

원저

황련해독탕 약침액의 iNOS 생성 억제를 통한 항염증효과가 알레르기성 비염 유발 생쥐의 치료에 미치는 영향

조재용 · 김유종 · 김은정 · 이승덕 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Effects of *Hwangryunhaedok-tang* Pharmacopuncture by the Anti-inflammatory Action of Suppression of iNOS Production on Mice with Allergic Rhinitis

Cho Jae-yong, Kim Yu-Jong, Kim Eun-jung, Lee Seung-deok and Kim Kap-sung

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Dongguk University

Objectives : The purpose of this study was find out the therapeutic effects of its exclusive use on the rat with allergic rhinitis.

Materials and Methods : Thirty Sprague-Dawley rats were divided into three group : normal group, control group and sample group. To induce the allergic rhinitis in control group and sample group, rats were sensitized intraperitoneally with 0.1% ovalumin solution 3 times at intervals of 1 week. Then intranasal sensitization was performed by diffusing 0.1% ovalumin solution 3 times at intervals of 2 days. After that time, rats in the sample group were administered by *Yonghyang*(LL₂₀) subcutaneously to treat the inflammation.

Results : 1. The anti-oxidant effects of *Hwangryunhaedok-tang* extract was dose-dependantly increased.
2. The RAW 264.7 cells were treated with LPS for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations (0.4, - 1.0 mg/ml) of HHT, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced iNOS mRNA expression and NO production were dose-dependantly decreased in HHT treated RAW 264.7 cells.
3. The number of eosinophil in HP noticeably decreased than CON and this decrease had probability. The

· 접수 : 2012. 2. 6. · 수정 : 2012. 2. 9. · 채택 : 2012. 2. 9.
· 교신저자 : 김갑성, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 031-961-9121 E-mail : kapsung@unitel.co.kr

infiltration of eosinophil in HP noticeably decreased than CON.

4. The damaged mucosa as disruption of cilia in respiratory cell and vacant mucose secreting cell were increased CON, but HP same as normal configuration.

Decrease of PAS positive cell were shown in CON, but goblet cell occupied with neutral mucous were shown in HP. Decrease of mucosal stress(HSP70).

Decrease of perennial sign(PPAR- γ). Decrease of itching and sneezing intricate neurotransmitter-(substance P).

5. The anti-inflammation of HHT pharmacopuncture for AR caused mucosa comes to result as belows.

Decrease of pre-inflammation cytokine(TNF- α). Decrease of transcription factor (NF- κ B p65). Decrease of transcription factor inhibitor(p-I κ B). Decrease of inflammation cytokine(iNOS).

Conclusions : The results may suggest that administration treatment using *Hwangryunhaedok-tang* pharmacopuncture decreases the inflammatory response on an animal model with allergic rhinitis.

Key words : ovalumin, allergic rhinitis, *Hwangryunhaedok-tang* pharmacopuncture, iNOS, anti-inflammation

I. 서론

알레르기성 비염은 발작적이고 반복적인 재채기, 수양성 비루, 비폐쇄, 코 및 인두의 소양감과 눈물을 특징으로 하는 비 점막의 제 I 형 과민반응성 질환으로서, 최근 모든 비염의 50% 이상이 알레르기에 의해 유발되며 전 인구에서 차지하는 비율은 약 20% 정도이고, 해마다 증가하는 추세에 있다¹⁾. 알레르기성 비염의 과민반응을 일으키는 원인 물질, 즉 면역글로블린 E를 형성하는 원인항원을 알레르겐이라고 한다²⁾.

한의학에서 알레르기성 비염은 鼻鼙, 噴嚏의 범주에 속한다고 볼 수 있다³⁾. 鼻鼙는 鼻流涕, 鼻塞, 不問香臭 등이 나타나는 질환을 말하며, 噴嚏는 鼻孔 내 가 가려우면서 기가 噴出할 때 소리를 내는 것으로서, 알레르기성 비염의 주요증상을 갖추었으므로 가장 유사성이 인정된다.

鼻鼙, 噴嚏의 발병 원인에 대해서는 역대 의가의 견해가 동일하지 않는데, 《黃帝內經》과 금·원시대의 유원소의 견해에 따르면 주로 폐·위 2경의 화열로 보고 있다. 즉 풍열에 감촉되거나 少陽·少陰司天으로 大熱이 유행할 때, 胃 內에 痰火와 積熱이 있을 때, 鼻鼙, 噴嚏의 질환이 발생한다고 하였다. 明代 천 후에는 風寒邪가 皮毛, 鼻竅로의 침입하여 시간이 경

과할 경우 鬱熱肺伏火邪, 內化變發의 病理變化가 발생한다고 하였다^{3,4)}.

현재 현대의학에서 사용되는 알레르기성 비염의 치료는 크게 회피요법, 약물요법 및 수술요법으로 나누어 볼 수 있으나, 그 치료의 한계점으로 인해 많은 비염 환자가 큰 호전을 경험하지 못하고 증상의 재발이 반복됨으로써 차츰 한방치료를 병행하는 것이 최근의 추세이다⁵⁾. 이와 관련하여 알레르기성 비염 치료에 대한 한의학적 약물치료⁶⁾ 및 침구치료 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 치료약물의 선정은 氣味論, 치료부위의 선정은 經絡論을 위주로 하는 약침요법이 임상에서 다용되고 있다.

저자는 약침요법 중 황련해독탕약침이 알레르기성 비염에 대한 치료효과를 관찰하기 위하여 생쥐의 비강 내 점막에 ovalbumin으로 유도된 알레르기성 비염을 유발한 후, 清熱解毒의 작용으로 인체의 火熱을 치료하는 작용을 가진 황련해독탕⁷⁾약침액을 通鼻竅, 散風邪, 清氣火의 穴性을 지니고 있으며, 비염치료 다용혈로서 인체에 상응하는 실험용 생쥐의 迎香(LL₂₀)⁸⁾에 주입하여 iNOS발현과 NO생성 억제를 통한 점막조직의 변화를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 동물 및 재료

1) 동물

태령 6주된 BALB/c계 암컷 생쥐(대한실험동물센터, 한국)에서를 분양 받아 무균사육장치 내에서 2주 일동안 적응시킨 후, 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

2) 재료

(1) 약침처방

실험에 사용된 약침처방은 《肘後備急方》에 수록된 황련해독탕(황금 5 g, 황련 5 g, 황백 5 g, 치자 5 g)으로서, 약재를 동국대학교 일산한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였다.

(2) 약침기

실험에 사용된 약침기는 26 gauge, 1ml 1회용 주사기(녹십자의료공급사, 한국)를 사용하였다.

