大韓本草學會誌 제26권 제4호(2011년 12월)
Kor. J. Herbology 2011 ; 26(4) : 1-7

가미옥병풍산(加味玉屏風散)의 비만세포에서의 알레르기 반응에 대한 효과 연구

정진기, 박용기*

동국대학교 한의과대학 본초학교실

Effect of modified-Okbyungpoongsan on mast cell-mediated allergic responses in RBL-2H3 mast cells

Jin Ki Jung, Yong-Ki Park*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the effect of modified-Okbyungpoongsan (mOP) on mast cell-mediated allergic response in basophilic leukemia cell line, RBL-2H3 mast cells.

Methods : Cells were stimulated with anti-DNP-IgE after the treatment of DNP-HSA (AI/D), and then incubated with different concentrations of mOP (0.1, 0.2, 0.5 and 1 ㎎/㎖) in RBL-2H3 cells. Cell toxicity was determined by WST-1 assay. The degranulation of mast cells was observed by microscope with toluidine blue staining and also the levels of beta-hexosaminidase, histamine and TNF-alpha were measured in culture supernatants by enzyme-linked immunosorbant assay.

Results : mOP inhibited anti-DNP-IgE-imduced degranulation of mast cells in RBL-2H3 cells. mOP also significantly decreased the levels of histamine and inflammatory cytokine, TNF-alpha in RBL-2H3 cells, but slightly decreased the level of beta-hexosaminidase.

Conclusions : These results indicate that mOP, an oriental prescription could be inhibit the allergic response through suppressing the mast cell activation.

Key words : modified-Okbyungpoongsan, anti-allergic effect, RBL-2H3 mast cell

서 론

알레르기(allergy)는 외부 자극의 반복적인 노출에 대한 변화된 면역반응을 나타내는 것을 의미하며, 변화된 상태 또는 이상반응이라는 광범위한 의미로부터 자극적이거나 해로운 작용을 일으키는 면역반응이라는 의미로 해석되고 있다[1]. 즉, 알레르기는 인체 내 면역반응의 일종으로 외부에서 침입한 어떤 물질에 대해 지나치게 이상반응을 보이는 현상이며 두드러기, 비염, 천식 등 과민반응으로 나타나고 보통 면역글로불린 E(IgE) 매개의 과민반응과 같은 의미로 사용되고 있다[2]. 알레르기 반응을 유발하는 요인(allergen)에는 유전적 요인과 연령, 성별, 기후변화와 같은 소인적인 측면, 집먼지진드기, 꽃가루, 동물의 털, 곰팡이, 기타 약물 등과 같은 외인성 요인을 들 수 있으며 현대사회의 산업화로 인한 대기오염의 증가나 흡연, 바이러스성 상기도 감염 등의 증가는 알레르기 반응 증가 중요 요인으로 작용할 수 있다[3].국내 알레르기 환자 수는 6백만 명 이상으로 전 인구의 15~20% 정도이며, 최근 서구화된 생활환경, 공래, 각종 화학물질 사용의 증가로 인해 알레르기 환자 수는 빠른 속도로 증가하고 있다.

알레르기 면역반응은 주로 피부 바로 아래와 전신의 느슨한 연결조직 안에 존재하는 비만세포(mast cell)에 의해 유발되는데 비만세포 표면의 Fcε RI에 B세포로부터 분비된 IgE 항체가 결합하고, IgE 항체에 알레르겐이 결합하게 되면서 활성화되어 세포 내 과립에 존재하는 히스타민(hiatamine), 혈소판 활성인자(platelet activating factor), 세로토닌(serotonin), 혈관에 작용하는 아민류나 지질매개물 등과 같은 화학매개물질(allergic mediator)과 염증사이토카인을 분비하게 되는데 이 과정을 통해 알레르기 반응이 유발됨으로써 만성적인 염증

*교신저자 : 박용기. 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학.
· Tel : 054-770-2661. · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr.
· 접수 : 2011년 11월 8일 · 수정 : 2011년 11월 26일 · 채택 : 2011년 12월 16일

반응을 유도하게 된다[4,5]. 따라서 비만세포로부터 다량 합성되어 분비되는 화학매개물질과 염증사이토카인류를 억제시켜주는 것은 알레르기 질환을 예방하거나 개선시켜 줄 수 있는 전략이 될 수 있다[6]. 현재 알레르기 질환의 치료제와 치료방법들은 대부분 증상을 완화시키는데 초점이 맞춰져 있어서 치료를 중단하면 바로 재발하는 양상을 보이고 있어 이러한 문제점을 극복할 수 있는 치료제 개발이 시급한 실정이다.

