

保肺養營煎이 알레르기 염증반응에서 Cytokines 및 Transcription에 미치는 영향

이재혁 · 김홍기 · 신우진 · 김진영 · 박동일*

동의대학교 한의과대학 한의학과

Anti-allergic Effect of Bopyeoyangyeong-jun to Cytokines and Transcription

Jae Hyuk Lee, Hong Gi Kim, Woo Jin Shin, Jin Young Kim, Dong Il Park*

Department of Oriental Medicine, Graduate School Dong-Eui University

In the present study, we investigated the anti-allergic effect of the water extract of Bopyeoyangyeong-jun(BYJ) to cytokines and transcription. To investigate the biological effect of BYJ, We examined cytotoxicity and inflammatory cytokine secretion with RBL-2H3. We examined tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), interleukin(IL)-4 secretion from RBL-2H3 cell after pre- treatment with Bopyeoyangyeong-jun of 1 mg/ml, 2 mg/ml. RBL-2H3 cell was stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA) and calcium ionophore A23187. We observed that Bopyeoyangyeong-jun reduced TNF- α , IL-4 secretion and mRNA expression in RBL-2H3 cells. Moreover, the expression of levels of cyclooxygenase (COX)-2 mRNA, nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (p65) protein, ERK MAPK, and the degradation of level inhibitor kappa B-alpha (I κ B- α) were down-regulated by BYJ. Taken together, these results indicate that Bopyeoyangyeong-jun has controls TNF- α , IL-4 secretion on allergic reaction.

Key words : Bopyeoyangyeong-jun(BYJ), TNF- α , IL-4, NF- κ B

서 론

알레르기과 면역은 서로 밀접한 관계를 가지고 있다. 면역이란 외부로부터의 미생물 혹은 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등과 특이하게 반응하여 항체를 만들며 이것을 배제하여 그 개체의 항상성을 유지하는 현상을 말하며 알레르기란 생체의 면역기전에 의한 항원항체 반응에 있어 인체에 유해한 반응을 야기시키는 생물학적 현상이다¹⁻⁵⁾.

알레르기는 4가지 유형이 있다. 제 1형 과민반응은 anaphylaxis type 또는 IgE 의존형이라고 하고, 제 2형은 cytolytic type 또는 조직특이형이라 하며, 제 3형은 Arthus type 또는 면역복합체형이라 하고, 제 4형은 tuberculin type 또는 지연형이라 한다⁶⁾.

아토피 피부염을 비롯한 알레르기 염증 반응이 발생하고 진

행되는 과정에서 비만세포, 호산구, 호중구 같은 염증세포와 이들 세포에서 분비되는 여러 종류의 화학매개체, 점막세포, T-세포에서 분비되는 cytokine과 chemokine 등이 관여한다⁷⁾.

인체의 염증세포에는 순환성 세포인 호중구, 호산구, 호염기구, 혈소판과 비순환성 세포인 비만세포, 대식세포, 내피세포로 구분할 수 있고 이 중 호산구는 기생충 감염과 기관지 천식과 같은 알레르기 반응에 있어서 숙주면역에 매우 중요하다⁸⁾.

한의학에서 면역에 관련된 언급으로는 《黃帝內經·素問·刺法論》⁹⁾에서 “正氣存內 邪不可干”이라 하였고, 《黃帝內經·靈樞·百病始生》¹⁰⁾에서 “風雨寒熱不得虛 邪不能獨傷人”이라 하였는데 正이란 正氣로서 생체의 조절, 방어 및 적응능력을 지칭하고, 邪란 病邪로 생체의 정상적인 활동을 방해하여 질병을 발생케 하는 인자를 말한 것이다. 이것은 면역반응이 방어, 항상성, 및 면역감시로 구별되고 이들의 정상적인 기능에 이상이 생기면 질병이 발생한다는 면역이론과 부합한다¹¹⁾.

保肺養營煎은 《晴崗醫鑑》¹²⁾에 처음으로 기재된 처방으로 肺虛하여 虛熱로 인한 痰嗽가 그치지 않고 津液이 枯渴하여 身

* 교신저자 : 박동일, 부산시 진구 가야동 산 24 동의대학교 한의과 대학

· E-mail : dipark@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8650

· 접수 : 2008/10/24 · 수정 : 2008/10/10 · 채택 : 2008/11/28

乾口燥한 데 사용한다라고 되어 있다. 본방은 四物湯合二陳湯의 變方으로 清熱祛痰과 津液을 補하여 慢性期咳嗽에 많이 응용한다.

본방에 대한 연구로는 이¹³⁾의 氣管支平滑筋張力과 炎症 및 免疫反應에 대한 효과와 서¹⁴⁾의 A/J mouse의 폐암 세포에 미치는 영향에 대한 실험적 보고가 있으나, cytokines 변화에 대한 분자생물학적 접근은 없었다.

이에 본 연구에서는 保肺養營煎의 항알러지 염증 효과에 관한 연구를 실시하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 약재는 保肺養營煎(Bopyeoyangyeong-jun 이하 BYJ)으로 동의대학교부속한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 保肺養營煎의 처방 구성과 내용은 《晴崗醫鑑》을 따랐으며, 1첩 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Composition of BYJ used in the present study

한약명	생약명(Herb name)	용량(단위: g)
乾地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	6
白芍藥	<i>Paeonia Radix</i>	6
沙蔞	<i>Codonopsis Radix</i>	6
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
麥門冬	<i>Liriodopsis Tuber</i>	4
白茯苓	<i>Hoeien</i>	4
橘皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4
貝母	<i>Fritillariae Rhizoma</i>	4
桔梗	<i>Platycodon Radix</i>	4
杏仁	<i>Armeniaca Fructus</i>	4
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	3
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	6
大棗	<i>Zizyphus Fructus</i>	7
총량		64

2) 세포 및 배양조건

실험에 사용한 RBL-2H3 세포는 master cell로 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받았으며 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated fetal bovine serum과 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 포함한 DMEM에서 37°C, 5% CO₂의 조건 하에 배양했다.

