

알레르기성 비염에서 황련-감초 하태독법의 IL-4활성 조절을 통한 항염증효과

정아람*

부산대학교 한의학전문대학원 한방소아과학교실

Anti-inflammatory effects of Hataedock with *Coptidis Rhizoma* and *Glycyrrhiza Uralensis* on Allergic Rhinitis through Regulating IL-4 Activation

A Ram Jung*

Department of Pediatrics, School of Korean Medicine, Pusan National University

The aim of this study is to evaluate the anti-inflammatory effect of Hataedock treatment using *Coptidis Rhizoma* and *Glycyrrhiza Uralensis* (CG) mixed extract in allergic rhinitis induced NC/Nga mice. We divided NC/Nga mice into 3 groups as follows: allergic rhinitis-induced group after CG Hataedock treatment (CGT, n=10), no treatment group (Ctrl), allergic rhinitis elicited group (ARE). To induce allergic rhinitis, NC/Nga mice of 3 weeks age were sensitized on 7, 8 and 9week by Ovalbumin (OVA) antigen in intranasal space. Hataedock using CG extract was administered on week 3 in allergic rhinitis-induced group (CGT) after Hataedock treatment. To identify distribution of Interleukin (IL)-4, Cluster of differentiation 40 (CD40), high-affinity IgE receptor (FcεRI), substance P, Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), Nuclear factor-κB (NF-κB) p65, Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and Cyclooxygenase-2 (COX-2), we used histological examination. CGT significantly inhibited IL-4 and CD40 response compared with ARE. The reduction of Th2 cytokine expression decreased inflammatory mediators such as FcεRI, substance P, MMP-9, NF-κB p65, iNOS and COX-2. Such immunological improvement induced reduction of respiratory epithelial damage and mucin secretion in goblet cell. These results indicate that Hataedock treatment suppresses allergic rhinitis through modulating of Th2 responses and diminishing various inflammatory mediators in nasal mucosal tissue. It might have potential applications for prevention and treatment of allergic rhinitis.

keywords : Hataedock, *Coptidis Rhizoma*, *Glycyrrhiza Uralensis*, Allergic rhinitis, Inflammation

서 론

알레르기성 비염(Allergic rhinitis)은 비강 내에서 발생하는 알레르기성 염증 반응으로써, 특정 알레르겐을 흡입하였을 때, 이들이 항원으로 작용하여 나타나는 면역반응에 의해 콧물, 재채기, 코 및 눈 가려움증이 발생하는 질환이다¹⁾. 알레르기성 비염은 성인과 소아 모두에서 가장 흔한 만성 염증성 질환으로서, 한 보고에 의하면 전 세계 인구의 40% 이상이 알레르기성 비염으로 진단받은 경험¹⁾이 있고, 미국의 경우 성인에서 10-30%, 소아에서는 40%정도가 알레르기성 비염 환자로 추정되고 있다²⁾. 알레르기성 비염은 삶의 질을 저해하는 대표적인 만성 염증성 질환으로, 콧물과 코막힘 등의

증상이 수면을 저해하여 소아청소년기 아동의 성장에 부정적인 영향을 미친다는 보고도 있다³⁾. 또한, 알레르기성 비염을 앓고 있는 소아환자의 75% 이상이 결막염, 천식, 아토피피부염, 비부비동염, 삼출성중이염, 아데노이드 비대와 같은 질환으로 발전했다는 보고도 있어 알레르기성 비염의 관리가 매우 중요함을 보여준다⁴⁾.

현재 알레르기성 비염에 대한 양방치료에는 항원에 대한 회피, 스테로이드제 및 항히스타민제와 같은 약물치료, 면역치료, 레이저 수술과 같은 방법이 사용되고 있다. 항원에 대한 회피는 일차적으로 고려되어야 할 치료이지만 환경관리가 실질적으로 어려우며, 약물요법의 경우 그 효과가 일시적이고 여러 가지 부작용을 야기할 수 있다⁵⁾. 항히스타민제의 경우 콧물, 재채기, 코가려움증 등 히스

* Corresponding author

Aram Jung, Department of Korean Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital, Geumo-ro 20, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea

E-mail : youi222@hanmail.net ·Tel : +82-55-360-5952

Received : 2019/03/10 ·Revised : 2019/04/15 ·Accepted : 2019/04/22

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.04.33.2.116>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

타민에 의해 매개되는 증상에 대해서는 효과적이거나 코막힘은 잘 조절되지 않아 임상에서는 흔히 스테로이드제 병용투여가 권고된다. 흡입형 스테로이드제의 경우 경구용에 비해 전신 부작용은 거의 없으나, 비강내 건조감과 분사 시 화끈거리는 불편감을 유발할 수 있고, 장기간 사용시 시상하부-뇌하수체-부신 축 억제(hypothalamic-pituitary-axis suppression)와 같은 부작용이 야기될 수 있다고 보고되어 있다⁵⁾. 면역요법의 경우 장기적인 치료를 필요로 하므로 높은 순응도가 요구되고, 이에 따라 소아환자에게 적합하지 못하다는 단점이 있고, 부종, 두드러기, 아나필락시스 등의 부작용이 따를 수 있다^{6,7)}. 이러한 치료방법의 한계로 인해 반복 재발되는 알레르기성 비염에 대해 한방치료를 병행하는 것이 최근의 추세이다.

