

생쥐의 B細胞에서 anti-CD40과 rIL-4로 유도된 Cytokine 생산과 IgE, Histamine에 대한 冷哮丸의 效果

유선웅, 박양춘

대전대학교 한의과대학 폐계내과학교실

Effects of Naenghyohwan(NHH) on anti-CD40 and rIL-4 induced cytokine production and IgE, Histamine in highly purified mouse B cells

Seon-woong Yoo, Yang-chun Park

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

This study was done to evaluate the antiallergic effects of Naenghyohwan(NHH). Cytotoxic activity for lung fibroblast cells, cytokines transcript expression of IL-1, IL-4, IL-5, TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ , production of IL-4, IL-10, IFN- γ , IgE in anti-CD40mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells and the production of histamin released in mast cells, and the expression of histamine release factor(HRF) in splenic B cells were measured.

The following results were obtained. NHH did not showed cytotoxicity in fibroblast cells. NHH increased the gene synthesis of TNF- α , IFN- γ (m-RNA). NHH decreased the gene synthesis of IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β 1(m-RNA). NHH decreased the appearance of IL-4, IgE significantly. NHH increased the appearance of IL-10, IFN- γ significantly. NHH decreased the proliferation of B cells significantly. NHH decreased the appearance of histamin expression of HRF in mast cells significantly.

The results suggest NHH is effective against the allergies. Continued studies of the antiallergic effects of NHH are urged.

Key Words: Naenghyohwan(NHH), cytokine, IgE, histamine

1. 緒 論

氣管枝喘息은 臨床的으로는 可逆的인 氣道閉鎖 증상을 보이면서, 病態生理學的으로는 氣道過敏反應을 나타내고, 組織病理學的으로는 氣道の 炎症所見이 관찰되는 炎症性 氣道疾患으로 정의할 수 있다. 氣管枝喘息은 세계적으로 增加 趨勢에 있는데 우리나라

에서도 産業化에 따른 大氣汚染, 住居 形態의 西歐化和 같은 環境의 變化에 따라 喘息의 有病率이 증가하고 있으며 이에 대한 적절한 治療와 預方 對策이 요구되고 있다.

氣管枝喘息은 韓醫學에서 哮喘證의 範疇에 해당되며 呼吸急促, 喉中有聲을 그 특징으로 하는데 實證은 外感風寒, 痰濕內盛으로, 虛證은 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛로 구분하고, 實證에서 痰濕內盛은 다시 痰濕, 寒痰, 痰熱로 나눌 수 있다.

冷哮丸은 《張氏醫通》에 처음 記載된 處方으로 “天冷易發 呼吸急促 喘鳴有聲 咳痰清稀色白 泡沫狀 胸膈滿悶 面色晦而帶青 形寒怕冷 口不渴 或 渴喜熱

· 접수 :2004년 4월 23일 채택 :2004년 5월 8일
· 교신저자 : 박양춘, 충북 청주시 용담동 173-9 대전대 부속 청주한방병원 1 내과
(Tel : 043)229-3704, Fax : 043)253-8757, E-Mail : omdpyc@dju.ac.kr

飲 舌苔白滑 脈弦緊 或 弦滑” 한 증상을 보이는 實證 哮喘의 寒痰型에 溫肺散寒 定喘化痰의 目的으로 使用하는 것으로 되어 있다.

現在까지 여러 가지 韓藥物의 氣管枝喘息 및 抗알레르기 效果에 대한 研究를 살펴보면, 최근에 와서는 分子生物學的인 기법을 도입한 研究¹⁾ 및 임상적 研究²⁾ 등이 보고 되고 있으나 冷哮丸의 效能에 대한 實驗的 研究는 찾아 볼 수 없었다.

이에 著者는 冷哮丸이 哮喘證의 治療에 사용되는데 착안하여, 알레르기 喘息에 관련된 效能을 糾明하고자 肺纖維芽細胞에서의 細胞毒성에 미치는 影響, Cytokine인 interleukin(이하 IL)-1 β , IL-4, IL-5, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, IL-10, transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), interferon- γ (IFN- γ)에 미치는 效果, IL-4, IL-10, IFN- γ , immunoglobulin E(IgE)의 生産量, B細胞의 細胞增殖, histamin 遊離 抑制效果 및 histamine-releasing-factor(HRF) 抑制效果를 測定하였던 바 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

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 환경[온도 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 \pm 10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300Lux]에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

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 用量은 Table 1.과 같다.

3) 試料製造

冷哮丸(Naenghyohwan, 이하 NHH) 56g에 증류수 1,300ml을 가하여 열탕추출기(대웅, Korea)에서 3시간

Table 1. Prescription of Naenghyohwan<NHH>

韓藥名	生藥名	重量(g)
麻 黃	Ephedrae Herba	40.0
川 烏	Aconiti Radix	40.0
細 辛	Asari Herba Cum Radice	40.0
蜀 椒	Zanthoxyli Fructus	40.0
白 礬	Alumen	40.0
皂 莢	Gleditsiae Fructus	40.0
半 夏	Pinelliae Rhizoma	40.0
南 星	Arisaematis Rhizoma	40.0
杏 仁	Armeniacae Semen	40.0
生甘草	Glycyrrhizae Radix	40.0
紫 菀	Astris Radix	80.0
款冬花	Farfarae Flos	80.0
Total Amount		560.0

가열하여 얻은 추출액을 여과지로 여과한 후 rotary vaccum evaporator(Buchi B-461, Switzerland)로 농축하고, 이를 다시 freeze dryer(Eyela Co., Japan)를 이용하여 얻은 완전 건조된 분말을 냉동(-84 $^{\circ}$ C) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 方法

1) B細胞 分離 및 培養

BALB/C 생쥐에서 비장을 분리하여 비장세포(spleen cell)를 채취하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 이에 적혈구용혈액(Sigma社) 2ml을 넣고 37 $^{\circ}$ C 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10ml의 D-PBS를 첨가하여 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 사용하였다. 분리한 비장세포에 J1J, GK153, M1/70 배양상층액(1ml/10⁶ 세포) 그리고 Thy-1.2 Ab 40 μ 를 처리한 후 얼음에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 2회 D-PBS로 수세한 후 rabbit complement lyophilised(Serotec., U.K.) 0.5ml을 처리한 후 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 5회 complete medium으로 수세하고 Sephadex G-10 column(Amersham Pharmacia, U.S.A.)에 통과시켜 B細胞를 분리하였다. B細胞 함량을 측정하기 위하여 α -B220-FITC를 이용하여 유세포형광분석기(flow cytometry)로 분석하였다.