3) 시약

본 실험에 사용된 Phorbol 12-myristate(PMA), calcium ionophore A23187, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-p-nitro-phenyl-N-β-D-glucosaminide는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터, Dulbecco's Modified Eagle' Medium(DMEM)와 Fetal Bovine Serum(FBS)는 Hyclone사(Logan, UT)로부터, TNF ELISA kit, IL-4 ELISA, kit INF-γ ELISA kit와 ANTI-cox-2 monoclonal antibody는 BD Biosciences사(Frankline Lakes, NJ)에서, anti-NF-κB(p65), IκB-α

β-actin, p38, ERK, JNK와 phosphorylated-p38, -ERK, -JNK polyclonal antibody는 Cell Signaling Technology사(Beverly MA)에서, anti-COX-1 monoclonal antibody는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA)에서, phosphatase labeled affinity purified antibody to rabbit IgG와 BCIP/NBT phosphatase substrate는 KBL사(Gaithersburg, MD)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제 및 투여

BYJ 20첩 분량을 round flask에 넣고 증류수 1800 ml를 가하여 100°C에서 3시간 동안 가열추출한 후 추출액을 동결건조하여 82.5 g의 파우더를 얻어 4°C에서 보관하였다. 실험하기 직전에 생리 식염수나 PBS(phosphate buffered saline)에 녹여 사용하였다.

2) TNF-α assay

RBL-2H3 세포를 6 well plate에 5×10⁵ cell/well의 농도로 분주한 후 24 시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 BYJ를 농도별(0, 1 및 2 mg/ml)로 희석하여 세포에 처리하였다. 1 시간 동안 배양한 후 1 µM A23187을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고 8 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 3 분간 원심분리하여 분리된 상층액을 -20°C에 보관하였다. TNF-α kit를 사용하여 ELISA법으로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 TNF-α의 양을 계산하였다.

3) IL-4 assay

RBL-2H3 세포를 6 well plate에 5×10⁵ cell/well의 농도로 분주한 후 24 시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 BYJ를 농도별(0, 1 및 2 mg/ml)로 희석하여 세포에 처리하였다. 1 시간 동안 배양한 후 1 µM A23187을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고 8 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 3 분간 원심분리하여 분리된 상층액을 -20°C에 보관하였다. IL-4 kit를 사용하여 ELISA법으로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4의 양을 계산하였다.

4) IFN-γ assay

RBL-2H3 세포를 6 well plate에 5×10⁵ cells/well의 농도로 분주한 후 24 시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 BYJ를 농도별 (0, 1 및 2 mg/ml)로 희석하여 세포에 처리하였다. 1 시간 동안 배양한 후 1 µM A23187을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고, 8 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 3 분간 원심분리하고, 분리된 상층액을 -20°C에 보관하였다. IFN-γ kit를 사용하여 ELISA법으로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IFN-γ의 양을 계산하였다.

5) Total RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA는 Trizol법으로 분리하였다. 세포에 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 첨가하여 용해시킨다.

Chloroform 0.2 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후, 실온에서 2-3 분간 반응시킨다. 반응이 끝난 샘플은 4°C, 14,000 rpm, 20분간

원심 분리한 후, 그 상침액을 멸균된 새 microtube로 옮긴다. 상침액과 동량의 isopropanol을 첨가하고, 잘 혼합한 후, 실온에서 15분간 침전시킨다. 침전이 끝난 샘플은 4℃, 14,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, 그 상침액을 버린다. 샘플에 75% ethanol 0.5 ml을 첨가하여 4℃, 7,500 rpm, 5분간 원심 분리한 후 상침액을 완전히 제거하였다. RNA pellet은 실온에서 자연 건조시켜, RNase free water에 현탁 하였다. 분리된 total RNA는 -70℃에서 보관 하였다.

분광 광도계 (Spectrophotometer, BioPhotometer, Eppendorf)를 사용하여 total RNA량을 측정하였다. 역전사효소인 M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 PCR template로 하여 PCR amplification을 실시하였다.

PCR amplification은 PCR machine (ASTEC PC802)을 사용 하였다. 10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 μM dNTP, 1 unit of Taq polymerase가 첨가되어 있는 PCR PreMix (Bioneer, Korea)에 3 μg의 RNA로 합성된 각각의 cDNA template와 Table 2에 표기한 primers를 첨가하고, distilled water로 PCR mixture 최종 volume이 20 μl가 되게 하였다. PCR amplification 조건은 다음과 같다. 95 °C에서 5 분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 °C에서 40 초 denaturation, 53 °C에서 50 초 annealation, 72 °C에서 40 초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 28 cycles를 반응시켰다. 그 후, 72 °C에서 7 분간 post-extension 시켰다.

PCR 후 증폭된 산물은 0.5 % agarose gel을 이용하여 0.5× TBE buffer에서 전기영동을 실시하였고, 전기영동이 끝난 gel을 EtBr (Ethidium Bromide)에 염색하여 UV에서 증폭산물을 확인 하였다. GAPDH를 internal control로 사용하였다.

Table 2. Oligonucleotide Primers Used for PCR in This Study.

