대한안이비인후피부과학회지 제16권 제3호(2003년 12월)
The Journal of Oriental Medical Ophthalmology &
Otolaryngology & Dermatology 2003;16(3):68-81

黃連解毒湯의 사람 비점막 섬유아세포 IL-8 분비에 대한 효과

이인수* · 김희택* · 이은용** · 김이화*** · 류주현****

Effect of Hwang-Ryeon-Hae-Dok-Tang on the Release of IL-8 in Human Nasal Mucosal Fibroblast

In-su Lee · Hee-taek Kim · Eun-yong Lee · E-hwa Kim · Ju-hyun Ryu

It is proposed that Hwang-Ryeon-Hae-Dok-Tang may modulate the immune response on allergy or asthma. Human nasal mucosal fibroblasts are a rich source cytokines, inflammatory mediators, and chemokines. Chemokines are important for the recruitment of leukocytes to sites of infection, which is essential in host defense.

Objectives : The objective of this study was to investigate the effect of Hwang-Ryeon-Hae-Dok-Tang(HH) on the release of the IL-8 chemokine in human nasal mucosal fibroblasts after stimulation with cytokines like interleukin-4(IL-4), tumor necrosis factor- (TNF-), interferon- (IFN-), and interle ukin-1 (IL-1).

Methods : To detect the release of IL-8, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit was performed. The cytotoxicity was measured by MTT assay.

Results : HH significantly inhibited the secretion of IL-8 with a dose-dependant manner. The effective dosage did not have the cytotoxicity on human nasal mucosal fibroblasts

* 세명대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실, ** 세명대학교 한의과대학 침구학교실,
*** 세명대학교 한의과대학 경혈학교실, **** 세명대학교 전기공학부
· 교신저자 : 이인수, 세명대부속한방병원 안이비인후피부과학교실
(Tel : 043-649-1817, E-mail : badboyx@hanmail.net)
본 논문은 한국산업기술재단 지역전략산업 석박사인력양성사업 연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

Conclusions : Results of our study show that HH would play an important role in modulation of IL-8 in human nasal mucosal fibroblasts.

Key words : Hwang-Ryeon-Hae-Dok-Tang, Interleukin-8(IL-8), Human nasal mucosal fibroblasts(HNF)

서론

상부 호흡기 질환 중 비염은 부비동 점막의 세균성 혹은 바이러스 감염에 의해 염증이 발생되고, 호흡과 분비물 배출에 곤란이 있는 질환이다 [1]. 비염같은 염증반응성 질환에 있어서 케모카인이 면역반응을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 한다. 케모카인은 염증 반응에서 백혈구의 선택적인 염증반응을 조절하는 중요한 역할을 하는 물질로 interleukin 생산, angiogenesis 및 collagen 생산에도 영향을 끼친다고 알려져 있다[2-3]. 케모카인은 다양한 종류의 세포에서 형성되며, 특히 T세포, 대식세포, 섬유아세포, 상피세포가 CC 케모카인을 분비한다고 알려져 있다[4]. 최근 많은 종류의 케모카인 및 그 수용체들이 계속해서 밝혀짐에 따라 이들이 수행하는 기능들의 영역도 확대되어 화학주성 이외에 조혈 기능의 조절[5], 혈관신생의 조절[6], 창상 치유[7] 등이 입증되었으며, 특히 사람 면역 바이러스의 병인에도 관여하고 있음이 밝혀졌다[8-9].

비점막 섬유아세포(human nasal mucosal fibroblast)는 염증과 알러지 등의 상부 호흡기 질환에 중요한 역할을 하는 것으로10) 알러지성 비염 등에는 호중구들이 침착 된다는 보고가 있으며, ELR(Glu-Leu-Arg)은 세가지 펩타이드가 붙어있는 CXC 케모카인으로 interleukin(IL)-8, growth-related oncogene (GRO)-α, -β, -γ, neutrophil-activating peptide(NAP)-2, epithelial-cell-derived neutrophil attractact(ENA)-78, 그리고 granulocyte chemotactic protein(GCP)-2가 있는데 이들 모두 호중구를 끌어들이고 활성화시킨다고 알려져 있다11-13). 최근 연구결과 비점막세포에서 알러지 환경을 조성하였을 경우에 가장 강하고 오랫동안 (24~72시간) 유발되는 케모카인은 IL-8인 것으로 밝혀졌다14).

黃連解毒湯은 葛[15]의 《肘後備急方》에 처음 수록되었고 王[16]의 《外臺秘要》에서 作方經緯와 病症에 대해 상세히 논하였으며, 金代의 劉[17]에 의해 本 處方의 가감법과 활용법이 제시되었다. 黃連解毒湯은 三焦熱盛으로 大熱煩擾, 口燥咽乾, 錯語不眠, 吐血, 衄血, 發斑하는 症狀과, 外科의 癰腫疔毒에 舌紅苔黃하고 脈數有力한 증상을 치료하는데 사용하였으며[18], 최근 임상에서는 염증성 질환과 알레르기성 질환의 초기에 사용한다.

