Compound 48/80로 유발된 Allergy에 대한 生血潤膚飮의 효과

김희열 · 박종현*

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실

Inhibitory Effect of Saingheylyunbooem on Compound 48/80 Stimulated Allergic Reaction

Hee Yeol Kim, Jong Hyun Park*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Deagu Haany University

The present study was conducted to investigate the anti-allergic activity of Saingheylyunbooem(SHU)). We investigated the anti-allergic effects of SHU in RBL-2H3 basophilic leukemia cells by compound 48/80, a mast cell degranulator in mice. SHU inhibited β-hexosaminidase and histamine release from compound 48/80 stimulated RBL-2H3 cells. The in vitro anti-inflammatory activities of SHU in LPS-stimulated RAW 264.7 cells were investigated. SHU inhibited NO production effectively dowregulated the expression of iNOS mRNA and iNOS protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These result provide evidences that SHU may be beneficial in the treatment of allergic inflammtory disease.

Key words : Saingheylyunbooem(SHU), allergy, compound 48/80, β-hexosaminidase, histamine release, nitric oxide

서 론

아토피 피부염은 피부 건조와 소양증을 특징으로 하는 가장 흔한 만성 염증성 피부 질환 중의 하나로 주로 영 유아기에 높은 발생을 보이며[1], 유전적인 소인과 여러 가지 외부 요인과의 상호작용을 포함한 복잡한 생리 병리학적인 면을 가지고 있다[2]. 최근 수십 년간 주거환경, 식생활 환경 등의 변화로 전 세계적으로 상당히 증가하는 추세에 있어 유아기, 아동기의 아토피 피부염 유병율은 10-20%에 달하는 것으로 보고되고 있다[3].

피부염의 발생 시 일반적으로 국소부신피질호르몬 제제와 보습제를 같이 사용하는데, 국소피질호르몬 제제는 장기간 사용 시 피부 위축, 혈관 확장, 색소 탈실 및 팽창선조의 발생 등 다양한 부작용을 야기 할 수 있어[2], 효과적이며 안전하게 치료할 수 있는 천연물에 대한 많은 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

한의학적으로 아토피 피부염은 女乃癬, 胎癬, 胎斂瘡 등으로 표현되며[4], 隋代의 巢[5]는 소아의 면부에 癬被가 甲錯되고 건조하게 되는 乳癬이라 하여 영아습진과 유사한 것으로 보았으며, 淸代의 吳[6]는 乾斂과 濕斂으로 나누어 설명하였다.

* 교신저자 : 박종현, 대구시 수성구 상동 165, 대구한의대학교 한의과대학
· E-mail : moguri@dhu.ac.kr, · Tel : 053-770-2248
· 접수 : 2010/01/19 · 수정 : 2010/02/01 · 채택 : 2010/02/11

生血潤膚飮은 醫學正傳[7]에 收載된 처방으로 生血, 生津液, 養陰하는 작용으로 潤燥, 淸燥, 止渴, 潤膚의 효과를 갖고 있어 燥로 인하여 皮膚가 갈라지고 鱗屑이 나오며 심하면 出血이 생기는 증상에 사용되며, 임상에서 乾燥를 위주로 하는 아토피성 피부염에 다용하고 있다.

아토피에 관한 연구를 살펴보면, 면역학적 관점이 주류를 이루어, 이 등[8]의 소아 아토피성 천식 및 피부염에서 Anti-IgE 자가항체의 양성율 및 특성, 이[9]의 아토피 피부염의 중증도와 혈청 IgE 및 IFN-γ에 관한 연구 등이 있으며, 치료방법에 관한 연구로는 김 등[10]의 加味生料四物湯의 항염증 효과와 止瘍膏의 아토피 피부염 손상 및 지양효과에 미치는 영향, 정 등[11]의 加味熱多寒少湯 투여 후 아토피 피부염 환자의 임상 변화에 대한 연구 등이 있다.

본 연구는 아토피성 피부염에 사용하는 生血潤膚飮의 항 알레르기에 대한 효과와 항염증 효과를 알아보기 위하여 정상 면역세포 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용하여 알레르기 반응 시 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진 β-hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 Nitric Oxide 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의적인

결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 검액의 준비

실험에 사용한 藥材는 대구한의대학교 부속한방병원에서 구입하여 良質의 것을 精選하여 사용하였으며, 처방은 『醫學正傳[7]』에 收載된 生血潤膚飮으로서 내용 및 1첩 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Components of Saingheylyunbooem(SHU)

Oriental Crude Drug	Scientific name	Dose (g)
當歸	*ANGELICAE GIGANTIS RADIX*	4
生地黃	*REHMANIAE RADIX PREPAPAT*	4
熟地黃	*REHMANIAE RADIX PREPAPAT*	4
黃芪	*ASTRAGALI RADIX*	4
天門冬	*ASPARAGI RADIX*	6
麥門冬	*LIRIOPIS TUBER*	4
五味子	*SCHIZANDRAE FRUCTUS*	4
黃芩	*SCUTELLARIAE RADIX*	2
栝蔞仁	*TRICHOSANTHIS FRUCTUS*	2
桃仁	*PERSICAE SEMEN*	2
紅花	*CARTHAMI FLOS*	0.4
升麻	*CIMICIFUGAE RHIZOMA*	0.8
총량		37.2

