

# 紫蛤散의 항알러지 효과에 대한 實驗的 研究

고재찬, 김준명, 송재진, 박양춘, 김병탁  
대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

## An experimental study of JaHap-san on the Antiallergic Effect

Jae-Chan Ko, Jun-Mung Kim, Jae-Jin Song, Yang-Chun Park, Byung-Tak Kim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

**Objective :** Experimental studies were done to research the effects of Jahap-san(zige-san) on the allergic reaction

**Methods :** For measuring the response about the antiallergic effect we investigated cytokines m-RNA expression of murine splenic B cell, production in anti-CD40 mAb-stimulated murine splenic B cells and the histamine release in IC-2 cells by anti-CD40 mAb-stimulated murine splenic B cells.

**Results :** The extract of Jahap-san(zige-san) revealed significant decrease effect on cytokines m-RNA expression of murine splenic B cell, production in anti-CD40 mAb-stimulated murine splenic B cells and the histamine release in IC-2 cells by anti-CD40 mAb-stimulated murine splenic B cells.

**Conclusion :** The extract of Jahap-san(zige-san) revealed significant effect on the antiallergy

**Key Word :** Jahap-san(zige-san), Antiallergic effect

## I. 緒 論

社會가 産業化되고 環境汚染 및 各種 化學物質의 使用이 늘어남에 따라 呼吸器疾患이 增加하고 있으며 특히 알러지 性 肺疾患이 늘어나고 있는 趨勢이다.

알러지란 人體가 外部로부터 侵入한 細菌이나 異種 物質에 대하여 일으키는 免疫反應이 自身에게 有害하게 作用하는 것을 말한다. 이는 組織損傷을 招來하는 過敏反應으로서 血管의 擴張, 毛細血管의 透過性 亢進, 平滑筋의 收縮과 痙攣, 粘液의 增加 및 粘膜의 浮腫과 炎症을 誘發시키는데, 특히 呼吸器에 深刻한 影響을 주어 기침과 痰의 分泌, 呼吸 困難, 發熱, 胸痛, 胸悶感, 喘鳴 등을 일

킨다.

紫蛤散은 紫河車 蛤蚧 附子 陳皮로 構成되어 大田大學校附屬韓方病院 肺系 內科에서 氣管枝喘息의 緩解期에 補益 肺腎 養血益精 止咳化痰의 目的으로 使用하고 있는 處方이다.

現在까지 韓藥物의 抗알러지 效果에 대한 實驗的 研究는 多樣하게 이루어지고 있으나 紫蛤散의 效能에 대한 實驗的 研究는 없었다. 이에 著者は 紫蛤散의 效能을 實驗的으로 糾明하고자 알러지 反應과 관련된 cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 의 轉寫 抑制 效果, IgE 發顯 阻害效果, B 細胞의 細胞 增殖에 대한 抑制效果 및 histamine 遊離 抑制效果를 測定하였던 바 有意한

結果를 얻어 報告하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 動物

本 實驗에 使用된 動物은 體重 18~20g의 Balb/C 생쥐를 韓國化學研究所에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C를 계속 維持하면서 2주일간 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

#### 2) 藥材

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였으며 處方 內容과 1貼의 用量은 다음과 같다(Table 1).

## 2. 方法

### 1) 檢液의 製造

紫蛤散(以下 JHS)은 3貼 分量 60g에 蒸溜水 2,000ml를 가하여 熱湯 抽出器에서 3시간 抽出하여 얻은 液을 吸入 濾過하여 rotary evaporator(Büchi 461)로 농축하였다. 이를 다시 Freeze dryer(Eyela, Japan)를 이용하여 完全 乾燥한 粉末을 冷凍(-84℃) 보관하면서 適當한 濃度로 稀釋하여 사용하였다.

### 2) 細胞 培養

#### (1) 생쥐의 B 細胞 分離

Balb/c 생쥐에서 脾臟을 分離하여 脾臟細胞(spleen cell)를 採取하여 2000 rpm에서 5분간 遠心分離하여 細胞를 回收하였다. 이에 赤血球溶血液(Sigma) 2ml를 넣고 37℃ 恒溫水槽에 5분간 放置하였다. 그리고 나서 즉시 10ml의 D-PBS를 添加하여 2000 rpm에서 5분간 遠心分離하여 使用하였다. 分離한 脾臟 細胞에 anti-Thy 1.2 assites(200  $\mu$ l/10<sup>8</sup>cells, Pharmingen, USA)를 處理한 후 얼음에서 30분간 反應시켰다. 反應後 2회 D-PBS로 水洗한後 rabbit complement lyop-hilised(Serotec., U.K) 0.5ml을 處理한後 37℃ 恒溫水槽에서 1시간 동안 培養하였다. 培養後 5회 complete medium으로 水洗하고 Sephadex G-10 column(Amersham Pharmacia, USA)에 通過시켜 B 細胞를 分離하였다. B 細胞 含量을 測定하기 위하여  $\alpha$ -B220-FITC를 利用하여 流細胞螢光分析機(flow cytometry)로 分析하였다.

#### (2) IC-2 細胞柱 培養

IC-2 細胞柱(RCB0102, Koyasu, Shigeo, Japan)는 IL-3 依存性(dependent) 생쥐 肥滿細胞(mast cell)로 10U/ml의 rIL-3(R&D system)를

RPMI1640-10% FBS 培養液에 處理하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 細胞培養을 하였다. IC-2細胞(2.0 x 10<sup>6</sup> 개)를 24 well plate에 分株하고 紫蛤散 抽出物을 處理한後 培養機에서(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 72시간 培養한다.

