

감초藥鍼이 PCA반응과 비만세포의 β -Hexosaminidase 및 Cytokine 분비에 미치는 영향

이항도¹ · 송춘호^{1,2}

¹동의대학교 한의과대학 경락경혈학교실, ²동의대학교 한의학연구소

Effect of Glycyrrhizae Radix Pharmacopuncture on PCA and Secretion of β -Hexosaminidase and Cytokines in RBL-2H3 Cells

Hang-Do Lee¹, Choon-Ho Song^{1,2}

¹Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

²Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Abstract

Objectives : The purpose of this study is to investigate anti-allergic effects of Glycyrrhizae Radix(GR) pharmacopuncture and GR extract.

Methods : *In vivo*, animals were gotten GR pharmacopunctures at both sides of ST36s three times for 5 days. Then, we investigated anti-DNP IgE-induced passive cutaneous anaphylaxis of Sprague Dawley rats. *In vitro*, we measured cell viability, β -hexosaminidase release, and the secretion of interleukin-4(IL-4) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in RBL-2H3 cells after treatment of various concentrations of GR extract.

Results : *In vivo*, we observed inhibition of passive cutaneous anaphylaxis after GR pharmacopuncture treatments at both sides of ST36s and optional points. *In vitro*, GR extract treatments did not affect cell viability, but inhibited β -hexosaminidase release and the secretion of IL-4 and TNF- α .

Conclusions : These results suggest that GR pharmacopuncture and GR extract should be beneficial in the inhibition of allergic inflammatory response.

Key words : Glycyrrhizae Radix, Pharmacopuncture, Allergy, RBL-2H3 cells

1. 서 론

알러지는 이물질 항원인 알러젠에 대한 면역매개성 반응으로 인해 조직염증과 기관 장애를 일으키는 질병으로 알러젠이 주로 환경에서 유래되는 이물질이기 때문에 피부와 호흡기에 가장 빈번하

게 나타난다¹⁾. 한국 어린이, 청소년의 알러지 질환에 관한 전국적 역학조사 결과에 따르면 우리나라에서도 천식, 알러지비염 그리고 아토피피부염 등 알러지 질환이 증가하고 있음이 보고되고 있다²⁾.

藥鍼療法은 침구요법과 약물요법을 결합한 신침요법의 일종이다. 치료 약물의 선정은 기미론을 위주로, 치료 부위의 선정은 경락론을 위주로 하는 약침요법은 과학기술 및 의료기기의 발달로 탄생한 한의학의 독특한 치료 기술이라 할 수 있다. 그러므로 적응증이 광범위하고 일반적인 치료법으로

· 교신저자: 송춘호, 부산시 부산진구 양정2동 산45번지
동의대학교 한의과대학 경락경혈학교실
Tel. 051-850-8643, Fax. 051-853-4036
E-mail: chsong@deu.ac.kr

· 투고 : 2011/08/24 심사 : 2011/09/05 채택 : 2011/09/14

효과를 보기 어려운 질환들에서도 효과가 뛰어나다³⁾.

감초(Glycyrrhizae Radix)는 감초 *Glycyrrhiza uralensis* Fischer, 광과감초(光果甘草) *Glycyrrhiza glabra* Linné 또는 창과감초(脹果甘草) *Glycyrrhiza inflata* Batal의 뿌리 및 뿌리줄기를 그대로 또는 주피를 제거한 것으로서⁴⁾ 임상에서 내분비질환, 위 십이지장궤양, 전염성 간염, 이비인후과 염증, 혈소판 감소성 자반증 등에 이용되고 있다⁵⁾. 감초를 이용한 실험적 연구로 멜라닌 형성 억제효과⁶⁾, 알코올 섭취 및 금단증상에 미치는 영향⁷⁾, 토끼의 허혈성 신부전에 대한 억제 효과⁸⁾, 췌장 Lipase활성의 억제⁹⁾ 등이 보고되어 있으나 감초를 활용한 알러지에 대한 연구보고는 활발하지 못한 실정이다.