2. 방법

1) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 RAW264.7 cell은 KCLB (Korean cell line bank)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO² incubator(Sanyo, Japan)에서 10% fetal bovine serum(Sigma, USA)가 함유된 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Welgin, Korea)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100unit/ml penicillin(Sigma, USA), 100µg/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

2) 황련해독탕 약침액의 제조 및

MTT assay

황련해독탕(*Hwangryunhaedok-tang*) 2침을 증류수 500ml에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50ml로 감압농축한 후 동결 건조한 것을 사용하였고, MTT assay 결과 황련해독탕 약침액 10mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0mg/ml를 투여량으로 결정하였다.

3) 실험군의 분류

아무런 처치를 하지 않은 정상군, 알레르기성 비염을 유발한 대조군 및 알레르기성 비염 유발 후 황련해독탕 약침처치한 HP군으로 각각 분류하였으며, 각군에 각각 10마리씩 배정하였다.

4) 염증유도 산화 스트레스 완화 효과조사

항산화능력을 측정하기위해 Riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에 40mM buffer 2.6ml, nitroblue tetrazolium 100µl, EDTA/cyanide 200µl, riboflavin 100µl 그리고 항산화 측정할 농도별 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0mg/ml) 황련해독탕 약침액 100µl를 넣고 3번 섞어주었다. Abs 560nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분 동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 10번 반복하여 평균값을 계산하였다.

5) iNOS mRNA 발현과 생성 변화 관찰

황련해독탕이 염증효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages - 5×10⁵ cells/well을 6 well에 plating하고 12시간 후에 lipopolysaccharide(LPS, 1 µg/ml, Sigma)를 2시간 처리하여 NF-κB 활성을 유도한 후 황련해독탕 약침액 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 수거한 RNA를 trizol reagent(Sigma, USA)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer(Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 iNOS primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 1). PCR 산물은 1~2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β-actin의 증폭을 동시에 실시하였다. mRNA 발현의 relative intensity는 Optimas 5.2(Optima, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 통해 비교하였다.

한편 NO 생성량은 nitrite assay를 통해 측정하였는데, 12시간 배양된 RAW 264.7 macrophages - 5 × 10⁵ cells/well에 lipopolysaccharide(1µg/ml) 2시간 처리 후 황련해독탕 약침액을 농도별 (0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml)로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액 상층액

Table 1. The Primer of iNOS and β -actin mRNA

Primer	Primer sequences		Product(bp)	No. of cycles
iNOS	Sense	5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	Antisense	5'-AGAAGTGGAGGTACATGCTGGAGCC-3'		
β -actin	Sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	Antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

iNOS : inducible nitric oxide synthase.

50 μ l에 Greiss reagent(Sigma, USA) 50 μ l을 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 아질산나트륨(NaNO₂)을 사용하여 표준용량곡선을 작성하고, 질소산화물(nitric oxide, NO₂⁻) 생성을 산출하였다.

6) 알레르기성 비염 유발 생쥐 비점막 손상에 대한 치료 효과 관찰

(1) 알레르기성 비염의 유발

알레르기성 비염 유발을 위해 ovalbumin(OVA : chicken egg albumine, grade V, Sigma, USA)을 항원으로 사용하였다. 인산완충용액(PBS : phosphate buffered saline)과 수산화 알루미늄겔 (Al(OH)₃ gel, Sigma, USA)을 1 : 1로 하여 OVA 1mg을 PBS와 수산화 알루미늄겔용액에 혼합하여 1ml를 만들어 0.1% OVA용액이 되도록 하였다. 정상군을 제외한 실험군인 대조군 및 황련해독탕 약침처치한 HP군에 알레르기성 비염 유발 시작 제 21, 14 및 제 7일전에 각각 0.1% OVA용액을 腹腔注射하여 감작시켰다. 최종 감각 7일경과 후, 7일 동안 격일로 3회씩 0.1% OVA용액을 생쥐 鼻腔에 점적하여 알레르기성 비염을 유발하였다. 유발은 콧물과 코 긁기 행동으로 확인하였다.

(2) 황련해독탕 약침의 시술

최종 감각 7일경과 후 황련해독탕 약침액 5 μ l/kg을 HP군의 영양(LI20)⁷⁾에 1회/1일 시술하였다.

(3) 호산성 백혈구(eosinophil) 변화조사

알레르기성 비염의 대표적 지표인 호산성 백혈구의 혈액 내 빈도 변화를 조사하기 위해 우선 심장천자(cardiac puncture)로 채혈한 후, Hinkelmann 용액에 희석한 다음 neubauer 계산판(Superior, Germany)으로 계수하였다. 한편 조직 내 호산성 백혈구의 분포는 wright's stain 후 관찰하였다.

(4) 비점막 조직표본 제작

알레르기성 비염 유발 7일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 머리 분리 후 비강 주변 구조물을 제거한 다음 10% NBF에 실온에서 24시간 동안 고정된 후 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

(5) 점막상피 손상 변화관찰

① 중성점액분비세포 변화관찰

중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 점액분비세포의 변화를 조사하기 위해서 periodic acid-schiff reaction(PAS) stain을 실시하였는데 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그런 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 hematoxylin에서 1분 동안 대조 염색하였다.

② 점막 손상 스트레스 변화관찰

점막 손상 스트레스를 조사하기 위해 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질(heat shock protein, HSP)의 하나인 HSP70 분포 변화 관찰을 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K(20 μ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum(DAKO, Denmark)에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti HSP70(1:250, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 24시간

link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex(ABC) kit(Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(Sigma, USA)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

③ 점막 내 PPAR- γ 변화관찰

알레르기성 비염 유발 시 증가하는 전사인자 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) 분포 변화를 mouse anti mouse PPAR- γ (1:100, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다.

④ 점막 내 Substance P 변화관찰

알레르기성 비염 유발 시 itching과 sneezing에 관여하는 신경전달물질인 substance P 분포변화를 mouse anti mouse substance P(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다.

(6) 염증 변화관찰

① TNF- α 변화관찰

전염증효소인 tumor necrosis factor(TNF)- α 분포 변화를 rabbit anti mouse TNF- α (1:100, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다.

② 전사인자 NF- κ B 활성 변화관찰

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 nuclear factor(NF)- κ B와 인산화된 I κ B protein의 분포 변화를 조사하기 위해 mouse anti mouse nuclear factor(NF)- κ B p65(1 : 500, Santa Cruz Biotech, USA)와 mouse anti mouse p-IKB(1:500, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

③ 염증효소생성 변화관찰

염증효소인 iNOS의 조직 내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse iNOS(1:250, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

7) 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학

결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigmaplot 2000(SPSS INC, USA)을 통해 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 항산화 효과

황련해독탕 약침액의 항산화 효율은 0.2 mg/ml에서 23 \pm 1.2%, 0.4 mg/ml에서 58 \pm 2.4%, 0.6 mg/ml에서 68 \pm 1.9%, 0.8 mg/ml에서 78 \pm 1.6% 및 1.0 mg/ml에서 88 \pm 1.7%로 각각 증가함으로써 농도-의존적으로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1).

