

갈근추출액이 알레르기 염증반응에 미치는 영향

김홍배 · 강경화* · 황원덕** · 유선애 · 이승연

동의대학교 한의과대학 소아과학교실

*동의대학교 한의과대학 생리학교실

**동의대학교 한의과대학 내과학교실

Abstract

The Effects of *Puerariae Radix* on Allergic Inflammation

Kim Hong Bae, Kang Kyung Hwa*, Hwang Won Deuk**, Lyu Sun Ae, Lee Seung Yeon

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongeui University

**Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongeui University*

***Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongeui University*

Objectives

To study the effects of *Puerariae Radix* (PR) on allergic inflammation.

Methods

In vivo Animals were orally administrated with PR once a day for 5 days. Then, we investigated compound 48/80-induced active systemic anaphylactic shock using ICR mice and anti-DNP IgE-induced passive cutaneous anaphylaxis using Sprague Dawley rat. *In vitro* we measured cell viability, b-hexosaminidase release, IL-4, TNF- α and PGE₂ secretion and IL-3, IL-4, TNF- α , COX-2 and iNOS mRNA expression from RBL-2H3 cells after treatment of PR.

Results

In vivo PR pretreatments inhibited compound 48/80-induced active systemic anaphylactic shock. Passive cutaneous anaphylaxis was inhibited. *In vitro* 0 ~ 1% PR treatments were not affect on cell viability and inhibited b-hexosaminidase release, IL-4, TNF- α and PGE₂ secretion. PR treatments also decreased IL-3, IL-4, TNF- α , COX-2 and iNOS mRNA expression in RBL-2H3 cells.

Conclusions

These results suggest that PR may be beneficial in the inhibition of allergic inflammatory response.

Key words : *Puerariae Radix*, allergic inflammatory response

I. 緒 論

아토피 피부염은 영아습진 또는 알레르기성 습진이라고도 하며 영아에서 가장 흔한 알레르기 질환이며, 홍반 부종, 심한 소양감, 삼출, 부스럼딱지와 인설을 특징으로 하는 염증성 피부질환이다¹⁾.

유전적 소인이 관여하며 아토피 피부염을 가진 소아는 31%에서 알레르기 비염과 천식으로 발전하는 경향이 있으며, 영아기에서는 남자보다 여자에서 발생빈도가 높고 유아기에서는 3:2의 비율로 남자에게서 많다고 한다²⁾. 대개 4세 이후 자연 치유가 되었으나 최근 산업화로 인한 여러 환경요인과 잘못된 식습관 및 스트레스 등으로 약 50% 정도가 만성화되어 성인형 아토피 피부염으로 진행되고 있다³⁾.

한의학적으로 아토피 피부염은 奶癬, 胎癬, 胎斂瘡, 濕疹, 濕瘡, 四彎風, 淫瘡 등의 범주에서 살펴볼 수 있으며⁴⁾, 稟賦不耐 脾胃不和로 濕熱이 생하거나, 外로 風熱之邪가 침입하고 內로 濕熱이 蘊蓄된 것이 肌膚에 蘊阻하여 발생하며, 建脾利濕, 祛風清熱, 養血潤燥 등의 치법을 사용한다⁵⁾.

葛根(*Puerariae Radix*)은 콩과에 속한 다년생 낙엽등본식물인 칩 (*Pueraria lobata* Ohwi) 및 동속근연식물인 털칩(*P. thersonii* BENTH.), 전분칩(*P. axilis* PAMP.), 산칩(*P. amurensis* WANG et TANG), 가새잎칩(*P. phascoloides* BENTH.) 등의 뿌리이며 우리나라 각 지역의 산에 자생한다⁶⁾.

葛根은 《神農本草經》⁷⁾에 “葛根 味甘平 主消渴 身大熱 … 解諸毒”이라고 수재된 이래 外感表證에 發汗解肌를 목적으로 葛根湯과

葛蘇飲, 透疹을 목적으로 升麻葛根湯, 生津止渴을 목적으로 黃蓮地黃湯, 清熱清腸을 목적으로 地榆散, 酒毒을 풀기 위한 三豆解醒湯과 神仙不醉丹 등에 두루 응용되어 왔다⁸⁻¹²⁾.

이에 저자는 發汗解肌, 解表透疹, 生津止渴 및 解酒毒하는 효능을 가진 葛根이 알레르기 염증 반응을 억제할 것으로 생각되어 mouse와 rat 모델에서 항알레르기 항염증의 효능을 살펴보고 rat basophilic leukemia cell line(RBL-2H3)에서 알레르기 염증반응을 매개하는 인자의 생성과 유출에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 검액의 제조

葛根(광일제약) 300 g을 증류수로 水洗 후 2 ℓ의 증류수를 가하여 3 시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리한 다음, 0.2 mm 여과지에서 여과하여 rotary evaporator로 200 ml가 되도록 감압 농축 후 동결건조하여 54.3 g의 추출물을 얻었다. 획득한 갈근 추출물(이하 PR)은 -20 ℃에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 사용하였다(Table 1).

