

생쥐의 B 세포에서 IgE의 분비와 Cytokine 생산에 대한 小青龍湯의 效果

배한호, 이정은, 한영주, 박양춘
대전대학교 부속 한방병원 호흡기내과

The Inhibitory Effects of SoCheongRyongTang(SCRT) on Cytokine Production and Secretion of IgE in Highly Purified Mouse B cells

Han-ho Bae, Joung Eun Lee, Young Ju Han, Yang-chun Park

Department of Internal Medicine College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

Objective : We aimed to identify the inhibitory effects of SocheongRyongTang on Cytokine Production and Secretion of IgE in Highly Purified Mouse B cells.

This experiment was designed to investigate the effect of SoCheongRyongTang(SCRT) on Antiallergy.

Materials and Methods : We measured the cytotoxic activity for cytokines transcript expression, production of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TGF- β proliferation of B cell in anti-CD40mAb plus rIL-4 plus HRF stimulated murine splenic B cells and histamine in anti-CD40mAb plus rIL-4 plus HRF stimulated mast cells.

Results : 1. SCRT increased the gene synthesis of IFN- γ (m-RNA), the appearance of IL-10, IFN- γ . 2. SCRT decreased the gene synthesis of IL-1 β , IL-4, TGF- β (m-RNA) and the appearance of IL-1 β , IL-4, TGF- β , IgE significantly.

Conclusion : SCRT decreased the proliferation of B cell significantly.

According to the above results, it is suggested that SCRT extract might be usefully applied for prevention and treatment of Allergic disease.

Key Words: SoCheongRyongTang, Cytokine, IgE, Antiallergy

I. 緒 論

Allergy란 인체가 외부로부터 침입한 세균이나 이종 물질에 대하여 일으키는 면역 반응이 자신에게 유해하게 작용하는 것을 말한다. Allergy 반응은 먼

역 글로불린이 항원과 반응하여 방출하는 화학전달 물질이나 T림파구에 의한 각종 화합물에 의해 혈관의 확장, 모세혈관의 투과성 항진, 평활근의 수축과 경련, 점액의 증가 및 점막의 부종과 염증 등이 유발되는 것으로 특히 호흡기계에 심각한 영향을 미치게 된다.

小青龍湯은 《傷寒論》에 처음으로 기재된 처방으로 解表散寒, 溫肺化痰, 止咳平喘하는 효능으로 만성 기관지염, 기관지천식, 알레르기성 비염, 노인성 폐기종 및 기관지염 급성발작에서 外感風寒하거나 水飲

· 접수 : 2003년 4월 12일 · 채택 : 2003년 6월 16일
· 교신저자 : 배한호, 충북 청주시 상당구 용담동 대전대부속
청주 한방병원 3층 의사실 대전대부속한방병원
호흡기내과
(Tel: 043-229-3801, 3704 Fax: 043-253-8757, E-mail:
hanhobae@hanmail.net)

停滯로 인한 경우에 응용된다³⁻⁵.

현재까지 小青龍湯의 효능에 대해서 다수의 실험 연구⁶⁻¹²와 임상연구¹³⁻¹⁵ 등이 보고되었으나, 아직 小青龍湯의 allergy에 미치는 효과에 대한 실험적 연구는 미비한 실정이다.

이에 저자는 小青龍湯이 cytokine과 immunoglobulin E(IgE)에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자, B 세포에서 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-4(IL-4), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10(IL-10), transforming growth factor- β (TGF- β), interferon- γ (IFN- γ)의 유전자발현 그리고 정량적으로 IL-4, IFN- γ , IgE, histamine 생성에 미치는 효과 등을 측정할 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 동물

실험동물은 雄性 4주령의 BALB/c 생쥐를 한국화학연구소에서 공급받아 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사 Co., Korea)와 정제수를 충분히 공급하고 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약제

본 실험에 사용한 약제는 《東醫寶鑑》에 수록된 小青龍湯으로 대전대학교 부속한방병원에서 구입한

것을 정선하여 사용하였으며 처방내용과 1첩의 용량은 다음과 같다.(Table 1)

3) 시료제조

小青龍湯 100g에 증류수 1300ml을 가하여 열탕추출기(대웅, Korea)에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 여과지로 여과, rotary vaccum evaporator(Buchi B-461, Switzerland)로 농축하고, 이를 다시 freeze dryer(Eyela Co., Japan)를 이용하여 얻은 완전 건조된 분말을 냉동(-84℃) 보관, 적당한 농도로 희석·사용하였다.

2. 方法

1) 생쥐 B 세포분리 및 배양

BALB/c 생쥐에서 비장을 분리하여 비장세포를 채취하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 이에 적혈구용혈액 2ml을 넣고 37℃ 항온수조에 5분간 방치하였다. 그 후 즉시 10ml의 D-PBS를 첨가하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다. 분리한 비장세포에 J1J10, GK1.5.3, M1/70 배양상층액(1ml/108세포)을 처리한 후 얼음에서 30분간 반응시켰다.(Table 2) 반응 후 2회 D-PBS로 수세하고 rabbit complement lyophilised 0.5ml을 처리한 후 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 5회 complete medium으로 수세하고 Sephadex G-10 column에 통과시켜 B 세포를 분리하였다. B 세포 함량을 측정하기 위하여 α -B220-FITC를 이용하여 유세포 형광분석기로 분석하였다.(Table 2)