소아에서 발현되는 염증성 질환은 태아기부터 발생하는 Th2 우세형의 면역학적 상태와 연관이 있다⁸⁾. 착상 직후 및 임신 유지기에는 유산 방지를 위해 태아가 Th2 면역반응이 우세한 환경에 놓이게 되며⁹⁾, 이에 따라 출생 시 Th2 우세형의 면역학적 상태로 태어나게 된다¹⁰⁾. 이는 곧 알레르기 비염에서 Th2 cytokine이 우세한 면역학적 상태와 일치한다¹¹⁾. 국제소아천식 및 알레르기질환 역학조사 3상(International Study of Asthma and Allergies in Childhood [ISSAC] study phase 3)의 보고에 의하면 6-7세 소아의 14.9%, 13-14세의 39.7%가 알레르기성 비염에 이환되어 있을 정도로 소아기에서 알레르기성 비염의 유병률은 성인에 비해 높다고 보고하고 있는데¹²⁾, 이 또한 Th2 우세형 면역 상태로 출생된 영아가 출생 후 알레르겐에 조기 노출된 결과로 추정해 볼 수 있다¹⁰⁾.

한의학에서는 출산 후 발생하는 이러한 염증성 반응들을 “태독(胎毒)”이라 이르고, 이를 예방하기 위해 하태독법(下胎毒法)을 사용하였다. 하태독법은 신생아에게 한약재를 달인 물을 소량 먹이거나 비단에 적셔 입안의 더러운 것들을 닦아주는 방법으로, 황련법(黃蓮法), 감초법(甘草法), 두시법(豆豉法), 우황법(牛黃法) 등이 있다¹³⁾. 하태독법 중 하나인 두시(豆豉)를 이용한 알레르기성 비염, 아토피피부염 실험연구에서 동물모델에 염증반응을 유발하기 전 하태독법을 시행하였을 때 염증발현이 완화되었다는 선행연구들이 있다^{14,15)}. 또한, 황련-감초 하태독법을 아토피피부염에 적용한 이전 연구에 의하면 황련-감초 추출물 처리를 한 NC/Nga 생쥐에서 Th2 cytokine이 적게 발현되었으며, 피부손상도 적게 나타났음이 확인되었다¹⁶⁾. 한의학에서의 태독을 없애는 치료법이 Th2 우세형 상태를 완화시킨 이전 연구를 통해 같은 병리기전을 가진 알레르기성 비염에도 유사한 효과를 보일 것을 기대해 볼 수 있다.

본 연구는 황련-감초 복합추출물을 이용한 하태독법을 시행한 후 ovalbumin (OVA)를 이용해 알레르기성 비염을 유발한 NC/Nga 생쥐에서 대표적인 Th2 cytokine인 IL-4 활성 조절을 통한 항염증효과를 확인하였기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 황련-감초 추출물의 제조

황련과 감초 각각 100 g을 증류수 1000 mL에 넣고 3시간동안

전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 mL로 감압, 농축한 후 동결 건조하여 추출물 31 g(수득률 15.5%) 획득하였다. 획득된 황련-감초 혼합 추출물을 CGT군의 NC/Nga 생쥐에 1회 경구투여하는 하태독법을 실시하였다(20 mg/kg).

2. 하태독법 실시와 알레르기성 비염의 유발

실험동물은 중앙실험동물(서울, 대한민국)에서 분양받은 태령 3주 된 NC/Nga수컷 생쥐(13~15 g)를 사용하였다. 생쥐들을 대조군(Ctrl), 알레르기성 비염유발군(ARE), 황련-감초 하태독법 시행 후 알레르기성 비염유발군(CGT)으로 나누었으며, 각 군에 10마리씩 배정하였다(Fig. 1). 알레르기성 비염의 유발여부는 콧물과 코긋기 행동으로 확인하였다. 본 연구과정은 부산대학교 Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) 승인을 받아 시행되었으며 (IACUC number: PNU-2016-1187), 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 National Institute of Health (NIH) 가이드라인에 따랐다.

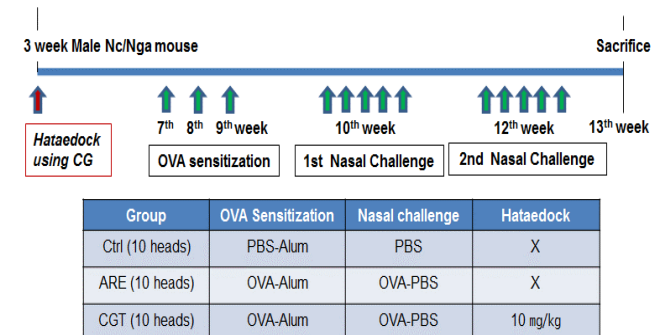


Fig. 1. Protocol for allergen sensitization and challenge. Mice were sensitized on week 7, 8, and 9 by Intranasal injection of OVA emulsified in alum hydroxide (Alum) (OVA 25 μ g; Alum 1 mg; PBS 300 μ l). On weeks 4 after initial sensitization, the mice were challenged with OVA (OVA 100 μ g; PBS 20 μ l) intranasally. On weeks 6 after initial sensitization, the mice were challenged with OVA (OVA 100 μ g; PBS 20 μ l) intranasally. Hataedock using of Coptidis Rhizoma and Glycyrrhiza uralensis (CG) was orally administered on weeks 3. Abbreviation: ARE, allergy rhinitis elicited group; Ctrl, no treatment group; CGT: Hataedock using CG treated group before allergy rhinitis elicitation.

