

소양인 형방패독산의 항염증효과에 대한 실험적 연구

허정원¹ · 강 희² · 안광석¹ · 김성훈³ · 최승훈¹ · 안규석^{1,4} · 심범상*

1: 경희대학교 한의과대학 병리학교실 & 경희대학교 한의학 연구소, 2: 경희대학교 동서의학대학원 동서의과과, 3: 암예방소재개발연구센터, 4: BK21경희대학교한의학사업단

Study on the Anti-inflammatory Effects of Soyangin-Hyeongbangpaedok-san

Jeong Won Heo¹, Hee Kang², Kwang Seok Ahn¹, Sung Hoon Kim³, Seung Hoon Choi¹, Kyoo Seok Ahn^{1,4}, Bumsang Shim*

1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, & Institute of Oriental Medicine, Kyunghee University, 2: Department of East-West Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, 3: Cancer Preventive Material Development Research Center, 4: Brain Korea 21 Oriental Medical Science Center

Soyangin-Hyeongbangpaedok-san(SHBPDS) is used for treating upper respiratory infections, In an effort to investigate the anti-inflammatory effects of SHBPDS, we measured production of several cytokines and immunoglobulin in various immune cells. SHBPDS decreased the secretion of TNF- α , but not that of IL-6 in PMA/A23187 stimulated HMC-1 cells. As for mouse B cells, it induced proliferation and caused differential effects in expressions of surface IgE as determined by flow cytometry and secretions of IgE, IgG1, IL-4 and INF- γ as measured by ELISA but showed little change in CD23 or CD69 expression. SHBPDS increased proliferation in anti-CD3/anti-CD28 stimulated CD4 Th cells. Under the Th1/Th2 polarization conditions, SHBPDS at 200 $\mu\text{g/ml}$ suppressed the secretion of INF- γ and IL-4. Based on the above results, we conclude that SHBPDS has antiinflammatory activities in mast cells and different immunomodulatory effects in B cells and Th cells.

Key words : Soyangin-Hyeongbangpaedok-san, anti-inflammatory effect, TNF- α , IL-6, HMC, B cell, Th cell

서론

가장 흔한 질병 중 하나인 감기는 virus에 의한 상기도 감염으로 인해 나타나는 급성 질병¹⁾으로 그 증상들은 인체 내 염증반응시 생산된 cytotoxin과 cytokine의 작용²⁾ 및 세균 등에 의한 2차 감염에 의해 표현되는 것들이다. 하지만 아직까지 감기에 대한 서양의학적 치료는 인체 면역에 의한 자연치유가 유일한 방법이며 증상의 악화 시에만 대증요법을 시행하는 정도의 소극적 치료가 대부분이다³⁾.

少陽人 荊防敗毒散은 본시 龔信이 傷寒時氣發熱 頭痛 項強 肢體煩疼症을 치료하기 위하여 입방한 것인데 東武는 그 중에서 人蔘 枳殼 桔梗 川芎을 빼고, 生地黃 地骨皮 車前子를 가하여서

이 처방을 만들었다. 이로써 단순한 開鬱解毒之劑에서 解毒補陰之劑로 변모하게 되었고 時氣解外之劑에서 內傷解鬱之劑로 바뀌게 된다³⁾. 그래서 少陽人 荊防敗毒散의 쓰임은 發熱, 頭痛이 있으나 惡寒이 심하지 않은 傷寒時氣의 증후에 少陽人의 체질적 결함을 극복하여 正氣를 해치지 않으면서 邪氣를 涼散시킬 목적으로 자주 이용되고 있어, 임상적으로 發熱을 동반하는 감기, 몸살 등의 외감성 질환이나 급, 만성염증성 질환에 이용되고 있고, 지금까지 진통·해열·항경련 및 진정작용⁴⁾과 항노화 효과⁵⁾가 보고되었으나 항염증효과에 대한 연구는 미흡하였다. 이에 비만세포(HMC-1) 및 마우스 면역세포에 少陽人 荊防敗毒散 알코올 추출물을 농도별로 투여하였을 때 마우스 면역세포의 증식능 및 그들이 분비하는 여러 cytokine들의 정량적 분석을 통하여 少陽人 荊防敗毒散의 항염증 기전을 분석해 보았다.

그 결과 少陽人 荊防敗毒散 알코올 추출물의 항염증효과에 관련하여 HMC-1, B cell, T cell의 증식능과 HMC-1에서의 TNF-

* 교신저자 : 심범상, 서울시 동대문구 회기동 경희대학교 한의과대학

· E-mail : shimbs@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-9445

· 접수 : 2009/03/10 · 수정 : 2009/03/23 · 채택 : 2009/04/09

α, IL-6의 분비량 B cell에서 CD69, CD23 및 sIgE의 발현정도와 IgE, IgG1, IL-4, INF-γ의 분비량 그리고 CD4+ T cell에서의 IL-2, IL-4, INF-γ의 분비량을 측정하여 몇 가지 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

소양인 荊防敗毒散 (Soyangin-Hyeongbangpaedok-san ; SHBPDS)의 구성약물과 용량은 東醫壽世保元⁶⁾에 준하였으며 (Table 1), 이들 약물은 경희의료원 약제과에서 구입하였다.

Table 1. Prescription of Soyangin-Hyeongbangpaedok-san(SHBPDS)

Herbal name	Chinese name	Dose
<i>Notopterygii Rhizoma</i>	羌活	3.75 g
<i>Angelicae Pubescentis Radix</i>	獨活	3.75 g
<i>Bupleuri Radix</i>	柴胡	3.75 g
<i>Peucedani Radix</i>	前胡	3.75 g
<i>Poria Rubra</i>	赤茯苓	3.75 g
<i>Schizonepetae Herba</i>	荊芥	3.75 g
<i>Ledebouriiellae Radix</i>	防風	3.75 g
<i>Lycii Radicis Cortex</i>	地骨皮	3.75 g
<i>Rehmanniae Radix</i>	生地黃	3.75 g
<i>Plantaginis Semen</i>	車前子	3.75 g
Total amount		37.5 g

2) 동물

본 연구에 사용한 실험용 쥐는 생후 7주령의 BALB/c 수컷 마우스(오리엔트(주))를 사용하였으며, 항온 항습 상태에서 일주일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사료는 방사선 처리가 된 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 사용하였으며, 음용수는 멸균처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 음용수는 무제한으로 제공하여 사육하였다.

3) 배지 및 시약

Fetal bovine serum(FBS), antibiotic-antimycotic과 Iscove's modified Dulbecco's media(IMDM)는 GIBCO에서 구입하였고 RPMI-1640는 WelGene에서 구입하였다. MTT assay 용액 (Celltiter 96 aqueous one solution reagent)은 Promega에서 구입하였으며 PMA, calcium ionophore A23187는 Sigma에서 구입하였다. MACS mouse CD45R(B220) microbeads, MACS mouse CD4(L3T4) microbeads, MACS 세포분리 컬럼(LS column) 그리고 MACS Midi-separator는 Miltenyi Biotec에서 구입하였다. ELISA에 사용한 모든 EIA kit, anti mouse CD40 항체, anti-mouse CD3e 항체 그리고 anti mouse CD28 항체는 BioLegend에서 구입하였다. recombinant mouse interleukin-4(rmIL-4), rmIL-2, rmIL-12, anti-mouse IL-4 antibody(Ab), anti-IL-12 Ab, phycoerythrin(PE) -anti-mouse CD69 Ab, PE-anti-mouse CD23 Ab, Fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse-CD45R/B220 Ab, FITC-anti-mouse IgE Ab 그리고 PE-anti-mouse CD45R/B220 Ab는 BD PharMingenTM

에서 구입하였다.