2) 실험동물

실험에 사용한 동물은 ICR계 mouse (male, 30 ± 2 g)와 Sprague Dawley계 rat (male, 200 ± 20 g)을 (주)샘타코 바이오 코리아에서 구입해

Table 1. 葛根

韓藥名	生藥名	學名	重量(g)
葛根	<i>Puerariae Radix</i>	<i>Puerariae thuenbergina</i>	300

서 사용했으며, 사육은 온도 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, dark/light (12 시간) 조건 하에서 고품질 pellet 사료와 물은 자유 섭취하도록 하였으며, 구입 후 2 주간 실험실 환경에 적응 후 실험에 사용하였다.

3) 세포주

RBL-2H3은 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받아 배양하였다.

4) 시약

본 실험에 사용된 compound 48/80, anti-deoxynucleoprotein (DNP) immunoglobulin(Ig) E, DNP-HSA, Evans blue, KOH, acetone, phosphoric acid, PMA (phorbol-12-myristate-13 acetate) 및 A23187 (calcium ionophore)은 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- α) kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터, RT-PCR kit (AccuPower RT/PCR PreMix)는 Bioneer로부터 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 검액의 처치

동결건조된 PR은 실험 직전 생리식염수에 농도별로 용해하여 실험용 존대를 사용하여 5일간 처치하였으며, 1일 1회 일정한 시각에 경구 투여하였다.

2) 실험군의 구성

실험군은 대조군 (CON)과 갈근투여군 (PR-I, PR-II)으로 구분하였다. CON은 생리식염수 투

여군, PR-I는 0.5 g/kg의 갈근투여군, PR-II는 1 g/kg의 갈근투여군으로 구성하였다.

3) Active systemic anaphylaxis

ICR mouse 10 마리를 1 군으로 하여 실험군 별로 검액 처치 후 마지막 처치 1시간 경과 후 compound 48/80 (8 mg/kg, Sigma)을 복강 내에 투여하고 mouse의 치사율을 30 분 동안 관찰하였다.

4) Passive cutaneous anaphylaxis

IgE 의존형 피부과민반응에 대한 영향을 알아보기 위하여 Katayama 등¹³⁾의 방법에 준하여 rat 3 마리를 1 군으로 하고 실험군 별로 5일간 처치하였다. 실험 3 일째 되는 날 rat의 등 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 mouse를 도살하고 청색으로 착색된 등 부위의 피부를 채취하여 1 N KOH용액 100 μl 에 침적시켜 37°C 에서 24 시간 방치하였다. Acetone과 phosphoric acid (5:13) 혼합액 900 μl 를 첨가하여 원심분리한 후 상층액을 620 nm에서 흡광도 측정을 하였다.

5) 세포 배양

RBL-2H3은 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_2 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution (Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시

킨 다음 계대 배양하였다.

6) MTT assay

RBL-2H3을 24 well plate (Corning, USA)에 2×10^5 cell/ml의 세포수가 되도록 DMEM 배양액에 분주하여 24 시간동안 안정화시킨 후, PR를 농도별 (0%, 0.05%, 0.1%, 0.25% 및 0.5%)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 200 μ l 씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 96 well plate에 100 μ l 씩 옮긴 후 ELISA (Molecular Devices, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3 회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

7) b-Hexosaminidase release

b-Hexosaminidase의 release는 Dastyh 등¹⁴⁾과 Schwartz 등¹⁵⁾의 방법에 의해 측정하였다. 간략히 요약하면 RBL-2H3을 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate에 각 well 당 2×10^5 개의 세포가 들어가도록 한 다음 37°C 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양한다. 각 well의 세포들을 extracellular buffer (5 mM KCl, 12.5 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM dextros, pH 7.4) 로 2번 세척한 다음 각 well 당 extracellular buffer와 PR를 농도별(0%, 0.25% 및 0.5%)로 처리한 후 1 시간동안 반응시켰다. 이후 PMA (50 nM)와 A23187 (1 mM)을 사용하여 세포를 37°C 5% CO₂ incubator에 1시간 반응시키고 ice bath에서 10분 동안 배양한 후 반응을 종결시켰다. Supernatant 20 μ l를 96 well plate에 옮기고, pellet은 Triton X-100 (0.1%) 1 ml을 24 well에