이에 본 연구에서는 전통적으로 解毒에 활용하고 있는 감초의 알러지 질환에 대한 효능을 현대적 기준에 맞게 실험적으로 검증하고 감초藥鍼을 알러지 질환 치료에 활용할 수 있는 근거를 마련하고자, 알러지 질환 모델을 이용하여 감초藥鍼의 足三里穴(ST36) 처치에 대한 효과를 살펴보고, 감초추출물이 rat basophilic leukemia cell line(RBL-2H3)에서 β -hexosaminidase와 interleukin-4(IL-4) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 감초추출물

본 실험에 사용된 감초는 (주)광명제약에서 구입하여 사용하였으며, 감초추출물은 감초 300g을 증류수로 세척하고 1ℓ의 증류수를 가하여 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리를 통하여 상층액을 분리하고, 0.2mm 여과지에서 여

과하여 rotary evaporator로 200mℓ가 되도록 감압농축한 후 냉동 건조하여 46.3g의 추출물을 얻었다. -20℃에 보관하였다가 실험직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μ m syringe filtering 후 실험에 사용하였다.

2) 실험동물

실험에 사용한 동물은 Sprague Dawley계 rat (male, 200 \pm 20g)을 (주)샘타코 바이오 코리아에서 구입해서 사용하였고, 사육은 온도 22 \pm 2℃, 습도 55 \pm 5%, dark/light(12 시간) 조건 하에서 고형 pellet 사료((주)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) 약침기

약침기는 30 gauge insulin syringe(Becton Dickinson, USA)를 사용하였다.

5) 시약

본 실험에 사용된 anti-deoxynucleoprotein(DNP) immunoglobulin E(IgE), DNP-HSA, Evans blue, KOH, acetone, phosphoric acid, acetic acid, phorbol-12-myristate-13 acetate(PMA), A23187(calcium ionophore), fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin, Dulbecco's modification Eagle medium(DMEM) 및 trypsin-EDTA solution은 Gibco BRL로부터, tetrazolium bromide salt(MTT) 및 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Amresco로부터, IL-4와 TNF- α kit는 BD Biosciences Pharmingen으로부터 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 처치

실험군은 rat의 종아리 앞쪽 면, 犢鼻와 解谿를 연결하는 선 위, 犢鼻(ST35)에서 아래로 3 촌 부위에 상응하는 양쪽 足三里(ST36) 부위를 처치하였으며, 임의혈군은 rat의 둔부를 취하여 임의혈(Optional Point: 이하 OP)에 각각 처치하였다.

2) 실험군의 구성

실험군은 足三里穴(ST36)과 임의혈(OP)에 생리식염수군(Saline), 감초藥鍼군(GR)으로 구분하여 처치하였다. 대조군은 아무런 처치를 하지 않은 군으로 하였으며, 각 혈자리에는 생리식염수나 감초藥鍼(20 μ g/kg)을 격일로 3회 처치하였다. 임의혈은 둔부를 취하였다.

3) Passive cutaneous anaphylaxis

IgE 의존형 피부과민반응에 대한 영향을 알아보기 위하여 Katayama 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 Sprague Dawley계 rat 3마리를 1군으로 하고 실험군 별로 5일간 격일로 총 3회의 藥鍼을 처치하였다. 실험 3일째 되는 날 rat의 다리 부위를 제모하고 0.5mg의 anti-DNP IgE를 네 군데 피하주사한 후 감각된 부위를 표시하였다. 48시간 경과 후 DNP-HSA 0.5mg과 4% Evans blue를 1:1로 혼합하여 rat의 미정맥에 주사하였다. 30분 후 rat을 도살하고 청색으로 착색된 등 부위의 피부를 채취하여 1 N KOH용액 100 μ l에 침적시켜 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치하였다. acetone과 phosphoric acid(5:13) 혼합액 900 μ l를 첨가하여 원심분리한 후 상층액을 Microplate reader(Molecular Devices, USA) 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 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 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution(Gibco BRL, USA)을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대 배양하였다.