2) CD23⁺, CD69⁺, IgE 發顯 分析

생쥐 B細胞를 24 wells plate에 5 \times 10⁵세포/well로 분

주하고 anti-CD40 mAb (500ng/ml)과 rmIL-4(500U/ml), 그리고 冷哮丸 抽出物(10, 100 μ g/ml)을 가하여 48시간(CD23과 CD69측정)과 68시간(IgE측정)배양하였고, 양성대조군으로 rmIL-10(50ng/ml)을 사용하였다. 배양 후 B細胞를 인산완충생리식염수(3% 우태아혈청, 0.1% NaN₃)로 2회 수세하였고, 4℃에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 anti-mouse CD69-FITC, anti-mouse B220-phycoerythrin(PE), anti-mouseIgE, 그리고 fluorescein isothiocyanate(FITC)-anti-mouse CD23 등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포 형광분석기로 생쥐 B細胞에서 IgE, CD23(Fc ϵ), 그리고 CD69의 發顯을 분석하였다. 분석프로그램은 Cell Quest 프로그램으로 IgE⁺/B220⁺, CD23⁺/B220⁺ 그리고 CD69⁺/B220⁺의 비율(gated, %)을 산출하였다.

3) B細胞에서 cytokine 遺傳子發顯 分析

(1) B細胞에 冷哮丸 處理

생쥐 B細胞를 분리하여 24 wells plate의 각 well에 1×10^6 세포씩 분주하고, 冷哮丸 抽出物(1, 10, 100 μ g/ml)을 처리하였고, 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb(500ng/ml)과 rmIL-4(recombinant mouse interleukin-4, 500U/ml, PharMingen)를 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10(recombinant mouse interleukin-10, 50ng/ml, Endogen)을 양성대조군으로 사용하였다. 冷哮丸 抽出物과 anti-CD40 mAb과 rmIL-4를 동시 배양하여 6시간 후 배양 상등액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

(2) B細胞의 RT-PCR

① RNA 추출

배양종료 후 상층액을 제거한 후 RNeasy[®]를 이용하여 생쥐 B細胞막을 티트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. RNeasy[®]를 1/10 양으로 CHCl₃ (chloroform) (40 μ l/400 μ l RNeasy[®])을 넣은 후 15초간 Vortex로 혼합하고 얼음에서 15분간 방치하였다. 고속원심분리기(4℃)로 15,000rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하고 천천히 흔들어 주었다. 그리고 고속원심분리기로 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을

제거하고, 1 ml의 80% EtOH/DEPC D.W를 넣고 살짝 vortex 후 15,000rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 다시 제거한 speed-vac으로 건조시켰다. DEPC/D.W(0.05%) 추출한 total RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應(RT-PCR)

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 75℃에서 5분 동안 변성(denaturation)시키고, 이에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25pmol/25 μ l), RNA inhibitor로서 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, 15mM 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 2,000rpm에서 5초간 원심침강하여 37℃ 항온수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95℃에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid, MWG, Germany)를 이용하여 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, IL-1 β , IL-4, IL-5, TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ 를 증폭하기 위하여 sense primer(20pmol/ μ l)와 antisense primer(20pmol/ μ l)를 혼합하여 1 μ l를 가하였다. 그리고 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 0.18 μ l Taq polymerase(5U/ μ l)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 μ l 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation(95℃, 5분), denaturation(95℃), annealing(55℃, 1분), elongation(72℃, 1분)을 25회한 뒤 postelongation을 72℃에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기

영동을 통하여 분석하였다.

PCR product의 양은 Windows 1D main program을 이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

4) IFN- γ , IL-4, IL-10, 및 IgE 生産量 測定

생쥐 B細胞를 분리하여 96 wells plate의 각 well에 2×10^5 세포씩 분주하고, 冷哮丸 抽出物(100 $\mu\text{g/ml}$)을 처리하였고, 약물처리 1시간 후 anti-CD40 mAb(500ng/ml)과 rIL-4(500U/ml)를 10일과 48시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 rIL-10을 양성대조군으로 사용하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 IFN- γ , IL-4, IL-10 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA, Endogen, U.S.A.)을 48시간, 그리고 IgE ELISA kit(Pharmingen, U.S.A.)로 분비량을 10일동안 배양 후 측정하였다. 각 항체를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 B細胞 배양상등액을 100 μl 씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μl 를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μl 씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 μl 의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Histamine 分泌量 測定

생쥐 복부의 비만세포를 분리하여 冷哮丸에 의한 histamine 放出量 抑制效果를 관찰하였다. BALB/C 생쥐에 5ml의 Tyrode 완충용액 B(NaCl, glucose, NaHCO₃, KCl, NaH₂PO₄, 0.1% gelatin)를 주사하고 90초간 복부를 천천히 맞사지한 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 완

충용액 A(Ca²⁺포함)로 수세한 후 Toluidine blue staining으로 살아있는 비만세포수를 측정하였다. 비만세포를 96 wells plate의 각 well에 2×10^5 세포씩 분주하고, 冷哮丸 抽出物(1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)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 유출량을 측정하였다.

6) 統計 處理

多樣한 實驗으로부터 얻은 結果는 mean \pm standard error로 記錄하였고, 有意性 檢證은 Student's t-test 分析方法을 利用하여 決定하였다.

III. 成績

1. 肺纖維芽細胞에서의 細胞毒性에 미치는 影響

肺纖維芽細胞에서 細胞毒性에 미치는 影響을 살펴본 결과, 實驗群에서 對照群에 비해 濃度依存的 減少가 있으나 有意性은 없었다(Table 2).

Table 2. Cytotoxicity Effects of Naenghyohwan(NHH) on Mouse Lung Fibroblast Cell(mLFC)

Dose($\mu\text{g/ml}$)	Viability(% of control)	
Control	0	100.0 \pm 2.7 ^a
	1	101.3 \pm 3.4
	10	105.5 \pm 2.8
NHH	50	99.7 \pm 4.0
	100	96.9 \pm 3.7
	200	90.1 \pm 3.6

^a: Means \pm Standard error.