2) CD23, CD44 및 CD69 발현분석

생쥐 B 세포를 24 wells plate에 5×10⁵ 세포/well로 분주하고 histamine-releasing-factor(HRF)(500ng/ml), anti-CD40 mAb(250ng/ml), recombinant mouse interleukin-4(rmIL-4)(500U/ml), 그리고 小青龍湯 추

Table 1. Prescription of SoCheongRyongTang(SCRT)

韓藥名	生藥名	用量(g)
麻 黃	<i>Ephedrae Herba</i>	6.0
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6.0
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	6.0
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	6.0
細 辛	<i>Asari Herba cum Radice</i>	4.0
乾 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4.0
桂 枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	4.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
Total Amount		40.0

Table 2. Monoclonal Antibody Used for Immunofluorescence Staining

Immune cell types	Markers	Monoclonal antibody
T cells	Thy1.2	JJ10
helper T cells	Thy1.2	GK1.5.3
Marophages	CD4	M1/70

출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 가하여 68시간 배양하였고, 양성대조군으로 recombinant mouse interleukin-10(rmIL-10)(50ng/ml)을 사용하였다. 배양 후 B 세포를 인산완충생리식염수로 2회 수세하였고, 4 $^{\circ}$ C에서 면역형광염색을 실시하였다. 각각에 FITC-anti-mouse CD23, FITC-anti-mouse CD44 그리고 FITC-anti-mouse CD69 등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 생쥐 B 세포에서 CD23(Fc ϵ), CD44 그리고 CD69의 발현을 분석하였다. Cell-Quest 프로그램으로 CD23+/B220+, CD69+/B220+ 그리고 CD44+/CD69+의 비율을 산출하였다.

3) Cytokine 유전자발현 분석

(1) 小青龍湯 추출물처리

생쥐 B 세포를 분리하여 24 wells plate의 각 well에 1×10^6 세포씩 분주하고, 小青龍湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 처리하였고, 약물처리 1시간 후 HRF(500ng/ml), anti-CD40 mAb(250ng/ml), rmIL-4(500U/ml)를 동시처리 후 배양하였다. 그리고 rmIL-10(50ng/ml)을 더 처리한 것을 양성대조군으로 사용하였다. 각 小青龍湯 추출물과 HRF, anti-CD40 mAb 과 rmIL-4를 동시 배양하여 6시간 후 배양 상등액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

(2) 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

① RT-PCR

Reverse transcription 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25pmole/25 μ l), RNainhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor(20U/ μ l), 1 μ l 100mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA

를 PCR에 사용하였다.

② cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system을 이용하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α 를 증폭하기 위하여 sense primer (20pmole/ μ l)와 antisense primer(20pmole/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq. polymerase (5U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l가 되도록 멸균증류수를 가하고 pre-denaturation(95 $^{\circ}$ C, 5분), denaturation (95 $^{\circ}$ C), annealing(55 $^{\circ}$ C, 1분), elongation (72 $^{\circ}$ C, 1분)을 25회한 뒤 post-elongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다.

4) IFN- γ , IL-4, histamine, 및 IgE 생산량 측정

생쥐 B 세포를 분리하여 96 wells plate의 각 well에 2×10^5 세포씩 분주하고, 小青龍湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 처리하였고, 약물처리 1시간 후 HRF (500ng/ml), anti-CD40 mAb(500ng/ml)과 rmIL-4를 10일과 48시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10을 처리하여 양성대조군으로 사용하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. IFN- γ , IL-4, histamine ELISA를 48시간, 그리고 IgE ELISA kit로 분비량은 10일 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 B 세포 배양상등액을 100 μ l씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450nm에서 흡

광도를 측정하였다.

5) 생쥐 B 세포 증식

생쥐 B 세포의 증식을 측정하기 위하여 96 wells plate의 각 well에 2×10^5 세포씩 분주하고, 小青龍湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 처리하였다. 약물처리 1 시간 후 HRF(500ng/ml), anti-CD40 mAb(500ng/ml)과 rIL-4를 72시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 rIL-10을 처리하여 양성대조군으로 사용하였다. 동시배양 40시간 배양 후 50 μ Ci/ml의 [methyl-³H] Thymidine을 첨가한 후 최종 48시간 배양하였다. 세포만을 세포수집기를 사용하여 유리섬유여지 위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

6) Histamine 방출량 측정

생쥐 복부의 비만세포를 분리하여 小青龍湯에 의한 histamine 방출량 억제효과를 관찰하였다. BALB/c 생쥐에 5ml의 Tyrode 완충용액 B(NaCl, glucose, NaHCO₃, KCl, NaH₂PO₄, 0.1% gelatin)를 주사하고 90초간 복부를 천천히 마사지한 후 경추탈골로 치사시키고, 복부의 비만세포가 포함된 유동액을 주사기로 분리하였다. 복부 비만세포를 Tyrode 완충용액 B로 2회 800rpm에서 5분간 원심분리 하고, 대식세포, 임파구세포 등과 분리하기 위하여 22.5% w/v metrizamide와 Tyrode 완충용액 B를 gradient로 만든 후 1,800rpm에서 15분간 원심분리를 하였다. Tyrode 완충용액 B-metrizamide층 사이에 세포층을 분리한 후 Tyrode 완충용액 A(NaCl, glucose, NaHCO₃, KCl,

NaH₂PO₄, 0.1% gelatin, Ca⁺⁺)로 수세한 후 toluidine blue staining으로 살아있는 비만세포 수를 측정하였다. 비만세포를 96 wells plate의 각 well에 2×10^5 세포씩 분주하고, 小青龍湯 추출물(100 μ g/ml, 10 μ g/ml)을 24시간 동안 처리하였다. 약물처리 24시간 후 HRF(500ng/ml)와 anti-IgE mAb(40ng/ml)를 30분간 자극한 후 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 배양 상등액을 회수하여 histamine release kit로 histamine 방출량을 측정하였다.