生血潤膚飮 10첩 분량 372 g을 증류식 약탕기 (CME 592, 미강기업, Korea)에 전탕 하였다. 전탕 후 얻어진 3 L를 rotary evaporator (Eyela N-11, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)를 이용하여 30℃에서 감압농축 하여 750 ㎖를 얻었다. 生血潤膚飮의 농축액은 -70℃에서 하루 동안 동결시킨 뒤 동결건조기 (VFDT0005-3085, Biocros, Korea)를 이용하여 -70℃에서 동결건조 시켰다. 농축시 당도는 15.07 brix 이고, 동결건조 후 무게는 84.06g(수율 22.6%)으로 PBS에 녹여 2.5 ㎛와 0.45 ㎛의 membrane filter (Milipore Co., USA)로 여과하여 실험에 사용하였다.

2) 실험동물

무균 환경에서 사육된 5주령의 수컷 ICR 마우스와 6주령의 암컷 마우스를 (주)오리엔트 (경기도 가평, 한국)에서 구입하여 각 실험에 사용하였다. 마우스는 사료와 물을 무제한으로 공급하면서 실험 전 약 1주간 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실의 조명은 12시간씩 dark/light 주기로 실시하였고, 온도는 22±2℃, 습도는 55±2%를 유지하였다.

2. 방법

1) 비장세포 분리

마우스를 경추 탈골시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 주위 조직을 제거하였다. Slide glass로 부드럽게 압착하여 비장을 분쇄한 후 4℃ Hanks Balanced Salt Solution (GibcoBRL, NY, U.S.A)용액으로 2회 세척하였다. Ficoll-pague (Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 1,800 rpm 에서 30분 원심 분리하여 임파구 층을 수거한 후, RPMI 1640 (GibcoBRL, NY, U.S.A) media로 1회 더 세척하고 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI 1640에 현탁 시켰다. 현탁된 세포는 일정액을 취하여 0.4% tryphan blue에 동량으로 혼합한 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 산정하였다.

2) 세포주 배양

마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7 (America Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A)은 Dulbecco´s Modified Eagle's Medium (GibcoBRL, NY, U.S.A)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, NY, U.S.A)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/㎖ penicillin, 50 ㎍/㎖ streptomycin (GibcoBRL, NY, U.S.A)을 첨가하여 100 ㎜ dish에 80% 세포의 밀도를 유지하면서 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. Rat의 basophilic 세포주인 RBL-2H3 세포주는 RPMI 1640 Medium (GibcoBRL, NY, U.S.A)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GibcoBRL, NY, U.S.A)과 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/㎖ penicillin, 50 ㎍/㎖ streptomycin (GibcoBRL, NY, U.S.A)을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

3) 비장세포의 증식능 측정

마우스 비장세포를 2×10^6cells/㎖ 세포가 되게 세포수를 조정하여 96 well culture plate에 100 ㎕ 분주한 다음 각 well에 시료를 농도별로 첨가한 후 37℃, 5% CO_2 incubator에 넣어 48시간 배양하였다. 배양 후 배양액 100 ㎕에 세포 증식능 시약을 20 ㎕를 첨가한 후 37℃, 5% CO_2 incubator에 1시간 30분 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 임파구 증식능을 측정하기 위해 CellTiter 96Ⓡ AQueous one solution cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, U.S.A) 시약을 사용하였다.

4) β-hexosaminidase의 측정

RBL-2H3 세포를 수거하여 Tyroid buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1.1 mM $MgCl_2$, 11.9 mM $NaHCO_3$, 0.4 mM NaH_2PO_4, 5.6 mM glucose, PH 7.2)로 1회 세척하였다. 5×10^5cells/㎖ 로 조절한 후 Tyroid buffer에서 부유시켰다. 부유된 세포에 농도별로 生血潤膚飮을 첨가하여 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후, compound 48/80 (1 ㎎/㎖, Sigma, U.S.A)을 첨가하고 37℃ 배양기에서 20분간 반응시켰다. 배양 후 RBL-2H3 세포주를 4℃에서 10분간 방치하여 반응을 종결시키고 상층액을 회수하였다. 상층액에 동량의 1 mM p-nitrophenyl-β-acetyl-glucosamide를 넣고 37℃ 배양기에서 1시간 동안 반응시킨 후 2배량의 sodium bicarbonate (PH 10.2)의 첨가로 반응을 종결시키고 407 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. β-hexosaminidase의 분비지표(release index)는 다음과 같이 계산하였다.

$$\beta\text{-hexosaminidase release index} = \left(\frac{\text{O.D at 470nm of sample}}{\text{O.D at 470nm of positive control}}\right) \times 100$$

5) Histamine의 측정

RBL-2H3 세포를 수거하여 Tyroid buffer(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 1.1 mM $MgCl_2$, 11.9 mM $NaHCO_3$, 0.4 mM NaH_2PO_4, 5.6 mM glucose, PH 7.2)로 1회 세척하였다. 세포수를 5×10^5cells/㎖ 로 조절한 후 Tyroid buffer에서 부유시켰다. 부유된 세포에 농도별 生血潤膚飮을 첨가하여, 37℃ 배양기에서 15분간 반응시킨 후 compound 48/80 (1 ㎎/㎖, Sigma, U.S.A)를 첨가하고 37℃ 배양기에서 20분간 반응시켰다. 배양 후 RBL-2H3 세포주를 4℃에서 10분간 방치하여 반응을 종결시킨 후 상층액을 회수하였다. Histamine의 정량은 Shore가 보고한 fluorometer를 이용한 측정방법을 사용하였다. 간단히 설명하면, 회수한 상층액 1 ㎖에 0.2 ㎖의 1N NaOH, 0.1 ㎖의 1% OPA (o-phthalaldehyde)를 첨가하고 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 1N HCl 0.2 ㎖ 첨가하여 반응을 종결시킨 다음, fluorometer (Genios, Tecan, Austria)를 사용하여 360 nm의 excitation 파장과 450 nm의 emission 파장을 사용하여 측정하였다.

6) Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로서 Griess (Sigma)시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100 ㎕와 Griess 시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α-naphthylamide in H_2O) 100 ㎕를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO_2^-의 농도는 sodium nitrite를 사용하여 만든 표준곡선에 의해 산출하였다.

7) RT-PCR을 이용한 iNOS 유전자 분석

RNA분리는 RNA-Bee (TEL-TEST, INC, U.S.A)를 이용하여 분리하였다. 마우스 비장세포에서 RNA를 분리하기 위하여 0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate)가 첨가된 PBS로 비장세포를 3회 세척 후 RNA-Bee 900 ㎕를 첨가하여 균질화시켰다. 여기에 클로로포름 100 ㎕를 넣고 15분간 얼음에 정치시켰다. 그 후 4℃, 12,000rpm에서 15분간 원심 분리하고 상등액을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 45분간 정치한 후 원심 분리하여, 70% DEPC-Ethanol로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 일정량 희석하여 spectrophotometer로 농도를 측정하였다. 5× RT buffer 2 ㎕ (10 mM dATP 0.25 ㎕, 10 mM dGTP 0.25 ㎕, 10 mM dTTP 0.25 ㎕, 10 mM dCTP 0.25 ㎕, MMLV reverse transcriptase (200 U/㎕) 0.25 ㎕, RNase inhibitor (28 U/㎕) 0.25 ㎕, 50 uM oligo dT primer 0.5 ㎕, DEPC-distilled water 4 ㎕)를 PCR tube에 넣어 42℃에서 60분간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였다. PCR은 10× PCR buffer 3 ㎕ (25 mM $MgCl_2$ 1.8 ㎕, 10 mM dATP 0.3 ㎕, 10 mM dGTP 0.3 ㎕, 10 mM dTTP 0.3 ㎕, 10 mM dCTP 0.3 ㎕, 50 uM sense 및 antisense primer 0.25 ㎕, Tag polymerase (5 U/㎕, Promega Co.) 0.25 ㎕)를 혼합하고, 여기에 증류수로 최종 부피가 20 ㎕ 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. PCR mixture를 PCR tube에 넣고 여기에 역전사 산물을 5 ㎕ 첨가하여 혼합한 뒤 PCR 장치에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 94℃에 3분간 1 cycle 반응 후 94℃ 45초, 57℃ 45초, 72℃ 45초간 35 cycle 반응시켰으며, 72℃에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료시켰다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동하여 Gel Doc (Bio Lad, Italy)를 이용하여 DNA band를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 primer는 (주)바이오니아사 (Bioneer Co, Choongbook)에 의뢰하여 합성하였으며, 각 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

Table 2. Primer sequences of iNOS gene expression

	Oligonucleotide sequence
G3PDH	5′-CCA CCC AGA AGA CTG TGG ATG GC-3′
	3′-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-5′
iNOS	5′-GAC AAG CTG CAT GTG ACA TC-3′
	3′-GCT GGT AGG TTC CTG TTG TT-5′

8) Western blotting을 이용한 iNOS 단백질 발현 분석

세포를 차가운 PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 10 ㎍/㎖ leupeptin, 2 mM PMSF, 2 ㎍/㎖ aprotinin 10 ㎍/㎖ Na_3VO_4, 10 ㎍/㎖ $Na_5P_2O_7$)를 가하여 (100 ㎕/1×10^6cells) 균질화하고 단백질을 추출한 다음 4℃에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, U.S.A)로 정량한 후 동일량의 단백질 (30 또는 40 ㎍)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrlyamide gel eletrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC, Schleicher & Schuell BioScience, Germany)에 transfer하였다. 이 NC를 3% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (TBS-T; 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 1시간 동안 반응 시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단하고 anti-iNOS 항체와 반응시킨 후 2차 항체인 anti-mouse IgG로 1시간 30분 반응시켰다. 각 반응 사이에 TBS-T로 10분씩 3회 30분 동안 수세하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 band를 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK) detection 방법으로 확인하였다.

결 과

1. 비장세포 증식능에 미치는 영향

生血潤膚飮이 면역계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마우스 비장세포 증식능에 미치는 효과를 관찰하였다. 분리된 마우스 비장세포에 生血潤膚飮 열수추출액을 농도별(500, 1000, 1500, 2000 ㎍/㎖)로 처리하여 24시간, 48시간 세포 증식능을 관찰하였다. 그 결과 24시간 배양시 마우스 비장세포의 증식능은 生血潤膚飮 처리 농도에 따라 0.276±0.007, 0.271±0.005, 0.239±0.004 및 0.234±0.004로 대조군 0.237±0.003에 비해 500 ㎍/㎖와 1000 ㎍/㎖에서 유의한 세포 증식능이 관찰되었다. 48시간 배양시 마우스 비장세포의 증식능은 生血潤膚飮 처리 농도에 따라 0.193±0.015, 0.168±0.015, 0.172±0.002, 0.181±0.007의 세포 증식능을 보였다 (Fig. 1).