Control : Non-treated group.

NHH : Pretreated group with various concentration NHH extract.

2. B細胞의 CD23⁺, CD69⁺, IgE 發顯抑制에 미치는 效果

1) CD23⁺ 發顯抑制에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4에 NHH 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群(N3)과 B細胞에 anti-CD40, rIL-4에 NHH 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群(N2)은 B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 함께 處理한 陰性對照群에 비해 減少하였다 (Table 3).

2) CD69* 發顯抑制에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4에 NHH 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群과 B細胞에 anti-CD40, rIL-4에 NHH 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群(N2)은 B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 함께 處理한 陰性對照群에 비해 減少하였다(Table 3).

3) IgE 發顯抑制에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4에 NHH 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群(N2)은 B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 함께 處理한 陰性對照群에 비해 減少하였다(Table 3).

3. IL-1 β , IL-4, IL-5, TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β 1 및 IFN- γ 遺傳子 發顯에 미치는 效果

각 PCR Products는 20mm씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다. PCR Product의 양은 Windows ID main program(AAB, USA)을 이용하여 최고값(height, Ht)으로 측정하였다.

1) IL-1 β (m-RNA) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

B細胞에 IL-1 β 유전자 발현을 관찰한 결과, rIL-4 B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 가한 후 다시 NHH 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理한 實驗群은 Anti-CD40과 IL-4을 처리한 陰性對照群에 비해 發顯이 抑制되었다(Table 4).

2) IL-4(m-RNA) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 가한 후 NHH 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理한 實驗群은 Anti-CD40과 IL-4을 처

리한 陰性對照群에 비해 發顯이 抑制되었다(Table 4).

3) IL-5(m-RNA) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 가한 후 NHH 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理한 實驗群은 Anti-CD40과 IL-4을 처리한 陰性對照群에 비해 發顯이 抑制되었다(Table 4).

4) TNF- α (m-RNA) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 가한 후 NHH 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理한 實驗群은 濃度依存的 抑制은 있었으나 陰性 및 陽性對照群에 비해 모두 높은 값이 나타났다(Table 4).

5) IL-6(m-RNA) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 가한 후 NHH 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理한 實驗群은 Anti-CD40과 IL-4을 처리한 陰性對照群에 비해 發顯이 抑制되었다(Table 4).

6) IL-10(m-RNA) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 가한 후 NHH 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理한 實驗群은 Anti-CD40과 IL-4을 처리한 陰性對照群에 비해 증가하였다(Table 4).

7) TGF- β 1(m-RNA) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 가한 후 NHH 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理한 實驗群은 Anti-CD40과 IL-4을 처리한 陰性對照群에 비해 發顯이 抑制되었다(Table 4).

8) IFN- γ (m-RNA) 遺傳子 發顯에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4를 가한 후 NHH 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 處理한 實驗群은 Anti-CD40과 IL-4을 처

Table 3. Inhibitory effect of Naenghyohwan(NHH) Extract on CD23*/B220*, CD69*/B220* and IgE/B220* Production, expression by NHH extract plus anti-CD40 mAb plus rIL-4-Stimulated Murine Splenic B Cells

Group	NHH	CD23*/B220*	CD69*/B220*	IgE/B220*
	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	(%)	(%)
A	0	4.59	0.59	9.25
B	0	22.1	6.88	39.1
C-	0	37.2	10.6	45.5
C+	0	12.2	4.52	30.8
N2	10	18.6	6.91	31.3
N3	100	34.8	10.0	36.7

A : IL-4(500U/ml) treated group.
 B : Anti-CD40(500ng/ml) treated group.
 C- : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) treated group.
 C+ : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + IL-10(50ng/ml) treated group.
 N3 : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + NHH(100 $\mu\text{g/ml}$)treated group.
 N2 : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + NHH(10 $\mu\text{g/ml}$)treated group.
 N1 : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + NHH(1 $\mu\text{g/ml}$)treated group.

Table 4. Inhibitory Effects of NHH Extract on Cytokines Transcription Expression by NHH Extract plus Anti-CD40mAb plus rIL-4-stimulated Murine Splenic B Cells Cytokine m-RNA expression(Ht)

Cytokine m-RNA expression(Ht)	Group							
	N	A	B	C-	C+	N3	N2	N1
IL-1 β	64	72	74	93	80	71	75	89
IL-4	14	11	12	38	13	12	15	58
IL-5	27	26	41	53	20	19	47	42
TNF- α	149	156	158	122	117	145	150	152
IL-6	22	29	48	41	45	34	36	47
IL-10	27	33	28	35	87	40	32	39
TGF- β 1	215	225	231	235	234	199	211	207
IFN- γ	21	20	17	15	30	79	41	37

N : Non-treated group.

A : IL-4(500U/ml) treated group.

B : Anti-CD40(500ng/ml) treated group.

C- : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) treated group.

C+ : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + IL-10(50ng/ml) treated group.

N3 : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + NHH(100 μ g/ml)treated group.

N2 : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + NHH(10 μ g/ml)treated group.

N1 : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + NHH(1 μ g/ml)treated group.

Table 5. Effect of Naenghyohwan(NHH) Extract on IL-4 Production, IL-10 Production, IFN- γ Production and IgE Production by NHH Extract plus Anti-CD40mAb plus rIL-4-Stimulated Murine Splenic B Cells

Group	NHH (μ g/ml)	IL-4 production (pg/ml)	IL-10 production (pg/ml)	IL-10 production (pg/ml)	IgE production (ng/ml)
N	0	63.5 \pm 8.4	52 \pm 7.6	52 \pm 7.6	15.9 \pm 2.6
A	0	174.3 \pm 10.5	107 \pm 11.9	107 \pm 11.9	44.0 \pm 12.9
B	0	128.4 \pm 7.7	122 \pm 9.5	122 \pm 9.5	25.1 \pm 5.6
C-	0	236.1 \pm 15.1	187 \pm 17.7	187 \pm 17.7	86.1 \pm 8.1
C+	0	88.3 \pm 7.5***	2329 \pm 201.7***	2329 \pm 201.7***	12.8 \pm 2.3***
N3	100	82.6 \pm 8.2***	325 \pm 23.3***	325 \pm 23.3***	28.2 \pm 6.9***

N : Non-treated group.

