

苓甘薑味辛夏仁湯이 Th 2 세포 분화 조절을 통해 알레르기성 비염에 미치는 효과

박수은 · 홍승욱

동국대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과교실

The Treatment Effect of *Younggamgangmishayin-tang* through Control of Th 2 cell Differentiation in Allergic Rhinitis

Soo-Eun Park · Seung-Ug Hong

Objectives : *Younggamgangmishayin-tang* is clinically used for the treatment of the allergic rhinitis. The aim of this study is to investigate the effects of *Younggamgangmishayin-tang* on allergic rhinitis.

Methods : The thirty rats were divided into three groups : control group, AR(allergic rhinitis elicited) group, YT(*Younggamgangmishayin-tang* treated after allergic rhinitis elicitation) group. To induce allergic rhinitis in AR group, YT group rats were sensitized intraperitoneally with 0.1% ovalbumin(OVA) solution 3 times at intervals of 1 week. Then intranasal sensitization was performed by diffusing 0.1% ovalbumin(OVA) solution 3 times at intervals of 2 days. After that time rats in YT group were oral administration treated by *Younggamgangmishayin-tang* for 7days. The change of the amounts of eosinophil, PAS, ZO-1, MIP-2, COX-2, IL-4 were observed in each group. Th 2 skewed condition in EL4 cell was induced by using PMA and OPL. *Younggamgangmishayin-tang* was added into EL4 cell by density. And then IL-4 mRNA was observed.

Results : In eosinophil study YT group was proved significant inhibitory effect. In PAS and ZO-1 YT group were preserved well. In MIP-2, COX-2 study YT group was proved significant inhibitory effect. In IL-4 and IL-4 mRNA study YT group was proved significant inhibitory effect.

Conclusion :According to the above results, it is considered that *Younggamgangmishayin-tang* has inhibitory effects on the allergic rhinitis rat models.

Key words : *Younggamgangmishayin-tang*, allergic rhinitis, Th 2 cell, IL-4

교신저자 : 홍승욱, 경기도 고양시 일산구 식사동 814
동국대 일산한방병원 한방안이비인후피부과
(Tel: 031-961-9085, Fax:031-961-9009,
E-mail: heentsu@duih.org)

• 접수 2008/02/25 • 수정 2008/03/28 • 채택 2008/04/07

서론

비염은 콧물, 재채기, 가려움증, 코막힘, 후비루 등의 증상을 동반하는 코 점막의 염증성 질환으로 정의하며, 이 중 알레르기성 비염이 전체 비염 중 과반수를 차지한다. 알레르기성 비염은 전체 인구의 10~50%에서 관찰되며, 특히 아시아에서는 성인의 10~40%, 소아의 10~46%에서 발생한다¹⁾. 구체적으로 한국에서는 알레르기성 비염의 유병률이 7.8%로 보고된 바 있지만 증상이 있어도 병원을 방문하지 않는 환자들을 고려하면 실제 유병률은 이보다 높을 것으로 생각된다²⁾.

한의학과 서양의학의 질병분류체계가 다르기 때문에 알레르기성 비염을 특정한방병명에 대응시킬 수는 없지만 鼻飧, 噴嚏, 鼻涕, 飧涕 등이 여기에 해당한다고 볼 수 있다. 이 질환의 원인은 肺氣虛弱으로 感受風寒하거나 脾肺氣虛로 水濕泛脾하여 발생하며, 또 腎氣虧損으로 인해 肺失溫煦하여 발생한다고 보았다. 그 치료법으로, 첫째 肺氣虛弱으로 인한 感受風寒型에는 寒則表之, 熱則清之, 疏散風寒, 溫肺散寒, 辛溫宣肺 등의 治法을 사용하고, 둘째 脾肺氣虛로 인한 水濕泛脾型에는 健脾益氣, 補中益氣의 治法을, 셋째 腎氣虧損으로 인한 肺失溫煦型에는 補腎助陽을 사용하고 있다³⁾.

알레르기성 비염의 치료와 관련된 선행 연구들을 살펴 보면 感受風寒型에는 蔘蘇飲⁴⁾, 麗澤通氣湯⁵⁾, 加味桂枝湯^{6,7)}, 通竅湯^{8,9)}을, 水濕泛脾型에는 補中益氣湯¹⁰⁾, 小青龍湯^{11,12)} 등의 처방이 알레르기성 비염에 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 肺失溫煦型에는 金匱腎氣丸加減, 吳茱萸丸, 六味地黃丸加減 등이 임상적으로 응용되어 왔다³⁾.

苓甘薑味辛夏仁湯은 《金匱要略》¹³⁾ “痰飲咳嗽病脈證病治” 篇에 최초로 茯苓甘草五味薑辛湯으로 기록되어 있는 方으로 茯苓, 甘草, 生薑, 五味子, 細辛, 半夏, 杏仁 7가지로 구성되어 있다. 이는 小青龍湯에서 麻黃, 桂枝, 芍藥을 去하고 利水作用이

있는 茯苓과 止咳平喘의 杏仁을 加한 것으로 小青龍湯證에서 表證은 없어지고 만성화하여 水毒과 冷症의 증상을 表現하는¹⁴⁾ 脾肺氣虛로 인한 水濕泛脾型 알레르기성 비염에 효과적인 것으로 알려져 있다. 그러나 이와 관련된 연구보고는 없는 실정이다.