2. 방법

1) 약재 추출물 제조

약재 추출은 SHBPDS 약재를 유리로 된 추출용기에 넣고 85 % methanol을 충분히 잠기도록 넣고 하루 동안 상온에서 浸出한 후 sonicator(Elmasonic, Germany)를 사용, 50℃에서 1시간씩 2회 물리적 자극을 가하여 浸出을 촉진하여 시행하였다. 이 용액을 여과지로 여과한 후 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 증류농축한 결과 얻은 농축액을 freezing dryer(Eyela, Japan)로 24시간 동결건조하여 분말 상태의 시료를 얻고 이것을 실험에 사용하였다(수율은 7.96%).

2) SHBPDS 알코올 추출물의 HMC-1(Human Mast Cell line)에 대한 항염증 효과

(1) HMC-1 세포주 배양

사람의 비만세포 계열인 HMC-1 세포는 10 % Fetal bovine serum(FBS)과 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

(2) 생존율(Viability) 측정

HMC-1 cell의 SHBPDS 알코올 추출물에 대한 생존율을 측정하기 위해 96-well plate에 well 당 2×10⁴ 개의 세포가 들어갈도록 serum free media에 현탁하여 분주하고 SHBPDS 알코올 추출물을 0, 1, 10, 100, 1000 μg/ml의 농도로 처리하였으며 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 MTT assay를 시행하였다. MTT assay 용액은 well당 20 μl 씩 첨가하였고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 반응시키며 30분 간격으로 microplate reader(TECAN, Austria)를 사용하여 흡광도(490-650 nm)를 측정하였다. 반응시간은 총 4시간을 넘지 않도록 하여 종료하였다. HMC-1의 SHBPDS 알코올 추출물에 대한 생존율은 SHBPDS 알코올 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 환산하였다.

(3) Pro-inflammatory cytokines(IL-6 and TNF-α) 측정

SHBPDS 알코올 추출물의 항염증 효과를 보기 위하여 HMC-1 세포에 PMA (Phorbol 12-myristate 13 acetate)와 calcium ionophore A23187으로 자극하여 유도된 염증반응에 대해 pro-inflammatory cytokine(IL-6 and TNF-α) 분비량 변화를 ELISA 방법으로 측정하였다. 각 시료는 duplicate로 시행하였으며 sandwich ELISA 기법을 이용하였다. HMC-1 세포는 24-well plate에 well 당 5×10⁵ 개의 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 PMA(20 nm)와 calcium ionophore A23187(1 μM)을 넣고 동시에 SHBPDS 알코올 추출물을 각각 0, 1, 10, 100, 1000 μg/ml의 농도로 처리한 후 8 시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 배양 종료된 배양액은 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 제거하고 상등액을 회수하여 ELISA 측정에 사용하였다.

3) SHBPDS 알코올 추출물이 마우스 B cell에 미치는 영향

(1) 脾臟세포 부유액의 준비

脾臟을 마우스(BALB/c)로부터 적출하여 10% FBS와 1% 항생제(antibiotic- antimycotic)가 함유된 RPMI-1640 배지로 세척한

후 micro slide glass의 거친 면을 이용하여 spleen을 잘게 으갠 뒤 0.40 μm nylon cell strainer로 여과하여 脾臟세포를 분리하였다. 분리한 脾臟세포 부유액은 300 g에서 10분간 원심분리한 후 그로부터 얻은 세포 침전물에 함께 존재하는 적혈구를 제거하기 위하여 RBC lysis buffer를 처리하였다. 파괴된 적혈구를 비장 세포 부유액으로부터 완전히 제거하기 위하여 RPMI-1640 배지로 2회 세척하였다. 원심분리에 의해 최종적으로 얻은 비장 세포를 적당량의 RPMI-1640 배지에 현탁한 후 trypan blue exclusion assay를 통해 생존을 확인과 함께 cell 수를 측정하였다.

(2) B 세포(CD45R/B220)의 분리

脾臟세포 중에서 B 세포를 분리하기 위하여 MACS mouse CD45R(B220) microbeads를 사용하였다. 脾臟세포 1×10^7 개 당 90 μl 의 완충용액(0.5% BSA-2 mM EDTA-PBS, pH 7.2)을 넣고 잘 현탁한 후 1×10^7 cells/90 μl 농도에 10 μl 의 MACS CD45R(B220) microbeads를 첨가하여 4°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 종료 후 반응액에 10~20배 부피의 완충용액을 넣고 300 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 얻은 침전물에 500 μl 의 완충용액을 첨가하여 재현탁하였다. B 세포 분리를 위해 MACS 세포 분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator에 장착하여 준비한 뒤 앞서 준비된 세포 현탁액을 column 안으로 통과시켰다. 그 상태에서 3회 완충용액으로 컬럼을 세척하여 컬럼에 결합하지 않은 분획을 제거한 후 MACS 세포분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator로부터 분리시킨 뒤 컬럼 안에 남아있는 B 세포 분획은 피스톤을 사용하여 밖으로 밀어내어 분리하였다.

(3) 배양 및 증식능(proliferation) 측정

마우스 B 세포의 증식능을 측정하기 위하여 96-well plate를 사용, 각 well 당 4×10^5 개의 세포를 분주하고 SHBPDS 알코올 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약제 처리와 동시에 anti mouse CD40 항체(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 rmlIL-4(10 ng/ml)를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT assay 용액을 well당 20 μl 씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 반응시키며 30분 간격으로 흡광도(490-650 nm)를 측정하였다. 반응시간은 총 4시간을 넘지 않도록 하여 종료하였다. 마우스 B 세포의 SHBPDS 알코올 추출물에 대한 증식능은 SHBPDS 알코올 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 환산하였다.

(4) CD23과 CD69 및 IgE 발현분석

B 세포의 CD23, CD69 그리고 IgE의 발현을 분석하기 위하여 유세포형광분석법(FACS)을 사용하였다. 마우스의 비장으로부터 분리한 B 세포를 24-well plate에 각 well 당 1×10^6 개가 되도록 세포를 분주하고 SHBPDS 알코올 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약제 처리와 동시에 anti mouse CD40 항체(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 rmlIL-4(10 ng/ml)를 처리하여 CD69의 경우 48시간, CD23과 IgE의 경우 72 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 유세포형광분석(FACS)을 실시하기 위해서 배양한 B 세포를 FACS용 완충액 (1% FBS-0.1% Na₃-PBS, pH 7.2)으로 2회 세척하고 각각 해당되는 형광물질로 염색하였다. CD69의 경우 PE-anti-mouse CD69와

FITC-anti-mouse-CD45R /B220으로 염색하였으며 CD23의 경우 PE-anti-mouse CD23과 FITC-anti-mouse- CD45R/B220으로 염색하였고 IgE의 경우 FITC-anti-mouse IgE와 PE-anti-mouse CD45R/B220으로 염색하였다. 모든 염색 반응은 상온에서 30분간 시행하였다. 형광을 띠는 항체로 표지한 세포는 반응 종료 후 3회 이상 FACS용 완충액으로 세척한 후 유세포형광분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, U.S.A)로 측정하여 해당 세포에서의 IgE, CD23(Fce) 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램을 사용하였으며 결과는 CD23+/B220+, CD69+/B220+, IgE+/B220+의 백분율(%)로 산출하였다.

