활성화 되는 동안 칼슘 유입에 대한 염소 채널 (Cl channel)의 활성화로 염소의 유입과 전도성이 증가하여 과분극이 약간 일어나 활동전위를 방해함으로써 염소 채널의 개방회수를 증가시킨다는 중요성을 강조하고 있다. 항알레르기 약물인 neocromil sodium이 배양 점막형 비만세포에서 염소 채널을 차단할 수 있음이 밝혀져 있으며 염소 채널은 비만세포로부터 화학적 매개물질의 유리를 위한 촉발인자가 될 수 있다. 결국 compound 48/80은 비만세포의 세포질 내로 칼슘의 유입을 증가시켜 혈관 자동성 아민을 유리하는 물질이므로 전신성 아나필라시는 이러한 기전과 관계가 깊은 것으로 사료되며 신호전달 과정의 활성화 기전은 compound 48/80이 직접 G-protein을 활성화 한다는 이론이 증명되고 있다<sup>53)</sup>.

본 연구에서는 Anti-IgE antibody-HSA 감작에 의한 세포모양의 변화뿐만 아니라 히스타민 분비에 관여하는  $\beta$ -hexosaminidase, NO, Pro-inflammatory cytokine 등에서의 小靑龍湯의 효과를 알아보았고, compound 48/80으로 유발된 전신성 아나필라시, 국소성 아나필라시 및 마우스 복강 비만세포로부터 히스타민의 유리에 미치는 小靑龍湯의 영향을 분석하였으며, 세포내 칼슘과 cAMP의 양을 측정하여 히스타민 유리에 대한 이들의 작용기전을 검토하였다.

비만세포인 RBL-2H3 세포주에 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시키면 히스타민의 유리와 동시에 대조군에서의 세포모양은 대체로 막대 내지 육각형 이었으나, 小靑龍湯으로 처리하면 농도 의존적으로 정상군과 모양이 유사하거나 세포 사멸을 유도하는 세포수가 증가한 것을 볼 수 있는데(Fig. 1) 이는 小靑龍湯이 비만세포에 대한 독성을 가진 것을 알 수 있다.

또한 histamine 자체 분비와 이에 관여하는 과립체의  $\beta$ -hexosaminidase를 小靑龍湯이 농도 의존적으로 유의성 있게 억제할 뿐만 아니라, NO 생성도 억제하여 탈과립(degranulation)의 생성을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 2, 3, 4).

상기의 결과가 cAMP의 증가에 기인한 것인지 염증반응에

관여하는 COX2에 기인한 것인지를 확인하기 위해 세포내 cAMP의 농도를 측정하여 비만세포에서의 히스타민 유리 억제 효과에 대한 기전을 검토한 결과, Fig. 5에서처럼 0.5분 후에 최고치였으며 약 1분대와 2분대에 감소하기 시작 하여 3분대에는 유의성 있게 감소한 것으로 나타나, 小靑龍湯이 compound 48/80과 세포막의 표면 수용체로 유입하기 전에 비만세포 cAMP의 증가를 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다.

세포막의 cAMP의 증가로 인해 PKA가 활성화될 것으로 예측되고 이로 인해  $Ca^{2+}$ 의 증가를 유도하여 히스타민의 분비를 조절한다. 다른 외부자극으로 비만세포인 RBL-2H3 rat mast 세포주에 혈관투과성과 염증반응에 관여하는 제1형의 IgE과 달리 외부자극에 의해 hyaluronidase를 활성화 하는 금속이온과 N-methyl-p-methoxyphenethylamine, formaldehyde의 중합체인 compound 48/80로 감작시킨 후 小靑龍湯에 의한 비만세포에서의 세포내 칼슘 농도를 측정하여 히스타민 유리 억제효과를 분석한 결과,  $Ca^{2+}$  농도도 小靑龍湯이 감소시키는 것으로 나타나 결국 小靑龍湯이 비만세포의 cAMP의 증가를 억제하거나 PKA의 활성화 내지 hyaluronidase를 저해하여  $Ca^{2+}$ 를 감소시켜 비만세포의 histamine 유리를 억제한다는 것을 알 수 있다(Fig. 5, 6).