최근 黃連解毒湯에 대한 실험적 연구로는 孫[19]은 抗菌活性作用에 대해, 宋등은[20-21] 免疫反應에 대해, 鄭[22]은 血壓降下作用에 대해, 朴[23]은 부자독성중화작용 등을 발표하였으나 黃連解毒湯이 사람 비점막 IL-8분비에 미치는 효과에 대한 보고는 없었다.

이에 저자들은 사람 비점막 섬유아세포에

알러지성 염증유발 사이토카인 중 IL-4, tumor necrosis factor-α, TNF-α, IFN-γ 및 IL-1β를 단독 또는 병용 투여하여, 섬유아세포에서의 케모카인 중 호중구의 화학주성에 관여하는 IL-8의 생성을 유도하였고, 이 IL-8 케모카인 생성에 黃連解毒湯이 미치는 영향에 대해 연구하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험

1. 재료

1) 사람 비점막 섬유아세포 분리

사람 비점막 섬유아세포는 비중격만곡증을 가진 환자의 수술과정 중 적출된 비갑개 하부 점막으로부터 분리하였다. 점막조직을 500U/㎖ penicillin과 500㎍/㎖ streptomycin이 들어있고 Ca 이온과 Mg 이온이 없는 phosphate-buffered saline solution(PBS)으로 3회 세척한 후 점막조직은 4㎟의 정사각형으로 잘라 0.25% collagenase를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 37℃, 1시간동안 배양하였다. Collagenase에 배양이 끝난 후 항생제가 들어있는 10 ㎖의 DMEM에 옮겼다. 비 상피세포와 모세혈관 내막세포들은 curve forcep 2개로 조직표면을 10회 눌러줌으로써 제거하였다. 내막세포 및 상피세포를 제거하고 남은 조직을 배양하여 사람 비점막 섬유아세포를 분리하였다.

2) 세포배양 및 세포자극

배양된 조직을 1-2 ㎟조각으로 잘라 T-25 tissue culture flask로 옮겼다. 2% fetal bovine serum (FBS)와 항생제가 들어있는 DMEM으로 한 주에 2번씩 교체하였다. 배양된 세포를 직경 100 ㎜ culture dish로 옮긴 후 배양하였다. 최종적으로 5회의 계대배양을 한 후, 이를 24 well plate에 분주한 후 각각 IL-4(10ng/㎖), TNF-α(10ng/㎖), INF-γ(10ng/㎖) 및 IL-1β(1ng/㎖)를 단독 투여하고, IL-4(10ng/㎖)와 TNF-α(10ng/㎖)를, TNF-α(10ng/㎖)와 INF-γ(10ng/㎖)를, INF-γ(10ng/㎖)와 IL-1β(1ng/㎖)를 병용 투여하여 24시간 처리한 후 TARC의 양을 측정하여 TARC 분비량이 최고인 조건을 확립하였다. 2차 실험에는 黃連解毒湯을 10㎍/㎖, 50㎍/㎖ 및 100㎍/㎖의 농도로 전처치한 후 12시간 후에 IL-4(10ng/㎖)와 TNF-α(10ng/㎖)를 투여하고 48시간 동안 배양하면서 시간대별 IL-8의 양을 측정하였다.

3) 약재

본 실험에 사용한 黃連解毒湯의 구성은 《外臺秘要》[16]에 준하였으며 약재는 세명대학교부속한방병원에서 구입하여 정선한 것을 사용하였고, 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다.

黃連解毒湯의 處方構成
(Prescription of HwangRyeonHaeDokTang : HH)

韓藥名	生藥名	重量(g)
黃 連	Coptidis Rhizoma	4
黃 芩	Scutellariae Radix	2
黃 柏	Phellodendri Cortex	2
梔 子	Gardeniae Fructus	3
Total		11

2. 방법

1) 검액조제

黃連解毒湯 10첩분량 110g을 증류수 700 ㎖에 가열 추출하여 이를 여과한 다음, 이를 rotary evaporator로 감압농축하였다. 이를 동결 건조하여 정제된 건조추출물 22g (수율 20%)을 얻어 사용하였다.

2) IL-8 측정

IL-8의 양은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 측정하였다. 측정에는 capture 항체와 detection 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A)를 별도로 구입하여 ELISA plate를 준비하였다. Nunc-ELISA plate를 각각의 cytokine capture 항체로 coating하여 4℃에서 16시간 처리하였다. Plate 바닥에 고정되지 않은 여분의 capture 항체를 씻어낸 다음 각 plate를 2% BSA-PBS로 blocking 하였다. Blocking이 끝난 다음 plate를 PBS-Tween 20(0.05%; v/v)으로 씻어내고 검체를 100㎕씩 가하였다. 2시간 후 각 plate들을 철저하게 세척한 다음 biotin을 결합시킨 polyclonal rabbit Anti-cytokine-antibody를 가하였다. 30분후 세척하였으며 streptavidin-peroxidase를 가한 다음 30분간 더 처리하였다. 다시 충분히 세척한 다음 발색 기질 tetra methyl benzidine(TMB)를 sodium citrate에 녹인 후 H_2O_2를 약간 첨가한 용액 100㎕씩 첨가하여 발색시켰다. 그 후 발색을 2M H_2SO_4을 50㎕ 첨가하여 반응을 정지시키고 450 nm 파장에서 ELISA reader로 측정하였다. 재조합 IL-8을 125pg/㎖부터 순차적으로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 모든 기준치는 duplicate로 측정하였고, 결과는 3회에 걸친 독립적인 실험치의 평균값 ± 표준편차로 나타내었다.