한의학에서는 免疫反應을 正邪의 相爭이라고 보고 있으며, 正氣는 면역계통의 결합과 효능을 개괄하고 면역 평형을 발휘하며 면역 안정의 작용을 증강시키고, 邪氣는 면역 파괴 능력을 지칭하고 면역 안정의 요인을 교란시키는 것이라고 인식하였다[7]. 또한 한의학적으로 알레르기 원인은 正氣가 虛한 상태로, 正氣가 허虛해지는 이유는 주로 肺, 脾, 腎 등의 기능이 弱化된 것과 관련이 있다고 보고 症狀에 대해 虛熱을 제거하는 活血祛瘀의 치료법이 알레르기 증상개선과 치료에 효과가 있는 것으로 보고 있다. 최근 한약을 이용한 면역기능 조절 및 강화를 통한 각종 알레르기 질환 개선에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 강활의 비만세포 매개 알레르기 반응 개선효과[8] 및 알레르기 천식 모델 마우스에서의 기관지폐포세척액 내 면역세포 조절 효과[9], 강활·방풍 추출물의 항염증 상승작용[10], 대황·황금·황백 추출물의 항균, 항염 및 항알레르기 효과[11], 황금 지상부의 항산화·항알레르기 활성[12], 황기의 면역세포 활성 증가효과[13], 대표적 보기약인 인삼·당삼·황기·백출·산약 복합물추출액의 면역조절효과[14], 황기에 의한 Helper T 세포의 생존과 활성 증대 효과[15] 및 옥병풍산합창이자산의 항알레르기 효과[16] 등 다양한 실험연구가 보고되고 있다.

玉屏風散은 白朮, 防風, 黃芪로 이루어진 처방으로서 益氣固表 작용에 의해 外邪의 체내 침입을 방지하고 면역력을 증강시키며 알레르기 체질을 개선하는 것으로 알려져 있다[17]. 또한 肺氣를 보하기 위해 玉屏風散에 황기와 백출을 증미하거나, 陰虛로 自汗이 되는 경우에 地黃湯과 合方 및 氣虛로 자한이 되는 경우 補益湯과 합방 또는 浮小麥을 加해서 사용하기도 한다[18]. 본 연구에서는 옥병풍산에 外邪를 發散風寒시키는 약인 辛夷, 細辛, 羌活과 혈액순환을 촉진시키는 活血藥인 川芎, 祛風濕藥인 獨活을 첨가하였고, 淸熱藥인 黃芩과 補氣藥인 甘草를 가미하여 가미옥병풍산(加味玉屏風散, modified-Okbyungpoongsan ; mOP)을 제조하였다. 가미옥병풍산의 항알레르기 효과를 측정하기위하여 알레르기 반응의 핵심세포인 비만세포(RBL-2H3 basophilic mast cell)에서 알레르기 반응 조절효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 가미옥병풍산 처방은 표 1과 같으며 각 구성약재는 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 규격화된 약재를 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 감별, 정선한 후 사용하였다.

Table 1. Prescription contents of modified-*Okbyungpoongsan* (mOP)

本草名	學名	生藥名	비율
川芎	*Cnidium officinale* Makino	Cnidii Rhizoma	1
白朮	*Atractylodes japonica* Koidz	Atractylodis Rhizoma Alba	1
辛荑	*Magnolia denudata* Desrousseaux	Magnoliae Flos	1
黃芪	*Astragalus membranaceus* Bunge	Astragali Radix	1
防風	*Saposhnikovia divaricata* Schischkin	Saposhnikoviae Radix	1
獨活	*Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan	Angelicae pubescentis Radix	1
羌活	*Ostericum koreanum* Maximowicz	Osterici Radix	1
黃芩	*Scutellaria baicalensis* Georgi	Scutellariae Radix	1
細辛	*Asarum sieboldi* Miq	Asiasari Radix et Rhizoma	1
甘草	*Glycyrrhiza uralensis* Fisch	Glycyrrhizae Radix	1

2) 시약 및 기기

실험에 사용되어진 시약은 fetal bovine serum(FBS, Thermo HyClone, Seoulin Biosciences Co., Seoul, South Korea), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Seoulin Biosciences Co.), mouse dinitrophenyl (DNP)-specific IgE(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), DNP IgE (Sigma-Aldrich), DNP-bovine serum albumin(Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA), WST-1 reagent(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), histamine release assay kit(SPI Bio Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France), TNF-α ELISA kit(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), p-nitrophenyl N-acetyl-beta-D-glucosamine (Sigma-Aldrich) 등이다.

실험에 사용되어진 기기는 microplater reader(Asys, Sunnyvale, CA, USA), rotary evaporator(Eyela, Tokyo, Japan), vaccuo freeze-dryer(Daeil Bio Tech, Gyeongkido, South Korea), UV-VIS spectrophotometer (Shimazu, Kyoto, Japan) 등이다.

2. 방법

1) 약물 제조

약탕기에 가미옥병풍산의 구성약재와 증류수 2 L를 넣고 3

시간 동안 달여서 열수추출한 후 와트만여과지(Wathman No. 1)로 여과하였다. 그 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 다음 동결건조기를 이용하여 분말 상태로 제조하였다. 가미옥병풍산의 총 회수양은 66.09 g 이었으며, 수율(yield)은 약 36.31 %였다. 건조한 가미옥병풍산 추출물은 실험 직전 멸균된 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)에 용해한 후 0.45 ㎛ membrane filter로 여과하여 실험에 사용하였다.