넣고 녹인 후 96 well에 20 μ l 넣는다. supernatant와 pellet이 담긴 96 well에 substrate buffer (4-p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 1 mM, sodium citrate 0.05 M, pH 4.5) 100 μ l을 넣고 37°C 에서 1시간 배양시킨 다음 각 well 당 stop solution 200 μ l을 첨가하여 반응을 종결시켰다. ELISA를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료와 대조구의 흡광도 값으로 다음 식에 의해 net percent release(%) 을 산출하였다.

$$\text{net percent release(\%)} = \frac{[S/(S+P)-S_{\text{control}}/(S_{\text{control}} + P_{\text{control}})] \times 100}{S_{\text{control}}/(S_{\text{control}} + P_{\text{control}})(\%)}$$

S : supernatant, P : pellet

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

8) IL-4 assay

RBL-2H3 cells을 6 well plate에 5×10^5 cell/well의 농도로 분주한 후 24 시간 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 PR를 농도별 (0%, 0.25% 및 0.5%)로 처리하였다. 1 시간동안 배양한 후 A23187 (1 μ M)을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고 8 시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000 rpm에서 2 분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 IL-4 kit (BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. ELISA를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4의 양을 계산하였다.

9)TNF-a assay

RBL-2H3 cells을 6 well plate에 5×10^5 cell/well의 농도로 분주한 후 24 시간동안 배양한 다음 새로운 DMEM배지에 PR를 농도별 (0%, 0.25% 및 0.5%)로 처리하였다. 1 시간동안 배양한 후 자극제 A23187 (1 μ M)를 처리하고 8

시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5000 rpm에서 2분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70℃에 보관하였다가 TNF-a kit (BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. ELISA를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 TNF-a의 양을 계산하였다.

10) PGE₂ assay

RBL-2H3 cells을 6 well plate에 5 × 10⁵ cell/well의 농도로 분주한 후 24 시간동안 배양한 다음 새로운 DMEM 배지에 PR (0%, 0.25% 및 0.5%)를 처리하였다. 1 시간동안 배양한 후 자극제 A23187 (1 μM)를 처리하고 8 시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5000 rpm에서 2 분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70℃에 보관하였다가 PGE₂ kit (R&D Systems, USA)를 사용하여 측정하였다. ELISA를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 PGE₂의 양을 계산하였다.

11) RT-PCR

RBL-2H3 cells에 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 흔들어 주었다. 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet은 DEPC (diethyl pyrocarbonate)-DW 20 μl에 녹여 RT-PCR에 사용하였다. RT-PCR kit (AccuPower RT/PCR PreMix, Bioneer, Korea)를 사용하여 94 °C에서 5 분간 반응시킨 후 94℃에서 30 초간 denaturation시키고, 55 ~ 62℃에서 30 초간 annealing시킨 다음, 72℃에서 1 분간 extension시키는 cycle을 30~32 회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72℃에서 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.

12) 統計 분석

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

Table 2. Primer Sequence

	Forward	Reverse	bp
IL-3	CTA TGC TGC TCC CGC TCC TGATG	CAT TCC ACG GTC ATAGGG CGAAAG	473
IL-4	ACC TTG CTG TCA CCC TGT	TTG TGAGCG TGG ACTCAT TC	351
TNF-α	CAAGGAGGAGAAGTT CCC AA	CGG ACT CCG TGA TGT CTAAG	501
COX-2	TGT ATC CCC CCA CAG TCA AAG ACAC	GTG CTCCCG AAG CCA GAT GG	146
iNOS	TTGCCACGG AAG AGACGC AC	CAG GCA CAC GCA ATG ATG GG	130
GAPDH	CCACAG TCC ATG CCA TCAC	TCC ACC ACC CTG TTGCTG TA	452

III. 結 果

1. Active systemic Anaphylaxis에 미치는 영향

Compound 48/80에 의한 active systemic anaphylaxis에서 CON은 100%의 치사율을 보인데 비해, PR-I은 80%의 치사율을 보였으며, PR-II는 70%의 치사율을 보였다 (Table 3).

2. Passive cutaneous Anaphylaxis에 미치는 영향

Anti-DNP IgE를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis에서 청색반의 누출량은 CON은 $76.43 \pm 2.01 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다. 반면 PR-I은 $54.09 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$, PR-II는 $51.94 \pm 1.47 \mu\text{g/ml}$

로 CON에 비해 유의성 ($p < 0.05$)있는 감소를 보였다 (Fig. 1).

3. 세포 생존률에 미치는 영향

RBL-2H3 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. RBL-2H3 cells의 경우 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 1.87 ± 0.08 의 흡광도를 나타내었으며, PR를 농도별 (0.05%, 0.1%, 0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 1.92 ± 0.03 , 1.96 ± 0.04 , 1.98 ± 0.08 및 1.99 ± 0.04 의 흡광도를 나타내어 모든 PR농도에서 정상세포에 비해 생존률에 유의한 감소를 보이지 않았다 (Fig. 2).