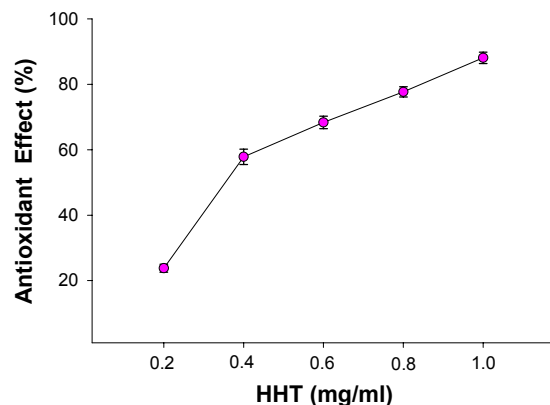


Fig. 1. The anti-oxidant effect of *Huangryunhae-dok-tang* (HHT) Pharmacopuncture solution

2. RAW 264.7 세포 내 iNOS mRNA 발현 및 NO 생성억제

1) iNOS mRNA 발현 억제

LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 황련해독탕 약침액 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극 시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 0.4 mg/ml에서 6.6%, 0.6 mg/ml서 8.5%, 0.8mg/ml에서 18.4% 및 1.0mg/ml에서 25.9%가 각각 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2-A).

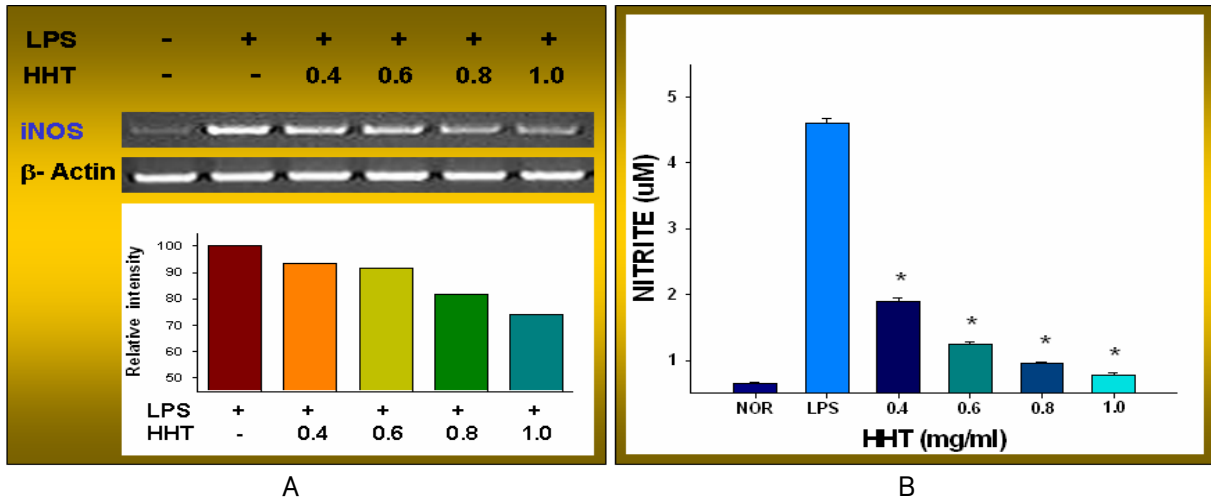


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced iNOS mRNA expression (A) and NO production (B) by HHT Pharmacopuncture(HP) solution

NOR : non-treated RAW 264.7 cells. LPS : lipopolysaccharide. iNOS : inducible nitric oxide synthase.
* : $p < 0.05$ compared with LPS alone.

2) NO 생성억제

LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 597%(4.60 ± 0.06 nM/ 5×10^5 cells)로 증가한 반면, 황련해독탕 약침액 처리된 RAW 264.7 세포에서는 유의성 있는 농도-의존적 감소를 보였다. 황련해독탕 약침액 0.4mg/ml 처리 시 59%(1.89 ± 0.06 nM/ 5×10^5 cells), 0.6mg/ml 처리 시 73%(1.25 ± 0.03 nM/ 5×10^5 cells), 0.8mg/ml 처리 시 79%(0.95 ± 0.02 nM/ 5×10^5 cells) 및 1.0mg/ml 처리 시 83%(0.77 ± 0.03 nM/ 5×10^5 cells)로 각각 유의성 ($p < 0.05$)있게 감소하였다(Fig. 2-B).

3. 알레르기성 비염 유발 생쥐 비점막 손상에 대한 치료효과

1) 호산성 백혈구 감소효과

혈액 내 호산성 백혈구 수를 조사한 결과, 正常群에 비해 대조군에서는 그 수가 증가한 반면, HP群에서는 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 보였다. 640 ± 57 개/ μ l인 정상군에 비해 대조군은 278%나 증가한 2416 ± 175 개/ μ l로 측정되었다. 이에 반해 황련해독탕 약침군(HP群)에서는 대조군에 비해 40% 감소된 1446 ± 138 개/ μ l로 측정되었다(Fig. 3-A).

한편 비강 점막 내로 이주한 호산성 백혈구의 수도 혈액 분석 결과와 일치하였다. 즉, 이주한 호산성 백혈구의 수는 대조군은 정상군에 비해 증가한 반면, 황련해독탕 약침군(HP群)은 대조군에 비해 감소하였으

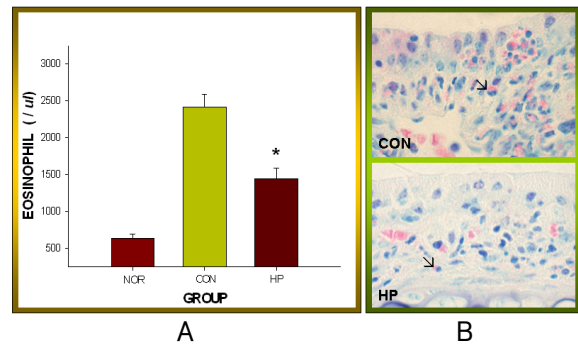


Fig. 3. The decrease of eosinophil in HP treated mice after Ovalbumin induced allergic rhinitis (AR)

A : eosinophil count. The number of eosinophil in HP noticeably decreased than CON and this decrease had probability.

B : the inhibition of eosinophil distribution. The infiltration of eosinophil (arrow) in HP noticeably decreased than CON (Wright's stain, $\times 1,000$).

NOR : non-treated group.

CON : AR elicited group.

HP : HHT pharmacopunctured group after AR elicitation.

* : $P < 0.05$ compared with CON.

며, 이러한 변화는 점막 고유층에서 잘 관찰되었다 (Fig. 3-B).