이에 본 논문에서는 알레르기성 비염 마우스 모델을 이용하여 苓甘薑味辛夏仁湯을 경구 투여하였을 때 혈액 내 산호성 백혈구 변화, 비강 점막세포 변화, 점액분비세포 변화(PAS와 ZO-1), 염증반응(MIP-2와 COX-2), Th 2 세포분화조절(IL-4) 등의 변화, EL-4 세포를 통해 Th 2 세포분화에 관여하는 유전자 발현 변화 등을 관찰하여, 유효한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

대한실험동물센터에서 분양 받은 태령 6주된 BALB/c계 암컷 생쥐를 무균사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중이 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군, 알레르기성 비염 유발군(AR군) 그리고 알레르기성 비염 유발 후 苓甘薑味辛夏仁湯 투여군(YT군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

2) 세포주와 세포 배양

실험에 사용한 생쥐 EL4 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ incubator에서 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, 웰진, 대한민국)를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 1,000 unit/ml penicillin, 1,000 μg/ml streptomycin(Gibco/BRL,

USA)을 첨가하였다.

3) 苓甘薑味辛夏仁湯 추출물의 제조, 투여 및 첨가량 결정

苓甘薑味辛夏仁湯(*Younggamgangmishayin-tang*) 2첩을 증류수 500ml에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50ml로 감압-농축하여 YT군에 알레르기성 비염 유발 후 7일 동안 2.5ml/kg/day 량으로 구강 투여 하였다. *In vitro*에 사용되는 苓甘薑味辛夏仁湯의 추출물은 감압-농축 후 동결 건조한 것을 사용하였고, MTT assay 결과 苓甘薑味辛夏仁湯 추출물 10 mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0 mg/ml를 첨가량으로 결정하였다.

Table 1. The Amount and Composition of YG Extract

Herbal Name	Scientific Name	Dose(g)
茯苓	<i>poria</i>	8g
半夏	<i>penallia rhizoma</i>	10g
杏仁	<i>armeniaca amarum semen</i>	6g
甘草	<i>glycyrrhizae radix</i>	6g
乾薑	<i>zingberis rhizoma</i>	6g
細辛	<i>asari herba cum radice</i>	6g
五味子	<i>schizandrae fructus</i>	6g
Total Amount		48g

Abbreviation :YG, *Younggamgangmishayin-tang*

Table 2. The Primer of IL-4 and β -actin mRNA

Primer		Primer sequences	Product (bp)	No. of cycles
IL-4	sense	5'-TAGTTGTCATCCTGCTCTT-3'	404	35
	antisense	5'-CTACGAGTAATCCATTTGC-3'		
β -actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

Abbreviation : IL-4, interleukin-4.

2. 실험 방법

1) Th 2 세포 분화 조절 유전자의 발현 억제 효과 조사

Th 2 세포 분화의 주도적 역할을 하는 cytokine은 IL-4이다. 苓甘薑味辛夏仁湯의 IL-4 mRNA 발현 억제를 통한 치료 효과를 조사하기 위해서 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA, Sigma)과 4-*tert*-Octylphenol(OP, Sigma)를 이용하여 EL4 세포의 Th 2 skewed condition을 유발시켰다. EL4 세포 - 5×10^5 cells/well을 6 well에 plating하고 12시간 후에 PMA(Final 1 ng/ml)과 OPI(Final 5 μ m/ml)를 1시간 처리하여 IL-4 mRNA 발현 증가를 유도한 다음 苓甘薑味辛夏仁湯 추출물 0.5, 1, 1.5 그리고 2 mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 배양한 EL4 세포의 RNA를 trizol reagent(Sigma)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer(introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, IL-4 primer를 PCR machine으로 온도 조건에 따라 반응시켰다(Table 2). PCR 산물은 1-2% agarose gel 상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

2) 알레르기성 비염 유발 생쥐 코 점막 손상에 대한 치료 효과 관찰

① 알레르기성 비염의 유발

알레르기성 비염 유발을 위해 ovalbumin(OVA : chicken egg albumine, grade V, Sigma, USA)을 항원으로 사용하였다. 인산완충용액(PBS : phosphate buffered saline)과 수산화알루미늄겔(Al(OH)₃ gel, Sigma)을 1:1로 하여 OVA 1mg을 PBS와 수산화알루미늄겔용액에 혼합하여 1ml를 만들어 0.1% OVA용액이 되도록 하였다. 대조군, AR군 그리고 YT군에게 알레르기성 비염 유발 시작 21, 14, 7일전에 0.1% OVA용액을 복강 주사하여 감각시켰다. 최종 감각 7일 경과 후 7일 동안 격일로 3회씩 0.1% OVA용액을 생쥐 비강에 점적하여 알레르기성 비염을 유발하였다. 유발은 콧물과 코 긁기 행동으로 확인하였다.

② 산호성 백혈구(eosinophil) 변화 조사

알레르기성 비염의 대표적 지표인 산호성 백혈구의 혈액 내 빈도 변화를 조사하기 위해 우선 심장천자(cardiac puncture)로 채혈한 후, Hinkelmann 용액에 희석한 다음 Neubauer 계산반(Superior, Germany)으로 계수하였다.

③ 코 점막 조직표본 제작

알레르기성 비염 유발 7일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 머리 분리 후 비강 주변 구조물을 제거한 다음 10% NBF에 실온에서 24시간 동안 고정된 후 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 동안 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5 μm 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin과 Eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

④ 점액분비세포 변화 관찰

㉞ 중성점액분비세포 변화 관찰

중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 점액분비세포의 변화를 조사하기 위해서 periodic acid-schiff reaction(PAS) stain을 실시하였는데, 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그런 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 Hematoxylin에서 1분 동안 대조 염색하였다.

㉟ 점액분비세포의 폐쇄이음 단백질 변화 관찰

폐쇄이음 단백질의 하나인 zonula occludin(ZO-1) 분포 변화 관찰을 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K(20 μg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti mouse ZO-1(1:20, Santa Cruz Biotech)에 4℃ humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG(1:100, Santa Cruz Biotech)에 4℃ humidified chamber에서 24시간 link하였고, 그런 후 avidin biotin complex kit(Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조 염색하였다.

㊱ 염증 변화 관찰

㉞ 혈관신생성 cytokine의 변화 관찰

혈관신생성에 관여하는 IL-8 유사 chemokine인 macrophage inflammatory protein(MIP)-2 분포 변화를 rabbit anti mouse MIP-2(1:100, Santa Cruz Biotech)을 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다.