#### 3) B 細胞에서 cytokine 遺傳子發顯

##### (1) B 細胞에 紫蛤散 處理

紫蛤散은 濃度가 10, 100 $\mu$ g/ml이 되도록 하였고, anti-CD40(Pharmingen, USA) 100ng/ml만으로 처리한 對照群과 紫蛤散을 同時에 處理한 實驗群으로 分離하여 6時間 동안 培養하였다. 培養 終了後에 培養液을 버리고 PBS로 2회 洗滌하였다.

##### (2) B 細胞의 RT-PCR

###### ① RNA 抽出

培養終了後 上層液을 除去한後 RNAzol<sup>®</sup>를 利用하여 B 細胞膜을 터트린後 RNA를 抽出하는 方法을 擇하였다. RNAzol<sup>®</sup>를 1/10 量으로 CHCl<sub>3</sub>(chloroform) (40 $\mu$ l/400 $\mu$ l RNAsol)을 넣은後 15초간 vortex로 混合하고 얼음(ice)에서 15분간 放置하였다. 高速遠心分離機(4℃)로 15,000 rpm에서 15분간 遠心分離한後 上層液을 取하여 同量의 2-propanol과 混合하고 천천히 흔들어 주었다. 그리고 高速遠心分離機(4℃)로 15,000rpm에서 15분간 遠心分離한後 上層液을 除去하고, 1ml의 80% EtOH/DEPC D.W를 넣고 살짝 vortex後 15,000rpm에서 15분간 遠心分離하고 上層液을 다시 除去한 speedvac으로 乾燥시켰다. DEPC/D.W(0.05%) 抽出한 total RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 處理한 20 $\mu$ l의 蒸溜水에 녹여 RT-PCR에 使用하였다.

② 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應(RT-PCR)

逆轉寫(reverse transcription) 反應은 準備된 total RNA 3 $\mu$ g을 75℃에서 5분 동안 變性(denaturation)시키고, 이에 2.5 $\mu$ l 10mM dNTPs mix, 1 $\mu$ l random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 $\mu$ l), RNA inhibitor로서 1 $\mu$ l RNase inhibitor(20U/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l 100mM DTT, 4.5 $\mu$ l 5 $\times$ RT buffer (250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)를 加한 후, 1 $\mu$ l의 M-MLV RT(200U/ $\mu$ l)를 다시 加하고 DEPC 處理된 蒸溜水로서 最終 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이 20 $\mu$ l의 反應 混合液을 잘 섞은 뒤 2000rpm에서 5초간 遠心沈降하여 37℃ 恒溫 水槽에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 다음, 95℃에서 5분 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化 시킨後 合成이 完了된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 使用하였다.

###### ③ cDNA PCR

遺傳子 增幅을 위한 thermocycler(Perkin Elmer, Branchburg, NJ)를 利用하여 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應을 修行하였다. 反應은 이미 合成된 3 $\mu$ l의 cDNA를 主型으로 使用하고, 主型에 對한 primer는  $\beta$ -actin, interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-4(IL-4), interleukin-5(IL-5), inter-leukin-6(IL-6), interleukin-13(IL-13), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )를 增幅하기 위하여 sense primer(20pmole/ $\mu$ l)와 antisense primer(20pmole/ $\mu$ l)를 混合하여 1 $\mu$ l를 加하고, 다시 3 $\mu$ l 2.5mM dNTPs, 3 $\mu$ l 10 $\times$ PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 $\mu$ l Taq polymerase (5U/ $\mu$ l)를 添加한 다음 最終 부피가 30 $\mu$ l 되도록 滅菌蒸溜水를

加하고 predenaturation; 95°C, 5分, denaturation; 95°C, annealing; 55°C, 1分, elongation; 72°C, 1分을 25cycles 한 뒤 postelongation을 72°C에서 3分 동안의 條件으로 PCR을 修行하였다. 각 PCR products는 20µl씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 條件에서 20분간 전기영동을 통하여 分析하였다. PCR product의 量은 Windows 1D main program(AAB, USA)을 利用하여 最高값(height, Ht)으로 測定하였다.

4) cytokine 및 IgE 測定

B 細胞를 分離하여 anti-B220으로 確認한 後 24 well plate에 2x10<sup>6</sup> 細胞를 각 well에 分株하였다. Anti-CD40 100ng/ml만으로 처리한 對照群과 紫蛤散을 同時에 處理한 實驗群으로 分離하여 48時間 동안 CO<sub>2</sub> 組織培養機에서 同時培養 하였다. 培養 終了後 全體 培養液을 2000 rpm에서 5분간 遠心分離하여 上騰液을 回收하여 ELISA와 histamine release에 使用하였다. ELISA는 IL-1β enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA, Endogen, USA), IL-4 ELISA와 IgE ELISA kit(Pharmingen, USA)으로 分泌量을 測定하였다. 각 抗體(antibody)를 coating 緩衝溶液에 稀釋하여 microwell에 coating한 後 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3回 washing 緩衝溶液으로 洗滌한 後 B 細胞 培養上層液(culture supernatant)을 100µl씩 分株하였다. 1時間 동안 室溫에서 放置한 後 2回 washing 緩衝溶液으로 洗滌한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 處理하고 1時間 室溫에서 放置한 後 다시 洗滌하였다. TMB 기질을 100µl씩 分株하고 暗所에서 30분간 放置한 後 50µl의

stop 溶液을 處理한 後 ELISA leader 450 nm에서 吸光度를 測定하였다.

5) B 細胞의 細胞增殖에 대한 影響

Anti-CD40 ligand와 同時에 紫蛤散을 處理한 B 細胞의 增殖抑制度를 測定하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 X 10<sup>5</sup> cells씩 添加하고, 紫蛤散 抽出物 (200, 100, 10, 1 µg/ml)을 濃度別로 處理한 後 細胞를 37°C에서 40時間 培養 後 50µCi/ml 의 [methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine (Amersham, USA)을 添加한 後 다시 8時間 培養하였다. 細胞內로 吸收된 放射線 同位元素의 量을 測定하기 위하여 細胞만을 細胞收集機(Cell Harvester)를 使用하여 유리섬유여지 (Glass microfiber filter, Whatman)위에 捕獲하고, 乾燥한 後 放射線 測程器(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 利用하여 放射線 同位元素의 量을 測定하였다.