A : IL-4(500U/ml) treated group.

B : Anti-CD40(500ng/ml) treated group.

C- : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) treated group.

C+ : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + IL-10(50ng/ml) treated group.

N3 : Anti-CD40(500ng/ml) + IL-4(500U/ml) + NHH(100 μ g/ml)treated group.

* : Statistically significant value compared with control data.

(*** : P<0.001)

리 陰性對照群에 비해 發顯이 增加되었다(Table 4).

4. IL-4, IL-10, IFN- γ , IgE 生産量에 미치는 效果

1)IL-4 生産量에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4 및 NHH 100 μ g/ml을 處理한 實驗群(N3)은 Anti-CD40과 IL-4을 處理한 陰性對照群에 비하여 有意性 있는 生産量 減少가 나타났다 (Table. 5).

2) IL-10 生産量에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4 및 NHH 100 μ g/ml을 處理한 實驗群(N3)은 Anti-CD40과 IL-4을 處理한 陰性對照群에 비하여 有意性 있는 生産量 增加가 나타났다 (Table. 5).

3) IFN- γ 生産量에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4 및 NHH 100 μ g/ml을 處理한 實驗群(N3)은 Anti-CD40과 IL-4을 處理한 陰性對照群에 비하여 有意性 있는 生産量 增加가 나타났다 (Table. 5).

Table 6. Inhibitory Effect of Naenghyohwan(NHH) Extract on the Histamine Release in Histamine-Release Factor(HRF) and Anti-IgE mAb-Stimulated Murine Peritoneal Mast Cells

Group	NHH ($\mu\text{g/ml}$)	Secreted histamine (nM)
N	0	12.2 ± 2.4
A	0	157.7 ± 25.8
B	0	223.4 ± 41.4
C	0	654.3 ± 52.3
N3	100	277.6 ± 30.9***
N2	10	369.1 ± 59.0**
N1	1	610.5 ± 47.8

N : Non-treated group.
 A : anti-IgE mAb(40ng/ml) treated group.
 B : HRF(500ng/ml) treated group.
 C : anti-IgE mAb(40ng/ml) + HRF(500ng/ml) treated group.
 N3 : anti-IgE mAb(40ng/ml) + HRF(500ng/ml) + NHH(100 $\mu\text{g/ml}$) treated group.
 N2 : anti-IgE mAb(40ng/ml) + HRF(500ng/ml) + NHH(10 $\mu\text{g/ml}$) treated group.
 N1 : anti-IgE mAb(40ng/ml) + HRF(500ng/ml) + NHH(1 $\mu\text{g/ml}$) treated group.
 * : Statistically significant value compared with control data.
 (** : P<0.01, *** : P<0.001)

4) IgE 生産量에 미치는 效果

B細胞에 anti-CD40, rIL-4 및 NHH 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群(N3)은 Anti-CD40과 IL-4을 처리한 陰性對照群보다 有意性 있는 生産量 減少가 나타났다 (Table. 5).

5. Histamine 分泌 抑制 效果

Anti-IgE mAb와 HRF 및 NHH(100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$)을 處理한 實驗群중 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 對照群에 比하여 有意性 있는 分泌 抑制가 나타났다(Table. 6).

IV. 考 察

氣管枝喘息은 알레르겐, 肥滿細胞 및 IgE가 關與하여 分泌되는 化學媒體의 直接的인 藥理作用에 의해서, 그리고 化學媒體와 cytokine, 유착분자가 關여하여 氣管支로 모여온 炎症細胞에 의해서 發病하는 氣道の 만성알레르기 炎症性 疾患으로 理解되고 있는데 그 病態生理에 가장 많은 影響을 미치는 IgE의 合成 및 調節에 關連된 cytokine들에 대한 研究들이 활발

히 이루어지고 있다¹².

氣管枝喘息은 韓醫學에서 呼吸急促, 喉中有聲하는 哮喘證의 範疇에 해당하는데 그 原因에 대하여는 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 過敏性 反應 등으로 정리하고 있다. 哮喘證의 辨證分類는 크게 實證과 虛證으로 나누어 實證은 外感風寒, 痰濕內盛으로, 虛證은 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛로 區分하며, 實證의 痰濕內盛은 다시 痰濕, 寒痰, 痰熱로 細分한다¹.

冷哮丸은 《張氏醫通》에 처음 記載된 처방으로 急性期 哮喘證의 寒痰에 溫肺散寒 定喘化痰의 目的으로 使用하였다¹. 處方의 內容과 構成藥物의 效能을 보면 麻黃, 細辛, 生薑은 解表시키고 川烏, 蜀椒는 溫裏시키며, 半夏, 南星, 紫苑, 款冬花, 杏仁은 化痰止咳시키고, 白礬은 燥濕化痰시키며, 皂莢은 活血祛痰시키고, 甘草로 和緩시킴¹³으로써 中外皆寒으로 인해 頑痰이 結聚되어 胸膈痞滿, 倚息不得臥 하는 症狀을 治療하여⁴ 哮喘證, 喘證, 痰盛咳嗽 등의 急性呼吸器疾患에 應用할 수 있다.

氣管枝喘息이나 哮喘證에 關하여 많은 研究가 이루어져 왔으나, 最近에는 喘息의 發病機轉과 病態生理에 대한 研究로 分子生物學的인 技法을 導入하고 있다¹⁴.

이에 著者는 臨床的으로 實證 哮喘의 寒痰 治療에 使用되고 있는 冷哮丸의 效能을 實驗的으로 糾明하기 위해, B細胞와 肥滿細胞를 利用하여 冷哮丸이 肺纖柔芽細胞에서의 細胞毒性에 미치는 影響, 脾臟 B細胞에서 CD23⁺, CD69⁺, IgE 發顯抑制에 미치는 影響, 알레르기 反應에 重要한 役割을 하는 代表的 cytokine인 IL-1 β , IL-4, IL-5, TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β 1, IFN- γ 에 미치는 效果, IL-4, IL-10, IFN- γ , IgE의 生産量, histamin 遊離 抑制效果를 觀察하였다.