3) MTT assay

黃連解毒湯의 세포독성 유무를 확인하기위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay법을 사용하였다. MTT를 각 세포배양액에 0.1㎎/㎖의 농도로 처리한 후 4시간 동안 37℃ CO_2 incubator에서 배양한다. 이후에 DMSO를 첨가하여 690㎚를 대조파장으로 595㎚에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 환산하였다.

4) 통계

약물의 효과를 판정하기 위해 각 One-way ANOVA test를 수행하였 고, 사후 검정으로 Dunnetts multiple comparison test를 사용하여 대조군과 비교하였다.

실험성적

1. 표준곡선 및 선형회기분석

IL-8을 이용하여 케모카인 정량을 위해 흡광도에 따른 IL-8의 표준곡선을 작성하였다. 그 결과 IL-8 농도가 각각 1.0pg/㎖, 2.0pg/㎖, 3.9pg/㎖, 7.8pg/㎖, 15.6pg/㎖, 31.3pg/㎖, 62.5pg/㎖ 및 125.0pg/㎖일 경우에 흡광도는 각각 0.183, 0.212, 0.236, 0.293, 0.391, 0.587, 0.947 및 1.483이었다. 이를 선형회기분석을 수행하여 수식을 산출하였고, 이를 흡광도로부터 IL-8을 정량하였다(Fig. 1).

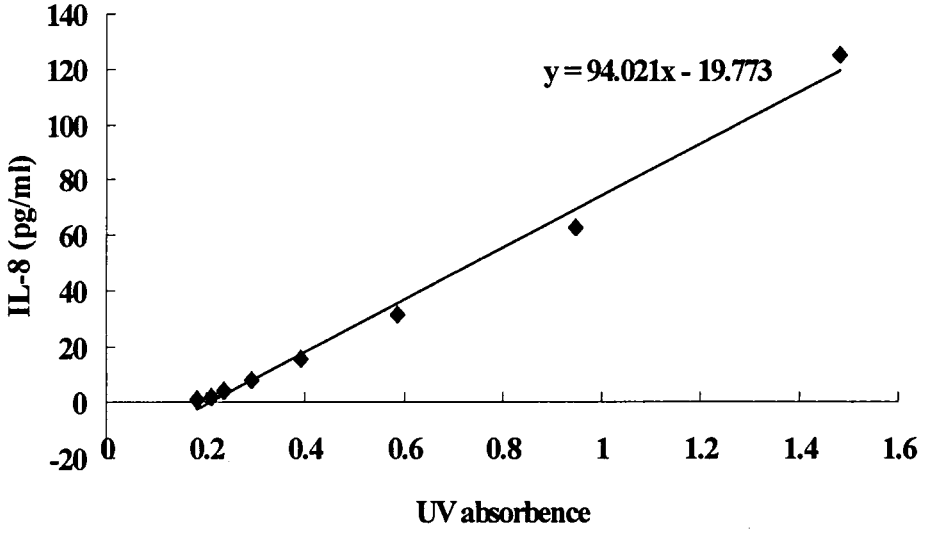

Fig. 1. Standard curve between ultra-violet (UV) absorbance at 450 nm and the concentration of IL-8. A simple linear regression analysis of IL-8 concentration on the UV absorbance was calculated and graphed. The equation of the estimated regression line is: y= 94.021x-19.773 . We used this formula for IL-8 quantification in further experiments.

2. 사람 비점막 섬유아세포의 사이토카인에 의한 IL-8 분비측정

사람 비점막 섬유아세포에 각각 IL-4, TNF-α, IFN-γ, IL-1β를 각각 투여하는 경우와 IL-4와 TNF-α, TNF-α와 IFN-γ, IFN-γ와 IL-1β를 병용 투여할 경우 IL-8의 분비량을 측정하였다. 그 결과 TNF-α (74333.6±2790.4 pg/mℓ, $p<0.05$)와 IL-1β (88336.3±7897.0 pg/mℓ, $p<0.05$)를 단독 투여하였을 경우와 IL-4와 TNF-α (65388.8±6325.0pg/mℓ, $p<0.05$), TNF-α와 IFN-γ (66770.0±4371.7pg/mℓ, $p<0.05$), IFN-γ와 IL-1β (80318.8±1395.2pg/mℓ, $p<0.05$)를 병용 투여할 경우에 IL-8의 분비량이 유의하게 증가하였으며 IL-4 (3954.6±125.7pg/mℓ)와 IFN-γ(7138.6±109.2 pg/mℓ)를 단독투여하였을 경우에는 아무것도 처치하지 않은 군 (302.1±3.1pg/mℓ)과 큰 차이를 보이지 않았다. 이 중 가장 높은 IL-8의 분비를 보인 IL-1β의 단독 투여를 이후 IL-8 유도를 위한 조건으로 사용하였다(Fig. 2).