3. 조직절편제작

각 군을 펜토바비탈나트륨(sodium pentobarbital) 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin: NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 두경부를 분리하고 비강 주변 구조물을 제거한 다음 10% NBF에 24시간 동안 실온에서 고정한 후 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 12시간 처리하였다. 이를 세척 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었고, 만들어진 절편을 hematoxylin & eosin 법으로 염색하였다.

4. 조직화학

비강 내 호흡상피에서 중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 점액분비세포의 변화를 관찰하기 위해 periodic acid-schiff reaction (PAS) stain을 실시하였다. 우선 periodic acid에서 5분

간 반응시킨 후 schiff reagent에서 15분동안 처리하였다. 그 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 hematoxylin에서 1분동안 대조염색하였다.

5. 면역조직화학

Protein inactivation을 위해 proteinase K (20 µg/ml)에 5분 동안 처리한 후 10 % normal mouse serum에서 2시간 동안에서 blocking을 시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti-IL-4 (1:200, Santa Cruz Biotech, USA), goat anti-CD40 (1:50, Santa Cruz Biotech), goat anti-Fcε receptor (1:50, Santa Cruz Biotech), goat anti-substance P (1:50, Santa Cruz Biotech), goat anti-MMP-9 (1:50, Santa Cruz Biotech), goat anti-NF-κB p65 (1:50, Santa Cruz Biotech) 그리고 goat anti-iNOS (1:100, Santa Cruz Biotech) 에 72시간 동안 4 °C humidified chamber 에서 반응시켰다. 그 다음 2차 항체인 실온에서 biotinylated mouse anti-goat IgG (1:100, Santa Cruz Biotech)에 24시간 실 온에서 link 하였고, avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05 % 3,3'-diaminobenzidine과 0.01 % HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

6. 영상처리분석과 통계처리

면역조직화학 결과는 image Pro Plus(Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화(means ± standard error) 하였다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 비점막 10개를 x400배율에서 촬영한 후 10,000,000 pixels로 영상분석 하였다. 영상분석 결과의 통계는 SPSS software (SPSS 23, SPSS Inc., USA)로 이루어졌으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 (P<0.05)을 검증하고 Duncan's multiple range test로 사후 검증 하였다.

결 과

1. 비점막 손상

알레르기성 비염 유발 후 비점막상피의 유실과 점막하 조직 내에서의 염증반응 증가가 관찰되었다. CGT에서 ARE에 비해 비점막 상피 손상정도가 적게 관찰되었다(*). PAS 염색 결과, 알레르기성 비염 유발 후 비중격 주변 호흡상피에서 분비소낭이 없는 술잔세포가 다수 관찰되었다. CGT에서는 ARE에 비해 술잔세포의 변화가 적었다(Fig. 2).

2. IL-4 생성 조절

비강 내 IL-4 조절여부를 관찰하기위해 면역조직화학 염색 후 Image pro Plus를 이용해 영상분석을 실시하였다. 알레르기성 비염 유발 후 두 군 모두에서 IL-4는 세포질에서 강한 양성반응을 보였고, ARE에 비해 CGT에서 41 % 유의성 있는 감소가 관찰되었다. IL-4 활성조절은 B cell 표면에 CD40을 발현시켜 B cell로부

터 IgE생성을 증가시킨다. 세포질에서 강한 양성반응을 보인 CD40 양성반응은 ARE에 비해 CGT에서 55 % 유의성 있는 감소가 나타났다(Fig. 3).

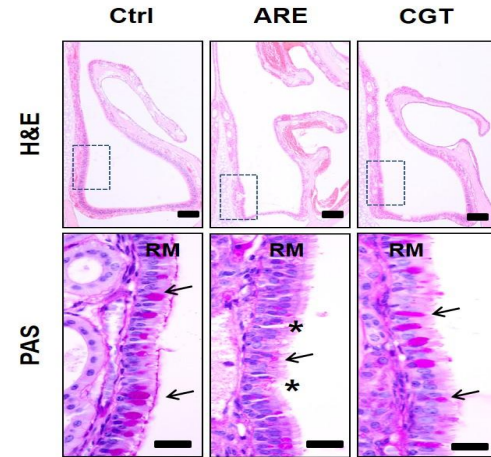


Fig. 2. The alleviation of AR induced respiratory epithelial damages by HTD using CG. Arrow indicates goblet cell and asterisk(*) indicates respiratory damaged region. Abbreviations: AR, Allergic rhinitis; ARE, allergy rhinitis elicited group; Ctrl, no treatment group; CGT: Hataedock using CG treated group before allergy rhinitis elicitation; H&E, Hematoxylin & Eosin; PAS, periodic acid-schiff reaction stain; RM, respiratory mucosa. Bar size, 50µm.