7) 통계 분석

실험에서 얻은 결과는 student's t-test를 이용하여 통계 처리하였고, p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 成績

1. Cytokine 유전자발현에 대한 효과

1) IL-1 β 유전자 발현에 대한 효과

B 세포에서 IL-1 β 유전자 발현을 관찰한 결과, anti-CD40, HRF와 rIL-4를 처리한 대조군에 비해, 억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군에서 IL-1 β 발현이 억제되었다.(Table 3, Fig. 1)

2) IL-4 유전자 발현에 대한 효과

대조군에 비해, 억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군에서 IL-4 발현이 억제되었다.(Table 3, Fig. 2)

3) IL-6 유전자 발현에 대한 효과

억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군과 100 μ g/ml,

Table 3. Cytokine m-RNA expression(Ht)

Cytokine m-RNA expression(Ht)	Group				
	Normal	Control	rIL-10	SCRT(μ g/ml)	
				100	10
IL-1 β	71	121	29	38	102
IL-4	26	93	34	42	66
IL-6	124	129	126	133	137
TNF- α	36	137	64	120	128
IL-10	124	121	159	174	171
TGF- β	202	209	192	119	142
IFN- γ	57	125	128	135	153

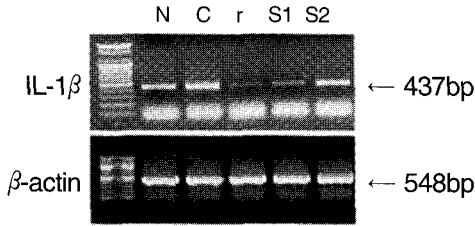


Fig. 1. Inhibitory effects of SCRT extract on IL-1 β transcript expression by SCRT extract plus anti-CD40 mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.
 N : Non-treated group.
 C : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 treated group.
 r : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + rIL-10 treated group.
 S1 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + SCRT(100 μ g/ml) treated group.
 S2 : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + SCRT(10 μ g/ml) treated group.

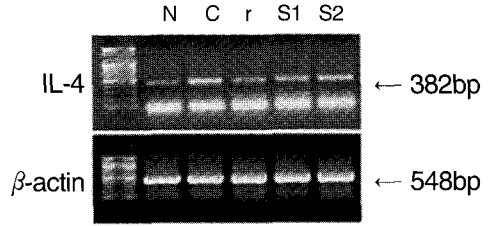


Fig. 2. Inhibitory effects of SCRT transcript on IL-4 transcript expression by SCRT extract plus anti-CD40mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.
 N, C, r, S1, S2는 Fig. 1.와 상동

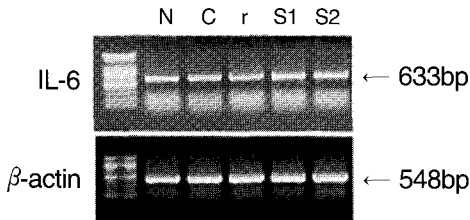


Fig. 3. Inhibitory effects of SCRT extract on IL-6 transcript expression by SCRT extract plus Anti-CD40mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.
 N, C, r, S1, S2는 Fig. 1.와 상동

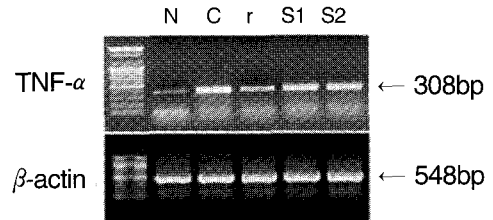


Fig. 4. Effects of SCRT extract on TNF- α transcript expression by SCRT extract plus anti-CD40mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.
 N, C, r, S1, S2는 Fig. 1.와 상동

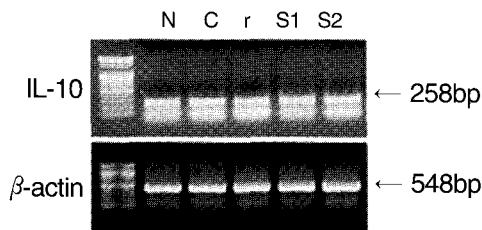


Fig. 5. Effects of SCRT extract on IL-10 transcript expression by SCRT extract plus anti-CD40mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.

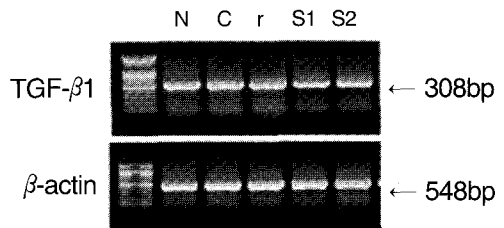


Fig. 6. Effects of SCRT extract on TGF- β 1 transcript expression by SCRT extract plus anti-CD40mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.