2) 점막상피 손상 완화

(1) 일반적인 형태 변화

비점막 손상이 제일 심한 지역은 비중격에 근접한

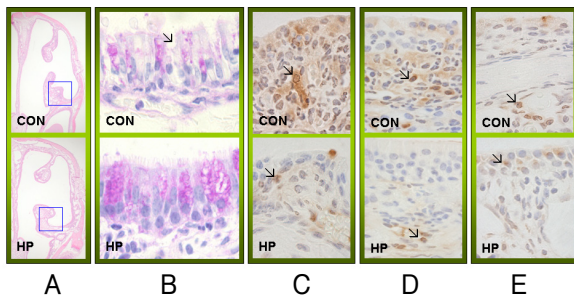


Fig. 4. The cure effects of HHT pharmacopuncture for AR caused mucosa damages

- A : mitigative Damage (H&E, x40). The damaged mucosa (box) as disruption of cilia in respiratory cell and vacant mucose secreting cell were increased CON, but HP same as normal configuration.
- B : configuration of goblet cell (PAS, × 1,000). The decrease of PAS positive cell (arrow) were shown in CON, but goblet cell occupied with neutral mucous were shown in HP.
- C : decrease of mucosal stress (HSP70 (arrow) immunohistochemistry, × 1,000).
- D : decrease of perennial sign (PPAR-γ (arrow) immunohistochemistry, × 1,000).
- E : decrease of itching and sneezing intricate neurotransmitter (substance P (arrow) immunohistochemistry, × 1000).

코선반(concha) 주변의 점막이었고, 섬모(cilia) 손상, 점액분비세포의 분비 증가, 점막 고유층 내 염증관련 세포의 이주 증가 등이 관찰되었다. 대조군에서 심한 손상이 대부분의 점막에서 관찰되었으나, HP군에서는 일부 지역에서만 점막 손상이 관찰되었다(Fig. 4-A).

(2) 中性 점액분비세포 변화

비점막의 술잔세포(goblet cell)에서는 중성 점액질이 분비되는데, 알레르기성 비염 유발 후 분비증가와 이에 따른 술잔세포 붕괴가 관찰되었다. 중성 점액질에 대한 PAS 양성반응이 HP군의 대부분의 술잔세포

에서는 관찰되지만, 대조군에서는 거의 모든 술잔세포가 비어 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 4-B).

(3) 점막 손상 스트레스 변화

스트레스에 대한 완충적 물질인 HSP70의 양성반응은 손상된 술잔세포주변 점막에서 관찰되었고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 HSP70 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 HP군에서 증가하였지만, 대조군에서 더 큰 증가를 보였다. HSP70 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 2397% 증가하였고, HP군은 대조군에 비해 81% 감소한 것으로 관찰됨으로써 유의성($p < 0.05$) 있는 변화가 인정되었다(Table 2, Fig. 4-C).

(4) 점막 내 PPAR-γ 변화

알레르기성 비염유발 시 증가하는 전사인자 PPAR-γ의 양성반응은 손상된 술잔세포주변 점막과 점막하층의 분비샘에서 관찰되었고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 PPAR-γ 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 HP군에서 증가하였지만, 대조군에서 더 큰 증가를 보였다. PPAR-γ 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 749% 증가하였고, HP군은 대조군에 비해 88% 감소한 것으로 관찰됨으로써 유의성($p < 0.05$) 있는 변화가 인정되었다(Table 2, Fig. 4-D).

(5) 점막 내 Substance P 변화

알레르기성 비염 유발 시 itching과 sneezing에 관여하는 신경전달물질인 substance P의 양성반응은 손상된 술잔세포주변 점막하층에서 관찰되었고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 substance P 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 HP군에서 증가하였지만, 대조군에서 더 큰 증가를 보였다. Substa-

Table 2. The Image Analysis of HSP70, PPAR-γ, and Substance P positive Reaction in HP after Ovalbumin induced Allergic Rhinitis (AR).

Antibody	Group		
	NOR	CON	HP
HSP70	463±14	11,563±398	2,203±62*
PPAR-γ	244±22	12,111±510	1,427±49*
Substance P	350±9	4,844±90	1,211±57*

M ± SD : mean ± standard deviation. * : $p < 0.05$ compared with CON. NOR : non-treated group. CON : AR elicited group. HP : HHT pharmacopunctured group after AR elicitation. HSP70 : heat shock protein 70. PPAR-γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

Table 3. The Image Analysis of Anti-inflammation in HP after Ovalbumin induced Allergic Rhinitis(AR)

Antibody	Group		
	NOR	CON	HP
TNF- α	968 \pm 22	18,585 \pm 430	4,619 \pm 113*
NF- κ B p65	371 \pm 15	2,736 \pm 55	880 \pm 25*
p-I κ B	378 \pm 15	3,078 \pm 114	1,431 \pm 47*
iNOS	670 \pm 27	7,671 \pm 78	1,797 \pm 95*

(image analysis for 100,000 particles / range of intensity : 80-120)

TNF- α : tumor necrosis factor- α . NF- κ B p65 : nuclear factor- κ B p65. p-I κ B : phosphorylated-I κ B.

iNOS : inducible nitric oxide synthase. NOR : non-treated group. CON : AR elicited group.

HP : HHT pharmacopunctured group after AR elicitation

nce P 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 1284% 증가하였고, HP군은 대조군에 비해 75% 감소한 것으로 관찰됨으로써 유의성($p < 0.05$) 있는 변화가 인정되었다(Table 2, Fig. 4-E).

3) 염증반응의 변화

(1) TNF- α 분비감소

전염증효소인 TNF- α 의 양성반응은 손상된 술잔세포주변 점막에서 관찰되었고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 TNF- α 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 황련해독탕 약침액(HP)에서 증가하였지만, 대조군에서 더 큰 증가를 보였다. TNF- α 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 1820% 증가하였고, HP군은 대조군에 비해 75% 감소한 것으로 관찰됨으로써 유의성($p < 0.05$) 있는 변화가 인정되었다(Table 3, Fig. 5-A).

(2) 전사인자 NF- κ B 활성화감소

염증유발 유전자들을 조절하는 전사인자 NF- κ B p65 양성반응은 손상된 술잔세포주변 점막에서 관찰되었고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 NF- κ B p65 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 HP군에서 증가하였지만, 대조군에서 더 큰 증가를 보였다. NF- κ B p65 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 637% 증가하였고, HP군은 대조군에 비해 68% 감소한 것으로 관찰됨으로써 유의성($p < 0.05$) 있는 변화가 인정되었다(Table 3, Fig. 5-B).

한편 인산화된 I κ B protein의 양성반응도 NF- κ B p65와 같은 양상으로 관찰되어 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 714% 증가하였고, HP군은 대조군에 비해 54% 감소한 것으로 관찰됨으로써 유의성($p < 0.05$) 있는 변화가 인정되었다(Table 3, Fig. 5-C).