6) Histamine release量 測定

IC-2 mast 細胞에 10U/ml의 rIL-3 (R&D system)를 RPMI1640 FBS (10%) 培養液에 處理하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 細胞培養을 하였다. IC-2 細胞 (2.0 x 10<sup>6</sup>개)를 24 well plate에 分株하고 anti-CD40 100ng/ml만으로 處理한 B 細胞 培養液과 anti-CD40 100ng/ml과 紫蛤散을 同時에 處

理한 B 細胞 培養液을 각 well에 分株한 後 72時間 동안 同時培養 하였다. 培養 終了後 全體 培養液을 2000 rpm에서 5분간 遠心分離 하여 上騰液을 回收하여 histamine release kit(ImmunoTech, France)으로 histamine 流出量을 測定하였다.

III. 成績

1. IL-1β(m-RNA)遺傳子合性 沮害效果

B 細胞만 處理한 正常群(N)의 Ht값은 68로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群(C)의 Ht값은 154로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 10µg/ml을 處理한 實驗群(J1)에서는 Ht값이 134로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 100µg/ml를 處理한 實驗群(J2)에서는 Ht값이 101로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다(Fig. 1).

2. IL-4(m-RNA)遺傳子合性 沮害效果

B 細胞만 處理한 正常群(N)의 Ht값은 17로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群(C)의 Ht값은 54로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 10µg/ml을 處理한 實驗群(J1)에서는 Ht값이 46로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 100µg/ml를

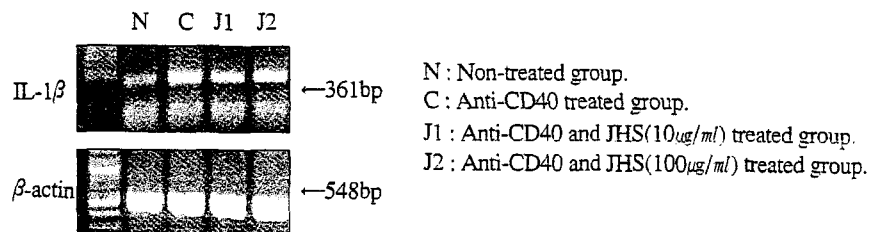


Fig. 1. The effect of JHS on IL-1β m-RNA expression of murine splenic B cell.

處理한 實驗群(J2)에서는 Ht값이 25로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다 (Fig. 2).

### 3. IL-5(m-RNA)遺傳子合性 沮害效果

B 細胞만 處理한 正常群(N)의 Ht값은 16으로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群(C)의 Ht값은 75로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群(J1)에서는 Ht값이 71로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 100 $\mu$ g/ml를 處理한 實驗群(J2)에서는 Ht값이 29로

나타나 對照群에 비하여 減少하였다 (Fig. 3).

### 4. IL-6(m-RNA)遺傳子合性 沮害效果

B 細胞만 處理한 正常群(N)의 Ht값은 31로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群(C)의 Ht값은 108로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群(J1)에서는 Ht값이 68로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 100 $\mu$ g/ml를 處理한 實驗群(J2)에서는 Ht값이 38로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다

(Fig. 4).

### 5. IL-10(m-RNA)遺傳子合性 沮害效果

B 細胞만 處理한 正常群(N)의 Ht값은 112로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群(C)의 Ht값은 212로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群(J1)에서는 Ht값이 183으로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 100 $\mu$ g/ml를 處理한 實驗群(J2)에서는 Ht값이 87로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다(Fig. 5).

### 6. TNF- $\alpha$ (m-RNA)遺傳子合性 沮害效果

B 細胞만 處理한 正常群(N)의 Ht값은 175로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群(C)의 Ht값은 177로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群(J1)에서는 Ht값이 170로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 100 $\mu$ g/ml를 處理한 實驗群(J2)에서는 Ht값이 169로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다(Fig. 6).

### 7. IL-1 $\beta$ , IL-4, IgE 發現沮害效果

IL-1 $\beta$  發現을 測定한 結果, B 細胞만 處理한 正常群에서는 14 $\pm$ 2.1pg/ml로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群에서는 42 $\pm$ 2.7pg/ml로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群에서는 36 $\pm$ 1.6pg/ml로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40와 JHS 100 $\mu$ g/ml를 處理한 實驗群에서는 30 $\pm$ 2.9pg/ml로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다(Table 2).

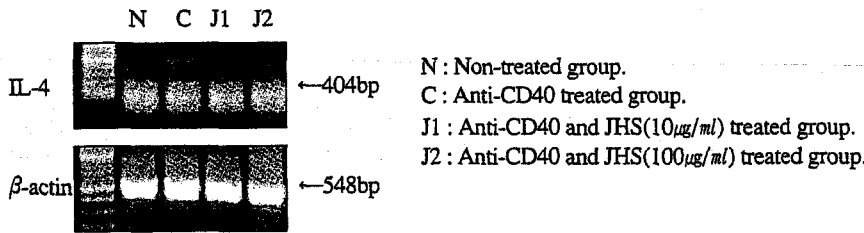


Fig. 2. The effect of JHS on IL-4 m-RNA expression of murine splenic B cell.