10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은 별다른 변화는 보이지 않았다.(Table 3, Fig. 3)

4) TNF- α 유전자 발현에 대한 효과

억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군은 억제효과가 나타났고 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군에서는 별다른 변화는 보이지 않았다.(Table 3, Fig. 4)

5) IL-10 유전자 발현에 대한 효과

대조군에 비해, 억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은 IL-10 발현이 증가되었다.(Table 3, Fig. 5)

6) TGF- β 유전자 발현에 대한 효과

대조군과 양성대조군은 별다른 변화가 없었던 것에 비해 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은

TGF-β 발현이 억제되었다.(Table 3, Fig. 6)

7) IFN-γ 유전자 발현에 대한 효과

IFN-γ 발현이 증가되었다.(Table 3, Fig. 7)

2. 小青龍湯이 B cell의 IL-4 생성에 미치는 효과

대조군에 비해 억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군과 100μg/ml, 10μg/ml의 小青龍湯 투여군은 IL-4의 생산을 유의성 있게 억제시켰다.(Table 4)

3. 小青龍湯이 B cell의 IFN-γ생성에 미치는 효과

억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군은 IFN-γ 생성을 억제하였고, 100μg/ml, 10μg/ml의 小青龍湯 투여군은 IFN-γ를 증가시켰다.(Table 5)

4. 小青龍湯이 B 세포의 CD23+, CD69+ 발현에 미치는 효과

활성유세포는 대조군에 비해 rIL-10 처리군과 100 μg/ml, 10μg/ml의 小青龍湯 투여군에서 억제효과가 관찰되었다.(Fig. 8)

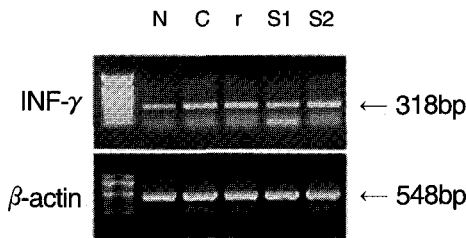


Fig. 7. Effects of SCRT extract on IFN-γ transcript expression by SCRT extract plus anti-CD40mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.

Table 4. Effect of SCRT Extract on IL-4 Production by HRF Plus Anti-CD40mAb Plus rIL-4-stimulated Murine Splenic B

Group	SCRT(μg/ml)	IL-4 production(pg/ml)
Normal (N)	0	21.3 ± 6.21 ⁰⁾
Control (C)	0	330.2 ± 16.10
rIL-10 (r)	0	103.7 ± 7.54***
SCRT1 (S2)	100	130.1 ± 17.48***
SCRT2 (S1)	10	207.4 ± 14.3***

⁰⁾ : Means ± standard error

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

5. 小青龍湯이 B 세포의 CD44+/CD69+ 발현에 미치는 효과

활성유세포는 대조군에 비해 rIL-10 처리군과 100 μg/ml, 10μg/ml의 小青龍湯 투여군에서 억제효과가 관찰되었다.(Fig. 9)

6. 小青龍湯이 B cell의 IgE 생성에 미치는 효과

대조군에 비해 억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군과 100μg/ml, 10μg/ml의 小青龍湯 투여군은 IgE 생성을 유의성 있게 억제시켰다.(Table 6)

7. 小青龍湯이 Mast cell의 histamine 생성에 미치는 효과

小青龍湯이 histamine 생성에 미치는 효과를 측정 한 결과, 대조군에 비해 100μg/ml, 10μg/ml의 小青龍湯 투여군은 histamine 생성을 유의성 있게 억제시켰다.(Table 7)

IV. 考 察

인체가 항원과 반응하는 데에는 2가지 경우가 있는데 항원에 대한 감수성이 낮아져서 질병이 생기지 않는 즉 면역(immunity)이 되는 것과 반응능력이 비정상적으로 증가되어 과민한 증상을 일으키는 것으로, 후자를 과민증(anaphylaxis)이라고 하며 현재 일반적으로 말하는 allergy는 거의 과민증만을 말하는 경향이 있다¹⁶⁾.

Allergy 반응은 면역글로불린이 항원과 반응하여 방출하는 화학전달물질이나 T림파구에 의한 각종 화

Table 5. Effect of SCRT Extract on IFN-γ Production by HRF Plus Anti-CD40mAb Plus rIL-4-stimulated Murine Splenic B

Group	SCRT(μg/ml)	IFN-γ production (pg/ml)
Normal (N)	0	4.1 ± 0.42 ⁰⁾
Control (C)	0	15.5 ± 2.31
rIL-10 (r)	0	8.7 ± 1.43
SCRT1 (S1)	100	21.1 ± 2.09*
SCRT2 (S2)	10	17.9 ± 2.33