(3) iNOS 生成 감소

염증효소인 iNOS 양성반응은 손상된 술잔세포주변 점막에서 관찰되었고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 iNOS 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 HP군에서 증가하였지만, 대조군에서 더 큰 증가를 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 1045% 증가하였고, HP군은 대조군에 비해 77% 감소한 것으로 관찰됨으로써 유의성($p < 0.05$) 있는 변화가 인정되었다(Table 3, Fig. 5-D).

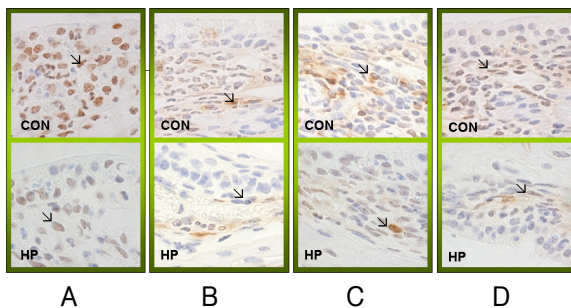


Fig. 5. The anti-inflammation of HHT pharmacopuncture for AR caused mucosa

- A : decrease of pre-inflammation cytokine (TNF- α (arrow) immunohistochemistry, \times 1,000).
- B : decrease of transcription factor (NF- κ B p65 (arrow) immunohistochemistry, \times 1,000).
- C : decrease of transcription factor inhibitor (p-I κ B (arrow) immunohistochemistry, \times 1,000).
- D : decrease of inflammation cytokine (iNOS (arrow) immunohistochemistry, \times 1,000).

IV. 고찰

알레르기성 비염은 반복적인 재채기, 水樣性 鼻漏, 鼻閉塞, 코 및 인두의 소양감과 눈물을 특징으로 하는 비점막의 과민반응성 질환으로서, 증상발현의 시기에 따라 계절성과 통년성으로 구별된다. 계절성 알레르기성 비염은 원인 항원과 접촉이 있는 특정한 계절에만 증상이 나타나는 것으로 대개 꽃가루가 원인이 되며, 통년성 알레르기성 비염은 특정한 계절에 국한되어 나타나지 않고, 일년 내내 존재하는 알레르겐에 대한 반응으로 증상이 지속되는 경우를 말한다. 최근 모든 비염의 50% 이상이 알레르기에 의해 유발되며 전 인구에서 차지하는 비율은 약 20% 정도이고, 해마다 증가하는 추세에 있다¹⁾.

알레르기성 비염의 과민반응을 일으키는 원인물질, 즉 면역글로불린 E를 형성하는 원인항원을 알레르겐이라고 하며, 집먼지진드기, 꽃가루, 곰팡이 포자, 애완동물의 털과 비듬, 바퀴벌레의 부스러기, 산업에서 이용되는 가공된 물질이나 화학물질 혹은 작업장이나 집에 쌓여 있는 먼지 등의 흡인성 항원이 주요 알레르겐이다²⁾. 알레르기성 비염은 알레르기의 소인이 있는 사람에게 원인 항원에 노출되면 항원에 특이한 IgE가 생성되며 이것이 비점막의 비만세포, 호염기세포에 결합되어 있다가 다시 항원에 노출되면 이 항원과 결합하여 비만세포와 호염기세포의 표면에서 막의 인산화 과정이 진행되고 비만세포 내에 완성형으로 저장되어 있는 histamine이 분비되며, 그 외에도 혈소판 활성 인자(PAF), prostaglandin, leukotriene D4(SRS-A) 등의 면역매개물질이 유리되어 맑은 물과 같은 콧물이 흐르며, 발작성 재채기, 코가 막히는 등의 증상이 발현된다¹⁾. 유발요소를 보면 먼지를 털거나 청소를 하면서 발생하는 먼지에 의한 경우, 에어컨이나 선풍기의 바람을 쐬거나 겨울의 찬바람 등 온도에 의한 경우, 아파트로 이사 가거나, 사무용기기를 사용하거나 새로운 환경에 대한 환경적 요인에 의한 경우, 그 외에 피곤하거나 스트레스나 감기에 의한 경우를 들 수 있다⁹⁾.

한의학에서 알레르기성 비염은 鼻飶, 噴嚏의 범주에 속한다³⁾. 鼻飶는 鼻流涕, 噴嚏, 鼻塞, 不問香臭 등이 나타나는 질환을 말하며, 噴嚏는 鼻孔 내가 가려우면서 기가 嚏出할 때 소리를 내는 것을 말하는데

‘鼻嚏’ ‘嚏噴’ ‘發嚏’라고도 한다.

鼻飶, 噴嚏의 원인에 대하여 《黃帝內經·素問》¹⁰⁾에서 ‘歲金不及 民病飶嚏’ ‘陽明所至爲飶嚏’ ‘少陰司天, 客勝則飶嚏’라 하여 ‘鼻嚏’와 기후변화와의 관계를 설명하고 있다. 鼻飶, 噴嚏의 원인과 관련성이 있는 臟腑에 대해서, 《黃帝內經·素問·金匱真言論》에서는 “西方白色入通於鼻 開竅於鼻”라 하였고, “肺主鼻 鼻者肺之關 肺氣通於鼻”라 하여 鼻의 질환이 폐와 밀접한 관련이 있음을 설명하고 있다. 폐는 鼻를 주관하는 것으로서 邪氣가 鼻에 들어가서 心肺에 간직되므로 心肺에 병이 있으면 鼻가 불리하게 된다 하였다. 鼻飶, 噴嚏의 발병 원인에 대해서는 역대 의가의 견해가 동일하지 않은데, 內經時代와 金·원시대에서는 주로 ‘火熱’과 肺氣와의 관련으로 인식하였다. 《黃帝內經·素問·氣交變大論》, 《五常政大論》, 《六元正紀大論》, 《至真要大論》과 金·원시대 劉元素의 견해에 따르면, 鼻飶의 병인병리를 肺·胃 2경의 火熱로 보고 있다. 즉 風熱에 感觸되거나 少陽·少陰司天으로 大熱이 유행할 때, 胃內에 痰火와 積熱이 있을 때 鼻飶, 噴嚏의 질환이 발생한다고 하였다. 明代 전후부터는 風寒邪가 皮毛, 鼻竅로의 침입과 폐기와의 관계를 주요 원인으로 보고 있다. 또 風寒邪가 시간이 경과할 경우 熱鬱肺伏火邪, 內化變發의 病理變化가 발생한다고 하였다³⁾.