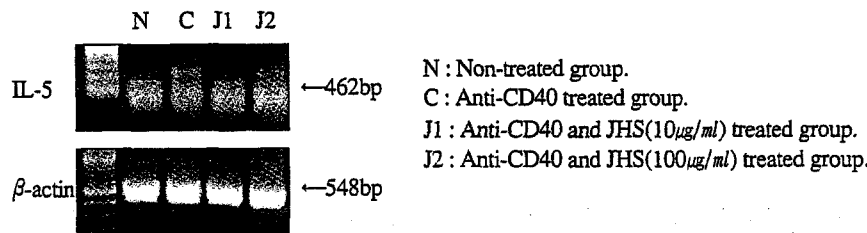


Fig. 3. The effect of JHS on IL-5 m-RNA expression of murine splenic B cell.

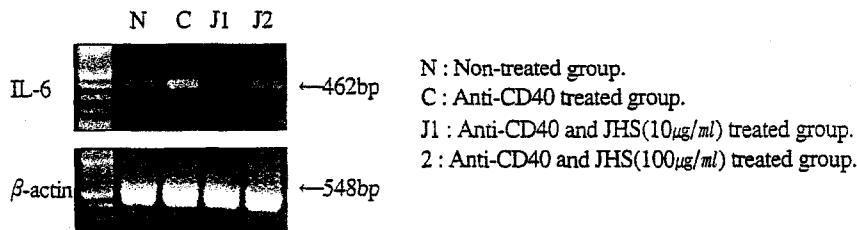


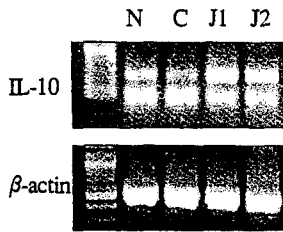
Fig. 4. The effect of JHS on IL-6 m-RNA expression of murine splenic B cell.

IL-4 發現을 測定한 結果, B 細胞만 處理한 正常群에서는  $158 \pm 12.4 \text{ pg/ml}$ 로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群에서는  $314 \pm 21.1 \text{ pg/ml}$ 로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS  $10 \mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群에서

는  $268 \pm 13.6 \text{ pg/ml}$ 로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS  $100 \mu\text{g/ml}$ 를 處理한 實驗群에서는  $213 \pm 15.2 \text{ pg/ml}$ 로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다 (Table 2).

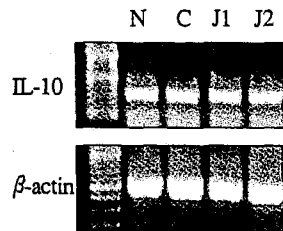
IgE 發現을 測定한 結果, B 細胞만 處

理한 正常群에서는  $3.3 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$ 로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群에서는  $24.2 \pm 4.7 \text{ ng/ml}$ 로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS  $10 \mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群에서는  $18.2 \pm 1.9 \text{ ng/ml}$ 로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS  $100 \mu\text{g/ml}$ 를 處理한 實驗群에서는  $13.5 \pm 2.8 \text{ ng/ml}$ 로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다 (Table 2).



N : Non-treated group.  
C : Anti-CD40 treated group.  
J1 : Anti-CD40 and JHS( $10 \mu\text{g/ml}$ ) treated group.  
J2 : Anti-CD40 and JHS( $100 \mu\text{g/ml}$ ) treated group.

Fig. 5. The effect of JHS on IL-10 m-RNA expression of murine splenic B cell.



N : Non-treated group.  
C : Anti-CD40 treated group.  
J1 : Anti-CD40 and JHS( $10 \mu\text{g/ml}$ ) treated group.  
J2 : Anti-CD40 and JHS( $100 \mu\text{g/ml}$ ) treated group.

Fig. 6. The effect of JHS on TNF- $\alpha$  m-RNA expression of murine splenic B cell.

Table 1. Prescription of JaHapSan(JHS)

韓藥名	生藥名	重量(g)
紫河車	<i>Hominis Placenta</i>	10.0
蛤蚧	<i>Gecko</i>	4.0
附子	<i>Aconiti Lateralis Preparata Radix</i>	3.0
陳皮	<i>Pericarpium Citri Nobilis</i>	3.0
Total Amount		20.0

Table 2. Inhibitory Effects of JHS on IL-1 $\beta$ , IL-4, IgE Production in Anti-CD40 mAb-stimulated Murine Splenic B Cells

	N	C	JHS	
			J1( $10 \mu\text{g/ml}$ )	J2( $100 \mu\text{g/ml}$ )
IL-1 $\beta$	$14 \pm 2.1$	$42 \pm 2.7$	$36 \pm 1.6^*$	$30 \pm 2.9^{**}$
IL-4	$158 \pm 12.4$	$314 \pm 21.1$	$268 \pm 13.6^*$	$213 \pm 15.2^{***}$
IgE	$3.3 \pm 0.4$	$24.2 \pm 4.7$	$18.2 \pm 1.9$	$13.5 \pm 2.8^*$

Normal : Non-treated group.  
Control : Anti-CD40( $100 \text{ ng/ml}$ ) treated group.  
JHS : Anti-CD40( $100 \text{ ng/ml}$ ) and JHS ( $10, 100 \mu\text{g/ml}$ ) treated group.  
\* P-value : Statistically significant value compared with control data  
(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

### 8. B細胞의 細胞增殖 沮害效果

B細胞의 細胞增殖을 測定한 結果, B 細胞만 處理한 正常群에서는  $221 \pm 34 \text{ ng/ml}$ 로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群에서는  $3069 \pm 208 \text{ ng/ml}$ 로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS  $1 \mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群에서는  $2859 \pm 197 \text{ ng/ml}$ 로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS  $10 \mu\text{g/ml}$ 를 處理한 實驗群에서는  $2035 \pm 157 \text{ ng/ml}$ 로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS  $100 \mu\text{g/ml}$ 를 處理한 實驗群에서는  $1490 \pm 121 \text{ ng/ml}$ 로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다 (Table 3).