알레르기 反應 중에서 第一型 過敏反應은 IgE 抗體가 中心役割을 하는데 이러한 IgE를 發顯시키는 B 림프구의 分化는 세 가지 種類의 信號에 의한다. 첫 째로 B細胞의 抗原 受容體를 통하여 抗原 特異的 反應을 決定하는데 中樞的인 役割을 하고, 둘째는 Th2 細胞에서 由來된 IL-4, IL-13 같은 cytokine에 의하여 提供되며, 셋째는 B細胞와 T細胞의 interaction에 의하

여 提供된다. 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-ligand이며 相互作用을 통해 B細胞의 成長과 抗原의 生産을 誘導한다⁴.

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 合하여 cytokine이라고 한다⁵.

Th림프구는 cytokine을 分泌하여 氣道の 炎症反應을 調節하는 重要한 役割을 하고 있다. Th림프구는 cytokine의 分泌樣相에 따라 Th1, Th2림프구로 나뉘어 진다. Th1림프구는 주로 IL-2, IL-12, IFN- γ 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. Th2림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 등을 生産하며 即時型過敏反應, 氣管枝喘息과 같은 알레르기性 疾患, 寄生蟲 感染에 대한 防禦作用에 關與한다⁵. Th1림프구와 Th2림프구는 서로 拮抗作用을 나타내어 機能이 抑制되는 現象이 觀察되며 알레르기性 氣管支喘息 患者의 氣管支 肺泡洗滌液에서는 Th2림프구의 機能이 活性化됨이 觀察되고 있다⁶.

實驗結果를 살펴보면, NHH를 處理한 B細胞 表面의 CD23⁺, CD69⁺, IgE의 發顯을 觀察하였을 때, 각각 濃度依存的으로 發顯이 抑制되었다(Table 3). CD23⁺는 B細胞의 分化 段階를 나타내는 標識로서 뿐 아니라 全般的인 B細胞의 成長의 調節 및 IgE 抗體 生成의 調節에 關與할 것으로 생각되고 있다⁷. CD69⁺는 T細胞의 初期 活性化를 나타내는 表面標識者로 T細胞, B細胞, NK細胞, 大食細胞, 中性球, 好中球, 單核球, 血小板, 上皮 랑게르한스 細胞. 등에서 發顯되는데 류마티스 關節炎, 慢性 炎症性 肝疾患, 輕症의 喘息, AIDS 등의 病理作用에 關與하는 것으로 생각되고 있다⁸.

IL-1 β 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 B前驅細胞의 成熟과 抗原刺戟을 받은 B細胞增殖를 誘導한다⁹. 또한 IL-6, TNF- α 와 더불어 喘息에 있어 氣道壁의 炎症 誘發因子로 알려져 있다⁹.

본 實驗에서 B細胞의 核으로부터 細胞質로 나오는 過程上에서 發顯되어진 IL-1 β 遺傳子合性を 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應으로 살펴볼 때, B細胞에 anti-CD40, rIL-4와 NHH를 100, 10, 1 μ g/ml을 處理한 實驗群은 濃度依存的으로 IL-1 β 의 遺傳子合性を 抑制하는 것으로 나타났다(Table 4).

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. 또한 IL-4는 T림프구와 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 알레르기反應에 重要한 役割을 하게된다¹⁰.

IL-5는 活性化된 T細胞가 生成하지만 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 받아 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를 增殖시켜 好酸球로 分化시킨다. 또한 好酸球를 活性化하는 役割을 한다¹¹.

따라서 IL-4와 IL-5는 氣管枝喘息의 病因에 주요한 役割을 하며, 이는 Th2에서 分泌되므로 喘息患者의 氣道內에서 Th2細胞의 活性化가 豫測되고 있다¹².

본 實驗에서 IL-4의 遺傳子合性を 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應으로 살펴보면, B細胞에 anti-CD40, rIL-4와 NHH를 100, 10, 1 μ g/ml로 處理한 實驗群은 대조군에 비해 强하게 抑制하는 것으로 나타났다(Table 4).

본 實驗에서 IL-5의 遺傳子合性を 逆轉寫-重合酵

素連鎖反應으로 살펴보면, 대조군에 비해 B細胞에 anti-CD40, rIL-4와 NHH를 각각 100, 10, 1 μ g/ml로 處理한 實驗群중 100 μ g/ml에서 IL-5의 遺傳子合性を 強하게 抑制하는 것으로 나타났다(Table 4).

따라서 冷哮丸은 IL-4, IL-5의 抑制를 통해 喘息患者의 氣道內에서 Th2細胞의 活性化를 抑制함으로써 氣管支 喘息에 대한 治療劑로서의 可能性을 보이고 있다고 생각된다.

韓藥物을 대상으로 한 最近의 研究에서 고 등²⁾의 實驗研究에 의하면 氣管枝喘息에 使用하고 있는 紫蛤散이 IL-1 β , IL-4, IL-5의 遺傳子發顯을 有意性있게 抑制한다고 하였고, 김 등³⁾과 이 등²³⁾의 研究에서는 定喘湯과 淸上補下湯이 IL-4, IL-5의 轉寫能을 抑制한다고 하였으며, 장 등²⁴⁾의 研究에서는 牡丹皮抽出液이 IL-1 β , IL-4에 대해서는 소폭, IL-5에 대해서는 큰 폭으로 轉寫能을 抑制한다고 하였다. 특히 小青龍湯을 대상으로한 臨床研究에 의하면 정 등¹⁶⁾의 臨床研究에서 喘息患者群의 血清內 IL-4는 正常群에 비하여 統計적으로 有意하게 높았고, 황 등¹⁷⁾의 臨床研究에서 血清內 IL-5는 正常群에 비하여 統計적으로 有意하게 높았으며 小青龍湯 投與 8주후 실시한 檢査에서 有意性 있는 差異가 發見되었다. 이와 같이 氣管枝喘息患者에 대한 韓藥物의 效能이 發揮되는 機轉을 說明함에 있어서 IL-4, IL-5에 대한 韓藥物의 影響이 重要な 部分을 차지하고 있는데, 冷哮丸도 IL-4와 IL-5의 發顯을 抑制하는 效果를 보이고 있어 實際 臨床에 있어 活用될 수 있는 可能性을 보여주는 것으로 생각된다.

TNF- α 는 大食細胞, T細胞, 肥滿細胞, NK細胞에서 生産되며 IL-1의 機能과 重複되나 抗癌機能이 더 뛰어난 役割을 한다¹⁹⁾. 또한 增加된 histamine의 分泌와 氣道內의 炎症을 誘發하는 cytokine으로 炎症細胞가 氣道壁에 移入되는 것을 촉진하고 上皮에서 纖維化를 活性化시킨다²⁰⁾.