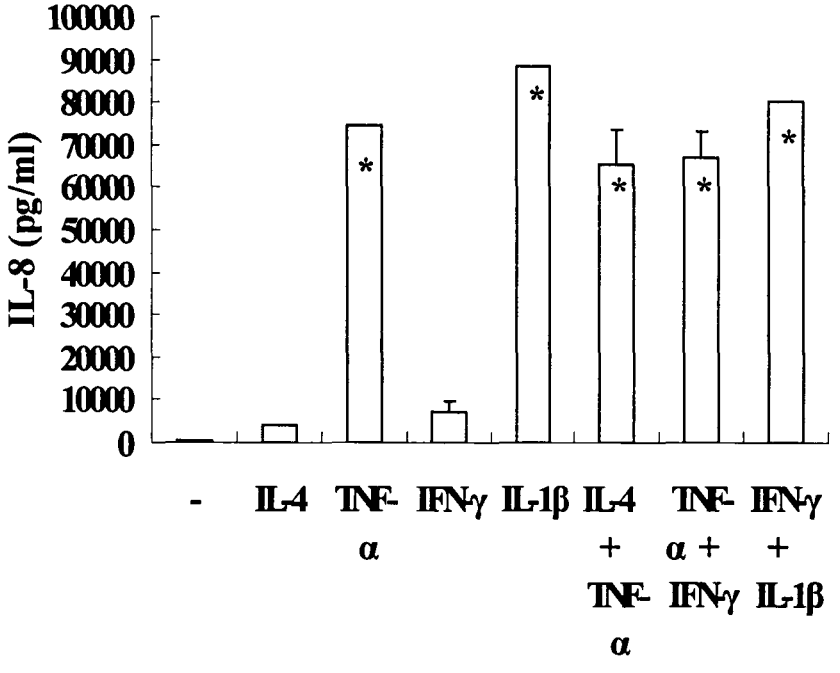

Fig. 2. IL-8 released into the culture media of human nasal mucosal fibroblast exposed to IL-4, TNF-α, IFN-γ IL-1β, both IL-4 and TNF-α, both TNF-α and IFN-γ, or both IFN-γ and IL-1β.

3. 시간대별 IL-8 분비양상 측정

시간대별로 IL-8의 분비 양상을 측정한 결과 대조군은 0시간, 12시간, 24시간 및 48시간에서 각각 0.0±0.0 pg/㎖, 28969.7±1210.6 pg/㎖, 81623.9±5817.8 pg/㎖ 및 170580.8±33916.5 pg/㎖의 IL-8 분비를 나타내었으며, 黃連解毒湯 10㎍/㎖을 투여한 군에서는 시간별로 각각 0.0±0.0 pg/㎖, 19393.9±16961.1 pg/㎖, 72507.1±10444.6 pg/㎖ 및 141871.7±39561.1 pg/㎖ IL-8 분비를 나타내었으며, 50㎍/㎖을 투여한 군에서는 시간별로 각각 0.0±0.0 pg/㎖, 28303.0±3592.2 pg/㎖, 61680.9±9401.7 pg/㎖ 및 138394.6±38004.5 pg/㎖ 의 IL-8 분비를 나타내었고, 100㎍/㎖을 투여한 군에서는 시간별로 각각 0.0±0.0 pg/㎖, 25590.2±1742.2 pg/㎖, 52681.5±5983.4 pg/㎖ 및 86942.1±8856.4 pg/㎖ 의 IL-8 분비를 나타내었다. 이상의 결과 중 黃連解毒湯 100㎍/㎖ 투여군의 24시간 및 48시간에서 유의한 감소를 관찰할 수 있었다 ($p<0.05$, Fig. 3).

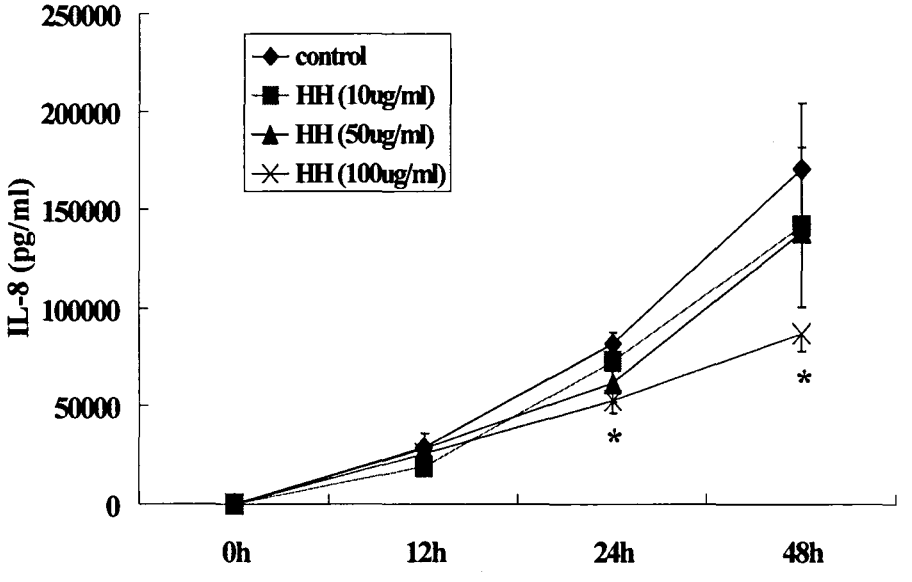

Fig. 3. Time course response of IL-8 secreti
on in human bronchial epithelial cell at 48h after cytokine and HH(10, 50 and 100 ㎍/㎖) treatment. Each value is the mean±S.E.M.(n=3).

