

# 桂枝藥鍼이 Type 1 Hypersensitivity에 미치는 영향

김동훈<sup>1</sup>·송춘호<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 경락경혈학교실, <sup>2</sup>동의대학교 한의학연구소

## Effect of *Cinnamomi Ramulus* Herbal Acupuncture on the Type 1 Hypersensitivity

Dong-Hoon Kim<sup>1</sup>, Choon-Ho Song<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

<sup>2</sup>Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University

### Abstract

**Objectives** : We studied anti-allergic effects of *Cinnamomi Ramulus*(CR) herbal acupuncture and *Cinnamomi Ramulus* extract.

**Methods** : *In vivo*, animals were herbal-acupunctured with CR at both ST36s three times for 5 days. Then, we induced active systemic anaphylactic shock using compound 48/80 in ICR mice, and passive cutaneous anaphylaxis using anti-DNP IgE in Sprague Dawley rat. *In vitro*, we measured cell viability,  $\beta$ -hexosaminidase release and the expressions of IL-4, TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNA in RBL-2H3 cells after treatment of various concentrations of CR extract.

**Results** : *In vivo*, CR herbal acupuncture pretreatments at both ST36s inhibited compound 48/80-induced active systemic anaphylactic shock. Passive cutaneous anaphylaxis was inhibited by CR herbal acupuncture pretreatments at both ST36s and optional points. *In vitro*, CR extract treatments did not affect on cell viability and inhibited  $\beta$ -hexosaminidase release. CR extract treatments also decreased the expressions of IL-4, TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNA in RBL-2H3 cells.

**Conclusions** : These results suggest that CR herbal acupuncture and CR extract should be beneficial in the inhibition of allergic inflammatory response.

**Key words** : *Cinnamomi Ramulus*, herbal acupuncture, allergy, RBL-2H3 cells

## I. 서 론

藥鍼療法은 침구요법과 약물요법을 결합하여 시술자의 변증 결과를 토대로 氣味論에 의거하여 치료약물을 선정하고 經絡論에 따라 치료부위를 택하여 장부와 연계된 經絡 經穴을 자극할 뿐만 아니라 한약의 작용을 동시에 얻음으로써 일반적인 치료법으로는 효과를 보기 어려운 질환을 치료하는데

뛰어난 효과를 나타내고 있다<sup>1)</sup>.

喘息, 알러지성 비염, 아토피성 피부염과 같은 알러지 질환은 환자의 삶의 질을 저하시킬 뿐만 아니라 엄청난 사회 경제적 비용 부담을 유발하고 있다<sup>2)</sup>. 지난 20년 동안 알러지 질환은 전 세계적으로 급격한 증가 양상을 보이고 있으며 한국 어린이와 청소년의 알러지 질환에 관한 전국적 역학 조사에 의하면 우리나라에서도 알러지 질환이 증가하고 있음이 보고되고 있다<sup>3)</sup>.

桂枝(*Cinnamomi Ramulus*, 이하 CR)는

· 교신저자: 송춘호, 부산시 부산진구 양정2동 산45 동의대학교 한의과대학 경락경혈학교실, Tel. 051-850-8643, Fax. 051-853-4036, E-mail: chsong@deu.ac.kr  
· 투고 : 2009/02/28 심사 : 2009/03/12 채택 : 2009/03/20

桂樹(*Cinnamomum cassia* Blume) 또는 기타 동속 근연 식물(녹나무과 Lauraceae)의 어린 가지로서<sup>4)</sup> 임상에서 진정, 진통, 해열, 소염, 항균, 항바이러스, 항암, 건위, 강심, 이뇨, 지해 등에 이용되고 있다<sup>5)</sup>. 桂枝를 이용한 실험적 연구로 血栓症과 高粘度血症에 미치는 영향<sup>6)</sup>, 家兔의 腎·脾 및 循環系機能에 미치는 影響<sup>7)</sup>, Angiogenesis의 抑制機轉에 미치는 영향<sup>8)</sup>, 항염 효과<sup>9)</sup> 등이 보고되어 있으나 桂枝를 활용한알러지에 대한 연구보고는 활발하지 못한 실정이다.

足三里(ST36)는 足陽明胃經의 合土穴로 주치범위가 광범위하여 消化, 循環, 呼吸, 泌尿生殖계통의 질환 등을 다스리며, 또한 強壯의 要穴로 임상에서 가장 많이 활용되는 經穴 중의 하나이다<sup>10)</sup>.