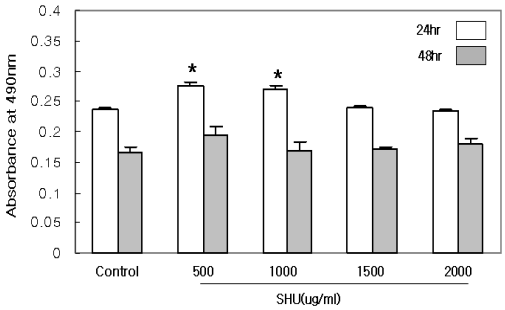

Fig. 1 Effect of the cell proliferation in mouse spleen cells. Mouse spleen cells (2×10^6 cells/㎖) were cultured with 500, 1000, 1500, 2000 ㎍/㎖ of Saingheylyunbooem(SHU) for 24hr and 48hr. Control group was incubated with RPMI 1640 medium only. Result are expressed as means ± S.D. in triplicate cultures. *, significant difference from control(P<0.05).

2. RBL-2H3 세포에서 β-hexosaminidase 분비억제에 미치는 영향

生血潤膚飮의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 비만세포나 호염구 세포의 분비과립에 초래하는 β-hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주에서 관찰하였다. RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위하여 세포내 칼슘 유입을 증가시켜 세포내 탈과립을 유도할 수 있는 compound 48/80을 사용하였다. 실험결과, compound 48/80 자극에 의한 β-hexosaminidase 분비가 compound 48/80 단독처리 60.3±0.7%에 비해 生血潤膚飮 처리시 농도에 따라 61.6±0.8, 57.5±0.1, 54.6±0.6, 52.4±0.2%로 1000, 1500, 2000 ㎍/㎖에서 β-hexosaminidase 분비가 유의하게 억제되었다(Fig. 2).

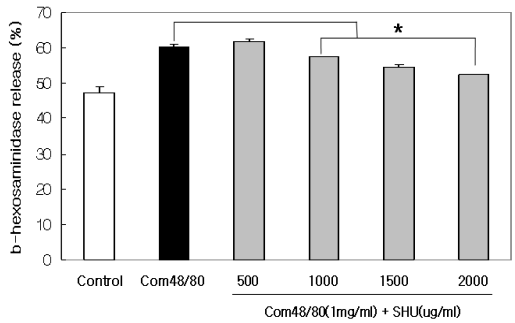

Fig. 2. Inhibitory effect of Saingheylyunbooem(SHU) on the β-hexosaminidase released from RBL-2H3 cells by compound 48/80. Result were expressed as % release of β-hexosaminidase. All values are means ± S.D from three experiments. * significant difference from compound 48/80 alone (P<0.05)

3. RBL-2H3 세포에서 Histamine 분비억제에 미치는 영향

生血潤膚飮의 항알러지 효과를 살펴보기 위해 알레르기 반응의 원인세포로 알려진 비만세포dhk 호염구 세포의 분비 과립에 존재하는 histamine의 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포주를 이용하여 관찰하였다. RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위해 compound 48/80을 사용하였다. 실험결과, compound 48/80 자극에 의한 histamine 분비가 compound 48/80 단독처리 74.1±3% 에 비해 生血潤膚飮 처리에 의해 histamine 분비가 65.2±2, 67.6±2, 58.7±3, 52.2±3%의 결과를 보였으며 1500, 2000 ㎍/㎖에서 유의하게 억제되었다(Fig. 3).

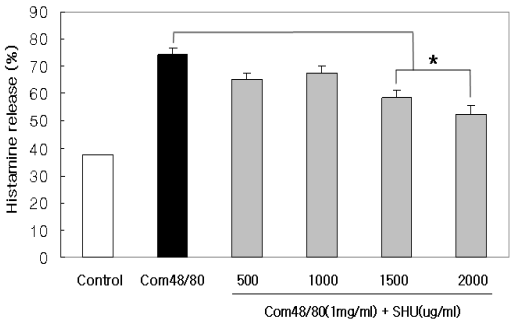

Fig. 3. Inhibitory effect of Saingheylyunbooem(SHU) on the histamine released from RBL-2H3 cells by compound 48/80. Results were expressed as % release of histamine. All values are means ± S.D from three experiments. * significant difference from compound 48/80 alone (P<0.05)

4. LPS로 자극된 RAW 264.7 마우스 대식세포에서 NO 생성 억제에 미치는 영향

生血潤膚飮의 항염증성 효과를 관찰하기 위해 LPS로 자극된 RAW 264.7 마우스 대식세포주를 이용하여 NO 생성 조절에 미치는 영향을 조사하였다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성 31.2±0.08(μM/㎖)은 生血潤膚飮의 처리 농도별에 23.4±0.08, 14.2±0.15, 9.6±0.08, 9.1±0.13(μM/㎖)으로 유의하게 억제되었다(Fig. 4).