㉟ 염증효소 cyclooxygenase(COX)-2의 변화 관찰

염증 효소인 COX-2의 조직내 분포를 조사하기 위해 rabbit anti-mouse COX-2(1:250, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

⑥ 점막내 Th 2 세포 분화 변화 관찰

점막내에서 Th 2 세포의 분화에 관여하는 IL-4의 분비 변화를 조사하기 위해 goat anti-mouse IL-4(1:250, Santa Cruz Biotec)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

3) 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 본 실험 결과는 Sigma plot 2000(Sigma, USA)을 통한 Student t-test로 유의성을 검증하였고 P<0.05의 경우 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 산호성 백혈구 변화

혈액내 산호성 백혈구 수를 조사한 결과, 대조군에 비해 AR군에서는 그 수가 증가한 반면, YT군에서는 AR군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. 1319±130개/μl인 대조군에 비해 AR군은 149%나 증가한 3288±364개/μl로 측정되었다. 이에 반해 YT군에서는 AR군에 비해 40% 감소된 2006±109 개/μl로 측정되었다(Fig. 1).

2. 코 점막 손상 완화 효과

1) 일반적인 형태 변화

코 점막 손상이 제일 심한 지역은 코 증격(nasal septum)에 근접한 코선반(concha) 주변의 점막이었고, 섬모(cilia) 손상, 점액분비세포의 분비 증가, 점막 고유층 내 염증관련세포의 이주 증가 등이 관찰되었다. AR군에서 심한 손상이 대부분의 점막에서 관찰되었으나, YT군에서는 일부 지역에서만 점막 손상이 관찰되었다(Fig. 2-A).

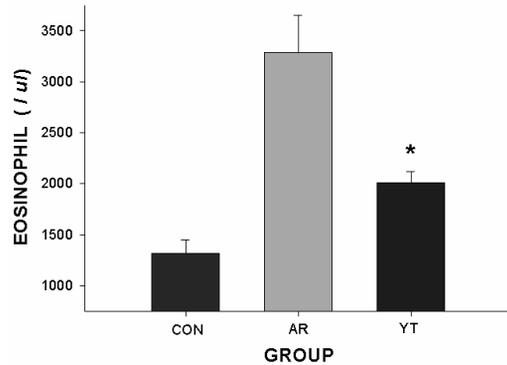


Fig. 1. The decrease of eosinophil in YG treated mice after AR elicitation.

The number of eosinophil in YT noticeably decreased than AR and this decrease had probability in P<0.05 of student t test.

* Abbreviation

YG : Younggamgangmisinhayin-tang;

AR : allergic rhinitis

CON: control group

AR : AR elicited group

YT : YG treated group after AR elicitation

* P < 0.05 compared with AR

2) 점액분비세포의 변화

① 중성점액분비세포 변화

코 점막의 술잔세포(goblet cell)에서는 중성 점액질이 분비되는데, 알레르기성 비염 유발 후 분비 증가와 이에 따른 술잔세포 붕괴가 관찰되었다. 중성 점액질에 대한 PAS양성반응이 YT군의 대부분의 술잔세포에서는 관찰되지만, AR군에서는 거의 모든 술잔세포가 비어있는 것으로 관찰되었다(Fig. 2-B).

② 점액분비세포의 폐쇄이음 단백질 변화

ZO-1 양성반응은 점액분비세포 이음복합체의 상층부인 폐쇄이음 부위 세포막에서 잘 관찰되었는데, 알레르기성 비염 유발 후 ZO-1 양성반응은 감소하였다. 점액세포 이음복합체가 심하게 손상 받은 AR군에서는 ZO-1 양성반응이 대조군에 비해

65% 감소하였다. 한편 이음복합체가 잘 유지된 YT군에서는 AR군에 비해 ZO-1 양성반응이 142% 증가하였고, ZO-1 양성반응을 점액분비세포 사이 세포막 상층부에서 다수 관찰할 수 있었다 (Table 3, Fig. 2-C).

3) 염증반응의 변화

① 혈관신생성 cytokine의 변화

혈관신생성에 관여하는 MIP-2 양성반응은 AR군에서는 증가하였다. 모세혈관주변 세포에서 관찰된 MIP-2 양성반응은 대조군에 비해 351% 증가하였다. 이에 반해 YT군에서는 AR군에 비해 61% 감소한 것으로 관찰되었다(Table 3, Fig. 2-D).

② 염증효소 COX-2의 변화

염증효소인 COX-2의 양성반응세포의 분포는 AR군에서는 증가하는 반면 YT군에서는 감소하였다. 이런 COX-2 양성반응세포는 점막고유관 기저부에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. COX-2 양성반응의 영상분석 결과 AR군은 대조군에 비해 1008% 증가하였고, YT군은 AR군에 비해 72% 감소하였다(Table 3, Fig. 2-E).

Table 3. The Image Analysis of ZO-1, MIP-2 and COX-2 Positive Reaction in YT after Allergic Rhinitis(AR) Elicitation.

Antibody	Group		
	CON	AR	YT
ZO-1	4186±53	1452±77	3511±138*
MIP-2	229±16	1033±81	401±8*
COX-2	142±24	1573±48	449±13*

(image analysis for 100,000 particles / range of intensity :80-120)

Abbreviation

M ± S,D : Mean ± Standard Deviation, CON : control group, AR : AR elicited group

YT : YG treated group after AR elicitation, ZO-1 : zonula occludin-1

MIP-2 : macrophage inflammatory protein-2, COX-2 : cyclooxygenase-2

* P < 0,05 compared with AR.