이에 본 연구에서는 桂枝의 효능과 桂枝藥鍼 치료에 대한 근거를 마련하고자 알려지 질환 모델을 이용하여 桂枝藥鍼의 足三里穴(ST36) 처치에 대한 효과를 살펴보고, 桂枝抽出物이 rat basophilic leukemia cell line(RBL-2H3)에서  $\beta$ -hexosaminidase와 IL-4, TNF- $\alpha$ 와 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 桂枝藥鍼液과 桂枝抽出物 (CR)

본 실험에 사용된 桂枝는 (주)광명제약에서 구입하여 사용하였으며, 桂枝藥鍼液과 桂

枝抽出物은 桂枝 300 g을 증류수로 水洗하여 1 l의 증류수를 加하여 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 減壓濃縮한 후 냉동 건조하여 5.2 g의 抽出物을 얻었다. -20℃에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2  $\mu$ m syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

### 2) 실험동물

실험에 사용한 동물은 ICR계 mouse(male, 30  $\pm$  2 g)와 Sprague Dawley계 rat(male, 200  $\pm$  20 g)을 (주)샘타코 바이오 코리아에서 구입해서 사용하였고, 사육은 온도 22  $\pm$  2℃, 습도 55  $\pm$  5%, dark/light(12 시간) 조건 하에서 고품질 pellet 사료(주식회사 샘타코 바이오 코리아)와 물은 자유 섭취하도록 하였으며, 구입 후 2주간 실험실 환경에 적응 후 실험에 사용하였다.

### 3) 세포주

RBL-2H3 cells은 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 배양하였다.

### 4) 藥鍼器

藥鍼器는 30 gauge insulin syringe (Becton Dickinson, USA)를 사용하였다.

## 5) 시약

본 실험에 사용된 compound 48/80, anti-deoxynucleoprotein(DNP) immunoglobulin E(IgE), DNP-HSA, Evans blue, KOH, acetone, phosphoric acid, acetic acid, PMA(phorbol-12-myristate-13 acetate), A23187(calcium ionophore), Naphthylethylene diamine dihydrochloride, Sulfonylamide 및 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>는 Sigma로부터, FBS(fetal bovine serum), penicillin, streptomycin, DMEM(Dulbecco's modification Eagle medium) 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, tetrazolium bromide salt(MTT) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Amresco로부터, Interleukin(IL)-4와 Tumor Necrosis Factor alpha(TNF- $\alpha$ ) kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터, cAMP와 PGE<sub>2</sub> kit는 R&D Systems으로부터 구입하여 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 처치

실험군은 mouse와 rat에서 인체의 정강뼈 거친면과 종아리뼈머리의 중점에서 解谿까지의 연결선상에서 犢鼻 아래 3촌으로 앞정강근 부위에 相應하는 양쪽 足三里(ST36)<sup>10)</sup> 부위에 처치하였으며, 임의혈군은 mouse와 rat의 둔부를 취하여 任意穴(Optional Point: 이하, OP)에 처치하였다.

### 2) 실험군의 구성

실험군은 족삼리혈(ST36)과 任意穴(OP)에 생리식염수군(Saline), 桂枝藥鍼群(CR)으로 구분하여 처치하였다. 대조군은 아무런 처치를 하지 않은 군으로 하였으며, 각 혈자리에는 생리식염수나 桂枝藥鍼(20  $\mu$ g/kg)을 격일로 3 회 처치하였다.

### 3) Active systemic anaphylactic shock

ICR mouse 10 마리를 1 군으로 하여 실험군 별로 약침 처치 부위를 제모한 후 격일로 3 회의 약침을 처치하였다. 마지막 처치 1 시간 경과 후 compound 48/80 (8 mg/kg, Sigma)을 복강 내에 투여하고 mouse의 치사율을 60 분 동안 관찰하였다.

### 4) Passive cutaneous anaphylaxis

IgE 의존형 피부과민반응에 대한 영향을 알아보기 위하여 Katayama 등의 방법에 준하여 Sprague Dawley 계 rat 3마리를 1군으로 하고 실험군 별로 5 일간 격일로 총 3 회의 藥鍼을 처치하였다. 실험 3일째 되는 날 rat의 다리 부위를 제모하고 0.5 mg의 anti-DNP IgE를 네 군데 피하주사한 후 감각된 부위를 표시하였다. 48 시간 경과 후 DNP-HSA 0.5 mg과 4% evans blue를 1:1로 혼합하여 rat의 미정맥에 주사하였다. 30 분 후 rat을 도살하고 청색으로 착색된 등부위의 피부를 채취하여 1 N KOH용액 100  $\mu$ l에 침적시켜 37°C에서 24 시간 방치하였다. Acetone과 phosphoric acid (5:13) 혼합액 900  $\mu$ l를 첨가하여 원심분리한 후 상층액을 Microplate reader (Molecular Devices,

USA) 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5) 세포 배양

RBL-2H3 cells은 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양받았으며 세포의 배양을 위하여 10% heat-inactivated FBS (Gibco BRL, USA)과 1% penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL, USA)을 포함한 DMEM (Gibco BRL, USA) 배양액에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