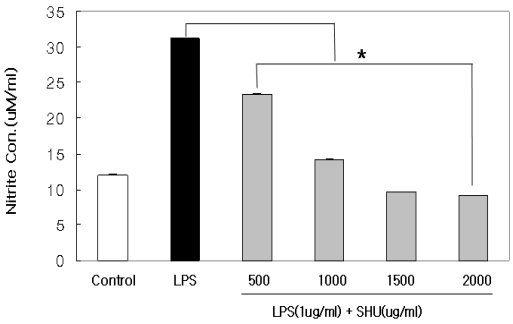

Fig. 4. Effect of Saingheylyunbooem(SHU) on production by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with lipopolysaccharide (LPS ; 1 ㎍/㎖) for 24hr in the presence or absence of SHU at indicated doses. The amount of NO released by cells were measured by the method of Griess. All values are means ± S.D from three experiments. * significant difference from LPS alone (P<0.05)

5. LPS로 자극된 RAW 264.7에서 iNOS mRNA 및 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

生血潤膚飮에 의한 RAW 264.7 마우스 대식세포에서 NO 생성의 억제가 iNOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현과의 관련성을 조사하기위해 RAW 264.7 마우스 대식세포주에 LPS와 生血潤膚飮을 처리한 후 iNOS mRNA 유전자 발현과 iNOS 단백질 발현을 RT-PCR 과 Western blotting 으로 관찰하였다. 실험결과, LPS 단독 처리시 iNOS mRNA 유전자 발현이 강하게 유도됨이 관찰되었으며, 이러한 유전자 발현은 생혈유부음 처리에 의해 감소되었으며, iNOS 단백질 발현 또한 生血潤膚

飮 처리에 의해 감소되었다(Fig. 5, 6).

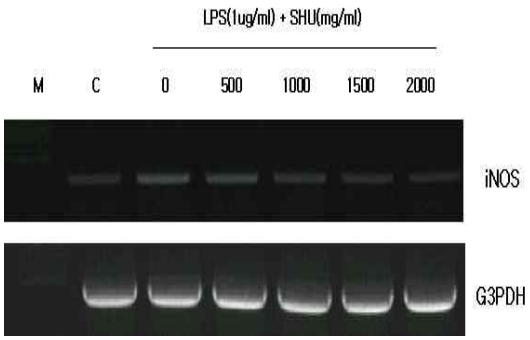

Fig. 5. Effect of Saingheylyunbooem(SHU) on iNOS mRNA expression by LPS-stimulated with LPS (1 ㎍/㎖) in the presence or absence of various concentration of SHU for 24hr. After stimulation, total RNA was isolated from cultured cells using RNA-Bee and RT-PCR performed. G3PDH was used control genes. M; 100bp site marker.

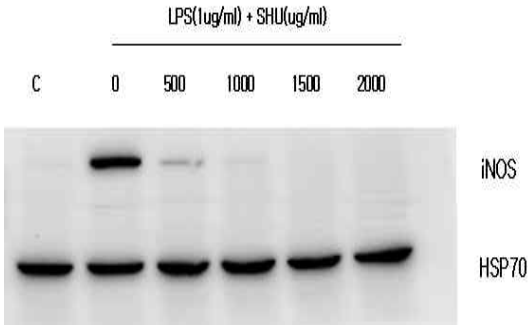

Fig. 6. Effect of Saingheylyunbooem(SHU) on iNOS protein expression by LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS ; 1 ㎍/㎖) in the presence or absence of various concentration of SHU for 24hr. The protein extracts were prepared, and the samples analyzed for iNOS expression by western blotting as described in the method. HSP70 was a control protein.

고 찰

아토피 피부염은 주로 영, 유아기에 높은 발병율을 보이는 흔한 피부질환으로 심한 소양감과 홍반, 부종, 삼출물, 가피를 동반하는 만성 재발성 질환이다[1,12,13]. 대부분의 임상 양상은 긁거나 문지른 결과에 의해 발생하며, 소양증은 낮 뿐만 아니라 밤에는 더욱 심하여 수면 장애를 일으킨다[14].

아토피는 알레르기 반응을 일으키게 하는 면역 물질을 쉽게 형성함으로써 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염 등을 잘 일으키는 유전적 경향을 말하는데[15], 주된 위험 요인으로 아토피의 가족력, 인종, 성별 등이 포함되며, 계절, 낮은 경제 계층, 도시 거주 등도 위험 요인으로 거론되고 있으며 아토피에 대한 무지, 영유아기의 알레르기를 일으키기 쉬운 음식물 섭취, 주거 환경에서의 진드기, 비듬, 먼지 등의 높은 농도, 환경 공해와 간접흡연 등도 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다[16].

아토피 피부염 치료의 목표는 건조한 피부에 대한 적절한 수화와 더불어 소양증과 피부염을 감소시키면서 그 악화 요인을 줄이는 것이다[17]. 현재 서양의학에서 일반적으로 사용하는 치료법은 악화원인의 파악 및 회피, 알레르겐의 회피, 경구용 항히스타민제 복용, H2 길항제 및 항우울제의 사용, 국소용 스테로이드 등 매우 다양하지만 장기간 사용 시 나타나는 부작용으로 인하여 보다 효과적이며 안전하게 치료할 수 있는 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[18].