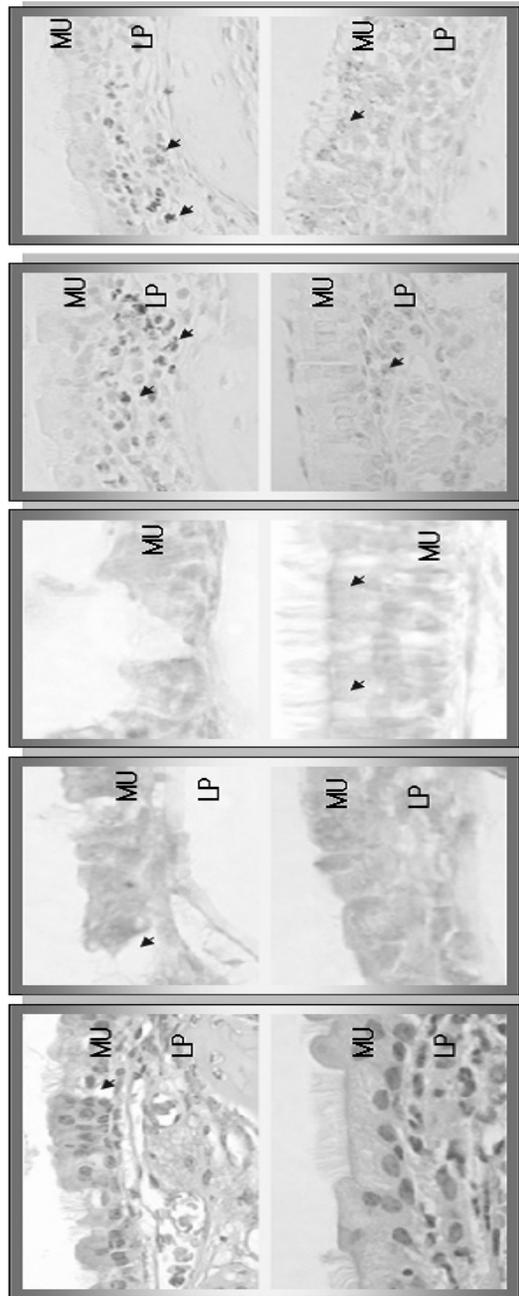


Fig. 2. The cure effect of YG for AR caused mucosa damages.

A, Mitigative Damage (H&E, x1000). The damage of mucosa as disruption of cilia in respiratory cell and vacant mucose secreting cell(arrow) were increased AR, but YT same as normal configuration.

B, Configuration of goblet cell (PAS, x1000). The

- decrease of PAS positive cell(arrow) were shown in AR, but goblet cell occupied with neutral mucous were shown in YT.
- C. Increase of ZO-1 (ZO-1 immunohistochemistry, x1000), The distribution of ZO-1 positive reaction(arrow) were decreased in AR, but increased in YT.
- D. Decrease of CXC chemokine (MIP-2 immunohistochemistry, x400), The distribution of MIP-2 positive reacted cell(arrow) were increased in AR, but decreased in YT.
- E. Decrease of inflammatory enzyme (COX-2 immunohistochemistry, x400), The distribution of COX-2 positive reacted cell(arrow) were increased in AR, but decreased in YT.

Abbreviation

AR : AR elicited group, YT : YG treated group after AR elicitation, MU : mucose secreting cell layer, LP: lamina propria, ZO-1: zonula occludin-1, MIP-2: macrophage inflammatory protein-2, COX-2: cyclooxygenase-2.

3. Th 2 세포 분화 억제를 통한 치료 효과

1) IL-4 mRNA 발현 억제

EL-4 세포에서 PMA와 OP 자극에 의한 IL-4 mRNA 발현은 증가하였는데, 苓甘薑味辛夏仁湯 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 苓甘薑味辛夏仁湯 추출물 처리 후 IL-4 mRNA 발현량은 0.5 mg/ml에서 25%, 1 mg/ml에서 25%, 1.5 mg/ml에서 42%, 2 mg/ml에서 46%가 감소하였다(Fig. 3-A).

2) 점막내 IL-4 생성 억제

점막고유층에서 관찰되는 IL-4 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났으며, AR군에 비해 YT군에서 IL-4 양성반응세포가 감소된 것으로 관찰되었다. AR은 대조군에 비해 666% 증가한 반면, YT군에서는 AR군에 비해 72% 감소하였다(Table 4, Fig. 3-B).

Table 4. The Inhibition of Interleukin(IL-4) as Th 2 cell Differentiation Intricated Cytokine in YT after AR Elicitation.

Antibody	Group		
	CON	AR	YT
IL-4	134±9	1206±82	343±42*

Abbreviation same as Table 3.

*P < 0.05 compared with AR

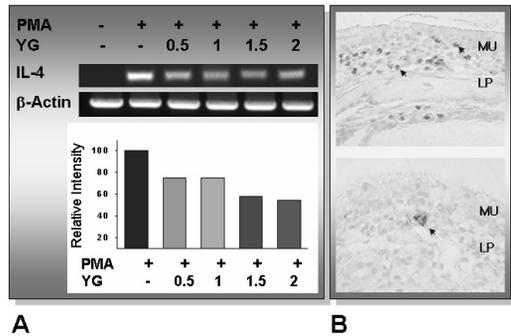


Fig. 3. The inhibition of Th 2 cell differentiation by YG.

A. *In vitro* (IL-4 mRNA expression).

The phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA) and 4-tert-Octylphenol(OP) induced IL-4 mRNA expression were dose-dependantly decreased in YG treated EL4 cell.

B. *In vivo* (IL-4 immunohistochemistry, x400).

The distribution of IL-4 positive reacted cell(arrow) in lamina propria were increased in AR, but decreased in YT.

Abbreviation same as Fig. 2.