### 6) MTT assay

RBL-2H3 cells을 24 well plate (Corning, USA)에  $2 \times 10^5$  cells/ml의 세포수가 되도록 DMEM 배양액에 분주하여 24 시간동안 안정화시킨 후, 桂枝藥碱液을 농도별 (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 처리한 후 1 시간동안 반응시켰다. 배양액을 제거 한 후 5 mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어 준 후 최대 4 시간 37°C incubator에서 배양한 후 tetrazolium bromide salt를 제거하고 DMSO를 300  $\mu$ l 씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어서 모두 녹인 후 96 well plate에 150  $\mu$ l 씩 옮긴 후 Microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3 회의 측정으로 그에

대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

### 7) $\beta$ -Hexosaminidase release

$\beta$ -Hexosaminidase의 release는 Dastych 등의 방법에 의해 측정하였다. 간략히 요약하면 RBL-2H3을 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate에 각 well당  $2 \times 10^5$ 개의 세포가 들어가도록 한 다음 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하룻밤 배양한다. 각 well의 세포들을 extracellular buffer (5 mM KCl, 12.5 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM dextros, pH 7.4) 로 2 번 세척한 다음 각 well 당 extracellular buffer와 桂枝藥碱液 (0, 0.01, 0.1, 0.25 및 1 mg/ml)을 처리한 후 1 시간동안 반응시켰다. 이후 PMA(50 nM)와 A23187(1 mM)을 사용하여 세포를 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에 1 시간 반응시키고 ice bath에서 10 분 동안 배양한 후 반응을 종결시켰다. Supernatant 20  $\mu$ l를 96 well plate에 옮기고, pellet은 Triton X-100 (0.1%) 1 ml를 24 well에 넣고 녹인 후 96 well에 20  $\mu$ l 넣는다. supernatant와 pellet 이 담긴 96 well에 substrate buffer (4-*p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 4.5) 100  $\mu$ l를 넣고 37°C 에서 1 시간 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution 200  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. Microplate reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료와 대조군의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 net percent

release(%)를 산출하였다.

net percent release(%) =

$$[S/(S+P) - S_{\text{control}}/(S_{\text{control}}+P_{\text{control}})] \times 100$$

S : supernatant, P : pellet

$S_{\text{control}}/(S_{\text{control}}+P_{\text{control}})$ (%) is spontaneous release of mediator without a stimulus

### 8) RT-PCR

RBL-2H3 cells를 6 well plate에  $5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주한 후 24 시간 동안 배양한 다음 새로운 DMEM배지에 桂枝藥鍼液을 농도별 (0, 0.25 및 1 mg/ml)로 세포에 처리하였다. 1 시간 동안 배양한 후 자극제 A23187 (1  $\mu$ M)를 처리하고 8 시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 1 ml의 TRizol을 넣고 2 분간 방치한 후 chloroform을 넣고 10 초간 vortexing하고 12,000 rpm에서 15 분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 동량의 isopropanol을 혼합하여 흔들여 주었다. 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW 20  $\mu$ l에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

RT-PCR kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 45°C에서 30 분, 94°C에서 5 분간 반응시킨 후 94°C에서 30 초간 denaturation시키고, 55~62°C에서 30 초간 annealing시킨 다음, 72°C에서 1 분간 extension시키는 cycle을 30~35 회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72°C에서 5 분간 PCR machine (GeneAmp, PCR system 9700, USA)에서 수행하였다. 각 PCR products는 2%

agarose gel에 loading하여 100 V 조건에서 30 분간 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 primer의 염기서열은 다음과 같다.

**Table 1. Primers for RT-PCR analysis**

	Forward	Reverse	bp
IL-4	ACC TTG CTG TCA CCC TGT	TTG TGA GCG TGG ACT CAT TC	351
TNF- $\alpha$	CAA GGA GGA GAA GTT CCC AA	CGG ACT CCG TGA TGT CTA AG	501
COX-2	TGT ATC CCC CCA CAG TCA AAG ACA C	GTG CTC CCG AAG CCA GAT GG	146
GAPDH	CCA CAG TCC ATG CCATCAC	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	452

### 9) 統計 분석

成績은 SPSS 12.0K for Windows 통계 프로그램 패키지를 사용하여 평균치  $\pm$  표준오차로 나타내었고 유의수준은  $P < 0.05$ 로 하였다. 각 실험군 간의 통계학적 분석은 one way-ANOVA와 Scheffe test 검정을 실시하였다.

## III. 결 과

### 1. Active Systemic Anaphylaxis (ASA)에 미치는 영향

Compound 48/80에 의한 ASA에서 아무런 처치를 하지 않은 대조군은 100%의 치사율을 보인데 반해, ST36에 saline과 CR을 처치한 군은 각각 90%와 70%의 치사율을 보였으며, OP에 saline과 CR을 처치한 군은 각각 90%와 80%의 치사율을 보였다(Table 2).