5) MTT assay

RBL-2H3 cells을 24 well plate(Corning, USA)에 2×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 DMEM 배양액에 분주하여 24시간동안 안정화시킨 후, 감초藥鍼液을 농도별(0, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 처리한 후 1시간동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 5mg/ml의 MTT를 각 well에 넣고 잘 섞어준 후 최대 4시간 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양한 후 MTT를 제거하고 DMSO를 300 μ l씩 분주하여 well에 생성된 formazin이 잘 녹을 수 있게 충분히 흔들어 모두 녹인 후 96 well plate에 150 μ l씩 옮긴 후 Microplate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준편차를 구하였다.

6) β -hexosaminidase release

β -hexosaminidase의 release는 Dastych 등¹¹⁾의 방법에 의해 측정하였다. 간략히 요약하면 RBL-2H3을 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate에 각 well당 2×10^5 개의 세포가 들어가도록 한 다음 37 $^{\circ}$ 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 well당 extracellular

buffer와 감초藥液을 농도별(0, 0.5 및 1 mg/ml)로 처리한 후 1시간동안 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%) 1ml를 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 l를 넣고 37°C 에서 1시간 배양시킨 다음 각 well당 stop solution 200 μ 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(%) =

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

S : supernatant, P : pellet

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

7) IL-4 assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate(Corning, USA)에 3×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양한다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 감초藥液을 농도별(0, 0.5 및 1 mg/ml)로 처리한 후 1시간동안 반응시켰다. 1시간 동안 배양한 후 A23187(1 μ M)을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 처리하고 8 시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5,000rpm에서 2분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 IL-4 kit(BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 IL-4의 양

을 계산하였다.

8) TNF- α assay

RBL-2H3 cells를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 24 well plate(Corning, USA)에 3×10^5 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양한다. 새로운 DMEM배지로 교환한 후 감초藥液을 농도별(0, 0.5 및 1 mg/ml)로 처리한 후 1시간동안 반응시켰다. 1시간 동안 배양한 후 자극제 A23187(1 μ M)를 처리하고 8시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후에 상층액을 분리하여 5000rpm에서 2분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 -70°C에 보관하였다가 TNF- α kit (BD Biosciences Pharmingen, USA)를 사용하여 측정하였다. ELISA를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 누출된 TNF- α 의 양을 계산하였다.

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. Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA)에 미치는 영향

Anti-DNP IgE를 이용한 PCA에서 청색반의 누출량은 아무런 처치를 하지 않은 대조군은 $97.43 \pm 12.25 \mu\text{g}/\text{site}$ 으로 나타났다. 반면 ST36에 saline과 GR을 처치한 군은 $45.73 \pm 6.46 \mu\text{g}/\text{site}$ 와 $37.44 \pm 4.30 \mu\text{g}/\text{site}$, OP에 saline과 GR을 처치한 군은 $65.79 \pm 9.98 \mu\text{g}/\text{site}$ 와 $48.74 \pm 5.81 \mu\text{g}/\text{site}$ 로 모두 대조군에 비해 유의한 억제를 나타내었다(Fig. 1).

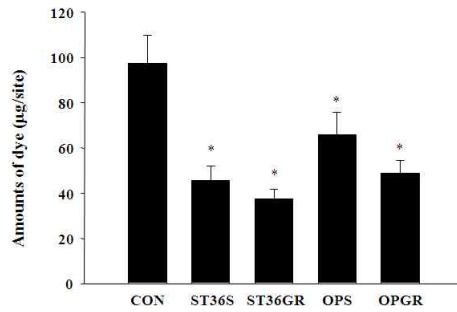


Fig. 1. Effects of GR pharmacopuncture on passive cutaneous anaphylaxis in rats.