(5) IFN- γ , IL-4, IgG1 및 IgE 생산량 측정

SHBPDS 알코올 추출물이 in vitro 상에서 B 세포 면역능에 미치는 영향을 보기 위하여 SHBPDS 알코올 추출물을 처리한 B 세포로부터 생성되는 IFN- γ , IL-4, IgG1 및 IgE의 양을 ELISA로 측정하였다. 각 시료는 duplicate로 시행하였으며 sandwich ELISA 기법을 이용하였다. 마우스(BALB/c)로부터 분리한 B 세포는 24 well plate에 각 well 당 1×10^6 개의 세포를 분주하였고, SHBPDS 알코올 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약제 처리와 동시에 anti mouse CD40 항체(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 rmlIL-4(10 ng/ml)를 처리하여 IFN- γ , IL-4, IgG1의 경우 72시간, IgE의 경우 10일 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 종료된 배양액은 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포를 제거하고 상등액을 회수하여 ELISA 측정에 사용하였다.

4) SHBPDS 알코올 추출물이 Th2 세포 분화에 미치는 영향

(1) CD4+ T cell의 분리

脾臟세포 중에서 CD4+ T 세포를 분리하기 위하여 MACS mouse CD4(L3T4) microbeads를 사용하였다. 脾臟세포 1×10^7 개 당 90 μl 의 완충용액(0.5% BSA-2 mM EDTA-PBS, pH 7.2)을 넣고 잘 현탁한 후 1×10^7 cells/90 μl 농도에 10 μl 의 MACS mouse CD4(L3T4) microbeads를 첨가하여 4°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 종료 후 반응액에 10~20배 부피의 완충용액을 넣고 300 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 얻은 침전물에 500 μl 의 완충용액을 첨가하여 재현탁하였다. CD4+ T 세포 분리를 위해 MACS 세포분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator에 장착하여 준비한 뒤 앞서 준비된 세포 현탁액을 column 안으로 통과시켰다. 그 상태에서 3회 완충용액으로 컬럼을 세척하여 컬럼에 결합하지 않은 분획을 제거한 후 MACS 세포분리 컬럼(LS column)을 MACS Midi-separator로부터 분리시킨 뒤 컬럼 안에 남아있는 CD4+ T 세포 분획은 피스톤을 사용하여 밖으로 밀어내어 분리하였다.

(2) 증식능 측정

마우스 비장으로부터 분리한 CD4+ T 세포의 증식능을 측정하기 위하여 anti-mouse CD3 ϵ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 처리된 96-well plate를 사용, 각 well 당 4×10^5 개의 세포를 분주하고 SHBPDS 알코올 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 약제 처리와 동시에 anti mouse CD28 항체(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양

성 적

하였다. 배양 후 MTT assay 용액을 well당 20 μ l 씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 반응시키며 30분 간격으로 흡광도 (490-650 nm)를 microplate reader를 사용하여 측정하였다. 반응 시간은 총 4시간을 넘지 않도록 하여 종료하였다. 마우스 CD4+ T 세포의 SHBPDS 알코올 추출물에 대한 증식능은 SHBPDS 알코올 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 환산하였다.

3) In vitro Th1/Th2 polarization 및 IL-4, IFN- γ , IL-2 생산량 측정

SHBPDS 알코올 추출물이 in vitro 상에서 Th1/Th2 polarization에 미치는 영향을 보기 위하여 anti-mouse CD3 ϵ (10 μ g/ml)이 처리된 24-well plate에 1.5 \times 10⁶cells/ml의 농도로 분주한 후 anti mouse CD28 항체(2 μ g/ml)와 rmIL-2(5 ng/ml)를 첨가하였다. Th1 polarization은 rmIL-12(5 ng/ml)과 anti mouse IL-4 (10 μ g/ml)을 첨가하여 시행하였고 Th2 polarization은 rmIL-4(5 ng/ml)과 anti mouse IL-12(10 μ g/ml)을 첨가하여 시행하였다. 그리고 동시에 SHBPDS 알코올 추출물을 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 농도로 처리한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 종료된 배양액은 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 세포를 제거하고 상등액을 회수하여 Th1/Th2 세포로부터 생성된 IL-4, IFN- γ 및 IL-2의 정량을 위하여 ELISA 측정에 사용하였다. 각 시료는 duplicate로 시행하였으며 sandwich ELISA 기법을 이용하였다.

5) ELISA 측정

본 연구에서 cytokines의 생산량은 sandwich ELISA 방법으로 측정하였으며 각 시료는 duplicate로 시행하였다. 측정 대상에 따라 각 1차 항체 원액을 coating 완충용액에 해당 농도가 되도록 희석하여 96-well micro plate에 well 당 100 μ l씩 분주한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12~16시간 동안 반응하였다. 10% FBS가 함유된 PBS를 well 당 200 μ l씩 넣고 최소 1시간 동안 상온에 두어 blocking 하였다. 각 well을 세척용 완충용액으로 well 당 \geq 200 μ l씩 넣고 3회 세척한 후 B 세포 배양 상등액을 100 μ l씩 분주하였다. 시료를 분주한 96-well microplate는 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 well 당 \geq 200 μ l씩 넣고 6회 세척 후 biotin이 결합된 2차 항체를 해당 농도가 되도록 10% FBS가 함유된 PBS에 희석하여 well 당 100 μ l씩 처리하여 1 시간 동안 상온에서 반응하였다. 세척용 완충용액으로 well 당 \geq 200 μ l씩 넣고 6회 세척 후 Streptavidin-HRP 용액을 해당 농도로 희석하여 well 당 100 μ l씩 처리하여 1 시간 동안 상온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 well 당 \geq 200 μ l씩 넣고 6회 세척 후 TMB substrate 용액을 well 당 100 μ l씩 처리한 후 30분 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 종료는 2N H₂SO₄ 용액을 well 당 50 μ l씩 첨가함으로써 완료하였으며 흡광도는 450-570 nm 파장에서 microplate reader기를 사용하여 측정하였다.

6) 통계분석

실험결과는 mean \pm standard deviation 값으로 표시하였으며 통계적 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 결정하였으며 유의확률(p-value) 값은 0.05미만인 경우에만 인정하였다.

1. SHBPDS 알코올 추출물이 HMC-1 (Human Mast Cell line)의 pro-inflammatory cytokines(IL-6 and TNF- α) 생성에 미치는 영향

1) HMC-1 cell의 SHBPDS알코올 추출물에 대한 생존율 (Viability)

HMC-1의 SHBPDS 알코올 추출물에 대한 농도별(0, 1, 10, 100, 1000 μ g/ml) 생존율(viability)을 측정한 결과 SHBPDS 알코올 추출물이 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 처리 된 실험군은 대조군과 비교하여 생존율에 변화가 없었으나 100 μ g/ml 농도에서 약간 감소(p=0.0391)하고 1000 μ g/ml 농도에서 대조군과 통계적으로 유의한 차이를 보이며 급격히 감소(p=0.0025)하였다(Fig. 1). 이러한 결과를 기반으로 HMC-1 세포의 항염증 효과 실험에 대한 SHBPDS 알코올 추출물 처리 농도를 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml으로 결정하였다.