알레르기성 비염에 해당하는 鼻飶, 噴嚏의 병인병리는 내인으로 肺脾腎 허약하고, 외인으로 風寒邪 異氣와 火熱에 감촉하여, 心火와 邪熱이 陽明經을 따라 축적되어 있다고 볼 수 있으며, 병력이 오래되어 풀립이나, 비후성 비염, 부비동염과 같은 합병증이 수반될 때에는 風寒化火의 병리변화로 ‘火熱’ ‘濕熱’이 內伏, 鬱滯되는 증상이라고 할 수 있다⁴⁾. 肺脾腎의 허손은 알레르기성 비염의 과민성 소질이 유전적 경향이 있다는 보고와 유사하며, 風寒邪 異氣와 火熱 등도 온도나 습도 등 외부의 기후조건이 알레르기성 비염의 중요유발인자로 작용한다¹¹⁾는 보고와 유사하다.

알레르기성 비염은 鼻塞, 鼻流涕, 噴嚏 등의 3대 증상이 나타나며, 경우에 따라서는 眼瞼 鼻腔 咽喉 등에서 瘙癢이 발생할 수 있다. 또한 비점막 창백과 종창 등의 증상이 나타나기도 하는데, 발병은 갑자기 발작적으로 일어나는 수가 많으나 점진적으로 일어나기도 한다고 하였다. 임상에서 흔히 관찰되기로는 鼻流涕가 가장 많으며, 噴嚏, 鼻塞 등의 순으로 나타나기도 하며, 鼻衄, 寒甚出濁涕, 不問香臭, 生瘡變成疔瘰肉, 不得息의 증상을 수반하기도 한다¹²⁾. 金代의 《素

問玄機原病式·六氣爲病編》에서 “鼽爲鼻出清涕也”, “涕, 鼻中因痒而氣嚏作于聲也”로 표현하였는데, ‘鼽’는 알레르기성 비염의 水樣性 鼻漏의 症狀과 ‘涕’는 발작성 噴涕의 증상과 유사하며, 鼻鼽, 鼽嚏가 바로 噴嚏, 鼻痒, 流清涕의 임상표현을 하는 병증임을 지적하고 있다¹³⁾.

고전문헌에 근거하여 볼 때 알레르기성 비염에 해당하는 鼻鼽, 噴嚏의 침치료는 督脈·手陽明大腸經·足太陽膀胱經·胃經의 순으로 다용되었는데, 모두 鼻部位를 직간접적으로 순행하는 경락으로서 鼻疾患에 치료효과를 나타내고 있다고 사료된다. 다용혈에 있어서, 주혈로는 頭部の 迎香·風池·印堂·鼻通 등이며, 여기에 肺俞·脾俞·腎俞·合谷을 배혈하고, 頭頂部 상용혈로는 迎香·人中·上星·百會·風池·風府 등이 있고 軀幹部에서는 大推·風門·上肢部에서는 合谷이 상용된다. 다빈도로 사용된 迎香·上星·合谷 등의 경혈들은 疏散風熱, 通鼻竅의 효능이 있어서 알레르기성 鼻炎 증상의 일반적인 치료원칙인 疏風宣肺, 通利鼻竅의 원칙과 一脈相通함을 알 수 있다. 大腸經이나 胃經이 많이 사용된 것은 鼻炎의 소인이 陽明과 관련이 많다고 추측이 가능하며 방광경·督脈의 경우는 外感과 관련을 보여준다¹⁴⁾.

多頻도로 사용된 迎香穴은 手陽明大腸經上의 經穴로서, 일명 衛陽穴이라고도 하는데, 《鍼灸甲乙經》¹⁵⁾에서는 “迎香, 一名衛陽 在禾膠上鼻下孔旁, 手足陽明之榿”라 하였으며, 《醫心方》¹⁶⁾에서는 “足陽明胃腑, 遇手陽明大腸”이라 하여 手足陽明經이 交會穴이 됨을 나타내고 있다. 迎香穴은 鼻와 인접하여 위치하고 있는데, 《鍼灸聚英》¹⁷⁾에서는 “在禾膠上一寸, 鼻孔傍五分”이라 하면서 “主鼻塞不問香臭, 偏風口窩, 面癢浮腫, 風動葉狀如蟲行, 脣腫痛, 喘息不利, 鼻衄多涕, 鼽衄有瘡, 鼻有息肉”이라 하여 頭面部 疾患에 두루 사용되었으며 특히 鼻疾患과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

황련해독탕은 葛洪의 《肘後備急方》에 처음으로 수록되었으며, 時氣溫疫病에 응용하였다. 金代에 이르러 劉에 의하여 本方의 가감 등 활용법을 제시한 바 있다. 본방의 구성약물은 전체적으로 藥性이 大苦大寒하여 清熱 瀉火解毒 去濕熱 등의 효능으로 구성되어 있다⁷⁾. 황련해독탕약침은 八綱藥鍼에 속하는 것으로 황련해독탕 처방을 끊어서 나온 증류액을 모아서 냉각시킨 후 여과과정과 pH 조절과정 등을 거쳐 고압멸균 뒤 사용하는데 清熱解毒의 효능으로 三焦實熱, 虛火上衝의 標治에 쓰이고 頭痛, 項強, 不眠, 熱性皮膚

病, 心火, 肝膽火, 肺火 등에 응용한다¹⁸⁾. 황련해독탕 약침에 대한 연구로는 황련해독탕 약침제제의 안정성¹⁹⁾, 침감²⁰⁾에 관한 연구가 있으며, 황련해독탕 약침으로 肩井穴을 자침 했을 때 심박변이율(HRV)에 미치는 영향을 관찰함으로써 자율신경계의 조절을 통해 인체의 불균형을 회복시킬 수 있음을 보였다²¹⁾.

산화스트레스는 활성산소종/활성질소종(reactive oxygen species, ROS/reactive nitrogen species, RNS)의 발생과 항산화 방어제(antioxydant defence system) 간에 심각한 불균형을 초래되는 상황을 말한다. 산화질소(nitric oxide, NO) 소모가 동반된 산화반응은 이차적인 산화(oxidation), 질소화(nitration) 및 nitrosation/nitrosylation물질을 생성하고 이러한 이차적인 nitrated species는 독특한 염증성 세포 신호 전달성을 나타낸다²²⁾. 이러한 작용은 동맥경화, 고혈압, 당뇨, 심혈관 질환²³⁾ 및 염증반응²²⁾의 병리기전을 주도하는데, 다양한 자극은 대식세포 내 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 발현시켜 L-arginine과 산소분자로부터 많은 양의 NO 생성을 촉진시킨다²⁴⁾. 최근에는 iNOS의 전사인자 NF-κB/Rel 활성 억제제를 통한 NO 생성 저해로 기인된 항염증효과에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, cirisium rhinoceros²⁵⁾ 등과 같이 한약에서 NO 조절제를 찾기 위한 연구들도 많이 진행되고 있다.