외부자극에 의해 유도되는 histamine의 분비에서처럼 면역 사이토카인의 분비도 PMA(20 nM)와 A23187(1  $\mu$ M)를 자극하여 비만세포인 RBL-2H3 rat mast 세포주로부터 발현되어 분비된다. 세포내에 발현되는 원염증반응 단백질인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 발현 양상을 알아본 결과, 小靑龍湯이 농도 의존적으로 억제하였으며(Fig. 7), 알레르기 반응에 관여하는 IL-4, IL-13, 그리고 염증반응에 관여하는 TNF- $\alpha$ , IL-6 그리고 GM-CSF의 mRNA 발현량의 real time PCR에서도 의미있는 억제를 보여 알레르기 반응을 억제하는 효과가 있음을 보여주었다(Fig. 8a-e).

또한 비만세포에서 히스타민을 유리시키는 대표적 화학물질인 compound 48/805, 6)에 의한 치사율과 혈청 분리에 의한 히스타민 분비량을 분석한 결과 농도 의존적으로 치사율이 감소하였고 혈청 중 히스타민의 유리도 유사하게 감소하였는데 이는 小靑龍湯이 히스타민 등 화학적 매개 물질의 유리를 억제하는 효과가 있음을 나타내는 것으로 사료된다(Fig. 9a, b).

수동 피부아나필라시 반응과 생쥐의 복강 비만세포(RPMC)에서도 대조군에 비해 小靑龍湯을 처리한 군이 농도 의존적으로 억제되었고(Fig. 10a, Table 3), 파랑색의 반응을 나타낸 대조군에 비해 월등히 녹색 내지 파랑색이 감소하는 반응을 보이는데 小靑龍湯이 알레르기 반응을 억제하는 효과가 있음을 시사하고 있는 것이다(Fig. 10b)

이상의 결과에서와 같이 小靑龍湯은 이러한 반응에 효과를 나타냄으로써 즉시형 알레르기 반응에 대한 중요한 임상적 의의를 갖는다고 할 수 있다. SCYT는 IgE 매개 수동 피부 아나필라시 반응을 억제하였고(Fig. 10a, b), Fc $\epsilon$ RI를 경유하는 비만세포의 자극은 다양한 매개물질의 분비를 일으키며 이러한 매개물질들은 즉시형 또는 지연형 알레르기 반응을 유도한다. 小靑龍湯은 피부에서 세포막의 유동성을 안정화시켜 비만세포의 탈과립을 조절하는 작용이 있을 것으로 사료된다. 한편 생쥐 복강 비만세

포에서 cAMP를 증가시키는 약물은 화학적 매개물질의 유리를 억제하는데 이는 adenylyl cyclase의 활성화나 cAMP phosphodiesterase의 억제에 기인하며, cAMP의 증가는 비만세포의 탈과립을 억제한다고 알려져 있지만 이는 catecholamines과 methylxanthines 같은 cAMP의 활성약물들에 의해 항원으로부터 histamine의 분비를 억제한 것과 상반된 결과이며<sup>54)</sup>, 다수의 생약에 대하여 항알레르기 작용과 cAMP의 양의 증가에 대한 상관 관계측면에서 본 연구는 기존의 보고와 상반된 결과로 나타나 향후 이에 대한 보완 연구가 더 필요할 것으로 사료된다<sup>55)</sup>.

또한 disodium cromoglycate (DSCG)는 잘 알려진 비만세포 활성화 억제제로 비만세포 유래의 알레르기 반응을 억제하는 약물의 효능을 검색하는데 있어 대조약물로 이용된다<sup>56)</sup>. DSCG와 같은 대조약물과의 비교실험이 필요하다고 사료되며 이에 대한 추가실험이 향후 병행연구가 진행해야 할 것이다.