IV. 고찰

한의학에서 알레르기성 비염은 鼻鼾 噴嚏 鼻塞 등의 범주에 속한다. 鼾에 대해 《醫學入門》¹⁵⁾에서는 ‘鼾者 鼻流涕也’라 하였고, 《萬病回春》¹⁶⁾에서는 ‘鼻流涕者 屬肺寒也’라 하여 鼾를 肺寒症으로 인식하였으므로 알레르기성 비염에서 수양

성 비루 증상에 해당한다고 볼 수 있다. 嚏는 《黃帝內經靈樞》¹⁷⁾에서 ‘陽氣和利, 滿于心, 出于脾, 故爲嚏’라 하였고 劉河間¹⁸⁾은 ‘嚏者 鼻中因痒而氣噴作于聲也’라 하였는데 이는 알레르기성 비염에서 발작적으로 하는 재채기 증상에 해당한다. 鼻塞은 《醫學入門》¹⁵⁾에서 ‘寒傷皮毛則鼻塞不利 火鬱清道則 香臭不知 新者偶感風寒 鼻塞聲重 流涕噴嚏’라고 하였고 《黃帝內經素問》¹⁹⁾에서 ‘西方白色, 入通於肺, 開竅於鼻’라 하여 脾와 肺가 밀접한 연관이 있음을 설명하였다.

발병 원인은 脾, 肺, 腎의 虛損 및 七情內鬱 등의 內因, 飮食, 勞役의 不內外因, 風寒邪氣의 침범 運氣, 六淫, 外傷 등의 外因 등으로 구분할 수 있다²⁰⁾. 飮食勞役은 식이성 항원과 신체적 피로가 여기에 해당하며, 七情內鬱은 精神, 情緒, 心理的素因과 스트레스가 여기에 해당하고 六淫外傷은 이상기후와 각종 外部 과민성 즉 寒熱變化, 화학기체, 자극성 냄새, 연기, 먼지, 화분 등이 여기에 해당한다고 볼 수 있다²¹⁾. 특히 명대 전후로는 風寒邪의 皮毛 鼻竅로의 침입과 肺氣와의 관계를 주요 원인으로 보고 있으며 또 風寒邪가 시간이 경과하게 되면 熱鬱 肺伏火邪 內外變發의 病理변화가 발생한다고 보고 있다.

치법은 주로 脾肺腎의 正氣를 도와주면서 邪氣를 제거하는 扶正祛邪의 방법이 쓰이며, 病因에 따라 溫補肺藏 祛風散寒 健脾益氣 補腎納氣 등의 방법이 사용된다.

苓甘薑味辛夏仁湯은 東漢의 張機가 撰한 《金匱要略》¹³⁾ 중 “痰飲咳嗽病脈證病治”篇에 茯苓甘草五味薑辛湯으로 최초로 기록되어 있는 方으로 구성 약물은 甘淡平無毒하며 利水滲濕, 健脾補中, 寧心安神作用이 있는 茯苓과 甘平無毒하고 補裨益氣, 清熱解毒, 潤肺止咳, 調和諸藥의 작용이 있는 甘草와 酸溫無毒하며 斂肺滋腎, 生津斂汗, 澀精止瀉作用이 있는 五味子와, 辛熱無毒하며 溫中回陽, 溫肺化痰, 溫經止血作用이 있는 細辛과 辛溫無毒하며

降逆止嘔, 燥濕祛痰, 消痞散結作用이 있는 半夏와 苦溫有小毒하며 止咳定喘, 潤腸通便作用이 있는 杏仁 등 七味이다^{22,23)}.

茯苓은 利水の 藥으로 胃內停水를 제거하고 小便不利와 心悸를 治하며, 杏仁은 胸間停水를 제거하고 喘, 呼吸困難, 浮腫을 治하고 茯苓과 半夏와 함께 利水作用을 돕는다. 五味子は 收斂性 鎮咳藥으로서 咳逆과 胃를 治하고 半夏, 杏仁의 鎮咳作用을 도우며, 細辛은 冷한 宿飲停水를 主治하며 五味子, 半夏와 함께 心下水氣로 인한 咳嗽을 진정시키고 乾薑과 배합하면 胃內停水를 제거하며 四肢厥冷을 治한다. 乾薑은 溫藥으로서 行水作用이 있어 水毒이 上方으로 치밀어 오르는 것을 治하며, 甘草는 諸藥을 調和시키는 作用을 한다고 하였다²⁴⁾.

본방은 小青龍湯에서 麻黃, 桂枝, 芍藥을 去하고 利水作用이 있는 茯苓과 止咳平喘의 杏仁을 加한 것으로 小青龍湯證과 같이 喘鳴, 咳嗽, 水腫에 사용되지만 貧血의 경향이 있고 脈은 沈하며 弱하고 冷症으로서 手足이 冷하고, 發熱, 惡寒, 頭痛, 身體疼痛 등의 表熱症狀은 이미 없으며 만성화하여 虛象으로 移行하고 水毒의 증상으로서의 胃內停水, 心悸亢進, 喘咳, 利尿減少, 浮腫 등이 있는 자를 목표로 한다. 구성 약물의 대부분이 溫性的 驅水劑로서 內의 寒과 水를 따뜻하게 하여 배설을 촉진시킨다¹⁴⁾.

따라서 肺氣虛弱으로 感受風寒하거나 脾氣虛弱으로 水濕侵脾하여 발생한다고 보여지는 알레르기성 비염에 효과적일 것으로 사료되어 본 실험에 임하였다.

이에 본 논문에서는 苓甘薑味辛夏仁湯의 효과를 알아보기 위해 실험용 생쥐 10마리를 한 군으로 하여 대조군(CON군), 알레르기성 비염 유발군(AR군), 그리고 알레르기성 비염 유발 후 苓甘薑味辛夏仁湯 투여군(YT군) 등 세 군으로 나누어 산호성 백혈구 변화, 비강 점막세포 변화, 점액분비세포 변화(PAS와 ZO-1), 염증반응(MIP-2와 COX-2),

Th 2 세포분화조절 (IL-4) 등의 변화를 알아보고 EL-4 세포를 통해 Th 2 세포분화에 관여하는 유전자 발현 변화를 관찰하였다.