본 實驗에서는, B細胞에 anti-CD40, rIL-4와 NHH를 각각 100, 10, 1 μ g/ml을 處理한 實驗群의 Ht값은 대조군에 비해 增加하는 것으로 나타났다(Table 4).

TNF- α 의 抑制가 重症 喘息과 重症 慢性閉鎖性肺

疾患의 治療에 有用할 것이라는 報告²¹⁾가 있으나 장²²⁾의 牡丹皮抽出液을 대상으로한 研究에서는 소폭 增加하였고, 배¹⁸⁾의 小青龍湯을 대상으로한 研究에서는 소폭 減少하였으며, 본 研究에서는 對照群보다 增加하는 것으로 나타났다. 따라서 冷哮丸이 TNF- α 를 억제함으로써 氣道內 炎症을 減少시켜 喘息에 效果를 나타내지는 않을 것으로 생각된다.

IL-6은 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 炎症性 cytokine으로 알려져 있다. 抗原과 反應한 T細胞에도 作用하며 IL-2 수용체를 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한다¹⁹⁾.

본 實驗에서는, B細胞만 處理한 正常群의 Ht값은 ²²⁾, B細胞에 anti-CD40과 rIL-4를 處理한 陰性對照群의 Ht값은 41, B細胞에 anti-CD40과 rIL-4에 rIL-10을 處理한 陽性對照群의 Ht값은 45, B細胞에 anti-CD40, rIL-4와 NHH를 각각 100, 10, 1 μ g/ml을 處理한 實驗群의 Ht값은 34, 36, 47로 減少되었다(Table 4).

한 등²⁶⁾의 研究에서 喘四君子湯은 100 μ g/ml 濃度일 때, 水蛭은 100 μ g/ml일때 각각 IL-6의 發顯을 減少시켰고, 김 등²⁵⁾, 고 등²⁷⁾의 研究에서도 發顯이 減少되었다. 배 등²⁸⁾, 주 등²⁹⁾의 研究에서는 意味있는 變化가 없었다. 본 實驗에서는 冷哮丸이 濃度依存的으로 陽性對照群에 비하여 IL-6를 減少시키는 것으로 나타났다. 이는 炎症性 cytokine인 IL-6의 發顯을 冷哮丸이 抑制하여 氣道粘膜의 過增殖과 異常分泌物 增加에 使用될 수 있는 可能性을 보여준다고 생각된다.

IL-10은 36kDa homodimeric cytokine으로 活性化된 大食細胞 및 림프구에서 分泌되며 cytokine synthesis inhibitory factor로 알려져 왔다. 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글로불린의 生産을 가져온다²⁷⁾. Th1림프구에서의 IFN- γ , IL-2의 生成을 抑制하고 單核食細胞에서 IL-1, IL-6, IL-8 등의 炎症性 cytokine 生成을 抑制할 뿐 아니라 Th2림프구에서의 IL-4, IL-5, IL-13 分泌를 抑制시키기 때문에 알레르기성 炎症反應을 妨害하기도 한다¹⁹⁾. 또한 好酸球에 대

한 apoptosis를 誘導하고 IgE 抗體 形成을 抑制한다²⁸. 實際로 喘息患者에 있어서는 IL-10의 合成이 減少하는 傾向을 보인다²⁹.

본 實驗에서는, B細胞에 anti-CD40, rIL-4와 NHH를 각각 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群의 Ht값은 陰性 對照群과 큰 차이를 보이지 않았다(Table 4).

김 등³, 배 등⁹, 장 등³⁰의 研究에서 定喘湯, 清上補下湯, 小青龍湯, 牧丹皮는 IL-10의 轉寫能을 增加시켰으나 본 實驗에서는 濃度の 增減과 關聯없이 소폭의 增加와 減少를 보여 有意한 變化는 없었다.

TGF- β 1은 轉換成長因子로서 IL-10과 더불어 免疫 抑制 cytokine의 일종으로 regular T(Tr)cell에 의해 分泌되는데³⁰, 慢性 好酸球性 炎症, 氣道の 纖維化 등의 氣道 構造의 變形과 關聯되며 특히 氣管枝喘息의 氣道改形(airway remodeling)의 進行에 重要的 役割을 한다고 알려져 있다³¹.

본 實驗에서는, B細胞에 anti-CD40, rIL-4와 NHH를 각각 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群의 Ht값은 對照群에 비해 減少되었다(Table 4). 따라서 冷哮丸이 氣管支의 氣道改形(airway remodeling)의 進行을 抑制하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

IFN- γ 는 細胞媒介 Th1 免疫反應의 誘導에서 決定的 媒介因子로 作用하고 B細胞의 分化和 增殖을 抑制하는데 Th1과 Th2 分化的 主要 調節因子이다. 따라서 IL-4 作用과 拮抗作用을 보여 IL-4에 의한 IgE 生成을 抑制한다³².

본 實驗에서는, B細胞에 anti-CD40, rIL-4와 NHH를 각각 100, 10, 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群의 Ht값은 對照群에 비해 增加되었다(Table 4).

정 등³³의 臨床研究에서 清上補下湯은 IFN- γ 를 有意性있게 增加시켰다. 배 등⁹, 장 등³⁴, 송 등³⁵의 研究에서 小青龍湯, 止哮飲, 加味射干麻黃湯은 IFN- γ 를 增加시켰는데 본 實驗에서도 對照群에 비하여 顯著的 增加 傾向을 보였다. IFN- γ 는 IL-4의 作用을 拮抗하는 것으로 알려져 이를 根據로 IFN- γ 를 氣管枝喘息 患者의 治療에 使用하려는 시도는 있으나, in vitro에서 末梢血液 多形核球 및 單核細胞에 의한 毒性酸化物 生成을 增加시키고³⁶, leukotriene C4 分泌를 增加시키

며³⁷, β -adrenoceptor 機能을 抑制하는 作用도 있는 것으로 報告되고 있다³⁸. 따라서 IFN- γ 를 增加시키는 韓藥物이 IFN- γ 自體를 直接 使用하는 것과의 差異點에 대한 研究도 必要하리라 생각된다.