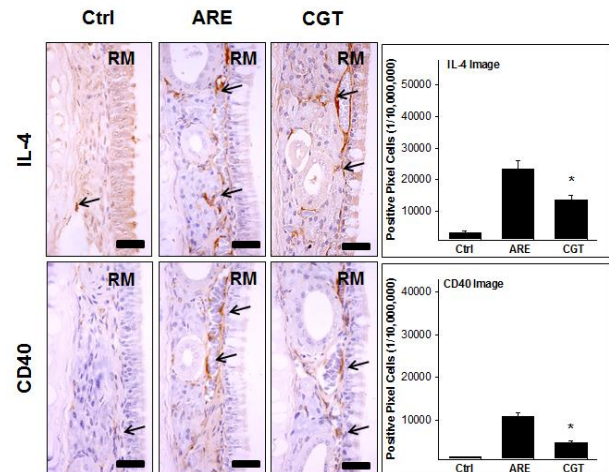


Fig. 3. The regulation of Th2 skewed condition. The IL-4 and CD40 positive reaction decreased in the CGT compared with the ARE group (immunohistochemistry; Bar size, 50µm). Results from image analysis also shows the same results (* p<0.05, compared with the ARE). Abbreviation: ARE, allergy rhinitis elicited group; Ctrl, no treatment group; CGT: Hataedock using CG treated group before allergy rhinitis elicitation; CD40, cluster of differentiation 40; IL-4, Interleukin-4; RM, respiratory mucosa.

3. 비만세포 활성 조절

비강 내 비만세포 활성에 관여하는 FcεRI 양성반응은 ARE에 비해 CGT에서 58 % 유의성 있는 감소가 나타났다. 비소양감의 원인이 되는 substance P 양성반응은 CGT에서 ARE에 비해 32 % 유의성 있는 감소가 관찰되었다. 비점막 내 부종을 일으키는 MMP-9 양성반응은 CGR가ARE에 비해 58 % 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

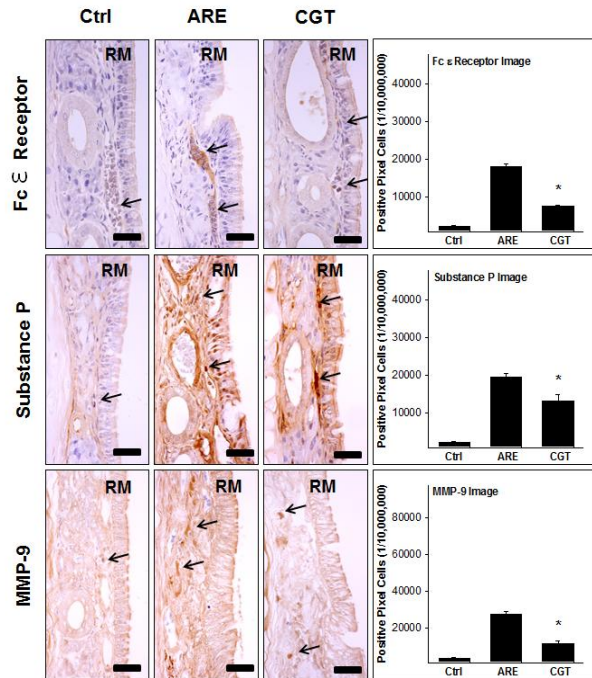


Fig. 4. The regulation of mast cell's activation. The FcεR1, substance P and MMP-9 positive reaction decreased in the CGT compared with the ARE group (immunohistochemistry; Bar size, 50μm). Results from image analysis also shows the same results (* $p < 0.05$, compared with the ARE). Abbreviation: ARE, allergy rhinitis elicited group; Ctrl, no treatment group; CGT: Hataedock using CG treated group before allergy rhinitis elicitation; MMP-9, Matrix metalloproteinase 9; RM, respiratory mucosa.

4. 항염증효과

염증효소 전사인자인 NF-κB p65 양성반응에서 CGT는 ARE에 비해 52 % 유의성 있게 감소하였다. 염증효소인 iNOS 양성반응은 CGT에서 ARE에 비해 65 % 유의성 있는 감소가 나타났다. 염증효소인 COX-2 양성반응은 ARE에 비해 CGT에서 72 % 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

고찰

알레르기성 비염은 비점막이 특정 항원에 노출된 후 콧물, 재채기, 코막힘 등을 유발하는 IgE 매개성 염증반응에 의한 질환이다. 본 연구에서는 알레르기성 비염에 대한 하태독법의 면역학적 변화를 평가하기 위해 황련-감초 복합추출물을 투여한 후 NC/Nga 생쥐에 알레르기성 비염을 유발하였을 때와 아무 처리를 하지 않고 알레르기성 비염을 유발한 경우를 비교하여, Th2 cytokine 조절능 및 염증반응 발현정도를 확인하였다. 대부분의 한약치료 연구들이 질병을 유발한 생쥐에 한약 처리 후 질병의 호전정도를 측정하였다면, 본 연구는 예방의학적 특성을 가지는 하태독법의 효과를 알아보기 위해, 하태독법을 먼저 시행하고 알레르기성 비염을 유발함으로써 알레르기성 비염의 치료가 아닌, 하태독법에 의한 면역조절능을 확인하고자 하였다.