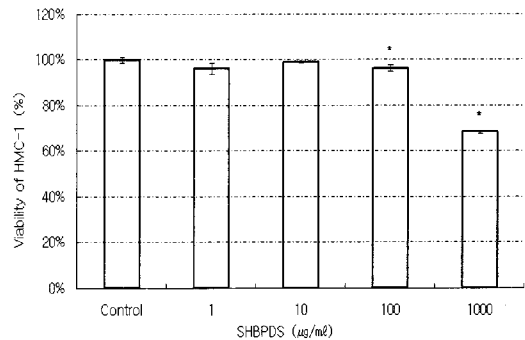


Fig. 1. Effect of SHBPDS alcohol extract on the cell viability in HMC-1 cells. HMC-1 cells(1 \times 10⁶cells/ml) were incubated with SHBPDS alcohol extract for 24 hours as indicated concentrations. Viability was evaluated using the MTS assay. *p < 0.05: Statistically significant value compared to control data.

2) SHBPDS알코올 추출물의 HMC-1 cell에 대한 항염증 효과

HMC-1 세포주에 PMA(20 nm)와 calcium ionophore A23187(1 μ M)으로 염증 반응을 유도하고 동시에 SHBPDS 알코올 추출물을 첨가했을 때 항염증효과를 pro-inflammatory cytokines인 IL-6와 TNF- α 의 양을 ELISA를 통해 비교함으로써 알아보았다. IL-6의 경우 SHBPDS의 모든 농도 범위에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않은 반면 TNF- α 의 경우 SHBPDS 알코올 추출물을 10 μ g/ml와 100 μ g/ml으로 첨가했을 때 통계적으로 유의한 차이를 보이며 감소하였다(각각 p=0.035와 p=0.008)(Table 2).

Table 2. Effect of SHBPDS alcohol extract on pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) secretion in HMC-1 cells.

SHBPDS(μ g/ml)	IL-6(pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
0	867.07 \pm 50.88	215.55 \pm 9.00
1	786.59 \pm 42.25	208.95 \pm 14.46
10	778.05 \pm 45.70	188.95 \pm 4.82*
100	765.85 \pm 45.70	167.36 \pm 1.93*

HMC-1 cells were stimulated with PMA(20 nm) and calcium ionophore A23187(1 μ M) for 8 hours with or without SHBPDS alcohol extract. Cytokine levels in supernatant were measured using ELISA. * p < 0.05: Statistically significant value compared to control data.

2. SHBPDS 알코올 추출물이 마우스 B 세포에 미치는 효과

1) 마우스 B cell의 SHBPDS알코올 추출물에 대한 증식능 (proliferation)

마우스 B 세포의 SHBPDS 알코올 추출물에 대한 농도별(0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 증식능(proliferation)을 측정된 결과 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내며 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군 수준으로 감소하는 경향을 나타내어(Fig. 2) 마우스 B 세포에 대한 면역실험에 있어서 SHBPDS 알코올 추출물 적용 농도는 0, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 결정하였다.

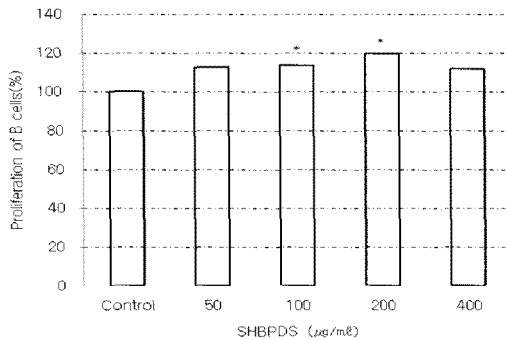


Fig. 2. Effect of SHBPDS alcohol extract on the cell proliferation in mouse splenic B cells. Mouse splenic B cells (4×10^5 cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) and recombinant mouse IL-4($10 \text{ ng}/\text{ml}$) with or without SHBPDS alcohol extract for 72 hours as indicated concentrations. Proliferation were evaluated using the MTS assay. * $p < 0.05$: Statistically significant value compared to control data.

2) SHBPDS알코올 추출물이 마우스 B cell의 CD23과 CD69 및 IgE 발현에 미치는 영향

SHBPDS 알코올 추출물이 마우스 B 세포의 CD69(early activation marker), CD23(low affinity IgE receptor) 그리고 세포 표면의 surface IgE (membranous IgE) 발현에 미치는 영향을 유세포형광분석기를 사용하여 측정된 결과 CD69와 CD23의 경우 첨가량에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3, 4). sIgE의 경우는 SHBPDS 알코올 추출물 첨가량이 증가할수록 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5).

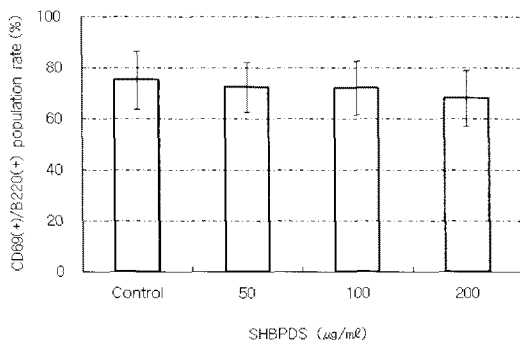


Fig. 3. Percentage of CD69+ positive mouse splenic B cells. Mouse splenic B cells (1×10^6 cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) and recombinant mouse IL-4($10 \text{ ng}/\text{ml}$) with or without SHBPDS alcohol extract for 48 hours as indicated concentrations. After incubation, the cells were harvested and assayed for CD69+/B220+ expression by flow cytometry. Statistically significant value compared to control data.($p < 0.05$)

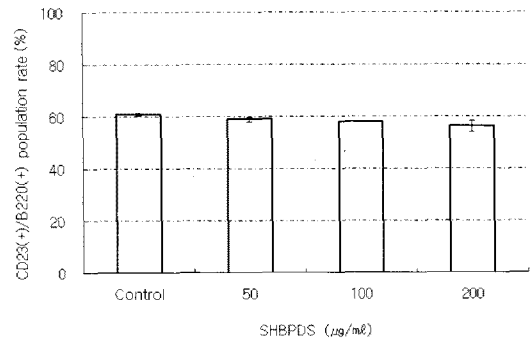


Fig. 4. Percentage of CD23+ positive mouse splenic B cells. Mouse splenic B cells(1×10^6 cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) and recombinant mouse IL-4($10 \text{ ng}/\text{ml}$) with or without SHBPDS alcohol extract for 72 hours as indicated concentrations. After incubation, the cells were harvested and assayed for CD23+/B220+ expression by flow cytometry. Statistically significant value compared to control data.($*p < 0.05$)

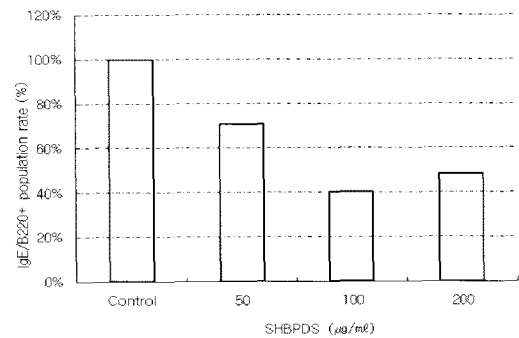


Fig. 5. Relative rate of IgE positive mouse splenic B cells. Mouse splenic B cells(1×10^6 cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies($3 \mu\text{g}/\text{ml}$) and recombinant mouse IL-4($10 \text{ ng}/\text{ml}$) with or without SHBPDS alcohol extract for 72 hours as indicated concentrations. After incubation, the cells were harvested and assayed for IgE/B220+ expression by flow cytometry. One of three similar experiments is shown.