산호성 백혈구는 IgE 매개 알레르기 질환에서 가장 중요한 효과기 세포의 하나로서 아토피 개체의 기관지, 비강, 피부 등에 다량 침착하여 활성화 및 탈과립에 의한 과립단백을 분비함으로써 조직 손상을 유발하여 알레르기 질환을 일으킨다²⁵⁾. 또한 혈관 투과성을 증가시켜 조직 부종 등을 유발시키며, 산호성 백혈구 자신과 다른 염증 반응세포를 유입시켜 염증 반응을 지속시키고, MBP(major basic protein), ECP(eosinophil cationic protein) 등의 세포 독성 단백질에 의해 점막을 손상시켜 점막 박탈 등을 초래함으로써 과민성을 증가시킨다²⁶⁾. 또한 조직에 국소화된 산호성 백혈구는 PAF(platelet activating factor)에 의하여 활성화되어 여러 과립단백을 분비하며 superoxide anion을 생성하여 조직손상을 초래한다²⁵⁾. 이러한 혈액 내 산호성 백혈구 수를 조사한 결과, 대조군에 비해 AR군은 149%나 증가한 반면 YT군에서는 AR군에 비해 40% 감소되는 유의성 있는 결과가 나타났다. 이는 알레르기성 비염을 유발한 후 가미통규탕을 투여해 투여하지 않은 경우보다 산호성 백혈구 수가 41% 감소한 결과를 얻은 유²⁷⁾의 연구보고와 비슷하게 나타났다. 또한 보중익기탕을 투여한 김¹⁰⁾, 소청룡탕을 투여한 송¹¹⁾의 연구에서도 산호성 백혈구가 유의성 있게 감소되는 것으로 보여졌다..

일반적으로 코 점막의 조직학적 구조는 점막층, 상피층, 기저층, 고유층으로 구성되어 있고 정상적인 코 점막 상피는 섬모 원주세포, 배세포, 무섬모 기저세포 등이 고르게 분포되어 있다²⁸⁾. 코 점막에는 중요한 염증세포인 비만세포, 산호성 백혈구, 호중구, 림프구 및 형질 세포 등이 있고 상피하층에는 분비선, 혈관 등이 자리 잡고 있어, 각종 감염성 질환이나 알레르기 반응에 있어서 조직학적

변화와 증상 발현을 유발시키게 된다²⁹⁾. 보통 기저면 상부에서는 산호성 백혈구나 호염기구가 없으며, 염증에 의해 중등도의 호중구 침윤이나 약간의 세균이 관찰된다. 그러나 알레르기성 코 점막에서는 이런 균형이 붕괴되면서 배세포의 증가, 섬모세포의 손실, 선세포의 비후, 비만세포, 산호성 백혈구 및 호염구의 증가, 혈관의 투과성 증가 등의 각종 변화가 초래된다. 이런 변화는 알레르기성 비염이 만성화되면서 점막하 부위 즉 고유층이 섬유화되어 점막 자체의 비가역적 비후가 일어나게 된다³⁰⁾. 본 실험의 AR군에서는 섬모(cilia) 손상, 점액분비세포의 분비 증가, 점막 고유층 내 염증관련 세포의 이주 증가 등이 관찰되었으며 이러한 심한 손상이 대부분의 점막에서 관찰되었으나, YT군에서는 일부 지역에서만 점막 손상이 관찰되어 茶甘薑味辛夏仁湯이 점막 손상을 완화시키는 것으로 나타났다. 이와 관련하여 김¹⁰⁾의 연구에서도 알레르기성 비염을 유발하고 보중익기탕을 투여한 경우 투여하지 않은 경우보다 섬모 손상이 적고 점막하조직도 정상군과 같이 잘 보존된 것으로 나타났으며 송¹¹⁾의 연구에서도 소청룡탕이 코 점막 손상을 완화시키는 것으로 나타났다.

ZO-1은 세포 최외부의 세포간 결합인 치밀이음부(tight junction) 관련 단백질로, 상피세포의 극성을 유지하는데 중요한 뿐만 아니라 세포의 환경을 세포내 신호경로로 연결하고 세포골격을 유지하는 데 중요한 단백질이다^{31),32)}. 이러한 ZO-1의 양성반응은 점액분비세포 이음복합체의 상층부인 폐쇄띠 부위세포막에서 잘 관찰되었는데, 알레르기성 비염이 유발된 AR군은 대조군에 비해 ZO-1 양성반응이 65% 감소하였고 YT군은 AR군에 비해 142% 증가된 양상을 보였다. 또한 AR군에서는 술잔세포에서의 중성 점액질 분비증가와 이에 따른 술잔세포의 붕괴가 관찰되었으나 YT군에서는 별다른 손상이 없는 것으로 나타나 茶甘薑味辛夏仁湯이 점액분비세포의 변화를 억제하는데 효과적

인 것으로 나타났다.

점막내의 급격한 Th 2 skweed condition은 전사인자 nuclear factor kappa B(NF- κ B)의 활성화에 의한 염증상황을 유도한다. 전사인자 NF- κ B는 proinflammatory cytokine에 활성화가 유도되어 COX-2와 iNOS 등의 염증 효소와 세포부착분자 ICAM-1등의 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다^{33,34,35}. 본 실험에서도 COX-2 양성반응은 점막과유관 기저부와 핵막 주변 세포질에서 많이 나타났는데 AR군은 대조군에 비해 100% 증가하였고 YT군은 AR군에 비해 72% 감소하는 경향을 보였다. 유도성 동종효소(inducible isoform)로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostagladin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스성 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관이완과 혈관신생성에도 관여한다^{36,37,38}. 또한 같이 혈관신생성에 관여하는 IL-8 유사 chemokine인 MIP-2³⁹도 모세혈관 주변 세포에서 대조군에 351%나 증가한 상태로 관찰되었으나 YT군에서는 AR군에 비해 61% 감소된 양상으로 나타나 茶甘薑味辛夏仁湯이 염증반응의 변화를 억제하는 것으로 나타났다.