Table 3. Effects of PR on the Active Systemic Anaphylaxis in Mice

Group	Dose (g/kg, p.o.)	Lethal rate(%)
CON	saline	100
PRI	0.5	80
PRII	1	70

Mice were orally administrated with saline or PR once a day for 5 days. On day5, mice were injected with compound 48/80 (8 mg/kg, i.p.). The lethal rates were observed later 30 minutes from compound 48/80 injection. CON was orally administrated with saline. PR-I was orally administrated with 0.5 g/kg PR. PR-II was orally administrated with 1 g/kg PR.

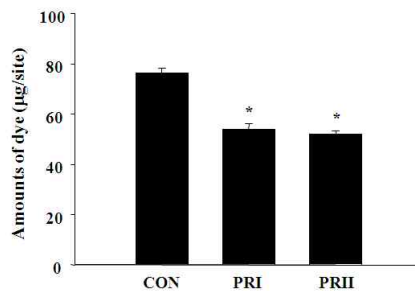


Fig. 1. Effects of PR on the passive cutaneous anaphylaxis in rats

Rats were orally administrated with saline or PR once a day for 5 days. On day3, 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. CON was orally administrated with saline. PR-I was orally administrated with 0.5 g/kg PR. PR-II was orally administrated with 1 g/kg PR. Each column represents the mean ± S.E. * $P < 0.05$; significant as compared to the CON.

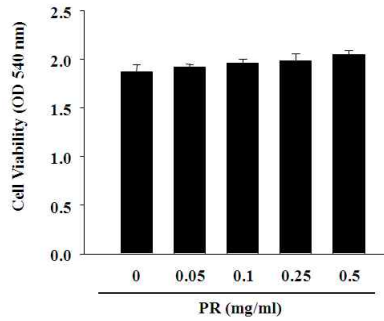


Fig. 2. Effects of PR on the cell viability of RBL-2H3 cells
 Each column represents the mean \pm S.E. of 3 independent experiments.
 The absorbance was measured at 540 nm using ELISA reader.
 Each column represents the mean \pm S.E.

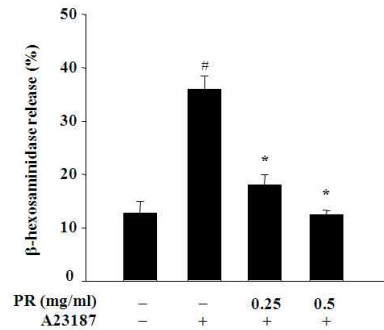


Fig. 3. Effects of PR on the b-Hexosaminidase release from RBL-2H3 cells
 Each column represents the mean \pm S.E. of 3 independent experiments.
 The absorbance was measured at 405 nm using ELISA reader.
 Release (%) = $S/(S+P) \times 100$, S : supernant, P : pellet
 #, $P < 0.05$; significant as compared to the untreated group
 *, $P < 0.05$; significant as compared to the PMA+A23187-stimulated group

4. b-Hexosaminidase release에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 누출된 b-hexosaminidase의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 $12.65 \pm 2.24\%$ 이었으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서 $35.93 \pm 2.56\%$ 로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187로 자극한 후 PR를 농도별(0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 $17.95 \pm 1.95\%$, $12.46 \pm 0.79\%$ 로 모든 농도에서 PMA와 A23187로 자극한 세포

에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다 (Fig. 3).

5. IL-4 분비에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 4.16 ± 0.04 pg/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 1056.16 ± 26.43 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 PR를 농도별(0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 930.03

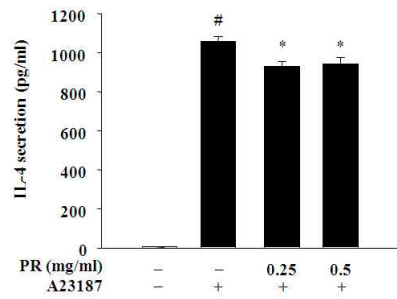


Fig. 4. Effects of PR on the IL-4 secretion from RBL-2H3 cells
 Each column represents the mean \pm S.E. of 3 independent experiments.
 The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader.
 #, P<0.05; significant as compared to the untreated group
 *, P<0.05; significant as compared to the A23187-stimulated group

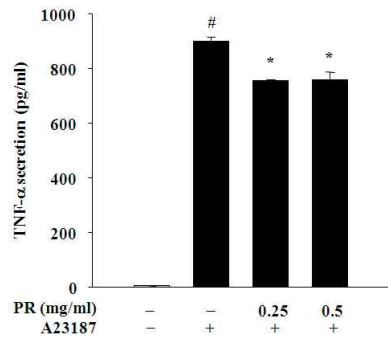


Fig. 5. Effects of PR on the TNF-α secretion from RBL-2H3 cells
 Each column represents the mean \pm S.E. of 3 independent experiments.
 The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader.
 #, P<0.05; significant as compared to the untreated group
 *, P<0.05; significant as compared to the A23187-stimulated group

± 23.17 pg/ml, 941.56 ± 34.65 pg/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다 (Fig. 4).