**Table 2. Effect of CR herbal acupuncture on the compound 48/80 induced active systemic**

**anaphylaxis in mice**

Acupoints	Treatment	Mortality(%)
-	-	100
ST36	CR	70
	Saline	90
OP	CR	80
	Saline	90

Data represent the mean ± S.E. of 10 mice. Mice were treated at both sides of ST36s or optional points (Ops) with saline or CR herbal acupuncture 3 times for 5 days every other days. On day 5, mice were injected with compound 48/80 (8 mg/kg, *i.p.*).

**2. Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA)에 미치는 영향**

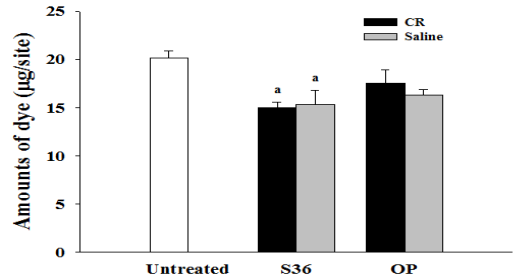
Anti-DNP IgE를 이용한 PCA에서 청색 반의 누출량은 아무런 처치를 하지 않은 대조군은 20.14 ± 0.72 μg/site으로 나타났다. 반면 ST36에 saline과 CR을 처치한 군은 15.32 ± 1.43 μg/site와 14.96 ± 0.62 μg/site, OP에 saline과 CR을 처치한 군은 16.32 ± 0.56 μg/site와 17.52 ± 1.39 μg/site로 모두 대조군에 비해 유의한 억제를 나타내었다 (Fig. 1).

**3. MTT assay**

RBL-2H3 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군에서 2.34 ± 0.06의 흡광도를 나타내었으며, CR (0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/ml)의 농도를 처리한 세포에서 각각 2.35 ± 0.07, 2.40 ± 0.01, 2.43 ± 0.05, 2.49 ± 0.05 및 2.32 ±

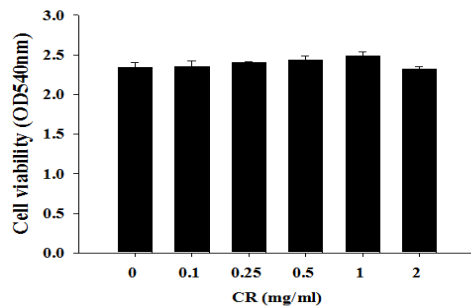
0.04의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 정상세포에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다 (Fig. 2).

**Fig. 1. Effects of CR herbal acupuncture on passive cutaneous anaphylaxis in rats.**



Rats were treated at both sides of ST36s or optional points (Ops) with saline or CR herbal acupuncture 3 times for 5 days every other days. On day 3, rats were passively sensitized by i.d. injection of anti-DNP IgE (0.5 mg), and challenged by DNP-HSA (0.5 mg, *i.v.*) containing 4% Evans blue after 48 hours. The areas of dye were measured after sacrificing the animals later 30 minutes from antigen challenge. Each column represents the mean ± S.E.. a, P<0.05; significant as compared to the untreated group

**Fig. 2. Effects of CR extract on the cell viability of RBL-2H3 cells.**

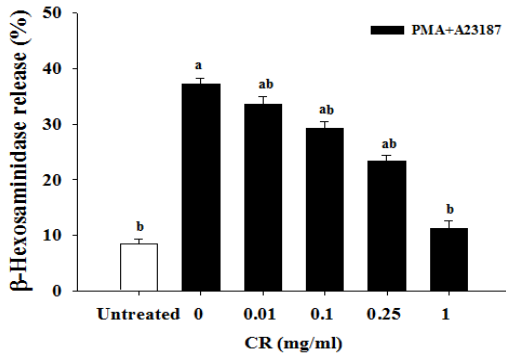


Each column represents the mean ± S.E. of 3 independent experiments. The absorbance was measured at 540 nm using ELISA reader.

#### 4. $\beta$ -Hexosaminidase release

RBL-2H3 cells에서 누출된  $\beta$ -hexosaminidase의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서  $8.46 \pm 0.80\%$ 이었으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서  $37.19 \pm 1.12\%$ 로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187 자극 30 분 전 CR (0.01, 0.1, 0.25, and 1 mg/ml)의 농도로 처리한 세포에서 각각  $33.60 \pm 1.37\%$ ,  $29.27 \pm 1.24$ ,  $23.32 \pm 1.09$  및  $11.29 \pm 1.38\%$ 로 모든 농도에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다 (Fig. 3).

Fig. 3. Effects of CR extract on the  $\beta$ -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells.



Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 independent experiments.

The absorbance was measured at 405 nm using ELISA reader.