면역반응 유도는 상당부분이 분화된 Th 세포가 분비하는 cytokine에 의해서 결정되는데, IL-4의 자극에 의한 Th 2 세포의 과도한 분화는 IL-4, IL-5, IL-6 분비 증가로 기인된 알레르기성 비염을 야기한다. IL-4에 의한 Th 2 반응은 Janus family tyrosine kinase(Jak) - signal transducers and activators of transcription(STAT) 경로를 통해 ligand 자극에 대한 특정 반응을 정확하고 빠르게 유도한다. 즉 Jak1&Jak3의 활성화는 해당 수용체의 특정 tyrosine residue의 인산화를 유도함으로써 수용체가 Sic homology 2 domain을 매개로한 STAT6과 결합을 이룰 수 있는 docking site를 형

성하도록 유도한다. 이어서 cytoplasmic protein인 STAT의 수용체로서의 recruitment가 일어나면 STAT은 receptor-associated Jak에 의하여 conserved tyrosine residue의 인산화를 겪은 후, 수용체로부터 유리되어hetero-dimerization을 이룬 다음 핵으로 전위되어 IL-4 유전자의 promoter인 STAT-response element에 결합하여 전사조절인자로서 작용함으로써 유전자의 발현을 유도하게 된다⁴⁰. Th 2 세포로 IL-4을 분비하여 IgE의 합성과 IgE 수용체의 발현을 유발한다⁴¹. AR군의 비강 점막내에서 IL-4 양성반응세포의 분포 증가가 관찰되었으며, IL-4 양성반응세포는 림프구형으로 핵주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이에 반해 YT군에서는 AR군에 비해 72% 감소된 양성반응을 보였는데 이는 유²⁷의 가미통규탕을 투여했을 때 60.2% 감소한 것보다 더 효과적인 결과를 나타냈다. EL-4 cell에서 PMA와 OP 자극된 IL-4 mRNA 발현에도 茶甘薑味辛夏仁湯 추출물이 농도-의존적으로 발현을 감소시키는데 유의한 효과가 있는 것으로 나타나 茶甘薑味辛夏仁湯이 Th 2 세포의 분화 조절에 관여함을 알 수 있었다.

茶甘薑味辛夏仁湯 처리 후 산호성 백혈구 수는 감소하였고, 코 점막 손상과 점막분비세포 손상이 완화되었으며 특히 폐쇄이음단백질인 ZO-1이 유지됨으로써 점막분비세포의 배열을 견고히 유지할 수 있었다. 또한 혈관신생성 ckemokine인 MIP-2 발현 억제를 통한 혈관신생성의 억제와 염증효소 COX-2 생성을 억제해 통해 염증으로 인한 조직 손상을 완화시켰다. 그리고 PMA와 OP로 자극된 EL-4 cell에서 IL-4 mRNA 발현 억제와 점막 조직내 IL-4 분포 감소를 통해 과도한 Th 2 세포 분화를 조절하였다. 이상의 결과로 茶甘薑味辛夏仁湯은 Th 2 세포조절을 통한 알레르기성 비염의 진행을 차단시키는 것으로 보여진다. 이에 表熱症狀은 없으면서 虛象으로 이행한 冷症과 水毒 증상을 보이는 알레르기성 비염 환자에게 임상적으로

효과적일 것으로 기대되며 추후 이에 따른 활용과 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

荳蔻薑味辛夏仁湯의 알레르기성 비염에 대한 치료효과를 조사하기 위해 행해진 본 연구는 생쥐 코 점막에 OVA 항원자극을 가하여 인위적으로 알레르기성 비염을 유발시킨 후 荳蔻薑味辛夏仁湯을 투여하여 혈액내 산호성 백혈구 변화, 비강 점막세포 변화, 점액분비세포 변화(PAS와 ZO-1), 염증반응(MIP-2와 COX-2), EL-4 세포를 이용한 Th2 세포 분화에 관여하는 유전자 발현 변화, Th2 세포분화조절(IL-4) 변화 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 荳蔻薑味辛夏仁湯 투여 후 알레르기성 비염의 지표인 혈액내 산호성 백혈구 수가 감소되었다.
2. 荳蔻薑味辛夏仁湯 투여 후 코 점막의 손상과 점액분비세포의 변화(점액분비세포 붕괴, ZO-1 손상)가 억제되었다.
3. 荳蔻薑味辛夏仁湯 투여 후 혈관신생성 chemokine인 MIP-2 발현 억제를 통한 혈관신생성이 억제되었고 염증효소 COX-2의 생성도 감소되었다.
4. 荳蔻薑味辛夏仁湯 투여 후 EL-4 cell에서 IL-4 mRNA 발현 억제되었으며 피부 조직내 IL-4 분포가 감소되었다.