Target gene	Name of Primer	Oligonucleotide sequences (5' to 3' direction)	Expected size	Accession number
TNF-α	TNF-3F	CGTCTACTCCTCAGAGCCC	226 bp	NM012675
	TNF-3R	TCCACTCAGGCATCGACATT		
IL-4	IL4-1F	AACACTTTGAACCCAGGTCAC	330 bp	X16058
	IL4-1R	AGTGCAGGACTGCAAGTATT		
COX-1	COX1-2F	ACTGGTCTGCCTCAACACCA	223 bp	S67721
	COX-1R	CAAGGGTGAGACCCCAAGTT		
COX-2	COX2-6F	TGACCAGAGCAGAGAGATGA	250 bp	S67722
	COX2-6R	CATAAGGCCTTCAAGGAGA		
GAPDH	GAPDH-2F	GGCCAAAAGGGTCATCATCT	201 bp	NM017008
	GAPDH-2R	GTGATGGCATGGACTGTGGT		

6) Western blot analysis

1× PBS buffer를 이용하여 세포를 세척한 후, scraper로 세포를 모은다. 모아진 세포에 lysis buffer를 첨가하여 현탁한 후, 세포로부터 protein extraction을 한다. Protein extracts를 Bradford법으로 정량한 후, 동량의 protein 샘플들을 10% SDS gel을 이용하여 전기 영동하였다. 전기영동 후, SDS gel의 bands를 nitrocellulose membrane에 transfer하고, transfer된 blots는 5% 탈지유를 이용하여 blocking시켰다. 1차 Ab인 NF-κB (p65), IκB-α, β-actin, p38, ERK, JNK, phosphorylated-p38, -ERK, -JNK

polyclonal Abs, COX-1, COX-2 monoclonal Abs를 각 blots에 첨가하여 4℃에서 반응시킨 후, 2차 Abs를 첨가하여 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝나면 AP (BCIP/NBT phosphatase substrate) system을 이용하여 각 blots의 band를 확인하였다.

7) Protein extracts 준비

1× PBS buffer를 이용하여 세포를 2번 세척한 후, scraper로 세포를 모은다. 모아진 세포에 protein extraction solution (PRO-PREP, Intron, Korea) 200 μl 첨가한 후 현탁하고, ice에서 30분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 4℃, 14,000 rpm, 20 분간 원심 분리한 후, cytoplasmic protein이 함유되어 있는 상침액을 멸균된 새 microtube로 옮긴다. 남아 있는 pellet에 nuclear protein extraction buffer 100 μl를 첨가하여 현탁시킨 후, ice에서 30분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 4℃, 14,000 rpm, 20분간 원심 분리한 후, nuclear protein이 함유되어 있는 상침액을 멸균된 새 microtube로 옮긴다.

8) 통계처리

成績은 평균치±표준오차로 나타내었고 평균치간의 有意性은 Student's t-test를 이용하여 檢定하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 有意한 것으로 判定하였다. 통계처리는 sigma plot 9.0을 사용하였다.

결 과

1. TNF-α assay

TNF-α의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 5.89±0.09 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 1200.52±15.17 pg/ml로 현저히 증가(p<0.005)하였으며, 자극 전 BYJ를 1 mg/ml, 2 mg/ml 의 농도로 처리한 세포에서는 각각 986.39±10.58 pg/ml, 944.05±19.11 pg/ml로 유의성(P<0.005) 있는 감소를 보였다.

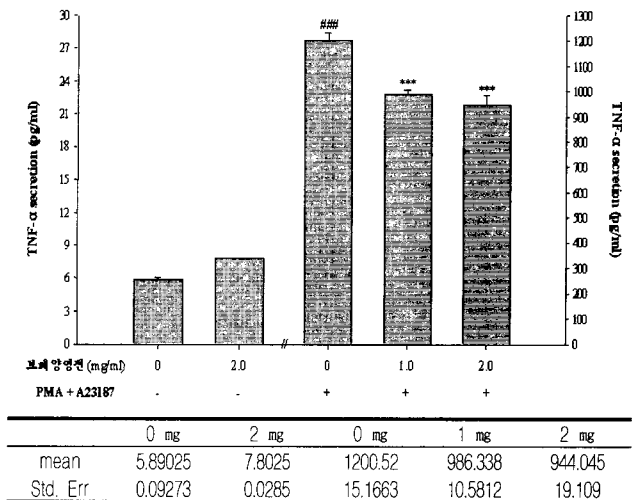


Fig. 1. Effect of BYJ on TNF-α Secretion from RBL-2H3 Cell. Each column represents mean ± S.E of 3 independent samples. The absorbance was measured at 450 μm using ELISA. ### p<0.005 ; significant as compared to unstimulated sample by Scheffe's multiple comparison. *** p<0.005 ; significant as compared to PMA+A23187-stimulated sample by Scheffe's multiple comparison.

2. IL-4 assay

IL-4의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 2.60 ± 0.02 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 822.46 ± 17.56 pg/ml로 현저히 증가($p < 0.005$)하였으며, 자극 전 BYJ를 1 mg/ml, 2 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 724.14 ± 35.08 pg/ml, 724.56 ± 8.09 pg/ml로 유의성($P < 0.05$, $P < 0.005$) 있는 감소를 보였다.

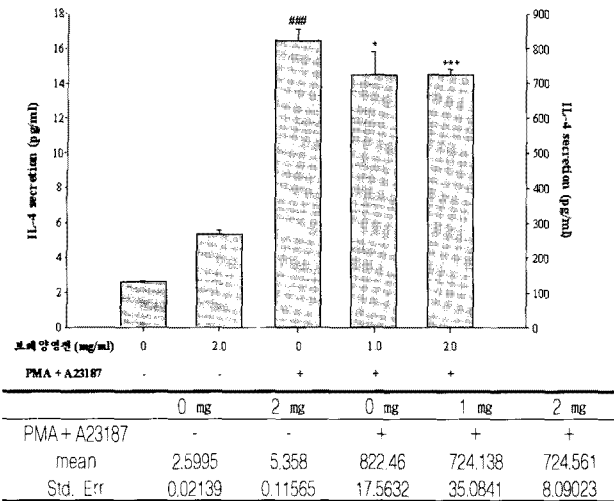


Fig. 2. Effect of BYJ on IL-4 Secretion from RBL-2H3 Cell. Each column represents mean \pm S.E of 3 independent samples. The absorbance was measured at 450 nm using ELISA. ### $p < 0.005$: significant as compared to unstimulated sample by Scheffe's multiple comparison. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: significant as compared to PMA+A23187-stimulated sample by Scheffe's multiple comparison.