한의학에서는 女乃癬, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 四彎風, 淫瘡 등이 아토피 피부염의 범주에 속한다고 볼 수 있는데[19], 巢元方은 『諸病源候論·小兒雜病諸候·癬候』에서 "小兒面上癬皮如甲錯起乾燥, 謂之乳癬, 言兒飮乳, 乳汁潰汚兒面, 變生此症"이라 하였고[5], 『醫宗金鑑』에서는 "乾痒白屑濕淫水, 熱極紅暈類火丹, 此症初生頭頂, 或生尾端, 又名女乃癬. 痒起白屑, 形如疥癬, 由腹中血熱, 落草受風, 此卽乾斂瘡, 由誤用湯火洗皮膚起票票, 瘙痒無度, 黃水津淫, 延及遍身, 卽成濕斂瘡"이라 하였으며[6], 『瘍醫大全』에서는 "與兒生後, 頭面遍身發爲女乃癬, 流脂成片腫, 臥不安, 瘙痒不絶"이라고 기술하여 오늘날 아토피 피부염의 원인과 증상에 대해 자세히 기술하고 있다[20]. 한의학적으로 아토피 피부염은 風熱, 血熱, 血虛, 脾胃運化機能 失調 등을 아토피 피부염의 원인으로 보고 치료에 임하고 있으며, 특히 燥熱을 주된 병기로 보고 있다[21].

生血潤膚飮은 醫學正傳[7]에 收載된 처방으로 當歸, 生地黃, 熟地黃, 天門冬, 麥門冬, 黃芪, 五味子, 片芩, 瓜蔞仁, 桃仁, 升麻, 紅花로 구성되어 있다. 구성약물 중 君劑인 天門冬은 養陰淸熱潤燥生津하기 때문에 능히 肺腎의 虛熱을 다스리며 麥門冬과 配合하여 肺燥를 다스리고, 生地黃은 淸熱凉血 生津止渴하며 熟地黃은 補血 滋陰의 효능이 있으며, 當歸는 補血和血 潤腸通便하고, 黃芪는 當歸와 배합하여 益氣 生血한다. 본 처방은 전체적으로 生血, 生津液, 養陰하는 작용으로 潤燥, 淸燥, 止渴, 潤膚의 효과를 갖고 있어 燥로 인하여 皮膚가 갈라지고 鱗屑이 나오며 심하면 出血이 생기는 증상에 사용되며, 임상에서 乾燥를 위주로 하는 아토피성 피부염에 다용하고 있다.

본 연구에서는 아토피성 피부염에 사용하는 生血潤膚飮의 항 알레르기에 대한 효과와 항염증 효과를 알아보기 위하여 정상세포 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용하여 알레르기 반응 시 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진 β-hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 Nitric Oxide 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

비장세포는 2차 면역장기로 대식세포와 많은 적혈구로 구성되어 있고 노화된 적혈구가 파괴되고 제거되는 곳으로 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[22]. 따라서 본 실험에서는 소아 아토피성 피부염에 다용되는 生血潤膚飮을 시간별(24시간, 48시간) 농도별(500, 1000, 1500, 2000 ㎍/㎖)로 처리하여 마우스 비장세포에 증식에 미치는 영향을 관찰하였다. 실험결과 처리시간 24시간에서는 500, 1000 ㎍/㎖에서 대조군에 비해 세포증식능이 유의성 있게 증가하였고, 48시간 배양시 마우스 비장세포의 증식능은 약간의 세포증식이 관찰되었다. 이는 生血潤膚飮이 면역 세포를 활성화하여 주로 기능이 저하되고 허

약한 환자에게 사용하여 저하된 기능을 강화 시켜 줄 수 있음을 알 수 있었다.

염증반응에 관여하는 면역세포로는 대식세포, 비만세포, 호염구등이 알려져 있지만 특히 알레르기 염증반응의 대표적인 세포로는 비만세포와 호염구가 알려져 있다[23-25]. 비만세포는 즉시형 과민 반응에서 일어나는 염증 반응에서 핵심적인 역할을 수행할 뿐 아니라 그외 다른 염증 과정이나 생리적인 면역의 진행과 조절에 주도적인 역할을 하고 있음이 알려져 있다[23,26-28]. Histamine 과 β-hexosaminidase는 이들 세포에서 탈과립의 지표로 알려져 있어 알레르기 억제물질의 생물활성 측정에 유용하게 사용되고 있다[24,28-30]. 본 연구에서는 Rat 점막 비만세포와 상동성이 높은 Rat RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주인 RBL-2H3 세포주를 지시세포로 사용하여 비만세포의 탈과립을 유도하는 compound 48/80을 사용하여 탈과립을 유도 하였다. Compound 48/80 은 비만세포내로 칼슘 유입을 증가시켜 세포내 칼슘 수준을 증가시키고 세포내 cAMP phosphodiesterase를 활성화시켜 세포내 cAMP 수준을 감소시킴으로써 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제로 알려져 있다[25,27]. Compound 48/80 은 고농도에서 비만세포로부터 약 90%의 히스타민을 유리시키는 것으로 알려져 있으며 적당량의 compound 48/80은 유리 촉진제로서 사용되고 있다[23,27,31]. 따라서 본 실험에서는 生血潤膚飮의 항알러지 효과를 알아보기 위해 RBL-2H3 세포주에 비면역자극제인 compound 48/80로 자극 후 이들 세포의 분비과립에 존재하는 β-hexosaminidase와 histamine 분비에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, β-hexosaminidase 분비가 生血潤膚飮 처리시 농도 1000, 1500, 2000 ㎍/㎖에서 유의하게 억제됨이 관찰 되었으며, histamine 분비 또한 1500, 2000 ㎍/㎖에서 유의하게 억제됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 生血潤膚飮이 비만세포의 탈과립으로 촉발되는 알레르기 염증질환에 매우 효과적일 것이라는 것을 시사하였다.