Release (%) =  $S/(S+P) \times 100$ , S : supernant, P : pellet

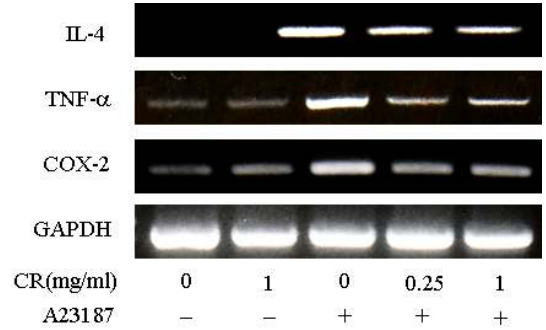
a,  $P < 0.05$ ; significant as compared to the untreated group

b,  $P < 0.05$ ; significant as compared to the PMA+A23187-stimulated group

#### 5. RT-PCR

RBL-2H3 cells에서의 IL-4, TNF- $\alpha$  와 COX-2의 mRNA의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포와 1 mg/ml의 CR을 단독으로 처리한 세포에 비해 A23187로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, A23187 자극 30 분 전 0.25 mg/ml와 1 mg/ml의 CR을 처리한 세포에서 IL-4, TNF- $\alpha$ 와 COX-2 mRNA 모든 유전자의 발현이 50%이상 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

Fig. 4. Effects of CR extract on the induction of the IL-4, TNF- $\alpha$  and COX-2 mRNA expression in RBL-2H3 cells.



Expression of the cytokines IL-4, TNF- $\alpha$  and COX-2 was induced following A23187 stimulation in RBL-2H3 cells. The time of maximal mRNA induction was 8 hours after pre-treated with 0.25 and 1 mg/ml CR. IL-4, TNF- $\alpha$ , and COX-2 mRNAs were expressed by RT-PCR method.

## IV. 고찰

桂枝는 녹나무과(樟科 : Lauraceae)에 속한 상록喬木인 桂樹 및 同屬 近緣植物의 嫩枝이다. 性味는 辛甘溫 無毒하고 心肺膀胱으

로 歸經하며 發汗解肌 溫通經脈 通陽化氣의 效能이 있고, 임상적으로는 風寒表證 즉 感冒風寒과 傷寒論의 桂枝附子湯과 같은 風濕痺痛, 金匱要略의 桂枝茯苓丸과 같은 經閉腹痛이나 痛經, 苓桂朮甘湯과 같은 陽氣不行으로 인한 痰飲이나 蓄水 그리고 水濕停滯의 病症을 다스리는데 응용된다<sup>11)</sup>.

문헌을 고찰해보면, <本草綱目><sup>12)</sup>에서 桂枝는 辛甘 溫無毒 하고 入肺膀胱經하며 利肝肺氣 心腹寒熱冷疾 霍亂轉筋 頭痛腰痛出汗 止煩止唾 咳嗽 溫中 堅筋骨 通血脈 利疏滲泄止渴 去營衛中風寒 表虛自汗 秋冬下部腹痛 益火消陰 寒痺風暗 陰盛失血 瀉痢驚癇 등을 主治한다고 하였다. <東醫寶鑑><sup>13)</sup>에서 桂枝는 枝上을 取하니 性質이 輕薄하여 能히 發散한다 하였고 足太陽經의 血分 寒邪를 能히 散한다 하였다. 氣味가 모두 輕하여 能上行하여 表를 發散하니 表虛 自汗의 要藥이라 하였다. <本草求真><sup>14)</sup>에서는 有升無降으로 肺에 入하여 利氣하고 膀胱에 入하여 化氣利水하고, 또 能히 臂에 橫行하여 調和營衛하니 痛風脇風을 治하며 止煩出汗 驅風散邪의 效能으로 解肌作用의 第一要藥이라 하였다. 임상에서 桂枝는 진정, 진통, 해열, 소염, 항균, 항바이러스, 항암, 건위, 강심, 이뇨, 지해 등에 주로 이용되고 있어<sup>5)</sup> 알러지질환에도 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

桂枝를 이용한 실험적 연구로 문 등<sup>6)</sup>의 血栓症과 高粘度血症에 미치는 영향, 양 등<sup>7)</sup>의 家兔의 腎·脾 및 循環系機能에 미치는 影響, 안 등<sup>8)</sup>의 Angiogenesis의 抑制機轉에 미치는 영향, 박 등<sup>9)</sup>의 桂枝의 항염 효과

등이 보고되어 있었으나 알러지에 대한 연구보고는 활발하지 못한 실정이었다.

足三里(ST36)는 주치가 광범위하여 消化, 循環, 呼吸, 泌尿生殖계통 등의 질환을 다스리고 理脾胃, 調中氣, 和腸消滯, 疏風化濕, 通調經絡, 調和氣血, 扶正培元, 祛邪防病, 強健脾胃하는 효능이 있어<sup>10)</sup>, 면역기능을 강화시킬 수 있는 經穴 중의 하나<sup>15)</sup>로 알려져 있으며 알러지성 紫癍病에 足三里 등을 사용한 증례<sup>16)</sup>가 보고되었다.