3. IFN- γ assay

ELISA method로 측정된 IFN- γ 의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 4.28 ± 0.18 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 4.33 ± 0.07 pg/ml였다. 자극 전 BYJ를 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 4.67 ± 0.06 pg/ml, 4.73 ± 0.06 pg/ml로 대조군과 실험군에서 유의한 변화는 확인할 수 없었다.

4. TNF- α 와 IL-4 mRNA 발현에 미치는 BYJ의 영향

BYJ의 inflammatory cytokines (TNF- α , IL-4) mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 각 각의 cytokine은 PMA와 A23187에 의해 mRNA 발현이 상당히 증가되었으나(Lane 3), BYJ를 전 처리한 실험군에서는 mRNA 발현이 BYJ의 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Lane 4, 5)

5. COX-2 mRNA 발현에 미치는 BYJ의 영향

COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. TNF- α , IL-4의 결과와 동일하게 COX-2 또한 PMA와 A23187에 의해 mRNA 발현이 상당히 증가되었으나(Lane 2), BYJ 2.0 mg/ml를 전 처리한 실험군에서는 mRNA 발현이 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Lane 3). 그러나

COX-1에서는 mRNA 발현의 차이를 확인할 수 없었다.

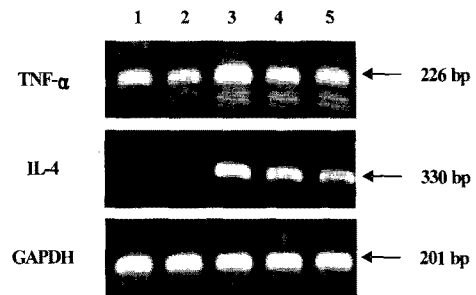


Fig. 3. Effects of BYJ on the PMA plus A23187-induced inflammatory cytokines (TNF- α and IL-4) mRNA expression in RBL-2H3 cells. Levels of TNF- α , IL-4, and GAPDH mRNA were assayed by RT-PCR. GAPDH was used as internal control gene. Lane 1, negative control group, Lane 2, only treated BYJ 2.0 mg, Lane 3, positive control group (only treated stimulus), Lane 4, BYJ 1.0 mg + stimulus, Lane 5, BYJ 2.0 mg + stimulus.

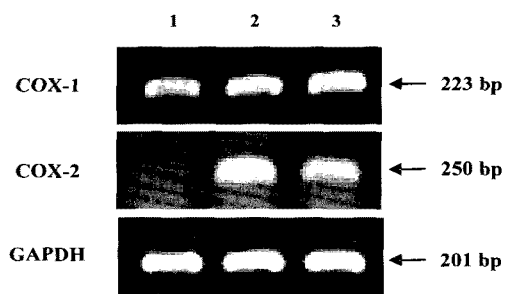


Fig. 4. Effects of BYJ on the PMA plus A23187-induced COX-1 and COX-2 mRNA expression in RBL-2H3 cells. Levels of COX-1, COX-2, and GAPDH mRNA were assayed by RT-PCR. GAPDH was used as internal control gene. Lane 1, negative control group, Lane 2, positive control group (only treated stimulus), Lane 3, BYJ 2.0 mg + stimulus.

6. NF- κ B 활성화에 미치는 BYJ의 영향

BYJ의 NF- κ B 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Western blot analysis를 실시하였다. Nuclear extract에서는 PMA와 A23187에 의해 NF- κ B 발현이 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었다 (lane 2). 그러나 BYJ 2.0 mg/ml를 전 처리한 실험군에서는 NF- κ B (p65) 발현이 감소하였고, cytoplasmic extract에서는 NF- κ B (p65) 발현의 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 BYJ에 의해 NF- κ B (p65)의 핵 내 이동이 감소되었음을 알 수 있다.

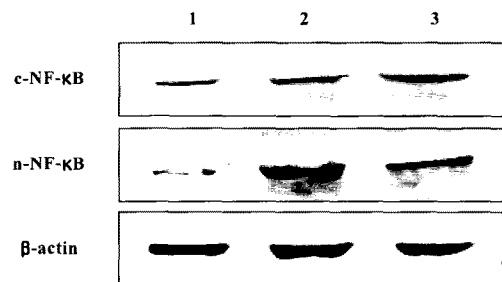


Fig. 5. Effects of BYJ on the expression of NF- κ B (p65) in RBL-2H3 cells. The cell extract were assayed Western blot analysis for NF- κ B (p65) in cytoplasmic (c-NF- κ B) and nuclear extracts (n-NF- κ B). Lane 1, negative control group, Lane 2, positive control group (only treated stimulus), Lane 3, BYJ 2.0 mg + stimulus.

7. IκB-α degradation에 미치는 BYJ의 영향

BYJ의 IκB-α degradation에 미치는 영향을 알아보기 위하여 cytoplasmic extract를 이용하여 Western blot analysis를 실시하였다. PMA와 A23187에 의해 cytoplasm에서 IκB-α degradation이 일어난 것을 확인할 수 있었다 (lane 2). 그러나 BYJ 2.0 mg/ml를 전 처리한 실험군에서는 IκB-α degradation이 감소하였다 (lane 3).

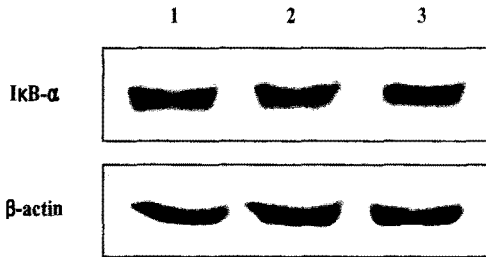


Fig. 6. Effects of BYJ on the degradation of IκB-α in RBL-2H3 cells. The cell extract were assayed Western blot analysis for IκB-α in cytoplasmic extract. Lane 1. negative control group. Lane 2. positive control group (only treated stimulus). Lane 3. BYJ 2.0 mg + stimulus.