4. 황련해독탕의 IL-8 분비억제효과

黃連解毒湯에 의한 IL-8 분비억제를 관찰한 결과 대조군에서 170580.8±33916.5 pg/mℓ의 IL-8 분비를 보였고, 黃連解毒湯을 10㎍/mℓ, 50 ㎍/mℓ 및 100㎍/mℓ의 농도로 처리한 후에는 각각 141871.7±39561.1 pg/mℓ, 138394.6±38004.5 pg/mℓ 및 86942.1±8856.4 pg/mℓ로 감소되었는데 100 ㎍/mℓ의 농도로 처리하였을 때 유의성 있는 감소를 나타내었다($p<0.05$, Fig. 4).

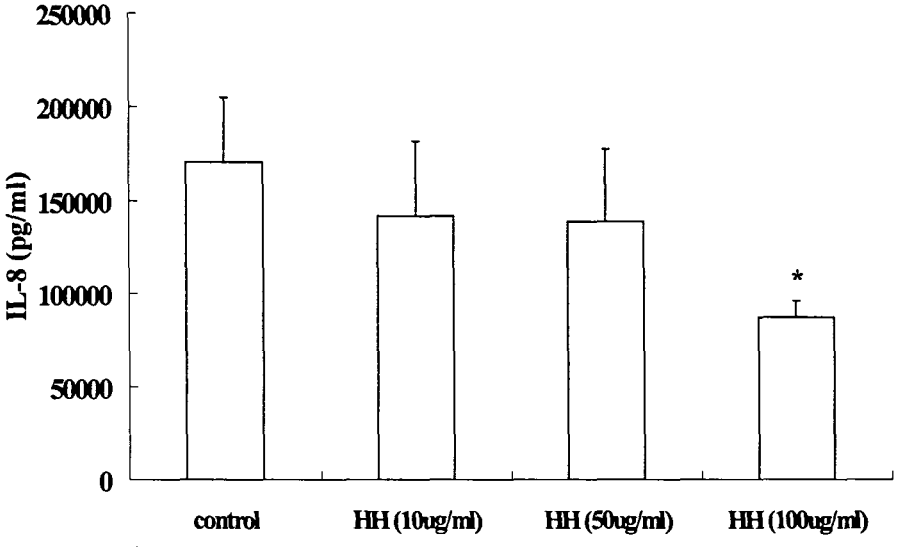

Fig. 4. Effects of HH(10, 50 and 100 ㎍/mℓ) on a secretion of IL-8 in human nasal mucosal fibroblast at 48h after cytokine treatment. Each value is the mean±S.E.M.(n=3).

5. MTT assay 결과

黃連解毒湯의 농도가 세포내에서 독성을 일으키는지 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 대조군의 생존률을 100.0±9.2%로 계산하였을 때 黃連解毒湯을 처치한 후의 세포생존률은 10 ㎍/㎖, 50 ㎍/㎖ 및 100 ㎍/㎖일 때 각각 99.8±7.8%, 95.7±11.2% 및 100.2±6.3%로 서로 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 5).

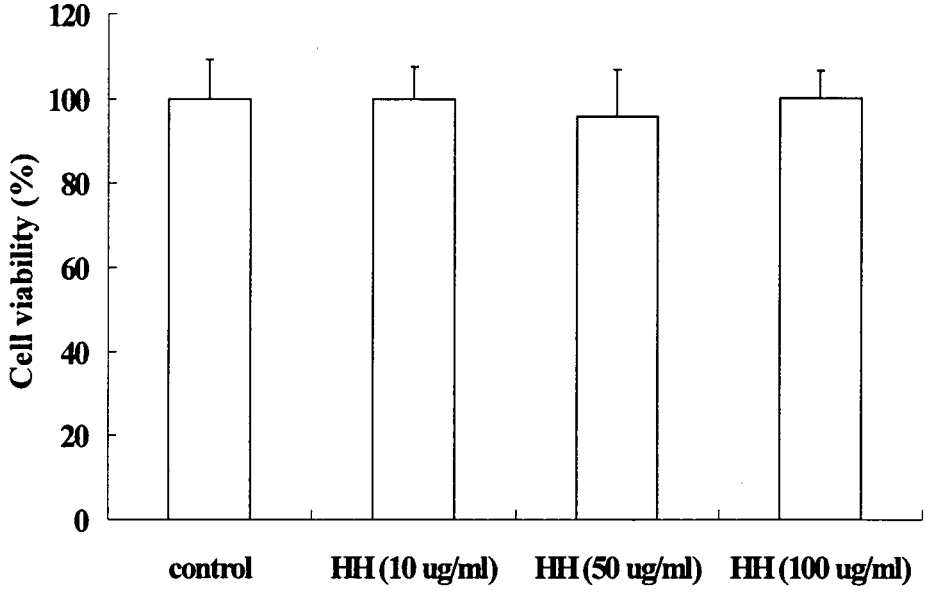

Fig. 5. Influence of HH on the viability of human nasal mucosal fibroblast. The cell viability was determined using the MTT assay. There was no significant change in the number of living cells between control and HH groups. Each value is the mean±SEM.(n=3).