2) 비만세포 배양

흰쥐의 basophilic leukemia cell line인 RBL-2H3 세포는 ATCC(CRL2256, Manassas, VA, USA)으로부터 부터 구입하였으며 15% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin · streptomycin이 함유된 Eagle's Minimum Essential Medium(MEM)를 배양액으로 하여 37 ℃ 와 5 % CO_2 조건으로 배양하였다.

3) 세포독성검정

비만세포에 대한 가미옥병풍산 추출물의 독성을 평가하기 위해서 WST-1 assay를 수행하였다. 즉, RBL-2H3 세포(2 × 10^4 cells/well)를 96-well culture plate에 100 ㎕ MEM 배지를 이용해 분주하고 하룻밤 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양한 다음, 여러 농도의 약물을 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 WST-1 reagent를 10 ㎕ 씩 넣은 후 30분 동안 암실 배양하면서 환원반응을 유도하였으며, 발색정도를 microplate reader를 이용하여 420 ㎚에서 흡광도를 측정 하였다. 세포독성 정도는 세포만 배양한 대조군의 100% 생존도를 기준으로 상대적인 세포생존도(cell viability ; %)를 계산하였다.

4) 비만세포 세포에서의 탈과립 관찰

비만세포에서의 탈과립(degranulation) 현상을 관찰하기 위하여 RBL-2H3 세포(1×10^5 cells/㎖)를 4-well cell culture slide plate(SPL Lifescience, Gyeonggido, Rep. of Korea)에 분주하여 anti-DNP-IgE (0.1 ㎍/㎖)와 함께 하룻밤 배양한 다음 1 ㎎/㎖ 농도의 약물을 1시간 동안 전처리하였다. 여기에 DNP-HSA(10 ㎍/㎖)을 처리하여 3 시간 동안 배양함으로써 탈과립을 유도하였으며 toluidine blue로 염색한 후 광학현미경에서 관찰하였다. 세포의 형태가 원형 또는 난원형이거나 세포 윤곽이 뚜렷하고 세포질 내에 과립들로 채워진 상태를 정상세포로 보았으며, 세포 윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립이 세포표면으로 표출되거나 주위에 흩어져 있는 경우를 탈과립형 비만세포로 간주하였다.

5) Beta-hexosaminidase 측정

Beta-hexosaminidase의 분비는 Huang 등 (2008)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 24-well culture plate에 세포(2×10^5 cells/㎖)를 분주한 후 anti-DNP-IgE(0.5 ㎍/㎖)를 처리하여 37℃, 5% CO^2 배양기에서 12시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 Siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM $MgCl_2$, 25 mM PIPES, 1 mM $CaCl_2$, 0.1% BSA, pH 7.2)를 이용해서 2회 세척한 다음 15% FBS와 MEM 배지에 적정 농도로 희석한 약물을 농도별(0.1~3 ㎎/㎖)로 처리하여 30분 동안 배양하였다. 이후 DNP-BSA(2 ㎍/㎖)를 처리하여 2시간 반응시킨 다음 ice bath에서 10분 동안 정치하여 반응을 종결시켰다. 세포배양액 40 ㎕를 96-well plate로 옮기고 여기에 substrate buffer(4-p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide 2 mM, sodium citrate, 0.05 M, pH 4.5)를 동량으로 넣은 다음 1시간 동안 배양하였다. 여기세 다시 stop solution 200 ㎕를 첨가함으로써 반응을 종결시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. Secretion of beta-hexosaminidase (%) = [대조군의 흡광도 - (약물처리군의 흡광도 / 대조군의 흡광도)] × 100

6) 히스타민 측정

비만세포에서 분비되는 히스타민의 농도를 측정하기 위하여 세포를 6-well culture plate에 분주하고 DNP-IgE (0.1 ㎍/㎖)를 처리하여 하룻밤 배양하였다. 여기에 1 ㎎/㎖ 농도의 약물을 처리하여 1시간 동안 배양한 후 DNP-HSA(10 ㎍/㎖)을 처리하여 3시간 동안 배양함으로써 히스타민을 유리시켰다. 반응종결을 위해 ice bath에서 10분간 정치하였으며 배양이 끝난 상층액을 96-well ELISA plate에 100 ㎕씩 옮기고 히스타민 농도를 히스타민 측정 키트(histamine release assay kit)를 이용하여 측정하였다.

7) 사이토카인 측정

비만세포에서 분비되는 TNF-α 의 농도를 측정하기 위하여 세포를 6-well culture plate에 분주하고 DNP-IgE (0.1 ㎍/㎖)를 처리하여 하룻밤 배양한 다음 1 ㎎/㎖ 농도의 약물을 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 여기에 DNP-HSA(10 ㎍/㎖)을 처리하여 12시간 동안 배양함으로써 TNF-α 분비를 유도하였으며, 반응종결을 위해 ice bath에서 10분간 정치하였다. 배양이 끝난 상층액을 96-well ELISA plate에 옮기고 TNF-α 농도를 TNF-α 측정 키트(TNF-α EIA kit)를 이용하여 측정하였다.