8. ERK MAPK 활성화에 미치는 BYJ의 영향

BYJ의 inflammatory cytokines 발현에 미치는 영향에 관한 메커니즘을 알아보기 위하여 Western blot analysis로 MAPKs 활성을 확인하였다. BYJ에 의해 phosphorylation-ERK MAPK 활성이 감소된 것을 확인하였으나, p38과 JNK MAPKs에서는 감소를 확인할 수 없었다.

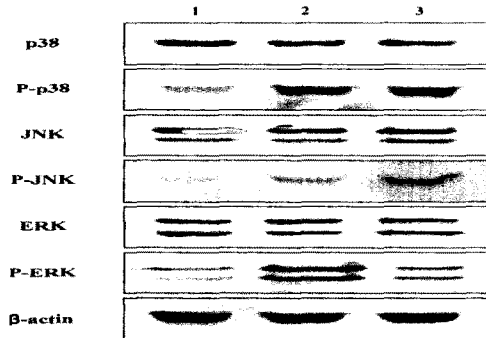


Fig. 7. Effects of BYJ on the activation of ERK MAPK on RBL-2H3 cells. The cell extract were assayed Western blot analysis for the phosphorylation of p38, JNK, and ERK. Lane 1. negative control group. Lane 2. positive control group (only treated stimulus). Lane 3. BYJ 2.0 mg + stimulus.

고찰

외부자극에 대한 생체의 반응을 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있는데, 하나는 생체에 유해한 물질을 약화하거나 중화시키려는 긍정적인 반응이고, 다른 하나는 개체에 해로운 과민염증 반응으로 나타나는 부정적인 반응이다. 전자를 면역이란 단어로, 후자를 알레르기 반응으로 설명할 수 있다^{15,16}. 현대 산업의 발달 및 자연 환경의 변화에 따라 날이 갈수록 전식과 알레르기 질환들의 발병 빈도 수의 증가가 나타나고 있으며 이로 인한 의식구

조 및 의료비 지출도 꾸준히 증가하고 있는 실정이다¹⁷.

알레르기는 Coombs 와 Gell에 의해 발생기전에 따라 제1형:IgE 매개형 과민반응, 제2형:항원-항체 매개성 과민반응, 제3형:항원-항체 복합체 매개성 과민반응, 제4형:T-세포 매개성 과민반응으로 분류한다. 그 중 제 1형 알레르기 반응은 항원 항체반응이 10-20분 사이에 일어나므로 즉각형 또는 아나필락시스형 알레르기라고 부르며, 일반적으로 불리우는 알레르기반응의 대부분을 차지하는데 피부, 기관지점막, 비점막 등에 분포되어 있는 비만세포 표면에 IgE와 항체가 반응하여 비만세포의 탈과립현상을 유발시켜 몇 분 내에 비만세포에서 혈관활성 및 염증반응 매개물질이 분비되어 평활근 수축, 점액분비, 점액부종, 혈관과민성항진, 혈관확장을 일으켜 알레르기 질환을 발생하게 하는 주요원인이 된다. 주요표적 기관은 폐, 피부, 위장관이고 주된 알레르기 질환은 아토피성 피부염, 고초열, 기관지천식, 알레르기성 비염등이 있다¹⁸.

알레르기 질환의 발생에 중요한 역할을 하는 비만세포는 Ehrlich에 의해 처음 관찰, 명명된 이래 탈과립 유발 인자들과 억제인자들에 대한 연구를 통하여 아토피 피부염, 기관지 천식 및 알러지 비염 등 여러 가지 알러지 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 약물을 개발하는 연구에 많이 이용되고 있다¹⁹.

생활환경에 미량으로 존재하는 단백질(항원)물질에 대해서 IgE를 쉽게 생산하는 신체상태를 "아토피"라고 한다. 만들어진 IgE는 비만세포 또는 호염기성구의 표면수용체에 붙게 된다. 외부에서 알레르겐이 들어와서 비만세포에 붙어있는 IgE와 결합하게 되면 비만세포가 활성화되고 비만세포 내 과립 속에 들어있던 히스타민 등의 일차 화학 매체가 분비된다. 또 이 때 세포막이 활성화되면 leukotriene, 프로스타글란딘, PAF(혈소판활성화인자)등의 이차화학매체가 분비된다. 또 비만세포로부터 IL-3, IL-4, IL-5등의 Th2 사이토카인이 분비된다. 알레르기 반응은 분비된 화학매체의 약리작용으로 신속히 일차 반응이 일어나고, 화학매체와 사이토카인의 작용으로 호산구등의 염증세포가 모여들고 이 세포들의 영향으로 알레르기 염증반응이 지속된다²⁰.

喘息은 한의학에서 呼吸急促, 喉中有聲하는 哮喘症의 범주에 해당하며, 寒冷說, 心因說, 痰因說, 素因說, 感染說, 과민성 반응 등을 원인으로 보고 있다. 치료는 實證은 外感風寒, 痰濕內盛으로 나누어 宣肺定喘, 化痰定喘하는 처방을 사용하고, 虛症은 肺虛, 心腎虛損, 上實下虛로 나누어 養肺定喘, 補益心腎, 瀉肺化痰 補益腎元하는 治法을 사용한다²¹.

保肺養營煎은 《晴崗醫鑑》¹²에 처음 기재된 처방으로 肺虛하여 虛熱로 인한 痰嗽가 그치지 않고 津液이 枯渴하여 身乾口燥한 데 사용하며 淸熱祛痰과 津液을 補하여 慢性期咳嗽에 많이 응용한다. 保肺養營煎은 乾地黃, 白芍藥, 沙蔘, 當歸, 麥門冬, 白茯苓, 橘皮, 貝母, 桔梗, 杏仁, 五味子, 甘草, 生薑, 大棗로 구성되어 있으며, 처방을 구성하고 있는 구성 약물의 주치 및 효능을 살펴보면 다음과 같다.