3) SHBPDS알코올 추출물이 마우스 B cell의 IgE, IgG1, IL-4 및 IFN- γ 생성에 미치는 영향

SHBPDS 알코올 추출물이 마우스 B 세포의 cytokines(IL-4 와 IFN- γ) 분비에 미치는 영향을 ELISA 기법으로 측정된 결과 IL-4의 경우 대조군에 비해 SHBPDS 알코올 추출물 농도에 따라 통계적으로 유의한 차이를 보이며 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 3). IFN- γ 의 경우 SHBPDS 알코올 추출물 농도 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 증가하였다가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군과 비슷하였고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 감소($p=0.0009$)하는 경향을 나타내었다 SHBPDS 알코올 추출물이 마우스 B 세포의 IgE 분비에 미치는 영향을 ELISA 기법으로 측정된 결과 대조군에 비해 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 통계적으로 유의한 차이($p=0.00004$)를 보이며 급격히 증가하였으나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 함께 SHBPDS 알코올 추출물이 마우스 B 세포의 IgG1 분비에 미치는 영향을 ELISA 기법으로 측정된 결과 대조군에 비해 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 약간 증가($p=0.0383$)하였고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 결과적으로 마우스 B 세포의 IgE와 IgG1의 분비에 SHBPDS 알코올 추출물이 미치는 영향은 첨가량이 증가할수록 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이후로 감소하는 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 3. Effect of SHBPDS alcohol extract on IL-4, IFN- γ , IgE and IgG1 secretion in mouse splenic B cells.

SHBPDS(μ g/ml)	IL-4(ng/ml)	IFN- γ (ng/ml)	Ig E(ng/ml)	IgG1(ng/ml)
0	58.31 \pm 1.58	103.91 \pm 2.57	6.09 \pm 0.00	2.11 \pm 0.09
50	112.88 \pm 1.95*	131.63 \pm 0.64*	18.51 \pm 0.00*	2.46 \pm 0.12*
100	185.72 \pm 0.37*	98.91 \pm 3.21	6.39 \pm 0.00	1.33 \pm 0.36
200	138.91 \pm 3.66*	55.73 \pm 1.29*	2.23 \pm 0.00*	0.63 \pm 0.34*

Mouse splenic B cells(1×10^6 cells/well) were stimulated with anti mouse CD40 antibodies(3 μ g/ml) and recombinant mouse IL-4(10 ng/ml) with or without SHBPDS alcohol extract for 3 days (IL-4, IFN- γ , IgG1) or 10 days (IgE) as indicated concentrations. Levels of cytokines and immunoglobulins were measured us:ng ELISA.*p < 0.05 compared with the control.

3. SHBPDS 알코올 추출물이 마우스 CD4 T 세포에 미치는 효과

1) CD4+ T cell의 SHBPDS알코올 추출물에 대한 증식능
 마우스 CD4 T 세포의 SHBPDS 알코올 추출물에 대한 농도 별 (0, 50, 100, 200 μ g/ml) 증식능을 측정 한 결과 대조군에 비해 SHBPDS 알코올 추출물 50, 100, 200 μ g/ml 농도에서 통계적으로 유의한 차이를 보이며 증가(각각 p=0.0022, p=0.0003와 p=0.0006) 하였다. 따라서 마우스 CD4 T 세포에 대한 면역실험에 있어서 SHBPDS 알코올 추출물 적용 농도는 0, 50, 100, 200 μ g/ml로 결정하였다.

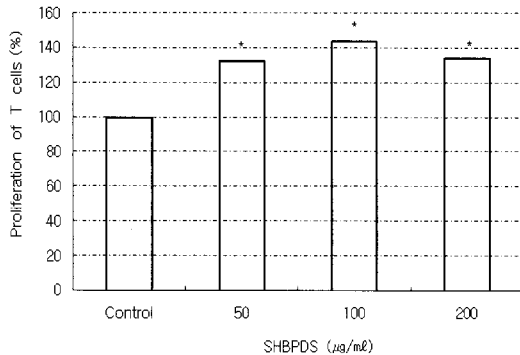


Fig. 6. Effect of SHBPDS alcohol extract on the cell proliferation in mouse splenic CD4+ T cells. Mouse splenic CD4+ T cells(4×10^5 cells/well) were stimulated with plate-bound anti-mouse CD3 ϵ antibodies(10 μ g/ml), anti-mouse CD28 antibodies(2 μ g/ml) and recombinant mouse IL-2(5 ng/ml) with or without SHBPDS alcohol extract for 48 hours as indicated concentrations. Proliferation were evaluated using MTT assay. Statistically significant value compared to control data.(*p < 0.05)

2) Th1/Th2 분화 및 IL-4, IFN- γ , IL-2 생성에 미치는 영향

SHBPDS 알코올 추출물이 Th1/Th2 polarization에 미치는 영향을 각 세포에서 분비되는 대표적인 cytokines의 양을 ELISA를 통해 측정함으로써 알아보았다. Th1 polarization의 경우 대표적인 cytokine인 IFN- γ 의 분비량을 측정 한 결과 SHBPDS 알코올 추출물 50, 100 μ g/ml 농도 범위에서 대조군과 차이가 없었으며 200 μ g/ml 농도에서는 대조군에 비해 약간 감소하였다 (p=0.0420)(Table 4). Th2 polarization의 경우 대표적인 cytokine인 IL-4와 최근 Th2에 영향을 주는 것으로 알려진 IL-2의 분비량을 측정하였다. Th2의 IL-4 분비량은 SHBPDS 알코올 추출물 50 μ g/ml 농도에서 대조군에 비해 약간 감소(p=0.0306)하였으며 농도에서 대조군에 비해 약간 증가(p=0.0195)하였고 200 μ g/ml 농도에서는 대조군에 비해 급격히 감소(p=0.0009)하였다. Th2의 IL-2 분비량은 SHBPDS 알코올 추출물 50 μ g/ml 농도에서 감소

(p=0.0001)하였고 100 μ g/ml 농도에서 증가(p=0.0266)하였으며 200 μ g/ml 농도에서는 대조군과 비슷한 값을 나타내어 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Table 4. Effect of SHBPDS alcohol extract on cytokines secretion in the differentiated Th1/Th 2 cells.