이상의 實驗 結果를 綜合해 볼 때 Anti-IgE antibody-HSA 또는 compound48/80으로 유도된 RBL-2H3 비만 세포주와 흰쥐 복강비만세포에서 小青龍湯이 histamine 분비에 관여하는  $\beta$ -hexosaminidase, NO, TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 Pro-inflammatory cytokine 분비를 억제하고, 세포내 칼슘과 cAMP의 양도 감소시켜 histamine의 분비를 억제하는 항알레르기 효과가 있는 것으로 나타나, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 천식에 관한 면역 질환에서 의미있는 치료제로 활용가능 할 것으로 사료되며, 추후 비만세포 활성화 억제제인 DSCG과 비교실험을 통하여 효과를 재확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 결론

RBL-2H3 비만세포와 동물병태모델에서 小青龍湯의 항알레르기 효과를 연구한 결과는 다음과 같은 결론을 얻었다.

RBL-2H3 비만세포주에 Anti-IgE antibody-HSA로 감작시킨 후 세포모양을 관찰한 결과 대조군에서는 다양한 막대 내지 육각형 모양이었으나 小青龍湯군 처리시 농도 의존적으로 세포 사멸을 유도하는 모양의 세포수가 증가하였다. 小青龍湯은  $\beta$ -hexosaminidase의 활성을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰고, 또한 NO의 생성도와 cAMP의 양과  $Ca^{2+}$  농도를 감소시켜 histamine의 분비를 억제하였다. 小青龍湯은 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 분비를 0.1 mg이상에서 유의성 있게 감소시켰다. 小青龍湯은 Q-PCR에서 IL-4, IL-6, IL-13, GM-CSF 그리고 TNF- $\alpha$  분비를 각각 10배, 12배, 11배, 17배 그리고 15배정도로 유의성 있게 억제하였다. 小青龍湯은 전신이나필라시에서는 1 mg이상에서, 수동 피부아나필라시에서는 0.1 mg이상에서 유의성 있게 histamine 분비를 감소시켰다. 小青龍湯은 생쥐의 복강 비만세포에서 히스타민의 유리를 농도 의존적으로 억제하였으며, 0.1 mg/ml 농도 이상에서 유의성 있게 억제하였다. 小青龍湯은 생쥐의 복강 비만세포에서 cAMP를 시간이 지남에 따라 유의성있게 감소시켰다.

이상의 결과와 같은 小青龍湯의 항알레르기 효과는 문헌적, 임상적 활용과 일치하는 실험적 결과를 보여주는 것으로 小青龍湯이 비만세포를 매개로 하는 즉시형 알레르기 반응의 예방과

치료에 기여 할 수 있을 것으로 사료되며, 향후 이에 대한 심층적이고 체계적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행됨.