이상의 결과로 荳蔻薑味辛夏仁湯은 Th 2 세포 조절을 통해 초기 알레르기성 비염의 진행을 차단하여 이후 진행되는 혈액학적 및 비점막의 관점에서 알레르기성 비염의 염증 상황을 개선하는데 유효한 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Pawankar R. Allergic rhinitis and asthma: the link, the new ARIA classification and global approaches to treatment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:1-4.
2. Cho SH, Kim YK, Shon JW, Kim WK, Lee SR, Park JK, et al Prevalence of chronic rhinitis in Korean children and adolescents. *J Asthma Allergy Clin Immunol* 1999;19:452-458.
3. 염승철. 알레르기비염 치료의 최신경향에 관한 동서의학적 고찰. *선무학술논집*. 2006;17(1): 191-214.
4. 남봉수, 김운범. 蔘蘇飲과 蔘蘇飲加味方의 항알레르기 효과에 관한 실험적 연구. *대한안이비인후피부과학회지*. 2002;15(1):343-355.
5. 박진구, 채병윤. 麗澤通氣湯과 麗澤通氣湯加味方의 항알레르기 효과에 대한 실험적 연구. *동의학회지*. 2001;5(1):76-97.
6. 심성용, 김경준. 加味桂枝湯이 알레르기 비염에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *한방안이비인후피부과학회지*. 2004;17(1):45-54.
7. 박진미, 심성용, 변학성, 김경준. 加味桂枝湯이 알레르기 비염에 미치는 효과에 대한 연구. *한방안이비인후피부과학회지*. 2005;18(1):234-240.
8. 정진영, 김운범. 通竅湯이 알레르기 비염 모델 흰쥐에 미치는 영향. *대한 안이비인후피부과학회지*. 2005;18(2):35-50.
9. 천승철, 이상곤, 지선영. 通竅湯加味方을 투여하여 치료한 알레르기성 비염환자의 만족도에 대한 임상보고. *대한안이비인후피부과학회지*. 2002;15(2):145-155.
10. 김종성, 심성용, 엄유식, 남혜정, 김경준. 補中益氣湯이 알레르기 비염 유발 백서의 과립구 및 조직학적 변화에 미치는 효과. *한방안이비*

- 인후 피부과학회지. 2004;17(1):66-74.
11. 송생엽, 심성용, 김경준. 小青龍湯이 알레르기 비염 유발 백서의 과립구 및 조직학적 변화에 미치는 효과. 한방안이비인후피부과학회지. 2004;17(1):75-81.
 12. 박주호, 심성용, 엄유식, 남혜정, 김경준. 小青龍湯이 알레르기 비염에 미치는 효과에 대한 실험적 연구. 한방안이비인후피부과학회지. 2004;17(1):55-65.
 13. 김정범 편. 金匱要略辨釋. 서울:한의학문화사. 2000:345.
 14. 이대희. 도설한방진료요방. 서울:의학연구사 1996:515-6.
 15. 李梴. 醫學入門. 남창:강서과학기술출판사. 1988.
 16. 龔廷賢저, 주갑덕역. 國譯萬病回春(하권). 서울:계축문화사. 1997:43-5.
 17. 홍원식역. 黃帝內經靈樞. 서울:전통문화연구회. 1995:238-46.
 18. 劉完素. 河間三六書. 서울:성보사. 1976:275-6.
 19. 홍원식역. 黃帝內經素問. 서울:전통문화연구회. 1995:37-8.
 20. 張梅芳. 李云英. 眼科與耳鼻喉科傳病中醫臨床診治. 北京:人民衛生出版社. 2000:410-39.
 21. 이해자, 박은정. 알레르기성 비염의 임상적 연구. 대한한방소아과학회지. 2001;15(2):167-75.
 22. 신민교. 임상본초학. 서울:영림출판사. 1986:172, 175-176, 232, 241, 250, 253-254, 260, 308, 310, 420, 512, 556-557, 564, 566, 629.
 23. 이상인. 한약임상응용. 서울:성보사. 1986:46-47, 151-152, 203, 323-324, 387, 463, 475.
 24. 박종갑. 한방치방해설 대구:문광도서공사 1986: 624-626.
 25. 이준성. 산호성 백혈구와 혈소판활성인자. 알레르기학회지. 1993;15(2):173-4.
 26. 김미경. 천식과 호산구. 알레르기학회지. 1996; 16(1):8-14.
 27. Hyun-Jung Yu, In-Hwa Choi. The Effect of Gamitongkyutang Distillate in with Allergic hinitis. 대한한의학회지. 2006;27(2): 196-210.
 28. Mygid N. Conventional medical treatment. In Nasal allergy. and ed. London, Blackwell scientific Publication, 1979:257-271.
 29. 이성만. 기니픽 비강내 Leukotriene D4 투여가 비강통기도 및 코 점막 미세구조에 미치는 영향에 관한 연구. 석사학위논문. 경희대학원 1996.
 30. Pipkom U, Karlsson G, Enerback L. Cellular response of the human allergic nasal mucosa to natural alergen response. J Allergy Clin Immunol. 1988;82:1046-50.
 31. Balda MS, Mater K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate erb-2 expression, Eur Mol Biol Org. 2000;19:2024-33.
 32. Jeong YK, Lee MJ, Lim SC, Kee KH, Jeon HJ, Suh CH. Expression of osteoponin, ZO-1 and E-cadherin in adenoma and adenocarcinoma of the colon. Kor J Pathol. 2005;39 :242-50.
 33. Andrea H., Thomas k., Josef P. and Konrad S. : Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. Biochemica et Biophysica Acta. 2000;1485: 63-99.
 34. Baeuerle P. A. : I κ B-NF- κ B structure: at the interface of inflammation control. Cell 1998;95: 729-731.
 35. Z. Morise, S. Komatsu, J. W. Fuseler, D. N. Granger, M. Perry, A.C. Issekutz, and M. B. Grisham : ICAM-1 and P-selectin expression in a model of NSAID-induced

- gastropathy. *Am J Physio*. 1998;27:246-252.
36. Groszmann, R.J. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 1993; 17(2):38-40.
37. H. J. Rothkötter, R. Pabst, and M. Bailey : Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen, *Vetrinary Immuno immunopath*. 1999;72:157-165.
38. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93(5):705-716.
39. Yoshida S., Ono M., Shono T., Izumi H., Ishibashi T., Suzuki H., Kuwano M. : Involvement of IL-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in TNF- α dependent angiogenesis. *Mol. Cell Biol*. 1997;17:4015-4023.
40. 이충은. JAK-STAT pathway를 경유하는 cytokine과 호르몬의 작용 기전. *대한내분비학회*. 2000;15(3): 367-387.
41. Friedmann P. S., Tan B. B., Musaba E., Pathogenesis and management of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*. 1995;25: 799-806.