SHBPDS(μ g/ml)	Th1 cell		Th2 cell	
	IFN- γ (ng/ml)	IL-4(ng/ml)	IL-4(ng/ml)	IL-2(ng/ml)
0	457.87 \pm 20.27	8.36 \pm 0.09	32.31 \pm 0.16	
50	430.87 \pm 0.94	8.04 \pm 8.08*	21.19 \pm 0.12*	
100	433.70 \pm 0.71	8.94 \pm 0.14*	31.49 \pm 0.23*	
200	408.87 \pm 7.07*	4.93 \pm 0.19*	33.22 \pm 0.43	

Purified CD4+ T cells(1.5×10^6 cells/ml) were incubated with rmlL-12(5 ng/ml) and anti-mouse IL-4 antibodies(10 μ g/ml) for Th1 polarization or rmlL-4(5 ng/ml) and anti-mouse IL-12 antibodies(10 μ g/ml) for Th2 polarization with or without SHBPDS alcohol extract for 72 hours. Cytokine levels in supernatant were measured using ELISA. Statistically significant value compared to control data.(*p < 0.05)

고 찰

少陽人 荊防敗毒散은 東醫壽世保元の 「少陽人 脾受寒表寒病論」에 나오는 처방으로 羌活 獨活 柴胡 前胡 荊芥 防風 赤茯苓 生地黃 地骨皮 車前子 각 3.75 g 으로 구성⁶⁾되는데, 羌活 獨活은 아래에서 下焦腎膀胱의 鬱結之邪를 升發시키고, 柴胡는 中焦肝脾의 鬱結之邪를 풀고, 前胡는 火降痰消하며, 荊芥 防風은 上焦에서 胸膈頭目的 留結之風濕을 제거하며, 車前子和 赤茯苓으로 肺肝의 風熱을 膀胱으로 滲泄시키며 生地黃으로써 胸膈之火를 平정하게하고 地骨皮는 肺中伏火와 肝腎의 虛熱을 물리치는 역할을 한다⁹⁾.

따라서 發熱 惡寒 脈浮緊 身痛 不汗出而煩躁하는 大青龍湯證이나, 口苦 咽乾 目眩 耳鳴 胸脇苦滿 寒熱往來 嘔逆의 小柴胡湯證에 이용된다^{6,7)}고 하였으며 治頭痛寒熱往來者 宜用⁶⁾이라 하였다. 이 증상은 감기, 몸살, 급성기관지염, 급성 인후염, 급성 후두염, 급성 폐렴 등의 질병군에 해당된다⁷⁾고 할 수 있으며, 실제 임상에서도 少陽人의 완고한 두통⁸⁾, 중풍환자의 흡인성 폐렴⁹⁾, 少陽人의 감기 후 지속되는 熱感 後 背寒症, 項強症, 만성비염 등의 질환에 이용된 예¹⁰⁾가 보고되고 있다.

감기는 한의학적으로 크게 風寒型, 風熱型, 挾濕型, 挾暑型, 時行感冒, 老人 혹 久病患感冒로 나누어 볼 수 있고¹¹⁾, 서양의학적으로는 상기도감염으로 정의되며 크게 일반감기, 유행성 독감, 특수형감기(인두염형, 기관지염형)로 구분되어진다^{11,12)}. 風寒型, 挾濕型, 挾暑型 감모는 일반감기와 유사하고, 風熱型 감모는 특수형감기에 해당된다고 할 수 있으며, 時行感冒는 유행성독감에 해당되며 老人 혹 久病患感冒는 만성호흡기염증과 유사하다고 할 수 있다. 風寒型 감모와 일부 風熱型 감모에 少陽人 荊防敗毒散이 이용되고 있으며, 감기에 의한 합병증의 초기증상에도 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

염증은 신체 외부로부터 물리적, 화학적 또는 생물학적 물질이 침입했을 경우 대식세포 및 호중구와 같은 백혈구의 반응을 촉진하기 위한 삼출, cytotoxin 분비, 손상된 세포를 대처하기 위한 주위 세포의 증식, 항체 생성 등으로 표현되는 일련의 면역반응으로²⁾ 감기 및 합병증에 의한 다양한 전신 증상들은 virus 감염에 의한 염증반응 때에 생산된 cytotoxin과 cytokine의 작용²⁾

과 상기도점막의 손상으로 세균 등에 의한 2차 감염에 의해서 일어나게 되는 것이다.

따라서 少陽人 荊防敗毒散이 감기로 인한 전신증상의 경감과 치료 작용을 나타내는 것은 염증반응에 관여하는 cytotoxin과 cytokine의 활성억제를 통해서 이루어지는 것으로 사료되며 지금까지 少陽人 荊防敗毒散의 연구로는 진통·해열·항경련 및 진정작용⁴⁾과 혈액학적 수치의 개선 및 간, 신기능의 증가를 통한 항노화 효과⁵⁾가 보고되었고, 호흡기계의 항염증 연구로는 小青龍湯¹³⁾, 蔘蘇飲¹⁴⁾, 連翹敗毒散加味方¹⁵⁾ 등의 알레르기성 염증에 대한 억제 효과와 銀翹散의 호흡기감염에 대한 효과¹⁶⁾, 桑菊飲의 면역증진을 통한 항염증효과¹⁷⁾ 등이 보고되고 있으며, 기타 한약재 및 처방의 항염증 효과에 대한 연구로는 조¹⁸⁾, 곽¹⁹⁾, 송²⁰⁾, 이²¹⁾, 문²²⁾, 임²³⁾, 김²⁴⁾, 김²⁵⁾, 김²⁶⁾ 등의 연구가 보고되고 있으나 少陽人 荊防敗毒散의 항염증에 대한 연구는 미흡하였다. 이에 少陽人 荊防敗毒散의 항염증효과에 대해 비만세포와 면역세포에서 분비되는 cytokine의 변화를 위주로 살펴보았다.

Mast cell(비만세포)은 선천면역 반응이 일어났을 때 탈과립 과정을 통해 TNF- α 와 IL-6 같은 cytokine을 분비하여 총혈반응 등을 일으켜 염증반응에 관여한다²⁷⁻²⁹⁾. TNF- α 는 IL-6와 함께 대표적인 전염증기(pro-inflammatory) cytokine으로 대식세포, NK cell, 비만세포 등에서 생산되어 선천면역 및 염증의 매개자 역할을 하며³⁰⁾, 특히 비만세포에서 유리된 TNF- α 는 백혈구의 혈관 외 유주를 유도하여 국소의 염증반응에 중요한 역할을 하고 있고³¹⁾, IL-6는 감염이나 손상 시에 면역세포의 성장과 분화에 관여하여³²⁾ 염증병소에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다³³⁾. 염증반응이 유도된 HMC-1 세포주에 SHBPDS 알코올 추출물을 투여하고 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 측정할 결과 대조군에 비해 두 가지 모두 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보여 SHBPDS 알코올 추출물은 TNF- α 와 IL-6의 분비억제를 통한 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다.

B cell은 T cell에 의해 활성화되어 증식하면서 plasma cell로 분화하게 되어 여러 가지 항체를 분비하여 체액성 면역을 담당하게 되며, B cell을 비롯한 면역에 관련된 세포 집단을 식별할 수 있는 분자를 세포표면 표지(marker)라고 한다. 이러한 세포표면 분자를 분류하기 위하여 계통적인 명명법으로 CD 명명법을 사용하고 있으며, 세포계열, 세포성숙기, 활성화단계를 구분하는 지표가 된다³⁴⁾. CD69는 활성화된 T cell과 B cell 그리고 macrophages와 NK cell에서 나타나는 표면분자이며, CD23은 Fc ϵ R2로 불리기도 하며, 성숙한 B cell과 활성화된 macrophages, eosinophils, follicular dendritic cells, platelets 등을 표현하는 표면분자로서 IgE의 합성을 조절한다³⁵⁾. sIgE는 항원과의 접촉을 통해 분화된 plasma cell에서 다량의 IgE를 분비하도록 하여 B cell의 활성화를 매개하는 수용체 역할을 한다. CD69 CD23 sIgE로 알아본 마우스 B cell의 활동성은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으며, 이는 B cell의 활동성 증가로 인한 체액성면역반응을 억제시켜 항염증효과가 있는 것으로 사료된다.