⁰⁾ : Means ± standard error

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

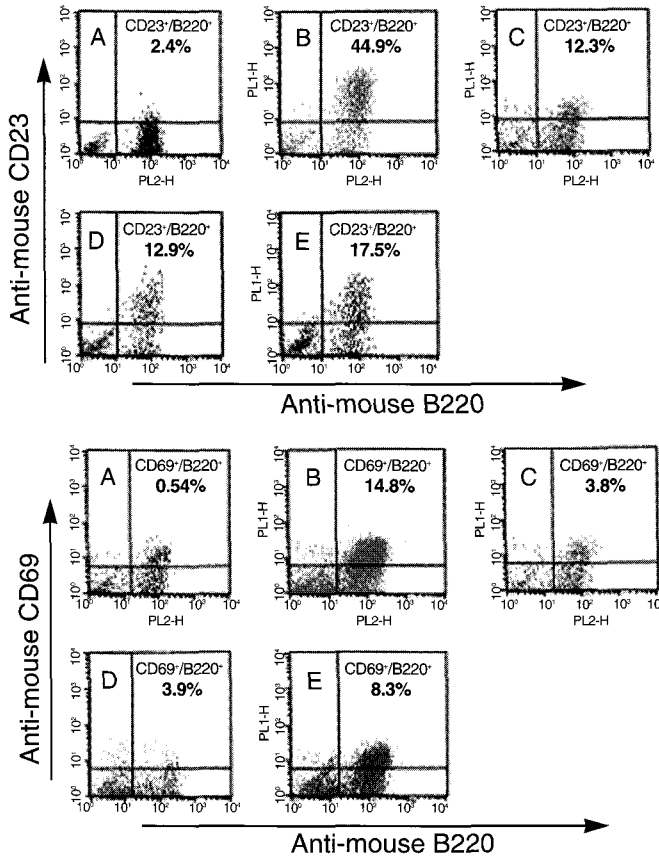


Fig. 8. Inhibitory effect of SCRT extract drug on CD23⁺, CD69⁺ expression by SCRT extract plus anti-CD40 mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.

- A : Non-treated group
- B : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 treated group
- C : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + rIL-10 treated group
- D : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + SCRT(100 μ g/ml) treated group
- E : Anti-CD40 + HRF + rIL-4 + SCRT(10 μ g/ml) treated group

Table 6. Inhibitory Effects of SCRT Extract on IgE Production by HRF plus Anti-CD40mAb Plus rIL-4-stimulated Murine Splenic B Cell

Group	SCRT(μ g/ml)	IgE production(pg/ml)
Normal (N)	0	11.5 \pm 1.40 ^{a)}
Control (C)	0	49.9 \pm 2.51
rIL-10 (r)	0	11.3 \pm 1.30***
SCRT1 (S1)	100	14.4 \pm 2.44***
SCRT2 (S2)	10	18.6 \pm 2.83***

^{a)} : Means \pm standard error

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

Table 7. Inhibitory Effect of SCRT Extract Drug on the Histamine Release in HRF and Anti-IgE mAb Stimulated Murine Peritoneal Mast Cells

Group	SCRT(μ g/ml)	Secreted histamine(nM)
Normal (N)	0	12.2 \pm 2.4
Control (C)	0	654.3 \pm 52.3
SCRT1 (S1)	100	384.1 \pm 22.4***
SCRT2 (S2)	10	418.5 \pm 32.8**

^{a)} : Means \pm standard error

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

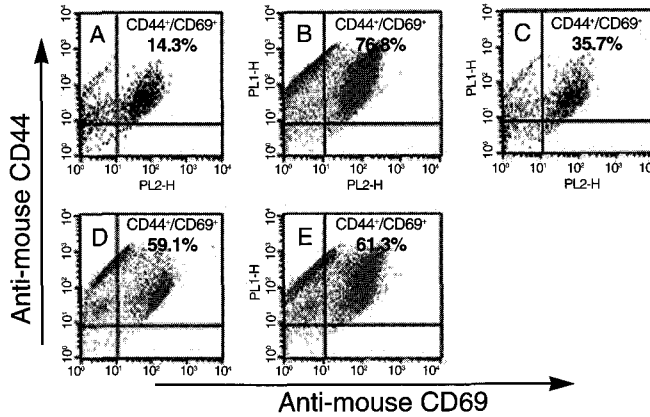


Fig. 9. Inhibitory effect of SCRT extract drug on CD44+/CD69+ expression by SCRT extract plus anti-CD40 mAb plus rIL-4-stimulated murine splenic B cells.

A, B, C, D, E는 Fig. 8와 상동.

합물에 의해 혈관의 확장, 모세혈관의 투과성 항진, 평활근의 수축과 경련, 점액의 증가 및 점막의 부종과 염증 등이 유발되는 것으로 allergy성 기관지염, 기관지천식, allergy성 비염 등의 질환을 일으키는데 특히 호흡기계에 심각한 영향을 주어 기침과 객담의 분비, 호흡곤란, 발열, 흉통, 흉민감, 천명 등을 일으킨다¹⁷.

최근 allergy 연구가 세포의 염증 발현에 관여하는 세포와 분자수준의 기전에 초점이 맞추어 지고 있다. 즉 세포단계의 염증면역반응에서 각종 cytokine이 어떻게 관여하고 역할하고 있는지를 계속적으로 보고하고 있으며, 각종 치료제제를 투여함으로써 그러한 mechanism에 변화를 초래하는 기전들을 구체적으로 제시하고 있다^{18,19}.

interleukin(IL)이란 항원과 반응하여 활성화된 림프구가 생성, 방출하는 물질로서 다른 세포에 작용하게 하는 활성물질이며 lymphokine으로 칭하기도 하며, macrophage가 생성하는 동일한 활성물질인 monokine은 monocyte의 억제작용물질을 의미하는데, 이 둘을 합하여 cytokine이라고 부른다¹⁶.