8) 통계학적 검정

실험에서 얻어진 결과의 통계학적 유의성은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램을 이용하여 실험군 당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 농도의 평균치의 통계적 유의성을 $p<0.05$ 수준에서 Turkey-Kramer multiple comparisions test에 의해 검정하였다.

결 과

1. 세포독성검정

가미옥병풍산(mOP)의 RBL-2H3 세포에서의 독성정도를 평가하기 위해서 WST-1 assay 를 수행하였다. 그 결과, 그림 1에서와 같이 세포만 배양한 대조군(control) 경우 세포생존도는 100±1.78%였으며, mOP를 0.1, 0.5, 1, 2, 3 ㎎/㎖ 농도로 처리하였을 때 각각 98.51±3.99 %, 95.45±0.72%, 90.08±0.91%, 87.33±7.11%, 80.61±1.25%로 측정되어 가미옥병풍산은 RBL-2H3 세포에서 1 ㎎/㎖ 농도까지 처리

하였을 때 독성이 나타나지 않았다. 따라서 이후 실험에서는 독성이 없는 농도범위인 1 ㎎/㎖ 이하 농도에서 수행하였다.

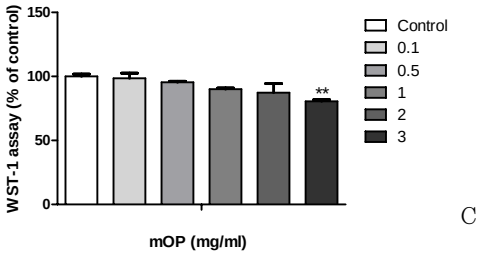

Fig. 1. Effect of modified Okbyungpoongsan on cytotoxicity in RBL-2H3 cells.
Cells were incubated with different concentrations of modified Okbyungpoongsan (mOP) for 24 h and then cell viability was measured by WST-1 assay. The results show mean value of three independent experiments (SD = bars). $^{**}P < 0.01$ vs. Control.

2. RBL-2H3 세포의 탈과립에 대한 효과

비만세포는 히스타민을 포함하여 여러 가지 화학매개물질이 함유된 과립으로 채워져 있는데 외부자극에 의해 탈과립화 됨으로써 유리되어 알레르기 반응을 유발하게 된다[4]. 따라서 비만세포 탈과립에 대한 가미옥병풍산의 효과를 확인하기 위해서 RBL-2H3 세포에 가미옥병풍산을 처리한 후 anti-DNP-IgE-antigen complex에 의한 탈과립 현상을 toluidine blue 염색으로 관찰하였다. 그 결과, 그림 2에서와 같이 IgE-antigen complex에 의해 탈과립이 유도된 대조군(AI/D)에서는 세포의 윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립이 세포표면으로 표출되거나 주위에 흩어져 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 가미옥병풍산(mOP)을 1 ㎎/㎖ 농도 처리한 세포에서는 정상세포와 유사하게 원형 또는 난형 형태를 유지하면서 세포질 내 과립들이 채워진 안정화된 형태를 유지함으로써 탈과립이 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

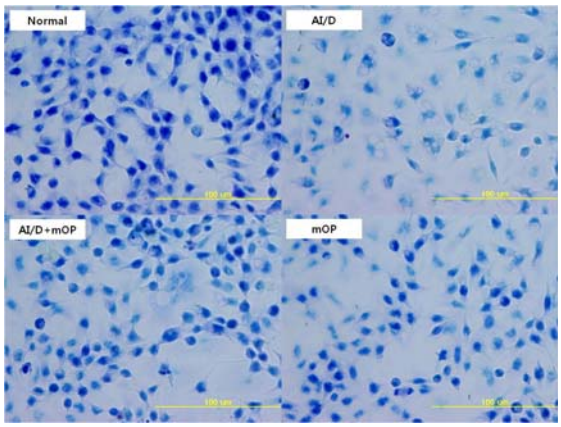

Fig. 2. Effect of modified Okbyungpoongsan on IgE-antigen complex-induced degranulation of RBL-2H3 cells. Cells were incubated with DNP-IgE (0.1 ㎍/㎖) for overnight, treated with modified Okbyungpoongsan (mOP) 1 ㎎/㎖ for 1h, and then stimulated with DNP-HSA (10 ㎍/㎖) for 3h. Cells were stained with toluidine blue, and observed by microscope (x1000). Normal, cells only ; AI/D, anti-DNP-IgE treated after the treatment of DNP-HSA. AI/D+mOP 1, anti-DNP-IgE-HSA teated cells and then treatment of mOP 1 ㎎/㎖. mOP 1 ㎎/㎖-treated cells only.