### 9. Histamine 遊離에 대한 發現沮害效果

Histamine 遊離量을 測定한 結果, IC-2 肥滿細胞만 處理한 正常群에서는  $12.4 \pm 1.5\%$ 로 나타났고, IC-2 肥滿細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群에서는  $100 \pm 4.5\%$ 로 나타났으며, IC-2 肥滿細胞에 Anti-CD40과 JHS  $10 \mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群에서는  $75.2 \pm 5.4\%$ 로 나타났고, IC-2 肥滿細胞에 Anti-CD40과 JHS  $100 \mu\text{g/ml}$ 를 處理한 實驗群에서는  $65.3 \pm 3.6\%$ 로 나타나 對照群에 비하여 減少하였다 (Table 4).

**Table 3.** Inhibitory Effects of JHS on Cell Proliferation of Anti-CD40 mAb-stimulated Murine Splenic B Cells

Group	Dose( $\mu\text{g/ml}$ )	Cell proliferation( $\text{ng/ml}$ )
Normal	-	221 $\pm$ 34
Control	-	3069 $\pm$ 208
	1	2859 $\pm$ 197***
	10	2035 $\pm$ 157***
JHS	10	2035 $\pm$ 157***
	100	1490 $\pm$ 121***

Normal : Non-treated group.

Control : Anti-CD40(100ng/ml) treated group.

JHS : Anti-CD40(100ng/ml) and JHS(1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ ) treated group.

\* P-value : Statistically significant value compared with control data (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001)

**Table 4.** Inhibitory Effects of JHS on The Histamine Release in IC-2 Cells by Anti-CD40 mAb-stimulated Murine Splenic B Cells

Group	Dose( $\mu\text{g/ml}$ )	Histamine release(% complete)
Normal	-	12.4 $\pm$ 1.5
Control	-	100 $\pm$ 4.5
	10	5.2 $\pm$ 5.4**
JHS	100	65.3 $\pm$ 3.6***

Normal : Non-treated group.

Control : Anti-CD40(100ng/ml) treated group.

JHS : Anti-CD40(100ng/ml) and JHS(10, 100 $\mu\text{g/ml}$ ) treated group.

\* P-value : Statistically significant value compared with control data (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001)

**Table 5.** The Effects of JHS on Cytokines m-RNA expression of murine splenic B cell

	N	C	JHS	
			J1(10 $\mu\text{g/ml}$ )	J2(100 $\mu\text{g/ml}$ )
IL-1 $\beta$	68	154	134	101
IL-4	17	54	46	25
IL-5	16	75	71	29
IL-6	31	108	68	38
IL-10	112	212	183	87
TNF- $\alpha$	175	177	170	169

#### IV. 考 察

呼吸器疾患은 대체로 血管性 肺疾患, 閉鎖性 肺疾患, 肺感染症, 彌滿性 肺疾患 및 肺腫瘍 등으로 區分되는데, 社會가 産業化되고 環境汚染 및 各種 化合物質의 使用이 늘어남에 따라 알러지性 肺疾患이 늘어나고 있는 趨勢이다.

알러지 反應은 免役글로불린이 抗原과 反應하여 化學傳達物質이 放出되거

나 T 淋巴球에 의한 化合物에 의해 血管의 擴張, 毛細血管의 透過性 亢進, 平滑筋의 收縮과 痙攣, 粘液의 增加 및 粘膜炎의 浮腫과 炎症을 誘發시키는데, 특히 呼吸器에 深刻한 影響을 주어 기침과 痰의 分泌, 呼吸困難, 發熱, 胸痛, 胸悶感, 喘鳴 등을 일으킨다<sup>14</sup>.

人體가 抗原과 反應하는 데에는 2가지 境遇가 있는데 抗原에 대한 感受性이 낮아져서 疾病이 생기지 않는 즉 免

疫(immunity)이 되는 것과 反應能力이 非正常的으로 增加되어 過敏한 證狀을 일으키는 것으로, 後者를 過敏症(anaphylaxis)이라고 하며 現在 一般的으로 말하는 알러지는 거의 過敏症만을 말하는 傾向이 있다<sup>6</sup>. 즉 알러지란 外部에서 侵入하는 異物質이나 或은 同種의 組織, 體內的 不必要한 產物등에 대하여 免疫學的 反應을 일으키는데 이것이 人體에 有害하게 作用하는 것을 말한다<sup>10</sup>.

韓醫學에서의 免疫에 關聯된 言及으로는 《黃帝內經·素問·刺法論》<sup>11</sup>에서 “正氣存內 邪不可干”이라 하였고, 《黃帝內經·靈樞·百病始生》<sup>12</sup>에서 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人”이라 하였는데 正이란 正氣로서 生體의 調節, 防禦 및 適應能力을 指稱하고, 邪란 病邪로 生體의 正常的인 活動을 阻礙하여 疾病을 發生케하는 因子를 말한 것이다. 즉 疾病發生은 邪氣의 侵害와 正氣抵抗과의 相互鬭爭으로 因한 病理現象으로 認識하였다<sup>13</sup>. 이것은 免疫反應이 防禦, 恒常性 및 免疫監視로 區別되고 이들의 正常的인 機能에 異常이 생기면 疾病이 發生한다는 免疫理論과 符合하는 것이다<sup>14</sup>. 따라서 알러지疾患과 연관되는 哮喘, 鼻淵, 噴嚏, 蕁麻疹, 紫斑症, 水腫 등의 病症을 治療함에 있어 正氣의 培養과 邪氣의 除去가 주된 治療 原則이 되는 것이다<sup>15</sup>.