대식세포는 면역반응의 초기반응과 비특이적 면역반응을 담당하며, 생체 내에서 감염, 염증 등의 반응에 중요한 역할을 하는데, 선천면역 뿐만 아니라 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여 하는 것으로 알려져 있다[22,32-34]. 대식세포는 superoxide, hydrogen peroxide 및 NO와 같은 중간물질을 생산하며, 탐식된 이 물질을 분해 시킬 때 생성되는 IL-1, TNF-α 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고 되고 있다. 그 중 산화질소 (nitric oxide; NO)는 주로 대식세포에서 생성되는 작고 불안정한 무기가스로 이중적 생물학적 성질을 가지고 있어서, 저 농도의 NO는 신경전달물질 등과 같은 작용을 하나, 과도한 NO 생성은 급・만성 염증에 관여하여, 숙주세포의 파괴와 염증조직의 상해를 초래하는 것으로 보고 되어 있다. 이렇듯 NO는 상황에 따라서 세포, 조직 혹은 개체에 이로울 수도 있고 해로울 수도 있어서 상황에 맞게 NO 분비를 촉진시키거나 억제시킴으로써 인체 생리현상을 조절 할 수 있으므로, NO 생성을 조절할 수 있는 물질을 찾고자 하는 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 본 실험에서 生血潤膚飮의 항 염증성 효과를 관찰하기 위해 LPS로 RAW 264.7 마우스 대식세포주를 자극하여 과도한 NO 생성을 유도한 후 生血潤膚飮의 NO 생성 조절에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과, LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성은 生血潤膚飮의 처리 농도 모두에서 유의하게 억제됨이 관찰되었으며 NOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현이 감소됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 生血潤膚飮이 염증성 질환의 예방 및 치료에 효과적일 것으로 생각된다.

이상의 결과는 生血潤膚飮이 항알레르기 및 항염증효과가 알레르기 반응 시 비만세포 세포의 탈과립 지표로 알려진 β-hexosaminidase 및 histamine 분비 억제, 염증반응과 관련된 NO 생성 조절 등에 관여되고 있는 것이 관찰되었으며, 추후 生血潤膚飮의 항알레르기 및 항염증에 효과적인 활성물질의 분리 정체가 수행된다면 새로운 항알레르기성, 항염증성 기능 물질로 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

결 론

生血潤膚飮의 항알레르기 효과를 관찰하기위하여 生血潤膚飮이 정상 면역세포의 증식에 미치는 영향, 알레르기 반응의 주요 세포인 비만세포와 상동성이 높은 RBL-2H3 basophilic leukemia 세포주를 이용하여 이들 세포의 탈과립 지표로 알려진 β-hexosaminidase 및 histamine 분비 억제에 미치는 영향, RAW264.7 대식세포주를 이용하여 염증반응과 관련된 NO 생성 및 조절기전에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

生血潤膚飮이 정상면역세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 2차 면역장기인 비장의 세포증식능을 조사한 결과, 生血潤膚飮을 처리에 의해 비장세포증식능이 유의성 있게 증가되었다. 生血潤膚飮의 항알레르기 효과를 측정하기위하여 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제인 compound 48/80을 사용 β-hexosaminidase분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, 生血潤膚飮의 처리에 의해 β-hexosaminidase 분비가 유의하게 억제되었다. 生血潤膚飮의 항알레르기 효과를 측정하기위하여 비만세포의 탈과립을 일으키는 비면역학적 자극제인 compound 48/80을 사용 Histamine 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, 生血潤膚飮의 처리에 의해 Histamine 분비가 유의하게 억제되었다. 生血潤膚飮의 항염증 효과를 관찰하기위해 급・만성 염증시 과도한 생성되는 NO 조절에 미치는 영향을 조사한 결과 生血潤膚飮이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 유도된 NO 생성을 유의하게 감소되었으며 iNOS mRNA 유전자 발현 및 iNOS 단백질 발현 또한 억제시켰다.

이상의 결과로 보아 生血潤膚飮은 알레르기 반응 세포의 탈과립 지표인 β-hexosaminidase 및 histamine 분비 억제와 염증반응과 관련된 NO 생성 억제를 통해 염증과 관련된 알레르기 질환에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각되며, 추후 生血潤膚飮의 항알레르기 및 항염증에 효과적인 활성물질의 분리 정체가 수행된다면 새로운 항알레르기성, 항염증성 기능 물질로 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