乾地黃은 味甘 하고 性은 寒하며 淸熱涼血, 養陰生津하며 白芍藥은 味苦酸 性은 微寒하며 涼血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗의 효능이 있고 沙蔘은 味甘 性微寒하여 養陰淸肺, 祛痰止咳의 효능

이 있고 當歸는味甘辛 性溫하며 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 효능이 있다. 맥문동는味甘微苦 性微寒하며 養陰潤肺, 清心除煩, 益胃生津의 효능이 있다. 白茯苓은味甘淡 性은平하며 利水滲濕, 健脾寧心의 효능이 있고 橘皮는味辛苦 性은溫하며 理氣, 調中, 燥濕, 化痰의 효능이 있다. 貝母는味苦甘 性은微寒하며 清熱潤肺, 化痰止咳의 효능이 있다. 栝梗은味苦辛 性은平하며 宣肺利咽, 祛痰排膿의 효능이 있고. 杏仁은味苦微辛 性은微溫하며 降氣止咳平喘, 潤腸通便하는 효능이 있으며 五味子는味酸甘 性은溫하며 斂肺, 滋腎, 生津, 澀精의 효능이 있다. 甘草는味甘 性은平하며 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥의 효능이 있다. 生薑은味辛 性은溫하며 解表散寒, 溫中止嘔의 효능이 있다. 大棗는味甘 性은溫하며 補脾和胃, 益氣生津의 효능이 있다. 그러므로 保肺養營煎은 아토피 피부염의 치료제로서 사용될 수 있으리라 생각된다²⁹⁾. 이에 저자는 RBL-2H3 세포를 사용하여 TNF- α , IL-4와 INF- γ 를 측정하여 cytokines에 대한 보폐양영전의 영향을 관찰하였다.

TNF- α 는 면역반응의 초기에 분비되는 전염증기 Cytokine으로 주로 활성화된 단구와 대식세포에서 합성되며, 이 외에 Th2세포와 Th1세포에서도 생산되는 것이 증명되었다²³⁾. TNF- α 는 염증의 중요한 개시인자²⁴⁾로 혈관내피세포의 표면 부착인자의 발현을 유도하여 백혈구를 염증 병소로 모이게 한다. 또한 단핵구 등의 세포에 작용하여 chemokine을 합성케 한다²⁵⁾. 과량의 TNF- α 는 endocrine hormone의 작용을 나타내어, 체온상승을 유발할 수 있으며, 간세포에 작용하여 급성기반응단백질들을 혈액 내로 만들게 하며 또한 골수전구세포의 분열을 억제하여 림프구감소증이나 면역결핍을 유도할 수 있으며, 근육세포의 대사작용을 촉진하여 저혈당상태를 유도할 수도 있다. 반면에 낮은 양의 TNF- α 는 염증반응에서 백혈구들이 혈관내피세포에 부착하는 것을 촉진하며, 염증세포들의 미생물 살해능력을 증가시키며, mononuclear phagocytes에 작용하여 여러 가지 염증반응에 관여하는 Cytokine을 생산하게 만들어 염증반응을 촉진한다²⁶⁾.

또한 TNF- α 는 생체 내에서 단독으로 또는 다른 cytokine들과 협력 작용하여 몇몇 종양의 혈관을 손상시킴으로서 종양 괴사를 유발시키거나, 몇몇 바이러스 혹은 기생충에 의한 감염에 대해 숙주의 저항성을 유도시키기도 한다²⁷⁾.

본 실험에서 TNF- α 의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 5.89 ± 0.09 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 1200.52 ± 15.17 pg/ml로 현저히 증가($p < 0.005$)하였으며, 자극 전 BYJ를 1 mg/ml, 2 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 986.39 ± 10.58 pg/ml, 944.05 ± 19.11 pg/ml로 유의성($P < 0.005$) 있는 감소를 보였다. 그러므로 BYJ는 TNF- α 의 발현을 억제하여 염증반응을 억제하는 작용을 한다고 생각할 수 있다.

T세포는 세포표면에 표현되는 항원 특이 수용체의 종류에 따라 구분하는 특이 림프구로서 CD4항원과 CD8항원의 표현여부와 기능에 따라 두가지 아형으로 분류하고 있다. 이 중 CD4+T세포는 MHC class II 분자와 연관된 항원을 인식하고 다양한 면역반응을 조절하며 CD8+T세포는 MHC class I 분자 연관 항원을 인식하며 주로 세포독성 기능을 나타낸다²⁸⁾. CD4+T세포는 생

성하는 사이토카인 종류의 면역기능에 따라 Th1 세포와 Th2세포로 구분된다. Th1 세포는 IFN- γ 를 주로 생성하며 Th2 세포는 IL-4와 IL-5를 주로 생성한다²⁹⁾.

일반적으로 IFN- γ , IL-2, IL-12 및 TNF- α 와 같은 Th1형 세포활성물질들은 주로 세포성 면역반응에, Th2형 세포활성물질인 IL-4, IL-5, IL-6, 및 IL-13은 체액성 면역반응에 의한 IgE 생성 등을 촉진한다. 특히 아토피성 피부질환은 Th1세포 활성물질의 감소와 IgE의 과량생성에 의한 과민반응의 증가가 특징인 다인성 질환이다³⁰⁾. IL-4는 NK cell, mast cell, neutrophil과 eosinophil에서 분비되는 cytokine으로 알레르기 반응의 유발, B 세포의 분화와 증식, IgE의 생성 등에 관여하여 염증 반응 분비 물질로 천식 유발과 아토피의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 또한 IL-4는 Th2 세포활성물질로서 B 세포에 작용하고 IgE 생성을 자극할 뿐만 아니라 면역 조절 기능을 가지고 있어서 Th1/Th2 불균형인 아토피 피부염에서 중요한 역할을 한다³²⁾.