3. Beta-hexosaminidase release

Beta-hexosaminidase는 호염구나 비만세포의 히스타민이 저장된 과립 안에 존재하여 외부 자극에 의해 세포 밖으로 분비되어 알레르기 반응을 유발함으로 탈과립 지표로 이용되고 있으며 알레르기 억제물질의 생리활성 측정에 유용한 지표로 사용되고 있다[17]. 따라서 가미옥병풍산의 비만세포에서의 탈과립 억제에 대한 효과를 확인하기 위해서 비만세포나 호염구 세포로부터 탈과립을 초래하는 beta-hexosaminidase의 농도를 측정하였다. 그 결과, 그림 3에서와 같이 DNP-IgE-BSA에 의해 활성화된 RBL-2H3 세포로부터 beta-hexosaminidase의 양이 증가하였으며, 이를 100%로 하였을 때 가미옥병풍산(mOP)을 0.1, 0.5, 1 ㎎/㎖ 농도로 처리하였을 때 각각 93.88±2.23%, 58.04±4.94%, 41.96±4.94%로 농도 의존적으로 감소되었다.

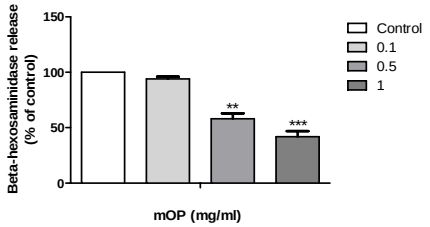

Fig. 3. Effect of modified Okbyungpoongsan on IgE-antigen complex-induced secreation of beta-hexosaminidase from RBL-2H3 cells. Cells were incubated with anti-DNP-IgE (0.1 ㎍/㎖) for overnight, treated with modified Okbyungpoongsan (mOP) 1 ㎎/㎖ for 1 h, and then stimulated with DNP-HSA (10 ㎍/㎖) for 3 h. The levels of beta-hexosaminidase in culture supernatant was measured by beta-hexosaminidase release assay kit. The results show mean value of three independent experiments (SD = bars). $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$ vs. Control.

4. 히스타민 분비에 대한 효과

활성화된 비만세포로부터 탈과립에 의해 분비되는 히스타민에 대한 가미옥병풍산의 효과를 확인하기 위해 세포배양액으로부터 히스타민의 농도를 효소면역반응법으로 측정하였다. 그 결과, 그림 4에서와 같이 정상세포에서는 히스타민의 농도가 20.27±4.87 μM로 낮게 측정된 반면, IgE-antigen complex에 의해 자극을 받아 히스타민이 유리된 대조군(AI/D)에서는 122.69±8.49 μM로 현저히 증가되었다. 또한 가미옥병풍산(mOP)을 0.1, 0.5, 1 ㎎/㎖ 농도로 처리하였을 때 히스타민의 농도가 각각 105.16±5.04 μM, 45.52±2.79 μM, 35.46±6.35 μM로 측정되어 가미옥병풍산은 비만세포로부터 히스타민의 분비를 억제하는 것으로 나타났다.

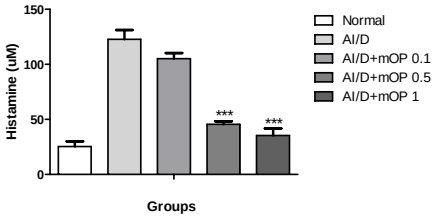

Fig. 4. Effect of modified Okbyungpoongsan on IgE-antigen complex-induced release of histamine from RBL-2H3 cells. Cells were incubated with anti-DNP-IgE (0.1 ㎍/㎖) for overnight, treated with modified Okbyungpoongsan (mOP) 1 ㎎/㎖ for 1 h, and then stimulated with DNP-HSA (10 ㎍/㎖) for 3 h. The levels of histamine in culture supernatant was measured by enzyme-immunoassay. The results show mean value of three independent experiments (SD = bars). $^{***}P<0.001$ vs. AI/D.

5. 사이토카인 분비에 대한 효과

활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 TNF-α 에 대한 가미옥병풍산의 효과를 확인하기 위해 세포배양액으로부터 TNF-α 의 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다.

그 결과, 그림 5에서와 같이 정상세포에서는 TNF-α 의 농도가 2.89±0.19 pg/㎖로 낮게 측정되었으며, IgE-antigen complex에 의해 활성화됨으로써 TNF-α 의 농도가 19.50±0.85 pg/㎖로 증가되었다. 또한 가미옥병풍산(mOP)을 0.1, 0.5, 1 ㎎/㎖ 농도로 처리하였을 때 각각 16.23±2.56 pg/㎖, 10.97±3.54 pg/㎖, 10.81±2.24 pg/㎖로 TNF-α 의 분비가 농도 의존적으로 감소함으로써 가미옥병풍산이 활성화된 비만세포에서 TNF-α 분비를 감소시킴으로써 염증반응을 억제하는 것으로 나타났다.

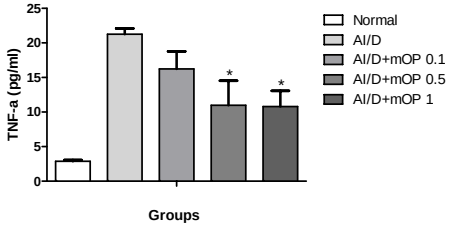

Fig. 5. Effect of modified Okbyungpoongsan on IgE-antigen complex-induced production of TNF-α from RBL-2H3 cells. Cells were incubated with anti-DNP-IgE (0.1 ㎍/㎖) for overnight, treated with modified Okbyungpoongsan (mOP) 1 ㎎/㎖ for 1 h, and then stimulated with DNP-HSA (10 ㎍/㎖) for 12 h. The levels of TNF-α in culture supernatant was measured by enzyme-immunoassay. The results show mean value of three independent experiments (SD = bars). $^{*}P<0.05$ vs. AI/D.