1. 조기여. 피부과학. 서울, 성화, pp 161-163, 2001.
2. 박영립. 아토피 피부염에서 보습제 사용. 한국피부장벽학회지 pp 37-40, 2007.
3. 박용민. 아토피 피부염 병태생리에 대한 최신 지견. 소아알레르기 및 호흡기학회지 16(3):189-196, 2006.
4. 윤화정, 고우신. 아토피 피부염 환자에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지 22(2):10-21, 2001.
5. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 大星文化社, pp 251-253, 1992.
6. 吳謙. 醫宗金鑑(下). 北京, 人民衛生出版社, pp 443-444, 1982.
7. 虞摶. 醫學正傳. 서울, 성보사, pp 77-79, 1986.
8. 이기영 외 4명. 소아 아토피성 천식 및 피부염에서 Anti-IgE 자가항체의 양성율 및 특성. 대한알레르기학회지 14(2):218-226, 1994.
9. 이주홍. 아토피 피부염의 중증도와 혈청 IgE 및 IFN-γ에 관한 연구. 대한피부과학회지 39(10):1067-1071, 2001.
10. 김정진, 양성완, 손낙원, 안규석. 加味生料四物湯의 亢炎症效果와 止瘍膏의 아토피 피부염 손상 및 지양효과에 미치는 영향. 동의병리학회지 17(2):428-435, 2003.
11. 정환수, 이진용. 가미열다한소탕 투여후 아토피 피부염 환자의 임상상 변화에 대한 연구. 소아과학회지 15(2):177-188, 2001.
12. 강병수. 한방임상 알레르기. 서울, 성보사, pp 196-201, 1988.
13. 홍창의. 소아과학. 서울, 대한교과서, pp 766-769, 1991.
14. 대한피부과학회. 피부과학. 서울, 여문각, p 163, 2001.
15. 에카자와 센로우. 소아 피부과학. 서울, 고려의학, pp 23-30, 2005.
16. Robert, S. Food Allergy: Current knowledge and future directions, Immunol Allergy Clin North Am. 19: 619-646, 1999.
17. 이유신. 임상피부과학. 서울, 여문각, pp 22-27, 1998.
18. 이혜란. 아토피 피부염. 소아과학회지 43(9):116-117, 2000.
19. 양재하, 박순달, 공남미. 아토피피부염의 양·한방적 고찰. 제한동의학술원논문집 49(1):416-427, 1999.
20. 顧世澄. 瘍醫大全. 서울, 태의사, p 279, 1961.
21. 顧觀光. 實用中醫外科學. 上海科學技術出版社, p 145, 1996.
22. Young Sun Lee, Ok Kyung Han, Chan Woo Park, Tae Won Jeon, Wang Keun Yoo, Seong Ho Kim, Hyo Jung Kim. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extraced Astragali radix in RAW 264.7 macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology. 100: 289-294, 2005.
23. Venarske, D., deShazo, R.D. Molecular mechanisms of allergic disease. South Med J. 96(11):1049-1054, 2003.
24. 최선필, 강미영, 남석현. 생화학, 분자생물학. 호염구세포주와 복강 비만세포에서 유색미 겨 추출물의 알레르기 염증 억제 활성. 한국응용생명화학회지(구 한국농화학회지) 48(4):315-321, 2005.
25. 박은수, 신민교, 송호준. 자작나무 및 벚나무 껍질추출물이 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. 대한본초학회지(본초분과학회지) 13(2):57-68, 1998.
26. 조정제, 임강현. 사람 비만세포주에서 사이토카인발현에 대한 다엽 주성분 Epigallocatechin - 3 - Gallate 의 억제효과. 대한본초학회지(본초분과학회지) 16(2):57-63, 2001.
27. 김성화, 김대근, 채병숙, 신태용. 비만세포 매개 즉시형 알레르기 반응에 대한 연명초의 억제 효과. 생약학회지 34(2): 132-137, 2003.
28. Eun-Kyung Park, Min-Kyung Choo, Myung Joo Han, Dong-Hyun Kim. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities.nt Arch Allergy Immunol. 133(2):113-120, 2004.
29. Shin, T.Y. and Lee, J.K. Effect of Phlomis umbrosa root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. Immunopharmacol Immunotoxicol 25: 73-85, 2003.
30. C. JcFowler, M. Sandberg and G. Tiger. Effect of water-soluble cigarette smoke extracts upon the release of β-hexosaminidase from RBL-2H3 basophilic leukaemia cells in response to substance P, compound 48/80, concanavalin A and antigen stimulation. Infalamm. res. 52: 461-469, 2003.
31. Ikarashi, Y., Yuzurihara, M., Sakakibara, I., Takahashi, A., Ishimaru, H., and Maruyama, Y. Effects of an oriental herbal medicine, "Saiboku-to", and its constituent herbs on compound 48/80-induced histamine release from peritoneal mast cells in rats. Phytomedicine 8: 8-15, 2001.
32. 류혜숙, 김현숙. 생강 추출물 투여가 마우스 면역세포활성에 미치는 영향. 한국영양학회지 37(1):23-30, 2004.
33. 이영선, 이금홍, 김상찬, 권영규, 신상우. 건강 열수추출액이 Methotrexate에 의해 유도된 마우스 면역억제 조절에 미치는영향. 대한동의생리병리학회지 20(4):896-901, 2006.
34. Daikonya, A., Katsuki, S. and Kitanaka, S. Antiallergic Agents from Natural Sources 9. Inhibition of Nitric Oxide Production by Novel Chalcone Derivatives from Mallotus philippinensis (Euphorbiaceae). Chem Pharm Bull. 52: 1326-1329, 2004.