藥鍼療法은 經絡學說의 원리에 따라 患者의 體質, 疾病의 상태 등을 辨證한 後, 治療 經穴 및 體表반응점에 특정 한약에서 정제 추출한 약물을 주사기로 일정량 注入하여 질병을 치료하는 한방의료 행위로서 鍼灸療法과 藥物療法을 결합한 新鍼療法의 一種이다. 약침은 치료 영역이 다양하고, 효과가 빠르며, 악성 종양 자가면역계 질환, 퇴행성 관절염, 추간관 탈출증 등 기존의 치료법으로 효과를 보기 어려운 난치병에 유용하다. 특히 기존의 약재를 약침으로 조제할 수 있으며 현재 사용되고 있는 약침보다 더욱 효과가 우수한 약침제제가 개발될 가능성이 높다는 점이 장점이다<sup>1)</sup>.

알러지는 체내로 들어온 세균이나 바이러스를 공격하여 파괴시켜버리는 면역 반응이 생체 내에서 부정적인 방향으로 반응이 일어나 세균과 바이러스를 파괴시킴과 동시에 자신을 공격하는 것이다<sup>17)</sup>. 한국의 소아 알러지 질환에 관한 전국적 역학 조사에 의하면 우리나라에서도 알러지 질환이 증가하고 있음이 보고되고 있다<sup>3)</sup>. 그러나 알러지 질환에 대한 연구가 활발해지고 알러지학을



비롯한 면역학의 발전에도 불구하고 알러지 질환의 원인, 악화인자, 치료, 예후 등에 대한 연구가 더 필요한 실정이다<sup>2)</sup>.

본 연구의 목적은 알러지 질환에 대한 桂枝의 효능과 藥鍼응용의 가능성을 검증하고자 하였으며, 알러지 동물모델과 RBL-2H3 cells을 사용하여 ST36에 桂枝藥鍼의 처치와 桂枝抽出物이 알러지 반응을 효과적으로 억제할 수 있는지 조사하였다.

전통적으로 아나필락시스는 비만세포와 호염기구로부터 분비되는 화학매체에 의해 발생하는 급성 전신성 알러지 반응으로 보통 원인 항원에 노출된 후 피부증상, 호흡기 증상, 심혈관 증상, 위장관 증상 등 다기관 증상을 보이며 원인은 식품, 약물, 곤충독 등으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. Active systemic anaphylaxis는 즉시형 전신성 아나필락시스 반응으로 알러지 반응 개시 수 분 이내에 발생하여 심하면 사망에 까지 이르는 것으로 알러지 실험 모델로 많이 사용되고 있다.

Active systemic anaphylactic shock을 유도하기 위해 사용된 compound 48/80은 혼합 다당체 성분으로 세포내  $Ca^{2+}$ 을 증가시키거나, 비만세포의 세포막 및 수용체에 작용하여 세포내로의  $Ca^{2+}$ 유입을 증가시켜 비만세포의 탈과립을 유도한다<sup>19)</sup>.

Compound 48/80에 의한 active systemic anaphylactic shock을 실시한 결과 아무런 처치를 하지 않은 대조군은 100%의 치사율을 보인데 비해, ST36에 saline과 CR을 처치한 군은 각각 90%와 70%의 치사율을 보였으며, OP에 saline과 CR을 처치한 군은 각각 90%와 80%의 치사율을 보였다

(Table 2).

Passive cutaneous anaphylaxis는 수동피부면역반응으로 특정 원인물질에 대한 알러지 소인의 유무를 검사하는 방법으로 임상에서 많이 사용되고 있는 방법이다<sup>20)</sup>. 이미 생성된 IgE 항체를 피부에 주입하여 48시간 동안 감각한 후 원인물질에 노출시켜 알러지 증상의 발현 정도를 살펴보는 방법이다. 따라서 본 연구에서는 이 두 가지 동물모델을 사용하여 알러지 반응에 대한 억제효과를 조사하였다.

Anti-DNP IgE를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis에서 청색반의 누출량을 조사한 결과 아무런 처치를 하지 않은 대조군은  $20.14 \pm 0.72 \mu\text{g}/\text{site}$ 으로 나타났다. 반면 ST36에 saline과 CR을 처치한 군은  $15.32 \pm 1.43 \mu\text{g}/\text{site}$ 와  $14.96 \pm 0.62 \mu\text{g}/\text{site}$ , OP에 saline과 CR을 처치한 군은  $16.32 \pm 0.56 \mu\text{g}/\text{site}$ 와  $17.52 \pm 1.39 \mu\text{g}/\text{site}$ 로 모두 대조군에 비해 유의한 억제를 나타내었다 (Fig. 1).

이러한 결과는 ST36에 대한 桂枝藥鍼 처치가 알러지 반응 억제 효과 면에서 다른 군에 비해 우수하다는 것을 나타낸다. 또한 OP와 아무런 처치를 하지 않은 대조군에 비해 유의한 억제효과를 나타낸 것은 桂枝의 본초학적 약리효과에 기인한 결과로 사료된다. 따라서 桂枝藥鍼이 compound 48/80과 IgE 면역반응에 의한 비만세포의 탈과립을 억제하고 혈관 투과성을 억제하는데 효과가 있다고 생각된다.