Cytokine은 어떤 한가지 항원에 특이적인 적은 수의 림프구로 하여금 그 항원을 제거하는 다양한 실행기전을 활성화시키도록 하는 증폭기전을 제공하며

로 cytokine의 과도한 생성 및 작용은 조직상해를 유발하거나 과사를 일으킬 수 있다. 그러므로 cytokine이나 저해제를 투여하는 것은 질병과 연관된 생물학적 반응을 변화시킬 잠재적인 접근방법이 될 수 있다²⁰.

Th 림프구는 cytokine의 분비양상에 따라 Th1, Th2 림프구로 나뉘어 진다. Th1 림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN- γ 를 생산하며 지연형 과민반응, 결핵균이나 바이러스에 대한 방어작용, 종양에 대한 숙주반응에 관여한다. Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 생산하며 즉시형 과민반응, 기관지천식과 같은 allergy성 질환, 기생충감염에 대한 방어작용에 관여한다²¹. Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 길항작용을 나타내어 기능이 억제되는 현상이 관찰되며 allergy성 기관지천식 환자의 기관지 폐포세척액에서는 Th2 림프구의 기능이 활성화됨이 관찰되고 있다²² 즉, 항원에 의한 IgE 생성에 필수적인 요소인 IL-4를 분비하는 Th2 림프구는 naive CD4+ T 세포가 IL-4의 영향으로 allergen과 반응시 분화되고 이때 IgE 생성을 방해하는 INF- γ 를 분비하는 Th1 림프구는 그 발달이 저해된다^{20,23}.

小青龍湯은 《傷寒論》에 처음으로 기재된 처방으로 “傷寒表不解 心下有水氣 乾嘔 發熱而咳 或渴 或

利 或噎 或小便不利 小腹滿 或喘者 小青龍湯主之”, “傷寒 心下有水氣 咳而微喘 發熱不渴 服湯已 渴者 此寒去欲解也 小青龍湯主之”라 하여 解表散寒, 溫肺化痰, 止咳平喘하는 효과가 있어²⁴ 風寒客表하고 內有水飲停滯하여 나타나는 惡寒發熱, 無汗, 頭面四肢浮腫, 身體疼痛, 胸痞, 乾嘔, 咳嗽, 喘息 등에 쓰이며 만성기관지염, 기관지천식, 알레르기성 비염, 폐렴, 급성발작 등 外感風寒하거나 水飲停滯로 발작하는 경우 및 allergy 질환에 폭넓게 응용되고 있다^{25,26}.

小青龍湯은 麻黃, 白芍藥, 五味子, 半夏, 細辛, 桂枝, 乾薑, 甘草의 약물로 구성되어 있는 처방으로 각각의 쓰임을 살펴보면 다음과 같다.

麻黃·桂枝는 發寒解表하고 宣肺平喘하며 白芍藥은 桂枝와 配合되어 榮衛를 調和하고 乾薑·細辛은 溫肺化痰하는 외에도 辛散風寒하며 五味子は 溫斂肺氣하는 약물이므로 止咳하고 아울러 肺氣의 耗散을 방지하며 半夏는 燥濕化痰하여 軟飲降濁하고 甘草는 諸藥을 調和하며 酸甘化痰하는 芍藥과 배합되어 麻黃·桂枝의 지나친 辛散作用을 緩和시킨다. 약이 비록 八味이나 정밀하게 配伍되어 散寒解表하고 化痰平喘하는 방제가 된다²⁶.

이에 저자는 小青龍湯의 allergy에 대한 효능을 실험적으로 규명하기 위해 B 세포에서 IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , IL-10, TGF- β , IFN- γ 의 유전자발현과 IL-4, IFN- γ , IgE의 생성 및 mast 세포에서 histamine 생성에 미치는 효과 등을 측정하였다.

IL-1 β 은 주로 활성화된 단핵식균세포에서 분비되며 그 생물학적 활성의 중요한 점은 lymphocyte activating factor로서 CD4+ T 림프구의 활성화와 증식 및 IFN- γ 분비를 촉진하며 혈관내피세포를 활성화하여 백혈구의 부착을 일으키는 것이다^{16,20,27}.

B 세포에서 IL-1 β 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 rIL-10 처리군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은 모두 IL-1 β 발현이 억제되었다.(Table 3, Fig. 1)

IL-4는 여러 종류의 세포에 다양한 기능을 나타내는 분자량 20kD의 cytokine이다. 활성화된 CD4+ T 세포가 주된 IL-4 생성세포이나 활성화된 비만세포

도 생성한다. IgE는 제1형 과민면역반응을 일으키는 중요한 인자이므로 IL-4 생산의 향진은 allergy 반응에 중요한 역할을 하게된다.²⁸ IL-4는 T 세포에 대해서도 작용을 하며 항원과 반응한 T 세포의 증식을 보조하기도 한다.^{16,27,29}.

B 세포에서 IL-4 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해, rIL-10 처리군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군 모두 IL-4 발현이 억제되었다.(Table 3, Fig. 2)

IL-6은 활성화된 T 세포에서 생성되며 B 세포가 항체 생산세포로 분화하는 최종단계를 유도하는 물질로서 알려져 있다. 항원과 반응한 T세포에도 작용하며 IL-2 수용체를 표출시켜 IL-2를 생성시켜서 증식을 초래하기도 하고 살해 T 세포의 발현도 보조한다³⁰.