慢性 肺疾患과 알러지性 肺疾患을 包括하는 病證인 咳嗽, 喘證, 哮喘 등의 治療에 있어서 初期 또는 急性期에는 清熱化痰, 宣肺解表하고, 慢性 또는 緩解期에는 補益肺腎, 養血益精, 止咳化痰하는 治法을 使用하는데<sup>6</sup> 紫蛤散은 後者인 氣管枝喘息의 緩解期에 多用되고 있다.

紫蛤散은 紫河車 蛤蚧 附子 陳皮로 構成되어 있어 附子は 溫裏시키고 蛤蚧, 紫河車는 補陽시키고 陳皮로 理

氣시킴<sup>17-19</sup>으로써 肺腎陽虛로 因해 水泛 成痰하여 發하는 咳嗽嘔惡, 喘逆多痰 등 의 症狀을 治療하며 哮喘, 喘症, 痰盛咳嗽 久嗽, 肺癆 등의 慢性呼吸器疾患에 使用되도록 構成되어 있다.

이에 著者는 紫蛤散의 效能을 實驗的으로 糾明하기 위해 Anti-CD40의 刺戟에 의한 關聯 cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 의 轉寫能에 미치는 影響, IL-1 $\beta$ , IL-4, IgE의 發現에 미치는 影響, B 細胞增殖에 對한 抑制效果 및 histamine 遊離 抑制效果 등을 測定하였다. 第一型 過敏反應은 IgE 抗體가 중심역할을 한다. IgE가 결합하는 Fc 受容體(Fc $\epsilon$ R)는 여러 細胞에서 發顯되는데 주로 肥滿細胞, 好鹽基球에서 現저하다. 이들 細胞의 Fc $\epsilon$ R에 IgE가 결합된 다음에 抗原이 결합되면 活性化, 脫顆粒을 거쳐 過敏反應 媒介因子를 分泌한다.<sup>21</sup>

이러한 IgE를 發顯시키는 B 림프구의 分化는 세 가지 種類의 信號에 의한 다. 첫째로 B 細胞의 抗原 受容體를 통하여 이루어지는데 抗原 特異的 反應을 결정하는데 中樞的인 役割을 한다. 둘째는 Th2 細胞에서 由來된 IL-4, IL-13 같은 cytokine에 의하여 提供된다. 셋째는 B 細胞와 T 細胞의 interaction에 의하여 提供된다.<sup>24</sup> 이때 B 細胞와 Th 細胞의 접촉은 B 細胞에 대한 增殖 信號를 傳達하는데 이때 決定的인 役割을 修行하는 受容體-ligand 짝은 B 細胞 表面에는 CD40이고 활성화된 Th 細胞에서는 CD40-ligand이다.<sup>25</sup>

CD40은 B 細胞, dendric 細胞 그리고 thymic epithelial 細胞 위에서 發顯되고, 活性化된 macrophage위에서 誘導되는 50-kDa의 glycoprotein이다. CD40은 CD40-ligand(CD40-L)라는 counter receptor에 連結되어 있고 33-

kDa type II transmembrane glycoprotein 이 活性化된 CD4<sup>+</sup> T細胞 위에서 發顯된다. 그래서 Antigen을 CD40-L의 發顯을 誘導한 TCR에 結合한다. CD40-L의 interaction은 B 細胞의 成長과 antibody의 生産을 誘導하나 T 細胞를 刺戟할 뿐 아니라 IL-2를 나누어 버린다.<sup>6</sup>

抗原과 反應하여 活性化된 림프구가 生成, 放出하는 物質로서 다른 細胞에 作用하게 하는 活性物質을 Lymphokine이라고 總稱하고 있다. 한편 macrophage가 生成하는 同一한 活性物質을 monokine이라 하지만 이것은 monocyte의 抑制作動物質을 意味하고 있다. 그와 같은 物質을 含하여 cytokine이라고 한다.<sup>9</sup>

Th림프구는 cytokine을 分泌하여 氣道の 炎症反應을 調節하는 重要한 役割을 하고 있다. Th 림프구는 cytokine의 分泌樣相에 따라 Th1, Th2 림프구로 나뉘어 진다. Th1림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 를 生産하며 遲延型 過敏反應, 結核菌이나 바이러스에 대한 防禦作用, 腫瘍에 대한 宿住反應에 關與한다. Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 生産하며 即時型過敏反應, 氣管支喘息과 같은 알러지性 疾患, 寄生蟲 感染에 대한 防禦作用에 關與한다.<sup>20</sup> Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 拮抗作用을 나타내어 機能이 抑制되는 現象이 觀察되며 알러지性 氣管支喘息 患者의 기관지 肺胞洗滌液에서는 Th2 림프구의 機能이 活性化됨이 觀察되고 있다.<sup>21</sup>

IL-1 $\beta$ 는 免疫 및 炎症의 媒介物로서 急性期에 反應하여 免疫反應을 增幅시키는 機能을 하는데<sup>22</sup> B 前球細胞의 成熟과 抗原刺戟을 받은 B 細胞增殖을 誘導한다.<sup>23</sup>

IL-4는 여러 種類의 細胞에 多樣한

機能을 나타내는 分子量 20kD의 cytokine으로 初期에는 休息 B 細胞를 增殖시키는 作用으로 알려져 B 細胞成長因子(B cell growth factor : BCGF-1 또는 B cell stimulating factor : BSF-1)로 불렸다. 活性化된 CD4<sup>+</sup> T 細胞가 주된 IL-4 生成細胞이나 活性化된 肥滿細胞도 生成한다. IL-4는 B 細胞의 細胞期에 따라 그 機能이 달라서 休息 B 림프구에 대하여는 活性因子로 作用하여 細胞의 크기가 커지며 細胞表面 MHC 第二抗原과 FcR 發顯을 促進하며 活性化된 B 림프구에서는 成長因子로 作用하여 DNA 合成을 充進시키고 增殖期の B 림프구에는 分化因子로 作用하여 IgG1과 IgE 分泌를 充進시키는 反面에 IgG2a, IgG2b 그리고 IgM 分泌를 抑制한다. 또한 IL-4는 T 림프구와 肥滿細胞의 增殖를 促進하며 大食細胞의 食作用을 充進시킨다. IgE는 第一型過敏免疫反應을 일으키는 重要한 因子이므로 IL-4 生産의 充進은 알러지反應에 重要한 役割을 하게 된다.<sup>23</sup>