IgE는 Fc ϵ RI 이라 불리는 표면수용체를 매개로 비만세포에 강하게 결합한 뒤 비만세포의 탈과립 과정을 유발하여 hay

fever, 천식, 발진, anaphylatic shock 등의 즉시형 과민반응을 매개한다고 알려져 있다. IgG는 혈청내에서 가장 풍부한 면역글로불린으로 잘 알려져 있으며³⁶⁾, 항체의 생산이 과다해 질 경우 B cell의 활성화를 억제하며 대식세포의 탐식작용을 촉진하고 보체를 활성화하여 항체 퇴적 현상을 매개하기도 한다³⁷⁾. IL-4와 INF- γ 는 각각 체액성 면역과 세포성 면역을 유도하는 cytokine으로 서로 길항적인 역할을 한다. 마우스 B cell의 IgE와 IgG1, INF- γ 의 분비량은 50 μ g/ml의 농도에서 유의성 있게 증가했다가 200 μ g/ml에서 유의성 있게 감소하는 경향을 보였다. 이는 50 μ g/ml의 농도에서는 염증작용을 촉진하는 결과를, 200 μ g/ml의 농도에서는 다시 염증반응을 억제하는 흔재된 결과를 보였다. 그러나 IL-4의 분비량은 농도와 무관하게 지속적으로 유의성 있게 증가하는 반응을 보여 알레르기성 염증의 억제효과에 대해서는 유의한 효과가 없는 것으로 사료된다.

림프구의 활성화는 T cell과 B cell의 상호작용으로 이루어지는데 이중 T cell은 면역반응에서 가장 중추적인 역할을 하는 세포로서 T helper cell과 T cytotoxic cell로 나누어지며 전자는 표면에 CD4라는 단백질이 발현되므로 CD4+ T cell이라고 하고 후자는 CD8이 발현되므로 CD8+ T cell이라고 한다. 특히 T helper cell(Th cell)은 IL-12에 의해 Th1 cell로 분화하여 IFN- γ 를 분비해서 세포성 면역반응에 관여하고, IL-4에 의해 Th2 cell로 분화해서 IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13을 주로 분비하여 체액성 면역반응에 관여한다. Th1 cell이 병적으로 많이 존재하는 경우 자가면역 질환이 유발될 수 있으며 Th2 cell이 상대적으로 우세하면 알레르기 질환을 야기할 수 있다³⁸⁾.

Cytokine이란 면역반응에 관여하는 림프계 세포, 염증세포 그리고 이외 조절계 세포들에서 분비되는 분자량이 작은 단백질 성분으로서 자연면역과 특이면역 대부분에서 중요한 기능을 나타낸다³⁹⁾. IL-2는 T cell의 성장과 cytokine의 생성증가, 자연살해세포의 성장을 자극하여 세포성 면역반응을 증진시키기도 하고 B cell의 성장과 항체생산을 자극하기도 한다^{40,41)}. IL-4는 B cell의 성장과 분화를 촉진하여 IgE로의 동형 전환을 유도하며 미감작 CD4+ Th cell을 Th2 cell로 분화시키는 주요자극제이다^{42,43)}. INF- γ 는 미감작 CD4+ T cell을 Th1 cell로 분화시키고 Th2 cell의 증식을 억제하며 대식세포의 염증반응을 증진시킨다. 림프구 증식은 면역지표의 하나로⁴⁴⁾ 少陽人 荊防敗毒散 알코올 추출물의 투여로 마우스 B cell과 T cell의 증식은 증가하는 경향을 보였으며, 이는 면역증진을 통한 항염증작용을 의미한다고 볼 수 있다. Th cell에서 분비되는 INF- γ IL-2의 양은 감소되었으나 IL-4의 양은 농도에 따라 감소와 증가를 함께 나타냈다. Th cell이 분비하는 cytokine의 양이 증가할수록 항체와 대식세포에 의한 염증반응은 증가하게 되므로 少陽人 荊防敗毒散은 INF- γ , IL-2 분비량을 감소시킴으로써 항염증효과를 유도하는 것으로 보이며, IL-4에 의해 유도되는 알레르기성 염증인 경우에는 일정한 항염증효과를 유추해 내기 어려울 것으로 사료된다.

少陽人 荊防敗毒散 알코올 추출물은 비만세포의 TNF- α 와 IL-6 분비량을 감소시키고, 마우스 B cell의 활동성과 마우스 Th cell의 IL-2, INF- γ 분비량을 감소시켰으며 이로써 항염증효과를

유도한다고 사료된다. 면역세포의 증식능의 증가는 면역력 약화에 의한 염증반응의 경우에 면역증진을 통한 항염증작용을 기대해 볼 수 있을 것으로 생각한다. 단, 즉시형 과민반응에 관여하는 항체와 cytokine의 증가는 과민반응에 의한 염증반응에 대해서 일정한 항염증효과를 기대하기 어려울 것으로 사료되며, 이에 대해서는 좀 더 지속적인 연구가 필요하다고 생각한다.

결 론

少陽人 荊防敗毒散(SHBPDS)의 알코올 추출물의 항염증 효과를 HMC-1 과 마우스의 면역세포를 통해 알아본 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

SHBPDS의 알코올 추출물은 염증반응이 유도된 비만세포에서 분비되는 Pro-inflammatory cytokine인 IL-6 와 TNF- α 의 분비를 감소시켰다. SHBPDS의 알코올 추출물은 마우스 B cell의 증식능을 향상시켰다. SHBPDS의 알코올 추출물의 투여로 마우스 B cell의 활동성을 나타내는 CD69, CD23, sIgE는 감소했으나 통계학적 유의성은 없었다. IgE 와 IgG1 및 INF- γ 의 분비는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군에 비해 유의성 있게 증가했다가 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 결과를 나타냈다. 반면 IL-4는 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하는 결과를 보였다. SHBPDS의 알코올 추출물의 투여로 마우스 T cell의 증식능은 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다. SHBPDS의 알코올 추출물의 투여로 마우스 Th cell이 분비하는 INF- γ (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 와 IL-2(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)는 대조군에 비해 유의성 있게 감소했으나 IL-4는 50, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 감소, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 증가하는 반응을 보였다.

따라서 SHBPDS의 알코올 추출물은 비만세포의 IL-6와 TNF- α 의 분비량 감소와, B cell의 활동성감소, Th cell의 INF- γ , IL-2의 분비량을 감소시켜 항염증효과가 있음을 알 수 있다. 그러나 과민반응에 의한 염증일 경우에는 일정한 항염증효과를 기대하기 어려울 것으로 사료되며, 면역세포의 증식능의 증가는 면역력 약화에 의한 염증반응의 경우에 면역증진을 통한 항염증작용을 기대해 볼 수 있을 것으로 사료되나, 이에 대한 연구는 추후 지속적으로 이루어져야 할 것으로 본다.