6. TNF-α 분비에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF-α의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 4.43 ± 0.05 pg/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 899.30 ± 15.60 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 PR를 농도별

(0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 754.04 ± 5.49 pg/ml, 759.96 ± 28.41 pg/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다 (Fig. 5).

7. PGE₂ 분비에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 PGE₂의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.05 ± 0.01 ng/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 0.12 ± 0.02 ng/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었

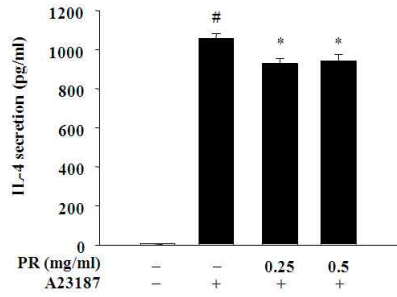


Fig. 6. Effects of PR on the PGE2 secretion from RBL-2H3 cells

Each column represents the mean ± S.E. of 3 independent experiments.

The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader.

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

*, P<0.05; significant as compared to the A23187-stimulated group

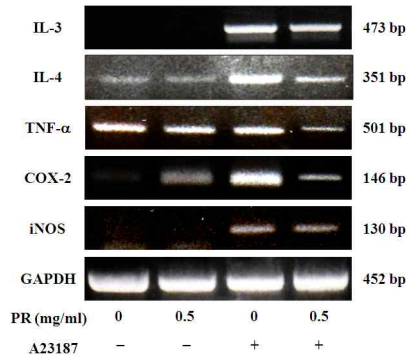


Fig. 7. Effects of PR on the induction of the IL-3, IL-4, TNF- α , COX-2 and iNOS mRNA expression in RBL-2H3 cells

Expression of the cytokines the IL-3, IL-4, TNF- α , COX-2 and iNOS was induced following A23187stimulation. The time of maximal mRNA induction was 8 hours after pre-treated with 0.5% PR. IL-3, IL-4, TNF- α , COX-2 and iNOS mRNAs were expressed by RT-PCR method.

다. 반면 A23187로 자극한 후 PR를 농도별 (0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 0.07 ± 0.01 ng/ml, 0.06 ± 0.01 ng/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다 (Fig. 6).

8. IL-3, IL-4, TNF- α , COX-2, iNOS mRNA 발현에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서의 IL-3, IL-4, TNF- α , COX-2, iNOS mRNA의 발현에 대해 살펴보면, 아무

런 처리를 하지 않은 세포와 0.5 g/kg의 PR을 단독으로 처리한 세포에 비해 A23187로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량이 증가하였으며, A23187자극 전 0.5 g/kg의 PR을 처리한 세포에서 모든 유전자의 발현이 감소하였으며, IL-4, TNF- α , COX-2와 iNOS mRNA의 발현은 50% 이상 감소하였다 (Fig. 7).

IV. 考 察

아토피 피부염은 소양감, 홍반, 삼출, 가피, 인설 등의 증상을 나타내는 만성 재발성 염증성 피부질환으로 유전적 요인과 함께 환경적 요인이 복합적으로 관여하여 발생한다.

아토피 피부염의 치료 목표는 건조한 피부에 대한 적절한 수화와 더불어 소양증과 피부염을 감소시키면서 그 악화 요인을 줄이는 것이며, 근본 원인이 밝혀지지 않고 있어 대증치료로 스테로이드제, 항히스타민제 등을 위주로 하며 면역조절제, 항생제 등을 병용하기도 한다¹⁶.

최근 한의계에서도 아토피 피부염에 대한 치료제 개발을 위한 다양한 노력들이 시도되고 있는데, 이 중 升葛湯¹⁷⁾, 葛根解肌湯¹⁸⁾ 등 갈근이 포함된 처방들에서 유의한 임상적 효과가 있었다는 성과들이 보고되고 있다.

갈근은 콩과에 속한 다년생 낙엽등본식물인 칩의 뿌리로, 개화기는 8월 결실기는 9-10월이며 산지나 초원의 음습지에 흔히 나며 전국에 분포한다.