본 실험에서 IL-4의 분비량은 아무런 처치를 하지 않은 세포에서 2.60 ± 0.02 pg/ml였으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에는 822.46 ± 17.56 pg/ml로 현저히 증가($p < 0.005$)하였으며, 자극 전 BYJ를 1 mg/ml, 2 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서는 각각 724.14 ± 35.08 pg/ml, 724.56 ± 8.09 pg/ml로 유의성($P < 0.05$, $P < 0.005$) 있는 감소를 보였다. 이상의 결과를 종합하여 살펴보면 세포 독성을 나타내지 않는 농도 하에서 BYJ는 TNF- α , IL-4의 생성과 분비를 저해시켰다. 그러므로 BYJ는 알레르기 염증반응과 관련된 cytokine의 생성 분비를 감소시킴으로서 알레르기의 염증반응을 억제하는 작용을 하고 있다고 생각된다.

Prostaglandin은 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intracellular messenger이다. Prostaglandin은 세균의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 cyclooxygenase (COX) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관 투과성 항진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. I형 효소인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다^{33,34)}.

본 연구에서 BYJ는 COX-2의 효소 활성을 억제하고 있음을 알 수 있다. 만성 염증성 질환의 병태생리는 복잡하지만 각종 염증을 매개하는 물질을 합성하도록 유도하는 전사인자의 활성이 필수적이다. 여러 가지 전사인자 중에서 nuclear factor-kappaB (NK- κ B)가 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NK- κ B는 1986년 Sen and Baltimore에 의해 B cell의 kappa light chain에서 발견된 transcriptional factor로 염증 반응, 면역 반응 등에 광범위하게 작용하며 특정 세포의 유전자 발현에 관여하는

전사 인자이다³³⁾. NK-κB는 LPS, cytokine, UV irradiation, growth factor, oxygen free radical, oxidative stress와 vital infaction 등의 자극에 의해 활성화된다. 정상적으로 NK-κB는 내피세포와 백혈구 등 여러 세포의 세포질에 있는 inhibitory kappaB (IκB) 단백질과 결합되어 있다. NK-κB가 자극을 받았을 때 NK-κB-IκB 복합체는 인산화되고 IκB 단백질은 핵내로 이동하여 유전자 발현의 조절 부위에 결합한 후 여러 염증성 매개체의 유전자 발현을 유도한다. 여러 염증 매개체로는 COX-2, inducible nitric oxide synthase(iNOS)를 암호화하는 유전자 뿐만 아니라, IL-1, IL-2, IL-8과 TNF-α 등과 같은 염증성 사이토카인의 전사가 있다³⁹⁾. 따라서 NK-κB의 활성 조절이 가능할 경우 만성과 급성 염증질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

본 연구의 결과를 살펴보면 자극 전 BYJ를 2.0 mg/ml를 처리하였을 때, 핵 내의 NK-κ (p65) 활성이 억제되었고, 세포질 내의 IκB-α degradation 또한 억제되었다.

생명체를 구성하는 각각의 세포들은 주어진 환경의 변화에 계속적으로 반응하는 동적인 것으로, 세포반응은 대부분의 경우 호르몬이나 사이토카인 등의 세포 밖의 인자를 세포가 수용체를 통해 받아들여 그 정보를 핵으로 전하여 관련된 유전자를 발현 시킴으로서 반응하게 된다. 이러한 세포 안에서 정보전달에 관여하는 대표적인 물질의 하나가 MAP kinase casacade이다. MAP kinase family는 mitogen-activated protein kinase(MAPK)/excellular signal regulated protein kinase(ERK), c-Jun N-terminal Kinase(JNK)/stress-activated protein kinase(SAPK)와 p38, ERK5/BMK1 등으로 구성된다. 이 중 MAPK는 세포분열 촉진인자에 의해 활성이 강하게 유도되는데 반해 JNK와 p38은 포유류에서 여러 가지 자외선, 산화스트레스, 엔도톡신 등 물리화학적 스트레스에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다³⁶⁾.

본 연구 결과를 살펴보면 BYJ 핵 내에서의 NF-κB (p65)의 protein 발현 정도를 억제시켰으며, 세포질 내에서의 IκB-α의 degradation 및 ERK MAPK 활성은 감소되었다. 그러므로 BYJ는 IκB-α의 degradation 억제를 통한 핵 내로의 NF-κB (p65) translocation 조절기전을 통하여 ERK MAPK를 억제시키는 것으로 평가할 수 있다.

이상의 결과를 종합하여 살펴보면 BYJ는 세포 독성을 나타내지 않는 농도 하에서 TNF-α, IL-4, INF-γ의 생성과 분비를 저해시키며, IκB-α의 degradation 억제를 통한 핵 내로의 NF-κB (p65) translocation 조절기전으로 알레르기의 염증반응을 억제하는 작용을 하고 있다고 보여지며, 기관지 천식 등에서 수반되는 기관지 염증 상태의 개선에 치료제로 개발 가능하리라 생각된다.

결 론

보폐양영전의 TNF-α, IL-4와 INF-γ의 발현 및 전사에 미치는 영향에 관하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

보폐양영전은 RBL-2H3 세포에서 TNF-α, IL-4 및 INF-γ의 분비량을 유의성 있게 억제시켰다. RBL-2H3 세포에서 TNF-α과

IL-4 mRNA 발현을 보폐양영전 농도 의존적으로 감소시켰으며, COX-2 mRNA 발현 또한 감소시켰다. 보폐양영전은 RBL-2H3 세포에서 NF-κB (p65)의 nuclear translocation을 억제시켰다. 보폐양영전은 RBL-2H3 세포에서 IκB-α degradation을 억제시켰다. 보폐양영전은 RBL-2H3 세포에서 ERK MAPK 활성을 감소시켰다.