B細胞의 定量化 實驗에서 IL-4의 生産量(pg/ml)을 살펴볼 때, B細胞에 anti-CD40과 rIL-4를 處理한 陰性 對照群에 비하여 NHH 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群에서 有意性 있는 抑制效果가 나타났다(Table 5). 冷哮丸이 陰性 對照群에 비하여 效果의으로 IL-4의 生産量을 抑制하는 것은 IL-4의 遺傳子 發顯을 抑制한 앞의 實驗結果와 일치한다.

B細胞에서 IL-10의 生産量(pg/ml)을 살펴볼 때, 對照群에 비해 NHH 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群에서 有意性 있는 增加가 나타났다(Table 5). 앞의 실험에서 IL-10의 遺傳子 發顯을 增加시키지는 않았으나 본 實驗에서는 IL-10의 生産量을 增加시켰으므로 冷哮丸이 알레르기성 炎症反應을 妨害하고 好酸球에 대한 apoptosis를 誘導하고 IgE 抗體 形成을 抑制한다고 생각된다.

B細胞에서 IFN- γ 의 生産量(pg/ml)을 살펴볼 때, 對照群에 비해 B細胞에 NHH 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群에 有意性 있는 增加가 나타났다(Table 5). 이는 IFN- γ 의 遺傳子 發顯을 增加시킨 앞의 實驗結果와 일치한다. 따라서 冷哮丸이 IFN- γ 의 IL-4에 대한 拮抗作用에 의하여 IgE 生成을 抑制함으로써 氣管枝喘息의 증상을 개선시키는데 효과가 있을 것으로 생각된다.

B細胞로부터 細胞 밖으로 生産되어 나오는 IgE의 量(ng/ml)을 살펴볼 때, B細胞에 NHH 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 處理한 實驗群에서는 陰性 對照群에 비하여 有意性 있는 減少가 나타났다(Table 5). 배 등⁹은 實驗的으로 小青龍湯이 IL-4, IgE의 生産量을 有意하게 減少시키고, IFN- γ 의 生産量을 有意하게 增加시킨다고 하였고, 김 등³과 김 등³⁹은 IgE를 減少시킨다고 하였는데 본 實驗에서는 冷哮丸이 IL-4, IgE의 生産量을 有意하게 減少시키고, IL-10, IFN- γ 의 生産量을 有意하게 增加시켜 알레르기 喘息에 實際的인 治療可能性을 보여 주고 있다.

Histamine은 即時型 알레르기 반응을 주도하며 肥

滿細胞와 好鹽基球에서 유래하는 cytokine이다. Histamine은 肥滿細胞 顆粒무게의 약 10%를 차지하고 있으며 顆粒안에 만들어져 있다가 抗原의 刺戟에 의하여 顆粒이 破壞되면서 遊離되어 平滑筋收縮과 血管透過力 增加 등을 일으킨다¹⁹⁾.

본 實驗에서 肥滿細胞의 histamin의 放出量(nM)을 측정 한 결과 대조군에 비해 肥滿細胞의 陰性對照群에 NHH를 處理한 群에서는 100, 10 μ g/ml 濃度에서 有意性 있는 減少效果가 나타났다(Table 6). 기존의 고 등⁸⁾, 배 등⁹⁾, 장 등²⁰⁾의 研究에서도 紫蛤散, 小青龍湯, 牧丹皮가 histamine 放出量을 減少시켰는데, 본 實驗에서도 冷哮丸이 histamine의 放出量을 減少시키는 것으로 나타나 冷哮丸이 卽時型 알레르기반응에 의한 平滑筋收縮과 血管透過性 增大 등을 抑制할 수 있을 것으로 생각된다.

종합하면 冷哮丸은 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β 1의 轉寫能을 抑制하였고, TNF- α , IFN- γ 의 轉寫能을 增加시켰으며, 특히 IL-4의 生産量을 減少시켰고, IL-10, IFN- γ 의 生産量을 增加시켰으며, IgE의 Fc 受容體(Fc ϵ R)의 發顯을 抑制하면서, IgE의 放出量은 減少시켰다. 아울러 B細胞에서 histamine 分泌因子와의 結合能을 減少시키며 肥滿細胞에서의 histamine 放出量을 減少시켰다. 따라서 冷哮丸은 氣管枝喘息을 비롯한 알레르기질환의 치료에 활용 가능할 것으로 사료된다.

V. 結 論

冷哮丸의 效能을 糾明하기 위하여 anti-CD40, rIL-4의 刺戟에 의한 脾臟 B細胞에서 CD23+, CD69+, IgE 發顯抑制에 미치는 效果, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ 의 發顯에 미치는 效果, IL-4, IL-10, IFN- γ , IgE의 生産量, 肥滿細胞에서 histamin의 放出量 등을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 冷哮丸은 肺纖維芽細胞에서 細胞毒性에 미치는 影響에서 生存度의 濃度依存的 減少는 있었으나 有意性은 없었다.
2. 冷哮丸은 脾臟 B細胞에서 CD23+, CD69+, IgE의 發顯에 대해 減少效果가 나타났다.

3. 冷哮丸은 IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β 1 遺傳子合成에 대해 濃度依存的으로 減少效果가 나타났다.
4. 冷哮丸은 TNF- α , IFN- γ 遺傳子合成에 대해 濃度依存的으로 增加效果가 나타났다.
5. 冷哮丸은 IL-4, IgE 生産量에 대해 有意性 있는 減少效果가 나타났다.
6. 冷哮丸은 IL-10, IFN- γ 生産量에 대해 有意性 있는 增加效果가 나타났다.
7. 冷哮丸은 histamine 分泌量에 대해 有意性 있는 減少效果가 나타났다.

以上の 結果로 보아 冷哮丸은 알레르기反應을 抑制시키는 效果가 認定되었으나 향후 이에 대한 持續的인 研究가 必要하리라 思料된다.