주요성분으로는 isoflavone puerarin, puerarin xyloside, daidzein, β -sitosterol, arachin acid 등이 알려져 있으며, 약리작용으로는 순환계통에 대한 개선과 혈관확장 작용, 항고혈압 작용, 항 혈소판 응집 작용, 혈당강하 작용, 평활근 이완작용, 해열작용, 익지 작용, 항 종류 작용, 항산소결핍 작용, 항산화 작용, 해독작용과 미약한 국소마취 작용 등이 있다^{19,20)}.

한의학에서 갈근은 《神農本草經》⁷⁾에 “葛根 味甘平 主消渴 身大熱 …… 解諸毒” 이라고 기재된 發汗解肌, 發表透疹, 生津止渴, 解毒排膿, 升陽止瀉 등의 효능으로 임상에서 感冒, 麻疹, 消渴, 下痢를 치료하고 酒毒을 푸는 등 다양한 처방들에 활용되어 왔다.

이에 저자는 한의학적으로 다양한 치료에 활용되고 있고, 항염증 등의 약리활성을 가지고 있는 갈근이 알레르기성 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있을 것이라 생각하여 연구하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Active systemic anaphylaxis는 즉시형 전신성 아나필락시스 반응으로 알레르기 반응 개시 수분 이내에 발생하여 심하면 사망에 까지 이르는 것으로 알레르기 실험모델로 많이 사용되고 있다. Passive cutaneous Anaphylaxis는 수동피부 면역반응으로 특정 원인물질에 대한 알레르기 소인의 유무를 검사하는 방법으로 임상에서 많이 사용되고 있는 방법이다. 이미 생성된 IgE 항체를 피부에 주입하여 48시간동안 감각한 후 원인물질에 노출시켜 알레르기 증상의 발현 정도를 살펴보는 방법이다. 따라서 본 연구에서는 이 두 가지 동물모델을 사용하여 알레르기 반응에 대한 억제효과를 조사하였다.

Active systemic anaphylaxis를 유도하기 위해 사용된 compound 48/80은 혼합 다당체 성분으로 세포내 Ca^{2+} 를 증가시켜 비만세포의 탈과립을 유도한다²²⁾. Compound 48/80에 의한 Active systemic anaphylaxis를 실시한 결과 CON은 100%의 치사율을 보인데 비해, PR-I은 80%의 치사율을 보였으며, PR-II는 70%의 치사율을 보였다 (Table 3).

Anti-DNP IgE를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis에서 청색반의 누출량은 CON은 $76.43 \pm 2.01 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 반면 PR-I은 $54.09 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$, PR-II는 $51.94 \pm 1.47 \mu\text{g/ml}$ 로 CON에 비해 유의성 ($p < 0.05$)있는 감소를 보였다 (Fig. 1). 이러한 결과는 PR이 compound 48/80과 IgE 면역반응에 의한 비만세포의 탈과립을 억제하고 혈관 투과성을 억제한 결과라고 생각된다.

알레르기 반응의 유발에서 가장 핵심적인 역할을 하는 세포는 호염기구와 비만세포이며 IgE항체가 세포막 표면에는 FcεRI이 수용체와 교차결합하고 비만세포의 활성화가 시작되면 세포질 내 과립의 팽창과 탈과립이 발생한다. 이 외에 호염기구와 비만세포를 활성화시키는 기전이 존재하는데 외부자극과 약물 등에 의한 Ca²⁺의 세포내 유입에 의해 탈과립이 발생한다.

본 연구에서 *in vitro* 실험에 사용된 PMA 및 A23187은 비만세포를 자극하여 세포내 Ca²⁺ 유입과 증가를 유도하는데 증가된 Ca²⁺은 비만세포를 활성화시키는 필수적인 매개인자로 여겨지고 있다²³⁾.

비만세포의 탈과립에 의해 유출되거나 세포막지질에서 새로 합성되는 IL-3, IL-4, TNF-α, PGE², NO 등 매개 물질에 의해 알레르기 염증반응을 유도한다. 염증매개 물질의 형성은 phospholipaseA₂의 활성화로 인해 arachidonic acid가 prostaglandin (PG)으로 바뀌는 과정 및 NO형성 과정으로 이어지게 된다²⁴⁻²⁵⁾. 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만²⁶⁾, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다²⁷⁻²⁸⁾.

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 PGs로 전환하는 효소로 COX-1과 COX-2로 분류된다²⁹⁾. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용하며³⁰⁾, COX-2는 염증매개물질인 PGE²를 형성시키며, PGE²는 염증반응, 면역반응, 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다³¹⁾.

RBL-2H3 cells은 mucosal type mast cell과 유

사한 특징들을 나타내고, 세포표면에 수십만 개의 IgE수용체가 존재한다. IgE에 감작된 후에 이 세포는 항원에 반응하고 histamine을 방출하는데 b-hexosaminidase는 비만세포의 분비과립에 저장되어 있다가, 비만세포가 면역학적으로 활성화될때 histamine과 함께 부수적으로 분비되므로 b-hexosaminidase의 활성화는 비만세포 탈과립의 표지인자로서 사용된다³²⁻³³⁾. 따라서 RBL-2H3 cells은 histamine과 b-hexosaminidase 분비에 알려지지 않은 약물의 효과를 연구하는데 좋은 실험모델로 알려져 있다.