참고문헌

1. 의학교육연수원. 가정의학. 서울, 서울대학교출판부, pp 268-271, 1993.
2. 조형준, 이진용, 김덕곤. 삼백피가 항알레르기 및 항염증반응에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지 19(2):175-195, 2005.
3. 한동석. 동의수세보원주석. 서울, 대원출판, pp 471-473, 2005.
4. 김대성. 소양인(少陽人) 형방패독산(荊防敗毒散)의 효능에 관한 실험적 연구. 사상의학회지 1(1):171-181, 1989.
5. 이수영, 안택원. 형방패독산과 독활지황탕이 Wistar rat의 노화에 미치는 영향. 사상의학회지 17(3):91-102, 2005.
6. 이제마. 동의수세보원. 서울, 여강출판사, p 227, 592.

7. 전국 한의과대학 사상의학교실. 사상의학. 서울, 집문당, pp 193-194, 561, 1997.
8. 김권현. 소양인형방패독산으로 몇가지 완고한 두통을 치료한 체험. 사상의학회지 6(1):49-50, 2005.
9. 한동윤, 심규현, 김정렬, 김달래. 소양인 중풍환자에 병발된 Aspiration Pneumonia에 형방패독산을 투여한 증례. 사상의학회지 15(2):75-83, 2005.
10. 허만희, 심길보, 이수현, 황석환, 허기희, 권병삼 외 36명. 체형사상학회 임상경험집 1권. 서울, 고승출판사, pp 161-165, 2006.
11. 이형구, 정승기. 동의폐계내과학. 서울, 민서출판사, pp 98-104, 1993.
12. 이종대. 새로 보는 감기의 한약치료. 서울, 정담출판, pp 31-33, 2002.
13. 정혁준, 홍무창, 신민규, 배현수. 소청룡탕이 분화된 Th1 cell 및 Th2 cell cytokine profile에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 19(2):380-388, 2002.
14. 남봉수, 김윤범. 삼소음과 삼소음가미방의 항알레르기효과에 관한 실험적 연구. 대한한학회, 15(1):343-355, 2005.
15. 권오성, 김진택, 박인식, 안상현, 이해풍, 김호현, 강윤호. 연교패독산가미방이 알러지성 접촉피부염에 미치는 영향. 동국대논문집, 8(1):77-91, 2005.
16. 이상준, 전귀옥, 송광규, 최해윤, 김종대. 은교산과 Ciprofloxacin의 병용투여가 Streptococcus pneumoniae 호흡기감염에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 19(4):1039-1045, 2005.
17. 김영성, 정승기, 이형구. 어성초(魚腥草) 및 상국음(桑菊飲)이 면역기능에 미치는 영향. 한의학회지 16(1):295-318, 2005.
18. Cho, J.H., Namgung, U., Kim, D.H. Anti-inflammatory activity of chihyo-san to protect respiratory tissues from asthmatic damage. Korea J. Oriental Physiology & Pathology 20(3):710-718, 2006.
19. 광노규, 강희, 명유진, 박성민, 심범상, 김성훈, 최승훈, 안규석. 連翹敗毒散 물 추출물의 마우스 Th1/Th2 사이토카인調節에 의한 항알레르기 효과. 동의생리병리학회지 20(4):844-852, 2006.
20. 송무식, 조동희, 전귀옥, 박미연, 최해윤, 김종대. 定喘化痰降氣湯이 xylene으로 유발된 마우스의 급성 염증에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 20(4):875-881, 2006.
21. 이정은, 유동열. 加味補陽還五湯의 抗血全 및 抗炎작용에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지 20(4):957-965, 2006.
22. Moon, J.W., Oh, M.S. Inhibitory effect of Coicis Semen composition on inflammatory responses in the collagen-induced arthritis mouse model. Korea J. Oriental Physiology & Pathology 20(5):1311-1314, 2006.
23. 임강민, 강희, 박성민, 심범상, 김성훈, 최승훈, 안규석. 不換金正氣散이 마우스 Th1/Th2 분화 및 알레르기 염증 반응 조절에 미치는 효과. 동의생리병리학회지 20(6):1467-1476, 2006.

24. 김지혜, 임현정, 신선미, 김수민, 이정은, 유동열. 加味復元通氣散의 항염증작용에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지 21(4):860-868, 2007.
25. 김은경, 김은영, 이현삼, 정혁상, 박성규, 손영주, 손낙원. 四物湯이 알러지 염증반응에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 21(3):617-625, 2007.
26. 김진경, 임현정, 신선미, 김수민, 이정은, 유동열. 龍膽瀉肝湯合黃連解毒湯加減의 항염작용에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지 21(4):946-954, 2007.
27. Artuc, M., Hermes, B., Steckelings, U.M., Grützkau, A., Henz, B.M. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing-active participants or innocent bystanders. *Experimental Dermatology*. 8(1):1-16, 1999.
28. 이영훈, 한의혁, 송창호. 비만세포의 두 얼굴. 천식 및 알레르기, 20: 684-690, 2000.
29. Hong, C.C., Shimomura-Shimizu, M., Muroi, M., Tanamoto, K. Effect of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α and nitric oxide production by mouse macrophage. *Biol Pharm Bull*. 27(7):1136-1139, 2005.
30. 김완수. rHRF 유발로 활성화된 생쥐의 B 임파구와 비만세포에서 신이 추출물의 항알러지 작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지 15(6):917-926, 2001.
31. 이종달. 그림으로 설명한 병리학. 서울, 고려의학, p 29, 1991.
32. Ershler, W.B., Keller, E.T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*. 51: 245-270, 2000.
33. Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 37(6):355-361, 2003.
34. 하대유. 그림으로 본 면역학 3판. 서울, 고문사, p 12, 16, 45, 1994.
35. Roever, A.C., Heine, G., Zuberbier, T., Worm, M. Allergen-mediated modulation of CD23 expression is interferon- γ and interleukin-10 dependent in allergic and non-allergic individuals. *Clin Exp Allergy*. 33(11):1568-1575, 2003.
36. 文希柱, 權赫儻. 기본면역학. 서울, 대학서림, pp 40-45, 1992.
37. Abul, K., Abbas Andrew, H. Lichtman. 세포분자면역학 5판. 서울, 범문사, pp 213-215, 2005.
38. Rao, A., Avni, O. Molecular aspects of T cell differentiation. *Br Med Bull*. 56(4):969-984, 2005.
39. 김세종. 면역학 길라잡이. 서울, 고려의학, pp 65-68, 2000.
40. 김태규, 박수정, 서영훈, 신동건, 엄현석, 이정립 외 5인. 면역생물학 5판. 서울, 라이프사이언스, pp 3-33, 2002.
41. 김주덕, 성인화, 오양호, 김영부, 정선식, 정현택 외 5인. 필수면역학. 서울, 고문사, pp 97-114, 1991.
42. Abul, K., Abbas Andrew, H. Lichtman. 세포분자면역학 4판. 서울, 범문사, pp 198-258, 2002.
43. Tokuyama, H., Tokuyama, Y., Nakanishi, K. Retinoids inhibit IL-4 dependent IgE and IgG1 production by LPS-stimulated murine splenic B cell. *Cell Immunology*. 162(1):153-158, 1995.
44. 류혜숙, 김현숙. 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포활성에 미치는 영향. 한국영양학회지 37(1):23-30, 2004.