## 참고문헌

1. 채병윤. 한방안이비인후과학. 집문당, 서울, pp 45-252, 321-326. 1989.
2. 타다 토미오 저, 황상의 역: 면역의 의미론. 서울, 한울, pp 145-148, 1998.
3. 이계희. 알레르기 질환에 관한 유병률 조사. 대구산업전문대학 논문집 11집, pp 95-105, 1997.
4. Metcalfe, D.D., Kaliner, M. and Donlon, M.A. The mast cell. Crit. Rev. Immunol. 3: 23, 1981.
5. Peterson, L.J., Mosbech, H. and Skov, P.S. Allergen-induced histamine release in intact human skin in vivo assessed by skin microdialysis technique: Characterization of factors influencing histamine releasability., J. Allergy Clin. Immunol. 97: 672-679, 1996.
6. Lagunof, D., Martin, T.W. and Read, G. Agents that release histamine from mast cells. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23: 331-351, 1983.
7. Alm, P.E. Modulation of mast cell cAMP levels. A regulatory function of calmodulin, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 75: 375, 1984.
8. 강병수. 한방임상 알레르기, 성보사, pp 10, 19, 22-23, 189-210, 1988.
9. 박진구. 여택통기탕과 여택통기탕가미방의 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 경희대학교대학원(석사), 2000.
10. 최은성, 채병윤. 신이산과 신이산 가미방의 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 동의학회지 3(1):31-47, 1999.
11. 이영규, 채병윤: 신이청폐음의 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구. 대한외관과학회지 13(2):165-181, 2000.
12. 양태규, 김윤범, 채병윤. 갈근탕과 가미갈근탕의 항알레르기 및 소염 해열 진통작용에 대한 실험적 연구. 대한외관과학회지 15(1):76-95, 2002.
13. 한희철. 천초산과 가미천초산의 항알레르기 효과 및 진통 해열작용에 대한 실험적 연구. 경희대학교대학원(석사), 2000.
14. 김정진, 양성완, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 항염증 효과와 止痒膏의 아토피피부염 손상 및 止痒효과에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(3):428-435, 2003.
15. 은재순, 이동희, 전용근, 권영안, 권진. 가미청비음이 면역반응에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 18(5):1391-1396, 2004.
16. 이태영, 강희, 명유진, 심범상, 최승훈, 김성훈, 안규석. The effect of Bojunggikatang-Chunbang on Activity of CD4+