고찰

알레르기성 비염은 재채기, 수양성 비루, 비폐색을 3대 특징으로 하는 제1형 알레르기 반응으로 알레르기 질환 중에서 가장 빈도가 높은 질환으로 세계적으로 약 10%내외의 발생빈도를 보이고 있다. 우리나라의 경우 약 10%의 빈도를 보이고 있으나 대기 오염의 증가, 주거형태의 변화, 다양한 식생활과 인스턴트 음식, 스트레스의 증가로 점차 증가추세에 있다[24].

알레르기성 비염은 계절성과 통년성으로 분류되며, 계절성은 급성적이고 특히 봄, 가을에 많고, 화분, 고초, 잡초 등에 의해서 발생되므로 화분증, 고초열이라 하며, 통년성 비염은 만성적으로 연중 계속되며 계절과 관련이 없다. 유발요인으로는 동물의 털, 비듬, 깃털, 진균류, 담배, 식품 등이며 개인에 따라 차이가 있지만 일상생활에서의 모든 물건이 알레르기原이 될 수 있고, 최근 우리나라에서는 집먼지진드기가 80%이상을 차지한다는 보고가 있다. 계절성은 통년성보다 돌발적이고 증상이 심하게 발생되며 항원에서 벗어나면 약해지고, 통년성은 항시 鼻알레르기와 유사한 감기 증상을 가지고 있으며 특히 소화기 장애 및 만성 변비 등과 전신적인 자율신경계의 장애 요인에 의해서 심하게 발생되기도 한다[25].

한의학에서 알레르기성 비염은 鼻鼽, 噴嚔 등에 해당하며, 鼻痒, 鼻塞, 鼻乾 등과도 연관이 있다. 韓醫學的인 원인은 風寒, 風熱, 濕熱, 燥熱 등의 外因과 肺虛, 脾虛, 腎虛 등의 內因, 飮食勞役, 日光 등의 不內外因이 있다 하였다.

치료 방법은 外感風寒의 침입이나 風熱의 內鬱, 脾胃濕熱 또는 陽明經에 風熱이 蓄積, 肺氣 虛弱, 脾虛, 腎陽虛로 변증하여 치료하며 이외에 風寒化火, 濕熱, 瘀血, 榮衛不和, 脾肺氣虛, 脾腎兩虛, 腎陽虛으로 분류하여 치료하는데 각각의 분형은 大同小異 하며, 임상변증 유형에 따라 溫補肺臟, 祛風散寒, 健脾益氣, 補腎納氣 등의 방법으로 內服藥을 투여하거나, 辛散風寒, 行氣活血, 芳香通竅하는 약물로 塞鼻하는 外治法 등이 있고 최근에는 穴位貼付劑, 穴位注射劑, 耳穴治療, 藥鍼, 레이저침 등을 응용하고 있다[26-28].

본 실험에 사용된 黃連解毒湯은 葛[15]의 《肘後備急方》에 처음 수록되었고 王[16]의 《外臺秘要》에서 作方經緯와 病症에 대해 상세히 논하여진 것으로 熱毒을 제거한다는 뜻의 처방이며 狂躁·煩悶·口燥·咽乾·乾口·錯語·吐血·衄血·發斑등을 다스리는데 사용한다.

黃連解毒湯方 중의 黃連을 君藥으로 하여 心火를 瀉하고 겸하여 中焦의 火도 瀉하며, 黃芩으로는 上焦의 火를 瀉하고, 黃柏으로는 下焦의 火를 瀉하며, 梔子는 三焦의 火를 瀉하여 導火下行하므로 四藥이 함께 輔助藥이된다. 이와 같이 四味의 藥을 合用하면 苦寒으로 火邪를 直折하여 去하게 하고 熱毒을 解毒하므로 諸症이 치유된다. 또한 癰腫疔毒은 熱毒의 內蘊으로 인하여 氣血에 瘀血이 정체하여 형성하는 경우가 많다. 《素問·至眞要大論》에 "諸痛瘍瘡 皆屬于心"이라고 하여 本方이 心火를 瀉하여 解하므로 癰腫疔毒에도 응용한다. 각 약물의 약리 작용에 의하면 黃芩은 解熱, 血壓降下, 殺菌, 粥狀動脈硬化의 防止作用이 있으며, 黃連은 殺菌, 殺蟲, 鎭痙, 血糖調節 등의 作用을, 黃柏은 血糖降下, 中樞神經抑制, 抗炎症效果를, 梔子는 血壓降下, 消炎, 解熱, 鎭痛作用 등이 있어 一切 火熱證, 譫語昏忘, 濕熱黃疸,

熱甚吐血, 衄血, 錯語不眠, 丹毒, 일반염증 및 당뇨병 등을 치료하는데 사용된다. 최근 임상에서는 염증성 질환 및 알러지성 질환 초기에 자주 사용된다[18,29-30].