NO는 중성구와 대식세포를 포함하는 염증성 세포에서 미량 생산된다. 대식세포는 inducible NOS(NOS2)를 포함하고 있고, 중성구는 기본적으로 constitutive NOS(NOS1)를 발현하며, 염증성 반응이 있을 때 NOS2를 발현한다. 대식세포에서 유래된 NO는 L-arginine 의존적인 병원균 제거능력을 나타내고 면역조절 역할을 한다²⁶⁾. NO에 매개된 세포유해작용에 분자생물학적 기전은 주로 Fe-S-NO 유도체를 불활성화시키기 위한 enzyme 4Fe-4S center의 산화, ribonucleotide reductase의 불활성화에 의한 DNA 합성 저하 또는 단백질 합성의 일반적인 저하로 설명된다^{27,28)}. 다양한 급성 또는 만성 염증반응 시 NO의 생성은 증가되어 조직 손상에 기여하며, 조직 내 NOS 발현과 NO²⁻/NO³⁻가 다양한 염증성 질환 시 증가되어 있다^{28,29)}.

본 연구는 황련해독탕 약침액의 iNOS 발현과 NO 생성 억제제를 조사하기 위해 RAW 264.7 macrophages에 LPS를 처리하였는데, 그람음성세균의 세포벽 성분인 LPS는 강력한 면역시스템 활성화 물질로서 국소 염증, 항체생성 및 심한 감염의 경우에는 패혈성 쇼크를 유발한다고 보고되었다³⁰⁾. 이러한 LPS분자는

CD14와 결합하고, PKC와 PKA와 같은 신호전달체계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다^{31,32}. CD14는 단핵구와 호중구에서 잘 발현되는 55-kDa의 glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein으로 LPS 수용체라고 알려져 있으며, LPS와 강하게 결합한다³³. LPS 처리 후 RAW 264.7 macrophages에서의 iNOS 발현은 증가하지만, 황련해독탕 약침액 처리 시 iNOS 발현은 감소되었다. 이는 황련해독탕 약침액이 NF- κ B 활성을 억제한 결과로서, 황련해독탕 약침액은 I κ B kinase(IKK) 활성을 감소시키며 이는 NF- κ B/Rel의 억제자인 I κ B의 인산화 유도 감소로 이어져 NF- κ B/Rel는 불활성상태 남게 되어 생쥐 iNOS 유전자의 TATA box 앞쪽 55bp와 917bp 위치의 NF- κ B/Rel 결합부위³⁴에 결합하여 전사 유도해야 할 NF- κ B/Rel 감소에 의해 iNOS 발현 감소가 유도된 것으로 사료된다. 이러한 iNOS 생성 감소는 L-arginine을 전구물질로 이용한 NO 생성²⁴에 영향을 미쳐 RAW 264.7 macrophage에서의 NO 생성 감소로 이어지는데, 본 연구에서도 농도-의존적 NO 생성 감소가 측정되었다.

한편 알레르기성 비염 유발 시 증가된 산화 스트레스는 iNOS 유전자의 조절단백질 중의 하나인 NF- κ B/Rel를 활성화시켜 면역반응과 염증반응을 유도한다. 1986년 B cell에서 immunoglobulin κ light chain에 결합하는 인자로서 발견된 전사인자 NF- κ B(nuclear factor kappa B)는 p50 subunit family (p50, p52)와 p65 subunit family(p65, c-Rel, RelB)의 homodimer 또는 heterodimer로 구성되며, 보통 상태에서는 세포질에서 그 inhibitor인 I κ B protein (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl3)들과 결합하고 있어 불활성화된 상태로 세포질에 존재한다. 그러나 cytokine (TNF- α , IL-1), bacterial/viral infection(LPS, dsRNA), stress (ROI, UV, adriamycin, 방사선) 등의 다양한 자극에 의해 I κ B protein이 인산화되어 분해됨으로서 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- κ B binding site(consensus sequence: 5'-GGGpuNNPyPyCC-3')에 결합하여 염증관련유전자, anti-apoptosis 유전자 등의 발현을 유도한다³⁵. I κ B protein의 인산화는 I κ B kinase로 알려진 IKK(IKK α , β)에 의해서 일어나게 되는데 IKK의 활성화는 다양한 자극에 의해 유도되어 I κ B protein의 serine residue를 인산화시킴으로서 인산화된 I κ B protein은 ubiquitination 되어 26S proteasom에 의해서 분해된다(degradation). 전사인자 NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β 등의 proinflammatory cytokine과 LPS 등에 활성화가 유도되어 염증효소

iNOS 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직 손상을 유도한다³⁶. 본 실험에서도 산화스트레스에 의한 TNF- α , NF- κ B p65, p-I κ B 그리고 iNOS 양성반응의 증가를 확인 할 수 있었다. 이러한 과도한 염증반응에 의한 조직 손상의 결과로 好酸性 白血球의 이주 증가, HSP70 대량 합성, PPAR- α 과다 발현, Substance P 생성 증가가 관찰되었다. 점막 상피 손상 시 대량 합성되는 열 충격 단백질(heat shock protein p) 70은 72,000mol의 질량을 가지고 있으며 HSP72, 73, glucose regulated protein(GRP)75, 78 등이 이 단백질군에 속하며 대부분의 생물체에서 발견되는 스트레스 저항 단백질로서 허혈, 열, 저혈당, 바이러스 감염, 경련, 중금속 오염 등 다양한 형태의 스트레스 상황에서 농도가 증가하는 것³⁷⁻³⁹으로 세포 내 변성된 단백질은 열성 단백질 인자를 자극하여 HSP70유전자의 전사를 유도하여 HSP70을 생성하며, HSP70은 세포상해에 저항이 있는 지역에서 주로 발견된다. 한편 동통 및 소양증의 신경전달물질인 Substance P는 증가되어, 혈관내피 의존성 혈관확장, 비만세포 탈과립의 유도, 염증세포이주 및 증식에 관여하며 itching과 sneezing 행동을 유도 한다⁴⁰.

우수한 항산화 효능이 있는 황련해독탕의 약침 시술은 점막손상을 완화시켰는데, 호산성 백혈구 수 감소, HSP70 합성 감소, PPAR- α 발현 감소, Substance P 생성 감소 등이 관찰되었다. 또한 산화스트레스에 의한 TNF- α , NF- κ B p65, p-I κ B 그리고 iNOS 증가도 감소되었다. 이상의 결과로 iNOS mRNA 발현 억제능이 있는 황련해독탕 약침액 시술은 알레르기성 비염 유발 비강 점막에서 과도한 산화스트레스 조절을 통해 전사인자 NF- κ B 활성 조절을 통한 항염증작용으로 점막 손상을 완화시키는 것으로 생각된다.