- Tcell. 동의생리병리학회지 18(2):580-585, 2004.
17. Suzuki, T., Takano, I., Nagai, F., Ushiyama, K., Okubo, T., Seto, T., Ikeda, S., Kano, I. Suppressive effects of Hochu-ekki-to, a traditional Chinese medicine on IgE production and histamine release in mice immunized with ovalubumin. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 1180-1184, 1999.
  18. 盧炳圭, 辛民敎, 宋昊堧. 어성초 추출물의 항알레르기 효과에 관한 연구. *대한본초학회지* 13(2):77-89, 1998.
  19. 최옥범. 머위(*Petasites Japonicum*) 추출물의 항알레르기 효과. *한국식품영양학회지* 15(4):382-385, 2002.
  20. 강희, 김윤범, 안규석. 황기의 알러지비염 동물실험에 대한 면역조절 효과. *동의생리병리학회지* 19(3):612-617, 2005.
  21. 권미화, 이진용, 김덕곤. 紫草가 항알러지 염증반응에 미치는 영향. *大韓韓醫學會誌* 26(3):110-123, 2005.
  22. 張仲景. 仲景全書. 서울, 대성문화사, pp 142-144, 1989.
  23. 이상인, 김동걸, 이영중, 노승현, 주영승. 방제학. 서울, 영림사, pp 50-52, 1990.
  24. 金基昌. 소청룡탕의 진통, 항경련 및 환취의 폐손상에 미치는 영향. 서울, 경희대학교 대학원(석사), 1984.
  25. 안철, 채병윤, 소청룡탕의 효능에 관한 실험적 연구. *대한외과과학회지* 1(1):25-38, 1988.
  26. 이준우, 정희재, 정승기, 이형구. 소청룡탕이 알레르기 천식 모델 환취의 BALF내 면역세포에 미치는 영향. *경희의학*, 17(2):242-253, 2001.
  27. 차은수. 소청룡탕이 Asthma model 내의 Cytokine에 미치는 영향. *경희대 대학원 학위논문(박사)*, 2000.
  28. 정승기, 허태석, 황우석, 주창엽, 김영우, 정희재. 소청룡탕이 기관지천식 환자의 혈청 IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ 변화에 미치는 영향. *大韓韓醫學會誌* 23(2):70-77, 2002.
  29. 정진용 외. 小青龍湯과 小青龍湯加沙蔘이 BEAS-2B 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. *大韓韓醫學會誌* 24(1):74-83, 2003.
  30. 강석균. 기관지천식에 사용되는 가미소청룡탕의 임상적 고찰. *대한한의학회지* 10: 138-144, 1989.
  31. 송생엽, 심성용, 김경준. 소청룡탕이 알레르기 비염 유발 백서의 과립구 및 조직학적 변화에 미치는 효과. *대한안이비인후피부과학회지* 17(1):75-81, 2004.
  32. Choi, O.H., Kim, J.h., kINET, j.p. *Nature*. 380: 634-636, 1996.
  33. Shore, P.A., Burkhalter, A. and Cohn, V.H. Jr. A method for the fluorometric assay of histamine in tissue. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 127: 182, 1959.
  34. Shin, T.Y., Won, J.H., Kim, H.M., Kim, S.H. Effect of *Alpinia oxyphylla* fruit extract on compound 48/80-induced anaphylactic reactions. *Am J. Chin. Med.* 29: 293-302, 2001.
  35. Kanemoto, T., Kasugai, T., Yamatodani, A., Ushio, H., Mochizuki, T. K., Kimura, M., Nishimura, M. Kitamura, Y. Supernormal histamine release and normal cytotoxic activity of beige rat mast cells with giant granules. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 100: 99-106, 1993.
  36. Peachell, P.T., Columbo, M., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L.M., Marone, G. Regulation of human basophil and lung mast cell function by cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.* 140: 571-578, 1988.
  37. Kim, S.H., Choi, C.H., Kim, S.H., Eun, J.S., Shin, T.Y. anti-allergic effects of *artemisia iwayomogi* on mast cell-mediated allergic model. *Exp. Biol. Med.* 230: 82, 2005.
  38. 이기영. 알레르기의 진료. 서울, 한국의학사, pp 26-28, 41-53, 182-230, 268-340, 502-525, 1992.
  39. 이문호 외. 내과학. 서울, 박애출판사, pp 1989-2059, 1977.
  40. 문희범. 알레르기 질환의 임상과 실제, 서울, 여문각, pp 2-11, 170-185, 1995.
  41. 허충림. 피부알레르기. *경희의학*, 12(2):108-116, 1996.
  42. 염석영. 임상알레르기학. 서울, 여문각, pp 10-19, 1984.
  43. 임현호. 알레르기성 비염의 통계적 관찰. *대한이비인후과학회지* 27(3):247-253, 1984.
  44. 백만기. 최신이비인후과학. 서울, 일조각, pp 192-195, 1999.
  45. 채병윤. Allergy性 鼻炎(噴嚏)에 대한 臨床的 研究. *대한한의학회지* 3: 1, 1982.
  46. 허준 著. 동의보감구역위원회 譯. 법민문화사, 서울, p 591, 1999.
  47. 서울대학교 의과대학 피부과학 교실. 의대생을 위한 피부과학. *고려의학*, 서울, pp 32-37, 2001.
  48. 김정희. 아토피피부염의 최신 지견. *소아알레르기 및 호흡기과학회지* 14(1):12-23, 2004.
  49. 余無言. 傷寒論新議. 臺北, 文光圖書公司, pp 40-43, 1959.
  50. 신민교 편저. 원색임상본초학. 남산당, p 175, 223, 241, 260, 512, 516, 618, 556, 1986.
  51. 윤용갑 저. 동의방제와 처방해설. 의성당, pp 155-156, 1998.
  52. Alfonso, A., Cabado, A.G., Vieytes, M.R. and Botana, L.M. Functional compartments in rat mast cells for cAMP and calcium on histamine release. *Cell Signal.* 12, 343, 2000.
  53. Weston, M.C. and Peachell, P.T. Regulation of human mast cell and basophil function by cAMP. *Gen. Pharmacol.* p 31, 715, 1998.
  54. 鄭義燮. 상백피가 환취 복강 비만세포의 히스타민 유리와 calcium uptake에 미치는 영향. *全北大 大學院(석사)*, 1992.
  55. Alexander, N., Greiner M.D, Eli, O., Meltzer, M.D. Pharmacologic rationale for treating allergic and nonallergic rhinitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 118(5):985-996, 2006.