본 실험에서 PR이 RBL-2H3 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 1.87 ± 0.08의 흡광도를 나타내었으며, PR를 농도별 (0.05%, 0.1%, 0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 1.92 ± 0.03, 1.96 ± 0.04, 1.98 ± 0.08 및 1.99 ± 0.04의 흡광도를 나타내어 모든 PR농도에서 정상세포에 비해 생존률에 유의한 감소를 보이지 않았다 (Fig. 2).

RBL-2H3 cells에서 분비된 b-hexosaminidase의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 12.65 ± 2.24%이었으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서 35.93 ± 2.56%로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187로 자극한 후 PR를 농도별 (0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 17.95 ± 1.95%, 12.46 ± 0.79%로 모든 농도에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 (p<0.05) 감소를 보였다 (Fig. 3).

알레르기 반응은 비만세포 및 알레르기 면역반응과 관련된 세포에서 분비되는 cytokine의 조절을 통해 억제할 수 있다. IL-4는 즉시형 과민반응의 매개자인 IgE와 비만세포 매개성 면역반응의 조절자로 IL-4의 생산 증가는 알레르

기의 발생에 증추적인 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 4.16 ± 0.04 pg/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 1056.16 ± 26.43 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 PR를 농도별 (0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 930.03 ± 23.17 pg/ml, 941.56 ± 34.65 pg/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다 (Fig. 4).

비만세포에서 유리된 TNF-a는 국소의 혈관 내피세포에 작용하여 ELAM-1의 발현 및 백혈구의 혈관외 유주를 유도하는 것으로써 특히 알레르기 국소의 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다³⁵⁾.

RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF-a의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 4.43 ± 0.05 pg/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 899.30 ± 15.60 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 PR를 농도별 (0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 754.04 ± 5.49 pg/ml, 759.96 ± 28.41 pg/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다 (Fig. 5).

RBL-2H3 cells에서 분비된 PGE2의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.05 ± 0.01 ng/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 0.12 ± 0.02 ng/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극한 후 PR를 농도별 (0.25% 및 0.5%)로 처리한 세포에서 각각 0.07 ± 0.01 ng/ml, 0.06 ± 0.01 ng/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다 (Fig. 6).

비만세포에서 nitric oxide의 생성과 역할에 대해서는 이견이 있으나³⁶⁻³⁷⁾ 알레르기 염증반응에서 대식세포의 활성화와 염증반응의 매개인자로서의 nitric oxide의 분비를 유도하는 효소인 iNOS와 COX-2과 관여하는 것으로 알려져 있다. 이에 RBL-2H3 cells에서 알레르기 염증반응을 유도하는 인자인 IL-3, IL-4, TNF-a, COX-2, iNOS의 mRNA 발현정도를 관찰하였다.

실험결과 RBL-2H3 cells에서의 IL-3, IL-4, TNF-a, COX-2, iNOS mRNA의 발현은 아무런 처리를 하지 않은 세포와 0.5 g/kg의 PR을 단독으로 처리한 세포에 비해 A23187로 자극한 세포에서 mRNA의 발현량이 증가하였으며, A23187 자극 전 0.5 g/kg의 PR을 처리한 세포에서 모든 유전자의 발현이 감소하였으며, IL-4, TNF-a, COX-2와 iNOS mRNA의 발현은 50%이상 감소하였다 (Fig. 7).

이상의 결과를 살펴보면 葛根추출물이 동물모델에서 알레르기 반응을 억제하였으며, PMA 및 A23187로 자극한 RBL-2H3 cells에서 알레르기 반응을 유도하고 염증반응을 촉발하는 여러 매개인자들의 분비 및 유전자 발현을 조절하여 알레르기 반응의 초기단계에 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

갈근추출물(PR)이 알레르기성 염증반응에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Compound 48/80에 의한 Active systemic anaphylaxis를 억제하였다.
2. Anti-DNP IgE를 이용한 Passive cutaneous anaphylaxis를 억제하였다.

3. RBL-2H3 cells에서 b-hexosaminidase의 분비를 억제하였다.
4. RBL-2H3 cells에서 IL-4의 분비를 억제하였다.
5. RBL-2H3 cells에서 TNF-a의 분비를 억제하였다.
6. RBL-2H3 cells에서 PGE2의 분비를 억제하였다.
7. RBL-2H3 cells에서 IL-3, IL-4, TNF-a, COX-2, iNOS mRNA의 발현을 감소시켰다.