서양의학에서는 알러지 반응과 염증반응에 있어 케모카인이 중요한 역할을 하고 있음은 이미 여러 실험에서 보고 되어왔다[7-8,33-34]. 케모카인은 화학주성을 유발하는 세포분비물로서 종류는 CXC, CC, C 및 CX3C subfamily로 구분한다[31]. CXC 케모카인은 주로 neutrophil을 유도하고 활성화 시키는 반면 CC 케모카인은 neutrophil을 제외한 monocytes, lymphocytes, basophils, eosinophils, neutral killer(NK) 세포 및 dendritic 세포를 유도하고 활성화시킨다고 한다[32]. CXC 케모카인으로는 IL-8, growth-regulated oncogenes(GRO-α, GRO-β, GRO-γ), neutrophil activating protein -2(NAP-2), epithelial cell-derived, neurtophil attactant-78(ENA-78), platelet factor-4 (PF-4), interferon-γ(IFN-γ)-inducible protein -10(IP-10) 및 monokine induced by IFN-γ (MIG) 등이 있으며 알러지 반응과 염증에 깊은 관련이 있음은 이미 잘 알려져 있다[35-36]. CXC 케모카인 중 IL-8은 호중구를 끌어들이는 케모카인 중 가장 강하다고 알려져 있으며[37], 비강내 방어 메카니즘으로 중요한 역할을 수행하는 비점막으로 호중구를 끌어들이기 위해 비강내 상피세포, 섬유아세포 및 점액분비세포 등에서 끊임없이 합성된다고 보고되어 있다[36].

이에 본 실험에서는 사람 비점막 섬유아세포에 몇몇 사이토카인을 이용하여 케모카인 중 특히 염증과 알러지의 병인과 관련 있는 호중구 침착에 관여한다고 알려져 있는 IL-8 발현을 유발시켜 병리적인 염증반응 혹은 알레르기성 비염과 유사한 상황을 유발한 후 黃連解毒湯의 작용에 대하여 연구를 수행하였다.

여러 가지 케모카인들을 분비한다고 알려진 사람 비점막 섬유아세포를 이용하여 IL-4(10 ng/mℓ), TNF-α(10 ng/mℓ), INF-γ(10 ng/mℓ) 및 IL-1β(1 ng/mℓ)를 단독 투여하거나 IL-4(10 ng/mℓ)와 TNF-α(10 ng/mℓ)를, TNF-α(10 ng/mℓ)와 INF-γ(10 ng/mℓ)를, INF-γ(10 ng/mℓ)와 IL-1β (1 ng/mℓ)를 병용 투여하여 IL-8 케모카인의 분비를 유도시켰으며 이 중 가장 높은 IL-8의 분비를 보인 것은 IL-1β를 단독투여하였을 경우이며(Fig. 2), 시간대별로 보면 48시간 후가 가장 많은 IL-8 분비량을 보여(Fig. 3) 이후 IL-8 유도를 위한 조건으로 사용하였다.

유도된 케모카인에 대한 黃連解毒湯의 효과 연구를 보면 대조군에서는 170580.8±33916.5 pg/mℓ의 IL-8분비를 보였고, 黃連解毒湯을 10 μg/mℓ, 50μg/mℓ, 및 100μg/mℓ의 농도로 처리한 결과 각각 141871.7±39561.1 pg/mℓ, 138394.6.2±38004.5 pg/mℓ 및 86942.1±8856.4 pg/mℓ의 분비감소를 관찰할 수 있었다. 특히 100 μg/mℓ의 농도로 처리하였을 때 통계적인 유의성을 관찰할 수 있었다 ($p<0.05$, Fig. 4). 이에 黃連解毒湯은 사이토카인에 의해 유도된 사람 비점막 섬유아세포의 IL-8 분비증가를 농도의존적으로 유의하게 감소시킴을 알 수 있었다. 그리고 그 분비감소를 보인 유효농도에서 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였으며 세포독성이 없었음을 알 수 있었다 (Fig. 5).

여러 가지 다른 기전이 있겠지만, 이상의 결과로 보아 黃連解毒湯의 비염 및 천식환자에

대한 효과는 케모카인 중 IL-8의 병리적인 분비양상을 억제하는 것으로 일부분 설명할 수 있으며, 이는 알러지성 비염 및 천식환자에 대한 黃連解毒湯의 임상활용에 기초자료로 활용이 가능할 것으로 생각된다.

결론

사람 비점막 섬유아세포에 이용하여 염증의 진행, 천식 및 알러지성 비염 등 다양한 질환의 병인과 관련되어 있다고 알려져 있는 IL-4, TNF-α, IFN-γ 및 IL-1β의 단독 투여, 그리고 IL-4, IFN-γ와 IL-1β, TNF-α와 IFN-γ를 병용 투여하여 IL-8 케모카인 분비를 유도하였고, 이때 黃連解毒湯의 작용을 ELISA를 이용해서 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 사람 비점막 섬유아세포에 IL-8의 분비량을 측정한 결과 TNF-α와 IL-1β를 단독 투여하였을 경우와 IL-4와 TNF-α, TNF-α와 IFN-γ, IFN-γ와 IL-1β를 병용 투여할 경우에 IL-8의 분비량이 유의하게 증가하였다.

2) 시간대별 IL-8 분비양상을 관찰한 결과 대조군에 비해 黃連解毒湯 투여군은 농도의존적으로 IL-8 분비를 감소시켰다.

3) 48시간 후 黃連解毒湯에 의한 IL-8 분비 억제를 관찰한 결과, 대조군에 비해 농도 의존적으로 IL-8 분비를 억제하였다.