고 찰

최근 식습관의 변화, 기후 변화 및 환경오염 증가로 알레르기 환자는 급격히 증가하고 있는 추세이며 현재 전 세계 인구의 20% 정도가 천식, 알레르기 비염, 아토피 등의 각종 알레르기 질환을 앓고 있다[20]. 알레르기 질환은 비정상적인 면역학적 기전에 의해 발생되는 과민반응의 일종으로 알레르기 초기 반응은 주로 알레르겐 자극에 의해 비만세포나 호염구로부터 히스타민이나 proteoglycan 같은 화학매개물질들이 저장된 분비성 과립으로부터 방출됨으로써 아라키돈산 대사산물이나 사이토카인(IL-4, TNF-α , GM-CSF)의 합성과 분비 촉진으로 만성 염증성 알레르기 반응이 유발되게 된다[21-24]. 따라서 활성화된 비만세포로부터 분비되는 화학매개물질들과 염증 사이토카인을 조절하는 것은 알레르기 질환의 발병과 진행을 막을 수 있는 치료 전략이 될 수 있다.

『靈樞本藏篇』에서는 알레르기 질환을 "衛氣者 所以溫分肉 充皮膚 肥腠理 使開闔者也"라 하여 비록 邪氣가 盛할지라도 衛氣가 충실하면 질병이 발생하지 못한다고 하였으며, 『素問瘧論』에서도 "衛氣之所在 與邪氣相合則病作"이라 하여 위기는 면역방어기능과 거의 같은 작용을 한다고 하여 表部에서 外邪에 대한 저항력을 나타내는 위기의 견고한 정도가 면역계 불균형으로 인한 알레르기 질환의 발병여부로 이해되고 있다[7].

알레르기 질환의 약물치료는 주로 비만세포 안정화, 비만세포 탈과립 억제, 비만세로포부터 히스타민 유리 억제 등 주로 비만세포 조절과 관련된 약물들로 항히스타민제, 항알레르기제, 항염증제, 화학매체에 대한 길항제 등 다양하게 사용하고 있다. 그러나 현재까지도 일시적인 증상개선은 가능하나 근본적인 치료가 되지 않고 있는 실정이며 부작용도 다양하게 보고되고 있다[25]. 따라서 최근에는 한약을 이용하여 면역기능을 조절하거나 강화시킴으로써 원인 치료제를 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있다[26,27]. 따라서 본 연구에서는 옥병풍산의 면역작용을 증가시키기 위하여 發散風寒藥인 辛夷, 細辛, 羌活과 혈액순환을 촉진시키는 活血藥인 川芎, 祛風濕藥인 獨活을 첨가하였고, 항염증작용을 증가시키기 위하여 淸熱藥인 黃芩과 補氣藥인 甘草를 가미하여 가미옥병풍산(加味玉屏風散, modified- Okbyungpoongsan ; mOP)을 창방하여 알레르기 반응 조절효과를 실험하였다.

가미옥병풍산의 알레르기 반응에 대한 조절 효과를 확인하기 위해서 비만세포주(RBL-2H3 basophilic mast cell)로부터 IgE-antigen complex에 의해 유도되는 탈과립 현상과 히스타민, beta- hexosiminidase, TNF-α 등의 화학매개물질 분비를 측정하였으며, 그 결과 가미옥병풍산은 활성화된 비만세포에서 탈과립을 억제함으로써 이들의 분비를 유의적으로 억제하여 비만세포 매개 알레르기 반응을 막을 수 있는 것으로 나타났다.

RBL-2H3 세포는 흰쥐의 basophilic leukemia cell로서 IgE 특이 수용체인 FcERI를 가지고 있어 IgE 자극에 의해 히스타민을 잘 분리하는 세포이며, 일반적인 항알레르기 효능은 이러한 비만세포의 탈과립을 측정하는 방법으로 과립에 저장되어 있다가 탈과립 시 히스타민과 함께 유리되는 beta-hexosiminidase 억제 정도와 히스타민의 양을 측정함으로써 평가하게 된다. Beta-hexosaminidase는 호염구나 비만세포의 히스타민이 저장된 과립 안에 존재하여 비염, 천식, 아토피 등과 같은 주요 알레르기 질환에서 외부자극에 의해 세포 밖으로 쉽게 분비되므로 탈과립의 지표로 매우 유용하게 이용되고 있다[19]. 본 연구에서 가미옥병풍산은 RBL-2H3 세포에서 IgE-매개 탈과립과 beta-hexosiminidase의 분비를 억제함으로써 항알레르기 효능을 나타내었다. 비만세포의 탈과립으로부터 분비되는 화학매개물질 중 히스타민이 가장 빠르게 유리되는데 말초혈관에 대한 투과성 항진, 혈관 확장, 기관지 평활근 수축, 점막표면에 대한 선세포의 분비 항진작용 등을 통해 즉시형 과민반응을 유발하고, 염증사이토카인과 지질대사산물인 프로스타글란딘이나 지질아민류 등을 합성, 분비함으로써 지속적인 만성 염증을 유발하게 된다[28].