하태독법에는 대표적으로 황련, 감초, 두시 등의 약재들이 사용되는데, 두시를 이용한 하태독법이 Th2 분화 조절을 통해 알레르기성 비염¹⁷⁾과 아토피피부염 마우스모델에서 항염증효과가 있음이 보고된 바 있으며¹⁸⁾, 황련-감초 하태독법이 아토피우사피부염 마우스모델에서 Th2 분화조절을 통해 피부손상을 완화시켰음도 보고되어 있으나¹⁹⁾, 황련-감초 하태독법의 알레르기성 비염에 대한 실험연구는 아직 보고되어 있지 않다. 하태독법에 대한 만족도 조사에 따르면, 시행받은 부모의 75 %가 만족한 결과를 보였고, 태열을 예방하는 효과가 있다고 응답한 비율이 65 %로써 하태독법의 근거가 확립되면 임상에서 잘 활용될 수 있을 것으로 보인다²⁰⁾. 한 실험연구에 의하면, Th2 우세형의 면역상태로 출생한 영아가 출생 후 Th1/Th2 균형으로 맞추어가는 능력이 생후 첫 주 이내에 완전히 성숙됨을 보고하고 있다²¹⁾. 이에 따라, 출생 직후 이른 시기에 Th2 면역반응을 제어하는 것이 과도한 Th2 우세형의 상태로 진행되는 것을 예방하는데 도움이 될 것으로 사료되며, 출생 직후에 시행되는 하태독법이 염증발현 제어에 있어 중요한 예방적 치료법이 될 것을 기대할 수 있다.

본 연구에서는, 우선 비점막 상피의 조직변화를 통하여 실제 염증반응의 감소가 일어났는지 확인하고자 하였다. 염증반응의 과정은 비점막의 섬유아세포를 활성화시켜 비점막의 부적절한 재형성을 야기하는데, 이러한 비점막 구조의 변화는 알레르기성 비염의 주된 병인이 된다²²⁾. 본 연구 결과, CGT와 ARE 모두에서 알레르기성 비염 유발 후 비점막상피의 유실이 증가하였으나, CGT가 ARE에 비해 비중격 주변 호흡상피에 분비소낭이 없는 술잔세포가 다수 관찰되어, 실제 걸로 드러나는 염증반응의 감소를 확인할 수 있었다.

위 염증반응의 감소가 황련-감초 추출물이 IL-4와 같은 Th2

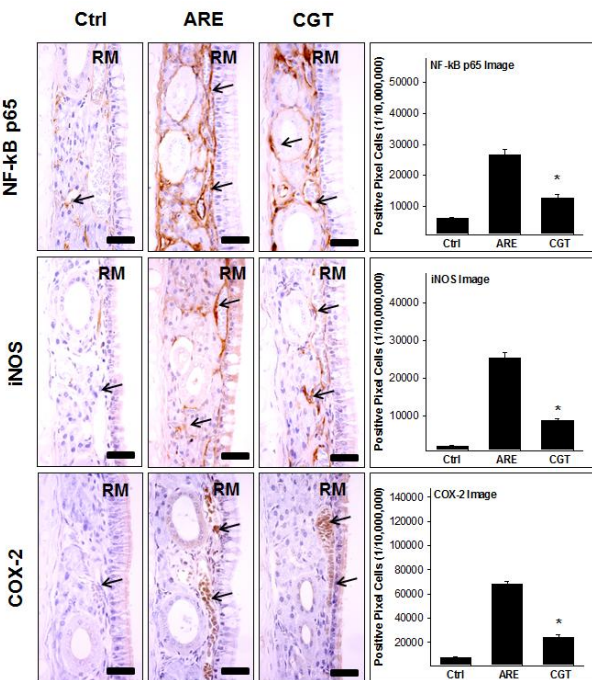


Fig. 5. The anti-inflammation effect. The NF-κB p65, iNOS and COX-2 positive reaction decreased in the CGT compared with the ARE group (immunohistochemistry; Bar size, 50μm). Data of image analysis was also shown same result (* $p < 0.05$, compared with the ARE). Abbreviation: ARE, allergy rhinitis elicited group; Ctrl, no treatment group; CGT: Hataedock using CG treated group before allergy rhinitis elicitation; COX-2, Cyclooxygenase-2; iNOS, Inducible nitric oxide synthase; NF-κB, Nuclear factor-κB; RM, respiratory mucosa.