IL-4는 活性化된 T 細胞로부터 生成되는 B 細胞 刺戟因子로서 알려져 있지만 抗原과 反應한 B 細胞가 抗體生成細胞로 分化할때까지의 몇 가지 段階에 作用한다. 즉 休止期の B 細胞에 作用하여 活成化하고 抗原과 反應하거나 T 細胞의 補助를 받은 準備狀態를 만든다<sup>9-10</sup>. IL-4는 T 細胞에 對하여 作用도 하며 抗原과 反應한 T 細胞의 增殖를 補助하기도 한다. 抗原과 反應한 前殺害 T細胞(pre-killer T cell)가 殺害 T細胞(killer T cell)로 分化하는 것을 補助하는 作用도 있다. B림프구와 大食細胞에서 IgE 受容體의 發顯을 誘導하여 알러지反應과 관계가 있다.<sup>8</sup>

IL-5는 活成化된 T 細胞가 生成하지 만 活性化된 B 細胞의 增殖를 가져오는

作用과 B 細胞가 IgM와 IgG를 生成케 하며 또한 IgA 生成을 充進한다. 또 B 細胞에 IL-2 受容體를 表出시키는 作用도 있고 B 細胞가 IL-2의 作用을 입어 增殖 分化하는 것을 補助한다. IL-5는 抗原과 反應한 前殺害 T 細胞에 IL-2 受容體를 表出시켜 IL-2의 作用으로 殺害 T 細胞로 分化하는 것을 補助하는 일도 한다. 顆粒球 集落 刺戟因子(G-CSF)와 共同으로 未熟 好酸球을 增殖시켜 好酸球로 分化시킨다. 또한 好酸球을 活性化하는 役割을 한다<sup>8,10</sup>.

IL-6의 경우는 活性化된 T 細胞에서 生成되며 B 細胞가 抗體 生産細胞로 分化하는 最終段階를 誘導하는 物質로서 알려져 있다. 抗原과 反應한 T細胞에도 作用하며 IL-2 受容體를 表出시켜 IL-2를 生成시켜서 增殖을 招來하기도 하고 殺害 T 細胞의 發顯도 補助한다<sup>9</sup>. 다른 몇몇 細胞도 IL-6를 發生하지만 골수중 細胞는 IL-6를 生産하여 자기의 增殖을 支持하는 것 같다<sup>10</sup>. 神經交細胞에서 遊離되는 IL-6는 神經交細胞의 成長因子로서 作用하는 것으로 思料되며 巨核細胞를 增殖시켜 血小板의 成長을 높이는 作用도 있다<sup>8</sup>.

IL-10은 B 細胞의 增殖에는 制限的으로 作用하지만 B 細胞가 plasma 細胞로 分化한 다음에 고도로 免疫글로블린의 生産을 가져온다<sup>17</sup>. 또한 Th1의 IL-2와 IFN- $\gamma$ 分泌를 抑制한다<sup>23</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 Macrophage, Tcell, mast cell, NK cell에서 生産되며 IL-1의 機能과 重複되나 抗癌機能이 더 뛰어난 役割을 한다<sup>22</sup>.

이에 著者는 B 細胞 및 IC-2 肥滿細胞를 利用하여 臨床的으로 慢性呼吸器 疾患 治療에 使用되고 있는 紫蛤散이 알러지 反應에 重要な 役割을 하는 代表的 cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-

6 IL-10, TNF- $\alpha$ 의 轉寫能에 미치는 影響, IL-1 $\beta$ , IL-4, IgE의 發顯에 미치는 影響, B細胞의 細胞增殖과 histamine 分泌에 미치는 影響을 살펴보았다.

B 細胞의 核으로부터 細胞質로 나오는 科程上에서 發現되어진 遺傳子合性을 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應으로 살펴볼 때, B 細胞만 處理한 正常群(N)의 값과 B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群(C)의 값 및 B 細胞에 Anti-CD40과 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群(J1)에서의 값, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS 100 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群(J2)에서의 값을 cytokine 별로 표로 나타내면 다음과 같다(Table 5).

B 細胞로부터 細胞 밖으로 生産되어 나오는 cytokine의 量을 살펴볼 때, B 細胞만 處理한 正常群(N)의 量과 B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群(C)의 量 및 B 細胞에 Anti-CD40과 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群(J1)에서의 量, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS 100 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群(J2)에서의 量을 cytokine 별로 보면 濃度 依存的으로 減少하였음을 알 수 있었다(Table 2).

B 細胞의 細胞增殖 阻害效果에 있어서, B 細胞만 處理한 正常群의 값은 221 $\pm$ 34로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群의 값은 3069 $\pm$ 208로 나타났으며, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS 1 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群에서는 값이 2859 $\pm$ 197로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群에서는 값이 2035 $\pm$ 157로 나타났고, B 細胞에 Anti-CD40과 JHS 100 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群에서는 값이 1490 $\pm$ 121로 나타나 對照群에 비하여 濃度 依存的으로 減少하였다(Table 3).