알러지 반응의 호염기구와 비만세포는 가장 중심적인 역할을 하는 세포인데 IgE 항

체의 Fc부분이 호염기구와 비만세포의 세포막 표면에는 FcεRI 수용체와 결합하면 항원을 매개로 주변의 분자와 교차결합이 일어나 탈과립을 유발한다<sup>20)</sup>. 이 외에 호염기구와 비만세포를 활성화시키는 기전이 존재하는데 외부자극과 약물 등에 의한 Ca<sup>2+</sup>의 세포내 유입에 의해 탈과립이 발생한다. 본 연구에서 *in vitro* 실험에 사용된 PMA 및 A23187은 비만세포를 자극하여 세포내 Ca<sup>2+</sup> 유입과 증가를 유도하는데 증가된 Ca<sup>2+</sup>은 비만세포를 활성화시키는 필수적인 매개인자로 여겨지고 있다<sup>21)</sup>.

비만세포의 탈과립에 의해 유출되거나 세포막지질에서 새로 합성되는 대표적인 물질은 histamine, leukotriene, IL-3, IL-4, IL-5, TNF-α 등으로 IgE 항체생산, 기관지평활근의 수축, 점막 표면에 대한 선세포의 분비향진 작용 등을 나타내어 즉시형 알러지 및 염증반응을 일으켜 알러지 초기 반응을 유도한다<sup>22)</sup>. RBL-2H3 cells는 mucosal type mast cell과 유사한 특징들을 나타내고, 세포표면에 수십만 개의 IgE 수용체가 존재한다. IgE에 감작된 후에 이 세포는 항원에 반응하고 histamine을 방출하는데 β-hexosaminidase는 비만세포의 분비과립에 저장되어 있다가, 비만세포가 면역학적으로 활성화될 때 histamine과 함께 부수적으로 분비되므로 β-hexosaminidase의 활성화는 비만세포 탈과립의 표지인자로서 사용된다<sup>23,24)</sup>. 따라서 RBL-2H3 cells는 histamine과 β-hexosaminidase 분비에 알려지지 않은 약물의 효과를 연구하는데 좋은 실험모델로 알려져 있다.

본 실험에서 桂枝抽出物이 RBL-2H3 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 대조군에서 2.34 ± 0.06의 흡광도를 나타내었으며, CR (0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/ml)의 농도를 처리한 세포에서 각각 2.35 ± 0.07 및 2.40 ± 0.01, 2.43 ± 0.05, 2.49 ± 0.05, 2.32 ± 0.04의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 정상세포에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다 (Fig. 2).

RBL-2H3 cells에서 분비된 β-hexosaminidase의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 8.46 ± 0.80%이었으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서 37.19 ± 1.12%로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한(p<0.05) 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187 자극 30 분 전 CR (0.01, 0.1, 0.25 and 1 mg/ml)의 농도로 처리한 세포에서 각각 33.60 ± 1.37% 및 29.27 ± 1.24, 23.32 ± 1.09, 11.29 ± 1.38%로 모든 농도에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한(p<0.05) 감소를 보였다 (Fig. 3).

PCR법과 역전사효소반응을 혼합한 RT-PCR (revers transcription-polymerase chain reaction)법은 세포에서 추출한 mRNA에서 cDNA를 합성하고 이것을 주형으로 하여 PCR법으로 증폭하고 polyacrylamide 전기영동으로 분석하는 기술이다. 이 방법으로 mRNA양을 추정하고 전사 레벨의 유전자 발현을 정량할 수 있다<sup>25)</sup>.

RBL-2H3 cells에서의 IL-4, TNF-α와

COX-2 mRNA의 발현에 대해 조사한 결과, 아무런 처리를 하지 않은 세포와 1 mg/ml의 CR을 단독으로 처리한 세포에 비해 A23187로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량이 현저하게 증가하였으며, A23187자극 30분 전 0.25 mg/ml과 1 mg/ml의 CR을 처리한 세포에서 IL-4, TNF- $\alpha$ 와 COX-2 mRNA 모든 유전자의 발현이 50%이상 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

桂枝抽出物이 PMA 및 A23187로 자극한 RBL-2H3 cells에서 IL-4, TNF- $\alpha$ 와 COX-2 mRNA 모든 유전자의 발현을 억제시킴을 볼 때, 桂枝抽出物은 알러지 염증반응을 억제시키는 기전을 가지고 있음을 알 수 있다.

이상의 연구결과를 살펴볼 때 桂枝藥鍼의 ST36처치와 RBL-2H3 cells에 桂枝抽出物의 전처치가 알러지 반응을 억제시킴을 알 수 있었으며 향후 桂枝藥鍼이 알러지 질환 치료에 응용가능할 것으로 판단된다.