參 考 文 獻

1. 박성학. 기관지천식-진단, 결핵 및 호흡기질환. 1995; 42(5):635-45.
2. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. ISAAC. Lancet, 1998; 351(9111):1225-32.
3. 전국한의과대학 폐계내과학교실 편저. 동의폐계내과학, 서울: 한문화사; 2002, p.192-9, 320-31.
4. 張璐. 張氏醫通. 중국: 상해과학기술출판사; 1995, p.177, 770.
5. 김영우, 정희재, 정승기, 이형구. 定喘湯과 淸上補下湯이 Asthma Model 내의 Cytokine에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001; 22(3):367-78.
6. 김진주, 정희재, 정승기, 이형구. 麥門冬湯과 定喘化痰降氣湯이 알레르기 천식 모델흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002; 23(1):37-49.
7. 주창엽, 황우석, 허태석, 정희재, 정승기, 이형구. 六味地黃湯合瀉白散과 桑白皮가 인간 기관지상피세포의 IL-6, IL-8 및 GM-CSF mRNA level에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001; 22(3):415-22.
8. 고재찬, 김준명, 송재진, 박양춘, 김병탁. 紫蛤散의 항알러지 효과에 대한 실험적 研究. 대한한방내과학회지. 2001; 22(3):405-13.

9. 배한호, 이정은, 한영주, 박양춘. 생쥐의 B細胞에서 IgE의 분비와 Cytokine생산에 대한 소청룡탕의 效果. 대한한방내과학회지. 2003; 24(2):249-59.
10. 정승기, 허태석, 황우석, 주창엽, 김영우, 정희재. 소청룡탕이 기관지천식환자의 혈청 IL-4, IL-5, IFN- γ 변화에 미치는 영향. 한방내과학회지. 2002; 23(2):70-7.
11. 황우석, 정광진, 홍준표, 주창엽, 이재성, 정희재, 이형구, 정승기. 소청룡탕의 기관지천식환자에 대한 임상적 效果. 대한한방내과학회지. 2002; 23(4):651-60.
12. 김태운. 알레르기 염증반응에서 사이토카인과 케모카인. 대한 천식 및 알레르기학회. 천식과 알레르기 질환. 서울: 군자출판사; 2002, p.55, 244.
13. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울: 행림사; 1992, p.123, 135, 333, 339, 448, 450, 481, 482, 632.
14. Bancheureau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S. The CD40 antigen and its ligend. Annu Rev Immunol. 1994; 12:881-992.
15. 정승원, 이미애, 하대규. 사이토카인이 Th1 세포의 Mitogen에 의한 증식반응에 미치는 영향. 대한면역학회지. 1997; 19(1):73-81.
16. Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M. cytokines and asthma. J investig Allergol clin imunol. 1997. 7(5):270-73.
17. 조영주, 문희범. Interleukin 4에 의해 유도된 CD23항원 양성 B 세포의 특성에 관한 研究, 대한면역학회지. 1992; 14(1):9-14.
18. Marzio R, Mael J, Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function. mmunopharmacol Immunotoxicol, 1999; 21(3):565-82,
19. 김세종. IMMUNOLOGY. 서울: 고려의학; 2000, p.1, 65, 154-6, 260-5.
20. Ferreira MB, Palma Carlos AG. cytokines and asthma, J of investigational allergology and clinical immunology, 1998; 8(3):141-8.
21. 서울大學校 醫科大學. 免疫學, 서울: 서울대출판부; 1991, p.59-63, 121- 33.
22. 어수택, 정성환, 이상우, 김현태, 김용훈, 박춘식. 천식환자의 기도내 cytokines 표현에 대한 연구. 결핵 및 호흡기질환. 1995; 42(1):1-10.
23. 이동생, 정희재, 정승기, 이형구. 청상보하탕의 항산화 效果, IL-4 억제 및 cDNA 칩을 이용한 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003; 24(2):360-70
24. 장성익, 진숙창, 이한배, 김성균, 이승희, 서영배, 이용구, 이영철. B 림과구와 비만세포에서 牡丹皮추출액의 항알러지 작용에 관한 研究. 대한한방내과학회지. 2003; 24(1):33-43.
25. Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. Cytokine Growth Factor Rev. 2003; 14(6):511-22.
26. 한동하, 정희재, 정승기, 이형구. 喘四君子湯과 水蠶(麻黃炒)가 인간기관지상피세포의 IL-6, IL-16, GM-CSF 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001; 22(4):604-11.
27. Briere F, Bridon JM, Servet C, Rousset F, Zurawski G, Bancheureau J. IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. Nouv Rev Fr Hematol. 1993; 35(3):233-5.
28. Takanaski S, Nonaka R, Xing Z, O' Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. J Exp Med. 1994; 180(2):711-5
29. Lasky JA, Brody AR. Interleukines involved in the pathogenesis of chronic airway inflammation. Resp Immunol. 1997; 148(1):39-47.
30. 이정희, 유진수, 이기중, 송민형, 한원교, 김평현, 이민천. TGF- β 1 유전자 도입된 EL4 세포의 in vitro와 in vivo 특성 연구. 대한면역학회지. 1998; 20(2):101-8.
31. Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, Nakao A. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. J Allergy Clin Immunol. 2002; 110(2):249-54.
32. 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.
33. 정승기, 황우석, 주창엽, 이재성, 조일현, 정희재. 청상보하탕의 기관지 천식환자에 대한 임상적 效果. 대한한의학회지. 2002; 23(4):151-60.
34. 장승규, 박양춘, 김병탁, 김동희. 지효음이 알러지반응과 폐손상에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001; 15(2):286-95.
35. 송상진, 김병탁, 박양춘. 가미사간마황탕의 항알러지 效果에 대한 실험적 연구. 동의생리병리학회지. 2001; 15(6):905-9.

36. Kemmerich B, Rossing TH, Pennington JE. Comparative oxidative microbicidal activity of human blood monocytes and alveolar macrophages and activation by recombinant gamma interferon. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136(2):266-70.
37. Saito H, Hayakawa T, Mita H, Yui YS, Shida T. Augmentation of leukotriene C4 production by gamma interferon in leukocytes challenged with an allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1988; 87(3):286-93.
38. Van Oosterhout AJ, Stam WB, Vanderschueren RG, Nijkamp FP. Effects of cytokines on beta-adrenoceptor function of human peripheral blood mononuclear cells and guinea pig trachea. *J Allergy Clin Immunol.* 1992; 90(3 Pt 1):340-8.
39. 김승수, 정회재, 정승기, 이형구. 神秘湯 및 加味神秘湯이 Allergy천식모델흰쥐의 BALF내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향에 관한 研究. *대한한의학회지.* 2002; 23(2):386-98.