Histamine 遊離에 대한 發現阻害效果에 있어서는 IC-2 肥滿細胞만 處理한

正常群의 Histamine 遊離量은 12.4 $\pm$ 1.5로 나타났고, IC-2 肥滿細胞에 Anti-CD40을 處理한 對照群의 Histamine 遊離量은 100 $\pm$ 4.5로 나타났으며, IC-2 肥滿細胞에 Anti-CD40과 JHS 10 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群에서는 Histamine 遊離量이 75.2 $\pm$ 5.4로 나타났고, IC-2 肥滿細胞에 Anti-CD40과 JHS 100 $\mu$ g/ml을 處理한 實驗群에서는 Histamine 遊離量이 65.3 $\pm$ 3.6로 나타나 對照群에 비하여 濃度 依存的으로 減少하였다 (Table 4).

이와 같이 紫蛤散이 알러지作用에 미치는 影響은 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 의 轉寫能을 抑制하여 IgE의 合成을 阻害하고, 肥滿細胞에 作用하는 IL-6를 抑制하므로써 炎症媒介物質의 分泌를 阻害하여 氣道粘膜炎의 過增殖과 異常分泌物增加를 減少시키는 效果를 나타낼 것으로 思料된다.

## V. 結 論

紫蛤散의 效能을 糾明하기 위하여 抗알러지 作用으로 Anti-CD40의 刺戟에 의한 關聯 cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 의 轉寫 抑制效果, IL-1 $\beta$ , IL-4, IgE의 發顯 抑制效果, B 細胞의 細胞增殖 및 histamine 遊離에 대한 抑制效果를 測定하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 紫蛤散은 IL-1 $\beta$ (m-RNA), IL-4(m-RNA), IL-5(m-RNA), IL-6(m-RNA), IL-10(m-RNA), TNF- $\alpha$ (m-RNA)의 遺傳子合性에 대해 濃度 依存的으로 減少시키는 效果가 나타났다.

2. 紫蛤散은 IL-1 $\beta$ , IL-4, 發現量을 濃度 依存的으로 減少시키는 效果가 나타났다.



3. 紫蛤散은 B 細胞의 細胞增殖을 濃度依存的으로 減少시키는 效果가 나타났다.

4. 紫蛤散은 Histamine 遊離에 對해 濃度依存的으로 減少시키는 效果가 나타났다.

以上の 結果로 보아 紫蛤散은 알러지 反應을 抑制시키는 效果가 認定되며 앞으로 이에 대한 持續的인 研究가 必要 하리라 思料된다.

## 參考文獻

1. 大韓病理學會 : 病理學(Ⅰ), 서울, pp589-591, 1999.
2. 李淵台 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, p.33, 1985.
3. 丁奎萬 : 알레르기와 韓方, 서울, 圖書出版第一路, pp.15-26, 60-61, 1990.
4. 文希柱 : 免疫 血清學, 서울, 大學書林, pp.67-74, 1988.
5. 康暫榮 : 알레르기 疾患의 臨床의 實際, 서울, 一潮閣, pp.192-207, 242-251, 1988.
6. 康秉秀 : 韓方臨床알레르기, 서울, 成輔社, p.8, pp.62-63, 369-370, 379-381, 1980.
7. 閔昌泓 柳在根 : 最新微生物學, 서울, 高文社, pp.79-80, 1984.
8. 서울大學校 醫科大學 : 免疫學, 서울, 서울 大出版部, pp.59-63, 121-133, 1991.
9. Papazissi, K., Geromichalos, D., Dimitriadis, K., Kortssaris, H : Optimization of the sulforhodamine B(SRB) colorimetric assay., immunological method. 208:151-158, 1997.
10. 金周德, 金聖光 역 : 免疫學入門, 서울, 醫齒學社, pp.47-81, 1983.
11. 張隱庵, 馬王堆 : 黃帝內經素問, 서울, 成輔社, p.21, 241, 1975
12. 張隱庵, 馬王堆 : 黃帝內經靈樞, 서울, 成輔社, p.396, 1975.
13. 金賢濟 : 東洋醫學概論, 서울, 東洋醫學研究院, pp.125-126, 1977.
14. 文濬典 安圭錫 崔昇勳 : 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.27-29, 78-80, 1990.
15. 趙鍾寬 : 免疫에 對한 東洋醫學的 考察, 東洋醫學, 12(1):19-23, 1986.
16. Roitt 외 : Immunology ; Fifth Edition ; Mosby, 1998, p144.
17. 全國韓醫科大學 本草學教授 : 本草學, 서울, 永林社, p.294, 302, 347, 369, 373, 438, 448, 453, 463, 478, 534, 536, 540, 567 578, 580 588, 622, 1994.
18. 申信求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, p.199, 225, 333, 349, 1987.
19. Bellanti JA : cytokines and allergic diseases ; clinical aspects, Allergy Asthma Proc., 19(6):337-341, 1998.
20. 정승원 외 : 사이토카인이 Th1細胞의 Mitogens에 대한 增殖反應에 미치는 影響, Korean J. Immunol. 19:73-81, 1997.
21. Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M : cytokines and asthma, J. of investigational allergology and clinical immunology, 7(5): 270-273, 1997.
22. 전국의과대학교수 : 오늘의 진단 및 치료, 서울, 한우리, p.852.
23. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S : The CD40 antigen and its ligand. Annu Rev Immunol 12:881-922 1994
24. Kehry MR, Hodgkin PD : B-cell activation by helper T-cell membranes. Crit Rev Immunol 14(3-4):221-238 1994.
25. 이세중. 면역학, 서울, 고려의학, pp.154-156, 1994.
26. Jelinek DF : Regulation of B lymphocyte differentiation. Ann Allergy Asthma Immunol 84(4):375-387 2000.
27. Briere F, Bridon JM, Servet C, Rousset F, Zurawski G, Banchereau J : IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. Nouv Rev Fr Hematol 1993 Jun;35(3):233-5