## V. 결 론

桂枝藥鍼이 type 1 hypersensitivity에 미치는 영향을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Compound 48/80에 의한 ASA에서 아무런 처치를 하지 않은 대조군은 100%의 치사율을 보인데 비해, ST36에 saline과 CR을 처치한 군은 각각 90%와 70%의 치사율을 보였으며, 임의혈에 saline과 CR을 처치한 군은 각각 90%와 80%의 치사율을 보여 ASA에 대한 억제 효과가

나타났다.

2. Anti-DNP IgE를 이용한 PCA에서 ST36군과 임의혈군 모두 아무런 처치를 하지 않은 대조군에 비해 유의성 있는 청색반의 누출량 감소를 보였다.
3. MTT assay를 실시한 결과 모든 농도에서 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다.
4. RBL-2H3 cell에서 분비된  $\beta$ -hexosaminidase의 양은 PMA와 A23187로 자극한 후 CR 0.01, 0.1, 0.25 and 1 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 감소를 보였다.
5. RT-PCR에서 CR은 IL-4, TNF- $\alpha$ 와 COX-2의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

## 參考文獻

1. 대한약침학회 학술위원회. 약침학. 서울 : 엘스비어코리아. 2008 : 3-7.
2. 고려의학 편집위원회. 알레르기 질환. 서울 : 고려의학. 2005 : 1.
3. 홍수중, 안강모, 이수영, 김규연. 한국 소아 알레르기 질환의 유병률. 대한 소아알레르기호흡기학회지. 2008 ; 18(1) : 15-25.
4. 식품의약품안전청. 대한약전외한약(생약)

- 규격집. 서울 : 동원문화사. 2007 : 42.
5. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 66-7.
  6. 文濬典, 安圭錫, 鄭燦吉. 血栓症과 高粘度血症에 미치는 황기, 桂枝 및 紅花의 效能에 關한 實驗的 研究. 동의생리병리학회지. 1989 ; 4(1) : 74-92.
  7. 梁熙昌, 具本泓. 桂枝의 芳香性物質이 家兔의 腎·脾 및 循環系機能에 미치는 影響. 경희의학. 1989 ; 5(1) : 68-78.
  8. 安圭錫, 崔昇勳, 姜琬熙. 桂枝가 Angio-genesis의 抑制機轉에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 1999 ; 13(2) : 41-53.
  9. 박희준, 이지숙, 이재동, 김남재, 표지희, 강전모 외. 계지의 항염 효과에 관한 연구. 東西醫學研究所 論文集. 2005 ; 192-203.
  10. 전국한의과대학·한의학전문대학원 경락경혈학 교재편찬위원회. 대학경락경혈학 각론(상). 원주 : 의방출판사. 2009 : 259-86.
  11. 신민교. 임상본초학. 서울 : 영림출판사. 2004 : 518.
  12. 이시진. 본초강목. 상해 : 인민위생출판사. 1978 : 1925-32.
  13. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 대성문화사. 1981 : 292.
  14. 黃宮繡. 본초구진. 대북 : 광업서국유한공사. 1981 : 87.
  15. 서범석. 면역과 관련된 수혈 고찰. 대전대 논문집. 1994 ; 2(2) : 133-61.
  16. 馮碧霞. 鍼刺治癒過敏性紫癍1例. 上海鍼灸雜誌. 1997 ; 16(4) : 45.
  17. 임병우, 최동국, 석경호. 기초면역학. 서울 : 효일. 2006 : 100.
  18. Golden DB. Patterns of anaphylaxis: acute and late phase features of allergic reactions. Novartis Found Symp. 2004 ; 257 : 101-10.
  19. Dainaka J, Ichikawa A, Koibuchi Y, Nakagawa M, Tomita K. Effect of the tridecamer of compound 48/80, a  $Ca^{2+}$ -dependent histamine releaser, on phospholipid metabolism during the early stage of histamine release from rat mast cells. Biochem Pharmacol. 1986 ; 35(21) : 3739-44.
  20. J.H.L.Player & B.M.Chain. 면역학. 서울 : E\*PUBLIC. 2006 : 75.
  21. White JR, Pluznik DH, Ishizaka K, Ishizaka T. Antigen-induced increase in protein kinase C activity in plasma membrane of mast cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1985 ; 82(23) : 8193-7.
  22. 김형민. 면역과 알레르기. 서울 : 신일상사. 1998 : 159-73.
  23. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. J Immunol. 1983 ; 131(2) : 934-9.
  24. Mastuda H, Morikawa T, Ueda K, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production from

RBL-2H3 cells. Bioorg Med Chem. 2002  
; 10(10) : 3123-8.

한 비주얼 생화학 · 분자생물학. 서울 :  
해돋이. 2000 : 60-1.

25. 大塚吉兵衛, 安孫子宜光. 생명과학을 위