cytokine의 활성을 조절함에 의한 것으로 생각되어 IL-4 및 IL-4 활성에 의해 B cell로부터 발현되는 CD40의 발현정도를 확인하였다. 알레르기성 비염 환자들로부터 항원유발검사를 통해 IL-4와 CD40 발현의 특징적 증가를 관찰할 수 있다는 사실로 보아²³⁾, 이 두 인자는 알레르기성 비염의 발현에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 활성화된 IL-4는 Th2 세포활성을 유도하고 이에 따라, T세포에 CD40L 단백질을 발현하게 한다. 이는 알레르겐에 대한 항체를 만드는 B cell에 CD40이라는 peptide를 발현시켜 여기에 결합함으로써 B cell로부터 IgE의 발현을 증가시킨다²⁴⁾. 실험결과, CGT에서 ARE에 비해 IL-4와 CD40의 발현정도가 유의미하게 적게 나타났음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 황련-감초 복합추출물을 이용한 하태독법 처리가 알레르기성 비염 발현에 있어서 Th2 면역반응조절을 통해 알레르기 비염의 발현을 억제할 수 있음을 의미한다.

B 세포에서 분비된 IgE는 항원과 함께 비만세포의 FcεRI 수용체와 결합하여 비만세포를 활성화시켜 각종 염증성 매개물질을 분비한다²⁵⁾. Substance P와 MMP-9은 비만세포 활성화를 통해 분비된 매개물들 중 하나로, substance P는 알레르기성 비염의 증상 중 비소양감과 재채기에 관여하는 신경전달물질이며²⁶⁾, MMP-9은 기저막의 주요성분인 젤라틴과 교원질을 분해하고, 염증반응시 염증세포들의 이동과 침윤을 촉진시켜 비점막의 부종을 야기한다²⁷⁾. 이전 연구결과들에 의하면 substance P는 정상인에 비해 알레르기성 비염 환자에서 5배나 증가하여 나타났고²⁸⁾, 알레르기성 비염 환자의 비점막하 분비선의 면역조직화학 검사 시 정상대조군에 비해 MMP-9이 높게 관찰되었다는 보고가 있다²²⁾. 이 연구들과 동일하게 본 연구에서도 NC/Nga생쥐에서 알레르기성 비염 유발 후 substance P와 MMP-9이 증가함을 확인할 수 있었고, FcεRI, substance P, MMP-9 양성반응 모두 ARE보다 CGT에서 유의미한 감소를 보였다(Fig. 4).

비만세포는 IgE 매개반응을 통해 IL-4에 의해 활성화되기도 하지만, 활성화된 비만세포가 IL-4와 같은 Th2 cytokine의 분비를 증가시킴으로써 염증반응이 확장되므로, Th2 면역반응 조절 및 비만세포 활성 억제는 염증반응 제어에 있어 매우 중요하다²⁵⁾. 본 연구결과는 황련-감초하태독법이 IL-4와 비만세포 활성 제어를 통해 알레르기성 비염에서 나타날 수 있는 비소양감, 비점막 부종 발현 및 염증반응의 확장을 억제할 수 있음을 보여준다.

알레르기성 비염에서 Th2 우세형 상태의 조절이 항염증 인자에 기여했는지 확인하기 위해 NF-κB p65, iNOS, COX-2와 같은 항염증 지표들을 확인하였다. 알레르기성 비염, 천식 등의 염증성 질환에서는 염증성 단백질들의 전사를 증가시키는 여러 전사인자에 의해 염증성 cytokine 및 효소들이 증가한다²⁹⁾. NF-κB는 이 전사인자들 중의 하나로, 알레르겐에 지속적으로 노출되는 알레르기성 비염 환자의 비점막상피세포층에서 특징적으로 NF-κB의 유의한 활성화를 확인할 수 있다³⁰⁾. NF-κB의 활성화는 iNOS mRNA를 증가시켜 iNOS발현을 증가시키고, 이는 다량의 Nitric Oxide (NO)생성으로 이어진다. NO가 superoxide anion (O³⁻)등과 결합하면 peroxynitrite anion (ONOO⁻)와 같은 세포독성물질을 형성하는 기전으로 염증반응이 악화된다³¹⁾.

한편, NF-κB는 COX-2와 같은 효소를 코드화하는 유전자를 조절함으로써, 염증반응에 주된 역할을 수행한다. COX-2는 phospholipase A₂ (PLA₂)에 의해 유리된 arachidonic acid를 prostaglandin H₂ (PGH₂)로 전환하는 과정에 작용하는 효소로서, 이 COX-2에 의해 생성된 prostaglandin이 염증을 촉진하는 매개물로 작용하여 알레르기성 비염을 일으키는 것으로 알려져 있다³²⁾. OVA에 의해 알레르기성 비염이 유도된 모든 그룹에서 iNOS, NF-κB, COX-2 발현의 뚜렷한 증가를 확인하였으나, CGT에서 ARE에 비해 알레르기성 비염의 발현 정도가 유의성있게 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