4) MTT assay법을 이용한 세포 독성 측정에선 대조군과 黃連解毒湯 투여군이 서로 차이를 나타내지 않아 실험에 사용한 농도는 세포 독성이 없었다.

이러한 결과로 보아 黃連解毒湯은 알러지성 비염 등 염증반응으로 인한 질환에 IL-8 케모카인 억제를 통해 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있을 것으로 사려된다.

참고문헌

1. Lund VJ, Kennedy DW. Quantification for staging sinusitis. The Staging and Therapy Group. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl. 1995;167:17-21.
2. Mantovani A. The chemokine system:redundancy for robust outputs. Immunol Today. 1999;20:245-57.
3. Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. J Immunol. 1997;158: 4129-36.
4. Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. Cytokine. 1991;3: 165-83.
5. Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin HG. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoatt -ractant protein-1. Int J Cancer. 1999;82:765-70.
6. Tachibana K, Hirota S, Lizasa H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The

chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature. 1998;393:591-4.

7. DiPietro LA, Burdick M, Low QE, Kunkel SL, Strieter RM. MIP-1alpha as a critical macrophge chemoattractant in murine wound repair. J Clin Invest. 1998; 101:1693-8.
8. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5:A RANTES, MIP-1α, MIP-1β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. Science. 1996;272:1955-8.
9. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The β-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. Cell. 1996;85:1135-48.
10. Bradding P, Feather IH, Wilson S, Bardin PG, Heusser CH, Holgate ST, Howarth PH. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. J Immunol. 1993;151:3853-65.
11. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem. 1995;270(45):27348-57.
12. Brandt E, Petersen F, Flad HD. A novel molecular variant of the neutrophil-activating peptide NAP-2 with enhanced biological activity is truncated at the C-terminus: identification by antibodies with defined epitope specificity. Mol Immunol. 1993;30(11):979-91.
13. Ehlert JE, Gerdes J, Flad HD, Brandt E. Novel C-terminally truncated isoforms of the CXC chemokine beta-thromboglobulin and their impact on neutrophil functions. J Immunol. 1998;161(9):4975-82.
14. Rudack C, Hermann W, Eble J, Schroeder JM. Neutrophil chemokines in cultured nasal fibroblasts. Allergy. 2002;57(12):1159-64.
15. 葛仙翁 : 肘後備急方, 臺北, 集文書局, 1978:3-8-9.
16. 王 燾 : 外臺秘要, 臺北, 國立中國醫藥研究所, 1968:72.
17. 劉河間 : 劉河間傷寒三六書, 臺北, 교육주부사출판부, 1976:55.
18. 李尙仁 : 方劑學, 서울, 永林社,1996:112,113.
19. 손창봉 : 항균활성작용에 대한 황련해독탕의 효능에 관한 연구, 원광대학교 석사학위 논문, 1986.
20. 송호준 : 黃連解毒湯이 緬羊赤血球에 對한 免疫反應에 미치는 影響, 원광대학교 석사 학위 논문, 1982.
21. 尹星燦 : 黃連解毒湯加味方에 의한 면역글로불린 E 媒介性 아나필락시의 억제 ;

大韓韓方成人病學會, 1997;3(1):66-77.

22. 鄭遇悅 : 황련해독탕 엑기스가 家兎의 體溫 및 血壓에 미치는 영향, 서울, 경희대학원 석사 학위 논문, 1976.
23. 박호식 : 부자독소에 의한 조직변화와 감두탕 및 황련해독탕의 중화에 관한 연구, 원광대학교 학위 논문, 1984.
24. 김찬중 : 알레르기비염 환자의 체질분포 및 특이적 IgE 측정법(MAST CLA)의 임상적 의의, 大韓外官科學會誌, 2002;15(2):211.
25. 盧石善 編著 : 原色 眼耳鼻咽喉科學, 주민출판사, 2003:557-564.
26. 上海中醫學院 : 五官科學, 香港, 商務印書館香港分館, 1982:4
27. 金完熙 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, 1985:252.
28. 金賢兒 : 알레르기성 鼻炎에 대한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 1994;7(1):53-84.
29. 申載鏞 : 方藥合編解說, 서울, 成輔社, 2000:208.
30. 杜鎬京 朴憲在: 黃連解毒湯의 藥理學的 硏究 경희한의대논문집. 1992:103-14.
31. Rollins BJ. Chemokines. Blood. 1997;90:909-28.
32. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today. 1999;20:245-57.
33. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med. 1998;338:436-45.
34. Strieter RM, Standiford TJ, Huggnagle GB, Colletti LM, Lukas NW, Kunkel SL. "The good, the bad, and the ugly"-the role of chemokines in models of human disease. J Immunol. 1996;156:35 83-86.
35. Van Damme J, Wuyts A, Froyen G, Van Coillie E, Struyf S, Billiau A, Proost P, Wang JM, Opdenakker G. Granulocyte chemotactic protein-2 and related CXC chemokines: from gene regulation to receptor usage. J Leukoc Biol. 1997;62(5):563-9.
36. HamilosDL. Chronic sinusitis. J Allergy Clin Immunol. 2000;106 (2):213-27.