참고문헌

1. Amir, S., Englis, A.M. An inhibitor of nitric oxide production. N6-nitro-L-arginine-methyl ester, improves survival in anaphylactic shock Eur J Pharmacol, 203: 125, 1991.
2. Jeong Kyu Man. Allergy anad Oriental Medicine. Seoul, Jeilro, pp 15-26, 59-61, 89, 97 101, 1990.
3. Kang Byeong Su. Oriental Medicine Clinic Allergy. Seoul, SungBoSa, pp 22, 64-69, 133-136, 1988.
4. Kang Suk Young. Diagnosis. Seoul, IlJoGak, pp 129-131, 1987.
5. Lee Gi Young. The effect of Bojungyikgitang that affect malfunction of mouse, The master's thesis of Kyunghee graduate school. 1992.
6. 서울대학교 의과대학. 면역학. 서울, 서울대학교출판부, pp 1-3, 135-142, 165-169, 229-241, 1994.
7. 김규언. 알레르기 발생기전에 대한 새로운 이해와 진단법. 소아과학회지, 45suppl 2: 223-237, 2002.
8. 노재열. 염증세포의 신호전달. 서울, 일조각, pp 192-195, 1994.
9. 張隱庵, 馬沅堆. 黃帝內經素問. 서울, 성보사, p 21, 241, 1975.
10. 張隱庵, 馬沅堆. 黃帝內經靈樞. 서울, 성보사, p 396, 1975.
11. 조종관. 면역에 관한 동양의학적 고찰. 동양의학 12(1):19-23, 1986.
12. 김영훈. 청강의감. 서울, 성보사, pp 105-106, 2001.
13. 이강령. 보폐양영전이 흰 쥐의 기관지평활근 장력과 면역에 미치는 영향. 동신대학교 대학원, 2004.
14. 서철훈, 김희철. 보폐양영전이 urethane으로 유발된 A/J mouse의 폐암에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지 13(2):71-91, 2005.
15. 서정민, 김진수, 이광규, 육상원. 현삼청폐음의 항염 및 항알러지 작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지 16(1):165-171, 2002.
16. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Poper, J.S. Cellular and molecular immunolog. W.B. Sanders Co. USA 2: 241-260, 1994.
17. 단병호. 국민환경의식조사보고서. p 52, 2005.
18. 中島鳥. 신면역학입문. 서울, 지문문화사, pp 250-258, 1995.
19. Ehrlich, P. Beitrage zur kenntnis der Anilinfarbunger und ihrer Verwendung in drmikroskopischen Technik. Arch Mikroock Anast, 13: 263-277, 1877.
20. Ngoc, L.P., Gold, D.R., Tzianabos, A.O., Weiss, S.T., Celedon, J.C. Cytokines, allergy, and Athma. Curr Opin

- Allergy Clin Immunol, 5(2):167-172, 2005.
21. 전국한외과대학폐계내과학교실. 동외폐계내과학. 서울, 한문
회사, pp 329-332, 2002
 22. 전국한외과대학본초학교수 공편저. 본초학. 서울, 영림사, p
136, 190, 302, 347, 460, 463, 478, 540, 542, 578, 581, 587, 622,
2000.
 23. 박종갑, 이현정, 이호표, 김진우. 아토피 피부염말초혈액 단핵
구에서의 IL-10, GM-CSF 및 TNF- α mRNA의 자발적 발현.
천식 및 알러지 19(6):912-919, 1999.
 24. Kim, H.M., Lee, Y.M. Role of TGF-beta 1 on the
IgE-dependent anaphylaxis reaction. J Immunol, 162:
4960-4965, 1999.
 25. Erchler, W.B., Keller, E.T. Age-Associated-increased
interleukin-6 gene expression, late-life disease, and frailty.
Annu Rev Med, 51: 245-270, 2000.
 26. 김종운. 면역학. 서울, 서울대학교 출판부, pp 33-36, 1986.
 27. 이종달. 그림으로 설명한 병리학. 서울, 고려의학, p 29, 1991.
 28. 김정원. 알레르기 및 면역학적 관점에서의 아토피 피부염. 대
한피부과학회지 41: 687-689, 2003.
 29. Kidd, P. Th1/Th2 Balance:The Hypothesis, its Limitation,
and Implication for Health and Disease. Altern Med Rev,
8: 223-246, 2003.
 30. Cooper, K.D. Atopic dermatitis. Recent trends in
pathogenesis and therapy. J Invest Dermatol, 102: 128-137,
1994.
 31. 정해영. 생명과학 · 분자의학을 위한 사이토카인 분자 생물
학. 월드사이언스. pp 117-124, 2002.
 32. Grewe, M., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Schopf, E.,
Thepen, T., Langeveld-Wildschut, A.G., Ruzicka, T.,
Krutmann, J. A role for Th1 and Th2 cells in the
immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today,
19: 359-361, 1998.
 33. 노민수, 허준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. 리포폴리사
카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합
성을 저해하는 천연물 탐색. 약학회지 42: 558-566, 1998.
 34. Kim, S.N., Son, S.C., Lee, S.M., Kim, C.S., Yoo, D.G., Lee,
S.K., Hur, G.M., Park, J.B., Jeon, B.H. Midazolam inhibits
proinflammatory mediators in the lipopolysaccharide-
activated macrophage. Anesthesiology, 105: 105-110, 2006.
 35. 유미현, 박은경, 김영훈, 이연아, 이상훈, 양형인, 홍승재, 백
용현, 박동석, 한정수, 유명철, 김경수. 화피의 항염 효과에
관한 연구. 대한한의학회지 27(1):184-195, 2006.
 36. 최인장. 세포문명과 세포기능을 조절하는 구조 정보 전달. 제
6장 MAP 카아나제. 월드사이언스, pp 93-104, 2006.