비만세포와 호염구는 과립이 세포질 내 존재하기 때문에 Wright's 또는 Giemsa 염색에 의해 염기성을 띄게 되고 또한 toluidine blue, alcian blue, anilin dye 등에 의해서 metachromatic하게 발현되어 형태학적으로 타 세포와 구별된다[28]. 본 연구에서 RBL-2H3는 IgE-매개 탈과립화됨으로써 toluidine blue 염색에서 정상세포와는 달리 세포의 윤곽이 불분명하고 세포질 내 과립이 세포표면으로 표출되거나 주위에 흩어져 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 가미옥병풍산이 탈과립을 억제함으로써 정상세포와 유사하게 세포질 내 과립들이 채워진 안정화된 형태를 유지하는 것을 확인하였다.

비만세포는 IgE와 알레르겐의 결합을 통해 활성화되면 다

양한 화학매개물질을 분비함으로써 점막 부종, 기관지 평활근 수축, 점액 분비 증가 등을 일으킴으로써 초기 알레르기 반응에 기여하며, 이러한 초기 반응 뿐 아니라 염증사이토카인이나 지질매개물 합성·분비를 통해 후기반응이나 만성 알레르기 반응에도 밀접하게 연관되어 있다. TNF-α 는 대표적인 염증사이토카인으로서 주로 비만세포에서 본질적으로 발현되며 대식세포와 더불어 다량 합성·분비됨으로써 다양한 염증반응을 유발하는 인자로 알레르기 염증반응에 중요한 역할을 한다[29]. 비만세포로부터 생성되어 분비되는 TNF-α 는 혈관내피세포의 유착분자의 발현을 증가시켜 호산구 및 T 세포의 표적기관으로의 유입을 촉진시키며, tryptase, PAF, PGD2, IL-5, GM-CSF 등의 분비를 유도하여 호산구에 대한 화학주성과 증식을 도와주게 된다[30]. 따라서 다양한 TNF-α 면역조절제가 알레르기 비염이나 천식 등의 질환에서 가장 우선적으로 고려되고 있다. 본 연구에서 가미옥병풍산은 RBL-2H3 세포에서 IgE-매개 TNF-α 의 분비를 유의적으로 억제시킴으로 알레르기 염증반응에 대한 억제효과도 있는 것으로 나타났다.

결론적으로 가미옥병풍산은 RBL-2H3 비만세포에서 IgE-매개 활성화를 통해 탈과립에 의한 히스타민과 β-hexosaminidase 분비를 감소시키고, 염증사이토카인인 TNF-α 의 생성을 억제함으로써 알레르기 염증반응 억제 효과를 나타내었으며, 이는 가미옥병풍산이 알레르기 비염, 천식, 아토피 등의 알레르기 질환을 개선시킬 수 있음을 의미한다.

결 론

가미옥병풍산의 항알레르기 효과를 확인하기 위해 RBL-2H3 비만세포에서의 알레르기 염증반응에 대한 조절효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가미옥병풍산은 비만세포에서 1 ㎎/㎖ 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았다.

2. 가미옥병풍산은 비만세포에서 anti-DNP-IgE-BSA complex 자극에 의한 탈과립 현상을 억제하였다.

3. 가미옥병풍산은 활성화된 비만세포로부터 분비되는 히스타민과 beta-hexosaminidase를 유의적으로 감소시켰다.

4. 가미옥병풍산은 활성화된 비만세포로부터 생성되는 TNF-α 의 분비를 유의적으로 감소시켰다.