B 세포에서 IL-6 유전자 발현을 관찰한 결과, 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다.(Table 3, Fig. 3)

TNF- α 는 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 활성화된 식균세포에서 주로 분비되며 화학주성물질을 자극하여 하부호흡기계로 염증세포를 유입시켜 육아종을 형성하고 세포분화와 식균작용을 촉진시킨다. 또한 급·만성 염증의 개시를 매개하며 IL-1, IL-6 등을 유도하여 특히 면역 반응과 급성 염증반응의 중요한 연결자가 된다^{16,20,27}.

B 세포에서 TNF- α 유전자 발현을 관찰한 결과, rIL-10 처리군은 억제효과가 나타났고 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군에서는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다.(Table 3, Fig. 4)

IL-10은 Th1 림프구에서의 IFN- γ , IL-2의 생성을 억제하고 단핵식균세포에서 IL-1, IL-6, IL-8 등의 염증성 cytokine 생성을 억제할 뿐 아니라 Th2 림프구에서의 IL-4, IL-5, IL-13 분비를 억제시키기 때문에 allergy성 염증반응을 방해하기도 한다^{16,31,32}.

B 세포에서 IL-10 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해, rIL-10 처리군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은 IL-10 발현이 증가되었다.(Table 3, Fig. 5)

TGF- β 는 전환성장인자로서 IL-10과 더불어 면역억제 cytokine의 일종으로 Regular T(Tr) cell에 의해

분비된다³³.

B 세포에서 TGF- β 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군과 rIL-10 처리군은 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았고, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은 TGF- β 발현이 억제되었다.(Table 3, Fig. 6)

IFN- γ 는 세포매개 Th1 면역반응의 유도에서 결정적 매개인자로 작용하고 B 세포의 분화와 증식을 억제하는데 Th1과 Th2 분화의 주요 조절인자이다. 따라서 IL-4 작용과 길항작용을 보여 IL-4에 의한 IgE 생성을 억제한다²⁸.

B 세포에서 IFN- γ 유전자 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 rIL-10 처리군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군 모두 IFN- γ 발현이 증가되었다.(Table 3, Fig. 7)

한편, 小青龍湯이 IL-4의 생성에 미치는 효과를 측정할 결과, 대조군에 비해 억제제인 rIL-10을 처리한 양성대조군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은 IL-4의 생산을 유의성 있게 억제시켰다.(Table 4)

INF- γ 생성량에 미치는 영향은 측정결과, 대조군에 비해 100 μ g/ml 小青龍湯 투여군은 유의성(100 μ g/ml ; $P < 0.05$) 있게 INF- γ 생성이 증가하였다.(Table 5)

CD23+는 성숙한 B 세포에서만 발현되는 B 세포 분화의 표면표지자이다. CD44+는 면역반응에 관여하는 B 세포의 세포막을 구성하는 이형질체군으로 표면표지자이다. CD69+는 T 세포의 초기 활성화를 나타내는 표면표지자이다³⁴.

B 세포에서 CD23+CD44+CD69+의 활성화세포 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해, rIL-10 처리군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군 모두 IL-4 발현이 억제되었다.(Fig. 8,9)

小青龍湯이 B 세포의 IgE 생성에 미치는 영향은 측정결과, 대조군에 비해 rIL-10 처리군과 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은 모두 유의성(100 μ g/ml ; $P < 0.001$, 10 μ g/ml ; $P < 0.001$) 있게 IgE 생성을 억제하였다.(Table 6)

Histamine은 즉시형 allergy 반응을 주도하며 mast cell과 basophil에서 유래하는 cytokine이다²⁸.

小青龍湯이 histamine 생성에 미치는 효과를 측정

한 결과, 대조군에 비해 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 小青龍湯 투여군은 histamine 생성을 유의성 있게 억제시켰다.(Table 7)

이상의 결과를 종합해 보면, 小青龍湯은 생쥐 비장 B 세포와 복부 mast 세포의 유전자수준과 세포분자 수준에서 IL-1 β , IL-4, TGF- β 의 발현을 억제하고 IFN- γ 의 발현을 증가시켜 B 세포의 증식을 억제하고 IgE의 합성과 histamine의 생산을 저해함으로써 염증 매개물질의 분비를 저해하여 기도점막의 과증식과 이상분비물증가를 감소시키는 항allergy 효과를 갖는 것으로 사료된다.

따라서 小青龍湯은 allergy성 기관지염, 기관지 천식 등의 질환에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 지속적인 관련 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結論

小青龍湯의 항allergy 작용을 규명하기 위해 B 세포에서 Anti-CD40, rIL-4 및 HRF의 자극에 의한 IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ 및 histamine과 IgE의 분비 등을 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 小青龍湯은 IL-1 β , IL-4, TGF- β 유전자 발현을 억제하였다.
2. 小青龍湯은 IL-6, TNF- α 유전자 발현 실험에서 의미 있는 변화를 야기하지 않았다.
3. 小青龍湯은 IL-10, IFN- γ 유전자 발현을 증가시켰다.
4. 小青龍湯은 IgE 생산을 유의성 있게 감소시켰다.
5. 小青龍湯은 mast 세포의 histamine 생산을 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 小青龍湯은 allergy 反應을抑制시키는 효과가 認定되며 앞으로 이에 대한 持續的인 研究가 必要하리라 思料된다.