실험결과, IL-4의 증가는 염증반응의 전사인자인 iNOS, NF-κB, COX-2를 활성화시킴으로써 염증세포를 이주시켜 점막손상 및 부종을 촉진하는 결과를 보여주었다(Fig. 5). 한의학에서는 알레르기성 비염, 아토피피부염과 같은 염증성질환을 열(熱)과 연관되는 질환으로 간주한다³³⁾. 한의학과 면역계의 관계에 대한 한 선행연구에 의하면 IL-6및 IL-1, TNF-α와 같은 급성기 염증반응을 야기하는 proinflammatory cytokine의 증가가 한의학에서 이르는 '열증(熱證, Hot ZHENG)'과 연관이 있다고 보고한 바 있다³³⁾. 이에 따라 콧물, 코막힘, 재채기, 가려움 등의 염증성 증상을 유발시키는 다양한 면역학적 변화는 비점막의 정상 면역체계가 '열(熱)'에 의해 교란되었다고도 해석할 수 있다. 한의학에서 황련(黃蓮, *Coptidis Rhizoma*)은 황금(黃芩), 황백(黃柏), 석고(石膏) 등과 함께 청열(淸熱)효능이 있는 대표적인 약제들 중 하나로 동의보감에서는 심경(心經)으로 들어가 심열(心熱)을 제거하며, 비위(脾胃)의 습열(濕熱)을 없애고, 열독(熱毒)을 제거하는 효능이 있다고 기술하였고, 감초(甘草, *Glycyrrhiza Uralensis*)는 청열해독(淸熱解毒), 윤폐지해(潤肺止咳)의 효능이 있다고 알려져있어³⁴⁾ 황련-감초 추출물의 청열(淸熱)효과가 염증관련 면역학적 지표들의 완화에 영향을 준 것으로 사료된다.

황련의 주성분은 isoquinoline 계열의 alkaloid인 berberine으로 NF-κB pathway조절을 통해 염증을 억제하는 기전이 보고되어 있고³⁵⁾, Th1/Th2 cytokine의 유전자 발현에 관여하여 Th2 우세형 상태를 Th1/Th2 균형상태로 옮길 수 있는 가능성이 보고되어 있어³⁶⁾ 해당성분의 염증조절기전이 본 연구의 항염증효과에 기여했을 것으로 생각된다³⁶⁾. 감초의 glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin 성분들에서도 항알레르기 및 항염증³⁷⁾ 효능이 보고되어 있으며, glycyrrhizin의 경우 IL-4 생성을 감소시키고³⁸⁾, glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin이 iNOS와 COX-2 발현을 억제하는 기전이 보고되어 있어³⁹⁾, 이들 성분 또한 생쥐에서 알레르기성 비염 발현 억제에 주요한 역할을 했을 것으로 사료된다.

이상의 결과로 황련-감초 복합추출물을 이용한 하태독법 시행이 알레르기성 비염의 병태생리에서 중요한 역할을 하는 IL-4 활성을 억제하고 비만세포 활성을 제어하여 여러 염증매개물질의 분비 감소를 통해 알레르기성 비염의 비점막 손상 완화에 기여한 것으로 생각된다. 향후 황련-감초의 복합추출물의 알레르기성 비염 예방가능성의 분자 메커니즘을 설명할 수 있는 연구가 필요하다고 사료되며, 하태독법의 안전성 및 유효성 검증에 관한 추가연구가 필요

할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. NRF-2016R1D1A1B03930474)