따라서 가미옥병풍산은 활성화된 비만세포로부터 탈과립 현상을 막아 히스타민, beta-hexosaminidase, TNF-α 등의 화학매개물질의 분비를 유의적으로 억제함으로써 알레르기 염증반응을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 한의약산업육성 제품화지원 연구개발사업 연구비(F090002)를 지원받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Korean Journal of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. Asthma and Allergy disease. Seoul : koonja publisher. 2002 ; 66 : 431-3.
2. Seoul National University College of Medicine. Immunology. Seoul : Seoul National University publisher. 1987 : 188-97.
3. Min YK, Choi JW, Kim LS. Otorhinolaryngology for primary care. Seoul : iljokac. 2002 : 60-2.
4. KM Ahn. Role of mast cell in allergic inflammation and innate immunity. Korean Journal of Pediatrics. 2004 ; 47 : 11-5.
5. Poole JA, Rosenwasser LJ. The role of immunoglobulin E and immune inflammation : implications in allergic rhinitis. Curr Allergy Asthma Rep. 2005 ; 5(3) : 252-8.
6. Borish L. Allergic rhinitis : systemic inflammation and implications for management. J Allergy Clin Immunol. 2003 ; 112(6) : 1021-31.
7. Ahn DK, Nac HS. Oriental medicine and immunology. Paju : openbooks. 1994 : 15-48.
8. Jung JK, Jung HM, Seo WG, Park YK. Anti-allergic effect of osterici radix water extract in human mast cells. Kor. J. Herbology. 2010 ; 25(3) : 35-41.
9. Bae JH, Yoo JH, Kil GJ. Effects of NR on production levels of cytokines and distribution of BAL cells in allergic asthma. Kor. J. Herbology. 2010 ; 25(1) : 33-8.
10. Lee DY, Choi GY, Yoon TS, Cheon MG, Kim SJ, Yasukawa K, Yu SY, Kim HK. Synergistic effect of notopterygium incisum and saposhnikovia divaricata in the anti-inflammatory activity. Kor. J. Herbology. 2008 ; 23(4) : 39-44.
11. Son DB, Song SP, Hwang CH, Hong SH, Hwang CY. A study on the anti-microbacterial activity, anti-inflammatory and anti-allergic effects of mixture of rheum coreanum scutellaria baikalensis phellodenron amurense. Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2005 ; 18(1) : 154-71.
12. Cha JH, Kim HW, Kim SG, Jung SH, Whang WK. Antioxidant and antiallergic activity of compounds from the aerial parts of scutellaria baicalensis georgi. Yakhak Hoeji. 2006 ; 50(2) : 136-43.
13. Song BK, Lee EJ, Kim HK, Jin SD, Kim SJ, Kim DH. Effects of astrgali radix on the function of murine immunocytes in vivo and in vitro. Kor. J.

Herbology. 1998 ; 13(2) : 115-28.
14. Shin SW, Lee YS, Park JH, Kwon TK, Suh SI, Kwon YK. Comparison of immunomodualtory effects of water-extracted ginseng radix, pilose asia-bell, astragali radix, astractylodes rhizoma alba and dioscoreae rhizoma. Korean J. Oriental physiology & pathology. 2004 ; 18(4) : 1140-6.
15. Kang H, Bae HS, Ahn KS. Astragali radix increases survival and activity of spleen lymphocytes. Korean J. Oriental physiology & pathology. 2001 ; 15(4) : 560-5.
16. Jung JK. Park YK. Anti-allergic effect of okbyungpoongsan-hap-changijasan. Kor. J. Herbology. 2010 ; 25(2) : 55-63.
17. Park MH. Effect of Okbyungpoongsan in oriental medicine. KISTI. 2006 : 1-7.
18. Hwang DY. (New) Bangyakhappyun. Seoul : Younglimsa. 2002 : 226.
19. Lee E, Chol EJ, Cheong H, Kim YR, Ryu SY, Kim KM. Anti-allergic actions of the leaves of castanea crenata and isolation of an active component responsible for the inhibition of mast cell degranulation. Archives of Pharmacal Research. 1999 ; 22 : 320-3.
20. Busse WWW, Lemanske RF Jr. Asthma. N Engl J. Med. 2001 ; 44(5) : 350-62.
21. Park YJ. Allergy drug developments. KISTI. Seou l : KISTI. 2006 : 1-5.
22. Brown JM, Wilson TM, Metcalfe DD. The mast cell and allergic diseases : role in pathogenesis and implications for therapy. Clin. Exp. Allergy 2008 ; 38 : 4-18.
23. Hu ZQ, Zhao WH, Shimamura T. Regulation of mast cell development by inflammatory factors. Curr Med Chem. 2007 ; 14(28) : 3044-50.
24. Gordon JR. Burd PR. Galli SJ. Mast cells as a source multifunctional cytokines. Immunol. Today. 1990 ; 11 : 458-64
25. Jeon SY. Controversies in management of allergic rhinitis : Immunotherapy vs. Medical Therapy. J Clinical Otolaryngol. 2000 ; 11 : 23-26.
26. Kim SH, Kim S, Lee SH, Park HW, Chang YS, Min KU, Cho SH. The effects of PG102, a water-soluble extract from actinidia arguta, on serum total IgE levels : a double-blind, randomized, placebo-controlled exploratory clinical study. Eur J Nutr. 2011 ; 50(7) : 523-9.
27. Kim D, Kim SH, Park EJ, Kang CY, Cho SH, Kim S. Anti-allergic effects of PG102, a water-soluble extract prepared from actinidia arguta, in a murine ovalbumin-induced asthma model. Clin Exp Allergy. 2009 ; 39(2) : 280-9.
28. Ahn K. Role of mast cells in allergic inflammation and innate immunity. Kor J Pediatrics. 2004 ; 47(11) : 1137-1141.
29. Chung KF, Barnes PJ. Cytokine in asthma. Thorax 1999 ; 54(1) : 825-57.
30. Temkin V, Kantor B, Weg V, Hartman ML, Levi-Schaffer F. Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/actirvator protein-1 pathway in uman peripheral blood eosionphils, causing cytokine production and release. J Immunol 2002 ; 169 : 2662-9.