11. 周鳳梧. 古今醫方縱橫. 北京. 人民衛生出版社. 1996:26-34.
12. 梁基相. 漢藥의 配合과 臨床應用. 서울. 傳統醫學研究所. 1993:64-6.
13. S. Katayama, H. Shionoya and S. Ohtake: A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous allergy in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* 1978; 22:89-101.
14. Dastych J, Walczak-Drzewiecka A, Wyczolkowska J, Metcalfe DD. Murine mast cells exposed to mercuric chloride release granule-associated N-acetyl-beta-d-hexosaminidase and secrete IL-4 and TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1108-14.
15. Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol* 1979;123: 1445-50.
16. 이혜란. 아토피 피부염. 소아과학회지. 2006; 43(9):1161-7.
17. 신상호, 김자혜, 김미보, 윤화정, 유선애, 이승연, 이미엽, 김규곤, 고우신. 승갈탕을 사용한 아토피 피부염 환자에 대한 임상시험. 한방안이비인후피부과학회지. 2007;20 (2): 199-212.
18. 양성완. 수종 한약처방이 아토피 피부염 환자에서 SCORAD 및 Cytokine 변화에 미치는 영향. 서울. 경희대학교 대학원. 2004.
19. 강병수, 김영관. 임상배학본초학. 서울. 영림사. 1994:477-9.
20. 중화 본초편찬위. 중화본초. 상해. 상해과학기술출판사. 2002: 610-19.
21. Barnes PJ. Immunology of asthma and

參考文獻

1. 홍창의. 소아과학. 서울. 대한 교과서주식회사. 1987:612-4.
2. 이진용, 김덕근. 아토피 피부염 환자 67명에 대한 임상적 고찰. 대한한방소아과학회지. 1993;7(1):121-33.
3. 김정원. 아토피피부염의 진단과 치료. 대한알레르기학회지. 1993;13(3):84-90.
4. 고백화. 實用中醫外科學. 上海. 上海科學技術出版社. 1985:460-4.
5. 김미정, 이승연. 소아 아토피 피부염에 대한 문헌적 고찰. 대한한방소아과학회지. 2000; 14(2):167-82.
6. 신민교 편저, 임상본초학, 서울. 영림사, 2002:341-43.
7. 손성연집. 神農本草經. 서울. 경희대학교출판국. 1968:7.
8. 雷裁權外 共編. 中華臨床中藥學. 上海. 人民衛生出版社. 1998:330-3.
9. 康秉秀外 共著. 方劑의 體系的 構成을 위한 臨床配合本草學. 서울. 영림사. 1994:477-9.
10. 楊濟 外 共編. 臨證用藥配伍指南. 北京. 中國醫藥科技出版社. 1996:67-9.

- chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:183-92.
22. 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.
 23. White, D.H., K. Pluzmik and T. Ishizaka. Antigen-induced increase in protein kinase C activity in plasma membrane of mast cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1986;82:8139-97.
 24. Vane, J. A. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New. Biol.*, 23:232-5.
 25. Funk, C. D., Frunk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S. and Fitzgerald, G. A. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.*, 1991;5: 2304-12.
 26. Weis, Z. A., Cicatiello, L. and Esumi, H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J.*, 1996; 316:209-15.
 27. Ryu, J. H. Ahn, H. Kim, J. Y. and Kim, Y. K. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res.*, 2003;17:485-9.
 28. Mu, M. M., Chakravorty, D., Sugiyama, T., Koide, N., Takahashi, K., Mori, I., Yoshida, T. and Yokochi, T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Res.*, 2001;7:431-8.
 29. Masferrer, J., Zweifel B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson. P. C. and Seibert, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl. Acad. Sci.*, 1994;91:3228-32.
 30. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S, Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. and Isakson, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1994;91:12013-7.
 31. Kim, J. Y., Jung, K. S. and Jeong, H. G. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Letters*, 2004;569:321-6.
 32. Marquardt DL, Wasserman SI. Modulation of rat serosal mast cell biochemistry by in vivo dexamethasone administration. *J Immunol.* 1983;131:934-9.
 33. 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;10:3123-8.
 34. Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Miyamasu M, Yamada H, Nakajima T, Fujisawa T, Ra C, Morita Y, Yamamoto K. Regulation of surface FcepsilonRI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;124:470-7.
 35. 이중달. 그림으로 설명한 병리학. 서울, 고려의학. 1991:29.

36. Gilchrist, M., Savoie, M., Nohara, O., Wills, F. L., Wallace, J. L., and Befus, A. D. *J. Leukocyte Biol.* 2002;71:618-24.
37. Careau E, Sirois J, Bissonnette EY. Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;26: 579-86.