References

1. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63(Suppl 86):8-160.
2. Nathan RA. The burden of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 2007;28(1):3-9.
3. Lee MJ, Chang GT, Han YJ. A Study on the Growth, Quality of Sleep of Children with Chronic Rhinitis. *J Pediatr Korean Med*. 2008;22(2):125-39.
4. Marino-Sanchez F, Valls-Mateus M, de Los Santos G, Plaza AM, Cobeta I, Mullol J. Multimorbidities of Pediatric Allergic Rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019;19(2):13.
5. Seth D, Kamat D. Intranasal Steroid Therapy for Allergic Rhinitis. *Pediatr Ann*. 2019;48(1):e43-e8.
6. Hur GY, Kim TB, Kim ST, Han MY, Nahm DH, Lee YW. Allergy immunotherapy. *Korean J Asthma Allergy Clin Immunol*. 2010;30:153-83.
7. The Korean Academy of Asthma AaCI, editor. *Asthma and allergic diseases*. Seoul: Yeomungak. 2012:Chapter 4, Immunotherapy:625-35.
8. Lou H, Fu Y, Wang C, Wang Y, Zhang L. Imbalance between Th1 and Th2 cells in cord blood is influenced by maternal allergic rhinitis and associated with atopic dermatitis during the first two years of life. *Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery*. 2014;49(5):390-4.
9. Krasnow J, Tollerud D, Naus G, Deloia J. Implantation and early pregnancy: Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy. 1996;11(8):1747-54.
10. Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ (Clinical research ed)*. 2000;321(7258):424.
11. Eifan AO, Durham SR. Pathogenesis of rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(9):1139-51.
12. Mallol J, Crane J, von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewart A. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: a global synthesis. *Allergologia et immunopathologia*. 2013;41(2):73-85.
13. Kang MY, Jang GT, Kim JH. A study on fetal toxicosis removal therapy. *J Pediatr Korean Med*. 2003;17(1):29-51.
14. Jung AR, Ahn SH, Park IS, Park SY, Jeong SI, Cheon JH, et al. Douchi (fermented *Glycine max* Merr.) alleviates atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by regulation of PKC and IL-4. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):416.
15. Choi JY AS, Kim KB. Reduction of Allergic Rhinitis by Controlling the Th2 Differentiation of Douchi Hataedock. *J Int Korean Med*. 2017;38(4):468-78.
16. CHA HY, Ahn SH, Cheon JH, Park SH, Choi JY, Kim KB. Anti-inflammatory Effects of Hataedock Extracted from *Coptidis Rhizoma* and *Glycyrrhiza Uralensis* on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions of NC/Nga Mouse. *J Int Korean Med*. 2015;36(4):486-97.
17. Ahn SH, Kim KB. Effects of Douchi Hataedock Treatment on Induction of Allergic Rhinitis in Obese Induced NC/Nga Mice. *J Pediatr Korean Med*. 2018;32(2):1-10.
18. Song JH, Ahn SH, Cheon JH, Park SY, Kim HY, Kim KB. Effects of Hataedock with Douchi 2,4-dinitrofluorobenzene-induced Atopic Dermatitis-like Skin Lesion in NC/Nga mice. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2016;30(2):109-15.
19. Cha HY, Ahn SH, Cheon JH, Park SY, Kim KB. Hataedock treatment has preventive therapeutic effects for atopic dermatitis through skin barrier protection in *Dermatophagoides farinae*-induced NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol*. 2017;206:327-36.
20. Kim MY, Kim PH, Jeong MJ. A Research on Mothers' Satisfaction with Ha-Taedok Treatment to Their Children. *J Pediatr Korean Med*. 2017;31(4):39-48.
21. Adkins B, Du RQ. Newborn mice develop balanced Th1/Th2 primary effector responses in vivo but are biased to Th2 secondary responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;160(9):4217-24.
22. Lee HM, Choi JH, Choi CS, Hwang SJ, Lee SH. Expression of MMP-9 and TIMP-1 in the Nasal Mucosa of Allergic Rhinitis. *Korean J Otolaryngol*. 2000;43:604-9.
23. Zhu R, Liu G, Li W, Wang Z, Chen H, Zhang W. A study of costimulatory molecules in allergic allergic rhinitis patients. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2008;22(17):780-2, 784.
24. Saunderson SC, Schuberth PC, Dunn AC, Miller L, Hock BD, MacKay PA, et al. Induction of exosome release in primary B cells stimulated via CD40 and the IL-4 receptor. *J Immunol*. 2008;180(12):8146-52.

25. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med.* 2012;106(1):9-14.
26. Zhang RX. The role of substance P, gene regulation and PM2.5 in the pathogenesis of allergic rhinitis. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2018;53(10):725-9.
27. Mori S, Pawankar R, Ozu C, Nonaka M, Yagi T, Okubo K. Expression and Roles of MMP-2, MMP-9, MMP-13, TIMP-1, and TIMP-2 in Allergic Nasal Mucosa. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2012;4(4):231-9.
28. Hanf G, Schierhorn K, Brunnee T, Noga O, Verges D, Kunkel G. Substance P induced histamine release from nasal mucosa of subjects with and without allergic rhinitis. *Inflamm Res.* 2000;49(10):520-3.
29. Barnes PJ, Adcock IM. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(2):46-50.
30. Kim ST, Oh SC, Kim CW, Park C, Jang IH, Cha HE, et al. Expression of NF-K B and I-K B in Allergic Rhinitis. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg.* 2000;43(11):1191-5.
31. Mendes KL, Lelis DF, Santos SHS. Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;38:98-105.
32. Na HK, Surh YJ. Role of Cyclooxygenase-2 and Its Products in the Regulation of Cell Growth. *J of Korean Assoc.* 2003;8(4):251-60.
33. Li S, Zhang ZQ, Wu LJ, Zhang XG, Li YD, Wang YY. Understanding ZHENG in traditional Chinese medicine in the context of neuro-endocrine-immune network. *IET Syst Biol.* 2007;1(1):51-60.
34. Heo J. Donguibogam. Seoul:Yegang publish:2019. p.2976.
35. Li Z, Geng YN, Jiang JD, Kong WJ. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus. *Evid Based Complementary Altern Med.* 2014;2014:289264.
36. Lin WC, Lin JY. Berberine down-regulates the Th1/Th2 cytokine gene expression ratio in mouse primary splenocytes in the absence or presence of lipopolysaccharide in a preventive manner. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(12):1984-90.
37. Ding JW, Luo CY, Wang XA, Zhou T, Zheng XX, Zhang ZQ, et al. Glycyrrhizin, a High-Mobility Group Box 1 Inhibitor, Improves Lipid Metabolism and Suppresses Vascular Inflammation in Apolipoprotein E Knockout Mice. *J Vasc Res.* 2018;55(6):365-77.
38. Bordbar N, Karimi MH, Amirghofran Z. The effect of glycyrrhizin on maturation and T cell stimulating activity of dendritic cells. *Cell Immunol.* 2012;280(1):44-9.
39. Yu JY, Ha JY, Kim KM, Jung YS, Jung JC, Oh S. Anti-Inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2015;20(7):13041-54.