參考文獻

1. 金周德, 金聖光 역. 免疫學入門. 서울: 醫齒學社; 1983, p.47-81.
2. 鄭奎萬, 알레르기과 韓方. 서울: 第一路; 1990, p.15, 31.
3. 吳謙等 編. 醫宗金鑑. 서울: 木과士; 2000, p.230.
4. 文睿典 외. 傷寒論精解. 서울: 慶熙大學校出版局; 1996, p.125-127.
5. 이상인. 方劑學. 서울: 杏林社; 1987, p.51-52.
6. 김기창, 이형구. 小青龍湯의 鎮痛, 抗痙攣 및 氣喘의 肺損傷에 미치는 影響. 경희한의대논문집. 1985;8(1): 129-138.
7. 안철, 채병윤. 小青龍湯의 效能에 관한 實驗的 研究. 경희한의대논문집. 1987;10(1):643-655.
8. 조영민, 정희재, 정승기, 이형구. 소청룡탕이 알레르기 천식의 호흡양상과 기관조직에 미치는 영향. 경희의학. 1995;15(1):78-89.
9. 차은수, 정희재, 정승기, 이형구. 소청룡탕이 Asthma model내의 Cytokine에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 2000;23(1):71-88.
10. 황우석, 정희재, 주창엽, 이재성, 이경기, 이형구 등. 소청룡탕 치료 기관지천식환자의 혈액내 호산구수와 혈청IgE 및 T림프구아형의 변화. 한방내과학회지. 2002;23(1):83-89.
11. 이준우. 小青龍湯이 알레르기 喘息 모델 氣喘의 BALF內 免疫細胞에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 2001.
12. 서영호. 小青龍湯이 Helper T cell의 활성화에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 2002.
13. 강석균. 기관지천식에 사용되는 가미소청룡탕의 임상적 고찰. 대한한의학회지. 1989;10(1):138-144.
14. 감철우, 김종대. 소청룡탕이 알레르기성비염에 미치는 영향에 대한 임상적 고찰. 동서의학. 2001;26(1): 23-32.
15. 허태석, 황우석, 정희재, 주창엽, 이형구, 정승기. 소청룡탕이 기관지천식환자의 폐기능과 삶의 질에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2001;22(4):131-141.
16. 김세종. IMMUNOLOGY. 서울: 고려의학; 2000, p.1, 65, p.154-6, 260-5.
17. 文希柱. 免疫血清學. 서울: 대학서림; 1988, p.67-74.
18. 윤형구, 신윤, 이상학. 알레르기성 천식환자에 있어서 투베르쿨린 피부반응검사와 Cytokine의 변화. 결핵 및 호흡기질환. 1999;46(2):175-184.
19. Lasky JA, B개요 AR. Interleukines involved in the pathogenesis of chronic airway inflammation. Resp. Immunol. 1997;148(1):39-47.
20. Abbas AK, Lichman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders; 1997, p.250-77.
21. 조상헌, 송숙희, 김윤근, 지영구, 최동철, 윤호주 등. 아토피 환자에서의 IgE항체 생성조절기전:말초혈액 림프구의 IL-4, IFN- γ 생성의 불균형. 알레르기. 1995;15(2):210-212.
22. Keane-Myers AM, Gause WC, Finkelman FD, Xhou XD, Wills-Karp M. Development of murine allergic asthma is dependent upon B7-2 costimulation. J Immunol. Jan 1998;160(2):1036-43.
23. Hultner L et al. In activated mast cells, IL1 Up-regulates the production of several Th2 related Th2 cytokine including IL9. J Immunol 2000;164(11):5556-63.
24. 吳謙等 編. 醫宗金鑑. 서울: 木과士; 2000, p.230.
25. 文睿典. 傷寒論精解. 서울: 慶熙大學校出版局; 1996, p.125-7.
26. 이상인. 方劑學. 서울: 杏林社; 1987, p.51-52.
27. 한용철. 임상호흡기학. 서울: 일조각; 1995, p.208-25.
28. 鄭奎萬, 알레르기과 韓方. 서울: 第一路; 1990, p.15, 31.
29. 천선희. 폐결핵 환자의 폐포 대식세포에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-8의 분비에 관한 연구. 결핵 및 호흡기 질환. 1998;45(5):942-52.
30. 金周德, 金聖光 역. 免疫學入門. 서울: 醫齒學社; 1983, p.47-81.
31. 이숙영, 윤형규, 신윤. 기관지천식에서 기관지폐포세척액내 IL-10 과 기도염증증도의 연관성, 결핵 및 호흡기질환. 1999;46(1):44-52.
32. Barnes PJ, Lim S. Inhibitory cytokines in asthma. Mol. Med. Today. 1998;4(10):452-8.
33. O' Neil D, Swanton C, Jones A, Medd PG, Rayment N, Chain B:IFN-gamma down-regulates MHC expression and antigen processing in a human B cell line J Immunol. 1999;162(2):791-8.
34. 한인숙, 전석길, 박관규. CD44v6의 항체분절 생산과 그들의 특이성 비교. 대한면역학회지. 1998;21(4): 303-9.