V. 결 론

황련해독탕 약침액의 항염증효과가 알레르기성 비염 치료에 미치는 영향을 관찰한 본 연구는 RAW 264.7 세포에서 iNOS mRNA 발현과 Nitrite 생성 변화를 조사하였고 생쥐 鼻腔 내 粘膜에 OVA 항원 자극을 통한 인위적으로 알레르기성 비염을 유발시킨 후 迎香穴에 황련해독탕 약침을 시술한 후 호산성 백혈구 변화, 鼻腔 점막 손상 완화, 전사인자 NF- κ B 활성억제를 통한 항염증효과(iNOS 발현) 등의 변화를

관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황련해독탕 약침은 농도 의존적으로 iNOS mRNA 발현과 NO(Nitrite-Oxide)생성을 억제하였다.
2. 알레르기성 비염의 지표인 혈액과 조직 내 호산성 백혈구 수는 감소하였고,鼻腔 內 점막손상완화(HSP70, PPAR- γ , substance P 양성반응 감소)되었다.
3. 염증반응의 주요적 전사인자 NF- κ B의 활성 억제를 일으켰고 전염증효소인 iNOS 생성도 억제되었다.

VI. 참고문헌

1. David, P. Allergic rhinitis: Definition, epidemiology, pathophysiology, detection and diagnosis, *The J of Aller and Clin Immunol.* 1993 ; 14(2) : 162-7.
2. 민양기, 최종욱, 김리석. 일차진료를 위한 이비인후과학임상. 서울 : 일조각. 2002 : 60-79.
3. 김윤자, 김장현. 알레르기성 鼻炎에 관한 文獻的 考察. 대한한방소아과학회지. 1996 ; 10(1) : 17-34.
4. 이주희 외. 비색증과 Allergy 비염에 관한 문헌적 고찰(원인과 증상을 중심으로). 대한한방내과학회지 1993 ; 14(2) : 26-34.
5. 우현수, 김창환. 알레르기성 비염의 한방치료에 대한 고찰. 대한한의학회지. 2006 ; 27(1) : 155-64.
6. 송영림, 김희택, 노석선. 荊芥連翹湯가미가 알레르기성 비염에 미치는 효능에 대한 임상보고. 대한외관과학회지. 1995 ; 5(1) : 163-74.
7. 두호경, 박헌재. 황련해독탕의 약리학적 연구. 경희한의대논문집. 1982 ; 5 : 103-14.
8. 대한침구학회 교재편찬위원회. 침구학(상). 파주 : 집문당. 2008 : 35.
9. 이해자, 박은정. 알레르기성 鼻炎의 臨床的 研究. 대한한방소아과학회지. 2001 ; 15(2) : 167-75.
10. 張馬 合註. 黃帝內經. 北京 : 台聯國風出版社. 1981 : 339, 424, 505-7, 530-1, 624-5.
11. 임현호. 알레르기성 비염의 통계적 고찰. 대한이비인후과학회지. 1984 ; 27(3) : 247-53.
12. 최은규, 노석선. 알레르기성 비염(분체)에 관한 임상보고. 대한한방외관과학회지. 1992 ; 5(1) : 143-9.
13. 김현아, 정지천. 알레르기성 비염에 대한 문헌적 고찰. 대한외관과학회지. 1994 ; 7(1) : 53-84.
14. 손동석, 김윤범. 비질환의 침구치료에 대한 문헌적 고찰. 동의학회지. 2000 ; 4(1) : 115-26.
15. 皇甫謐. 針灸甲乙經. 沈陽 : 遼寧科學技術出版社. 1999 : 21, 24, 30.
16. 丹波康賴. 醫心方. 沈陽 : 遼寧科學技術出版社. 1996 : 73, 75, 80.
17. 高武. 針灸聚英. 北京 : 中醫古書出版社. 1999 : 18, 102, 205, 263, 264.
18. 李恂九, 鄭昇杞. 동의폐계내과학. 서울 : 아트동방. 1996 : 118, 136, 491.
19. 신길조, 조기호, 김영석, 배형섭, 이경섭. 황련해독탕의 약침제제의 안전성 및 효능에 관한 연구. 경희한의대논문집. 1994 ; 17(1) : 85-119.
20. 윤종석 외. 황련해독탕 약침, 자하거 약침의 침감에 대한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2004 ; 21(4) : 197-206.
21. 설현, 육태한. 肩井穴 黃連解毒湯藥鍼이 심박변이율(HRV)에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2004 ; 21(6) : 37-50.
22. Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med.* 1999 ; 26(9-10) : 1346-55.
23. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999 ; 43(3) : 562-71.
24. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 1987 ; 235(4787) : 473-6.
25. Min-Hsiung Pan, Ching-Shu Lai, Ying-Jan Wang, Chi-Tang Ho. Acacatin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TRA-induced tumor promotion in mice. *Biochem Pharmacol.* 2006 ; 72 : 1293-303.
26. Tan CM, Xenoyannis S, Feldman RD. Oxidant

- stress enhances adenylyl cyclase activation. *Circ Res.* 1995 ; 77(4) : 710-7.
27. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol.* 1993 ; 54(2) : 171-8.
 28. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985 ; 82(22) : 7738-42.
 29. Belvisi M, Barnes PJ, Larkin S, Yacoub M, Tadjkarimi S, Williams TJ, Mitchell JA. Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung disease in humans. *Eur J Pharmacol.* 1995 ; 283(1-3) : 255-8.
 30. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992 ; 267(2) : 54-61.
 31. Novotney M, Chang ZL, Uchiyama H, Suzuki T. Protein kinase C in tumoricidal activation of mouse macrophage cell lines. *Biochemistry.* 1991 ; 30(22) : 5597-604.
 32. Muroi M, Suzuki T. Role of protein kinase A in LPS-induced activation of NF-kappa B proteins of a mouse macrophage-like cell line, J774. *Cell Signal.* 1993 ; 5(3) : 289-98.
 33. Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata , Le Beau MM. The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science.* 1988 ; 239(4839) : 497-500.
 34. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 ; 90(20) : 9730-4.
 35. Baeuerle PA and Baltimore D. NF-kB - Ten years after. *Cell.* 1996 ; 87 : 13-20.
 36. Baeuerle PA. IκB-NF-kB structure: at the interface of inflammation control. *Cell.* 1998 ; 95 : 729-31.
 37. Gonzalez MF, Shiraiishi K, Hisanaga K, Sagar SM, Mandabach M, Sharp FR. Heat shock protein as markers of neuronal injury. *Mol Brain Res.* 1989 ; 6 : 93-100.
 38. Vass K, Beger ML, Nowak TS, Jr Lassmann H. Induction of stress protein HSP70 in nerve cell after status epilepticus in the rat. *Neurosci Lett.* 1989 ; 100 : 259-64.
 39. Bergstedt K, Hu BR, Weiloeh T. Initiation of protein synthesis and heat shock protein-72 expression in the rat brain following severe insulin induced hypoglycemia. *Acta Neuropathol.* 1993 ; 86(2) : 145-53.
 40. Pfaar O, Raap U, Holz M, Hörmann K, Klimek L. Pathophysiology of itching and sneezing in allergic rhinitis. *SWISS MED WKLY* 2009 ; 139(3-4) : 35-40.