Rats were treated at both sides of ST36s or optional points(OPS) with saline or GR pharmacopuncture(20µg/kg) 3 times for 5 days every other days. On day 3, rats were passively sensitized by i.d. injection of anti-DNP IgE(0.5mg), and challenged by DNP-HSA(0.5mg, 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 \pm S.E..

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

CON : untreated group

ST36S : saline-treated group at both sides of ST36s

ST36GR : GR pharmacopuncture-treated group at both sides of ST36s

OPS : saline-treated group at optional points

OPGR : GR pharmacopuncture-treated group at optional points

2. MTT assay

RBL-2H3 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군에서 2.38 ± 0.03 의 흡광도를 나타내었으며, GR(0.5, and 1 mg/ml)의 농도를 전 처리한 세포에서 각각 2.51 ± 0.05 및 2.55 ± 0.10 의 흡광도를 나타내어 모든 농도에서 정상세포에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다(Fig. 2).

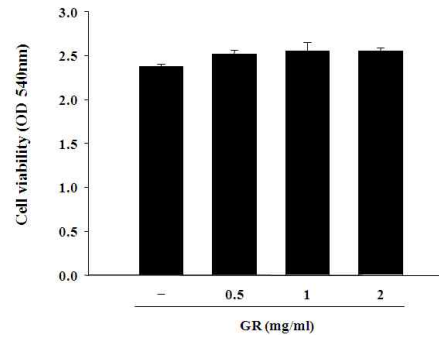


Fig. 2. Effects of GR extract on the cell viability of RBL-2H3 cells.

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

The absorbance was measured at 540 nm using ELISA reader.

3. β -Hexosaminidase release

RBL-2H3 cells에서 누출된 β -hexosaminidase의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 $2.69 \pm 0.38\%$ 이었으며, PMA와 A23187로 자극한 세포에서 $35.76 \pm 0.78\%$ 로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187 자극 1시간 전 GR(0.5, and 1 mg/ml)의 농도로 처리한 세포에서 각각 25.38 ± 0.44 및 $7.04 \pm 0.32\%$ 로 모든 농도에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3).

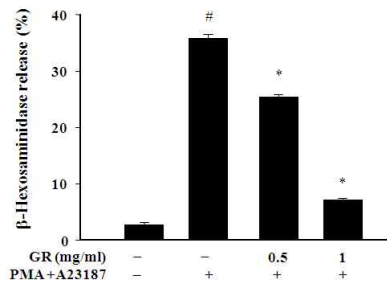


Fig. 3. Effects of GR extract on the β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells.

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

4. IL-4 분비에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 0.41 ± 0.03 pg/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 3.24 ± 0.08 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187 자극하기 전 GR(0.5, and 1 mg/ml)의 농도로 처리한 세포에서 각각 2.53 ± 0.09 pg/ml, 2.76 ± 0.06 pg/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 4).

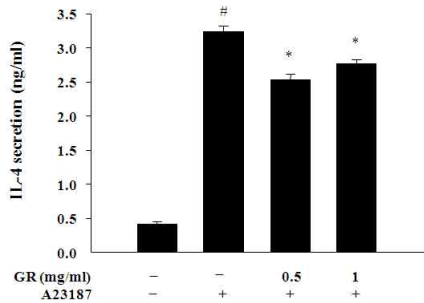


Fig. 4. Effects of GR extract on the IL-4 from RBL-2H3 cells.

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

The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. a, $P < 0.05$; significant as compared to the untreated group b, $P < 0.05$; significant as compared to the A23187-stimulated group

5. TNF- α 분비에 미치는 영향

RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF- α 의 양은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 4.86 ± 0.05 pg/ml이었으며, A23187로 자극한 세포에서 816.59 ± 12.90 pg/ml로 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187 자극하기 전 GR (0.5, and 1 mg/ml)의 농도로 처리한 세포에서 각각 680.24 ± 16.32 pg/ml, 699.38 ± 13.36 pg/ml로 모든 농도에서 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 5).

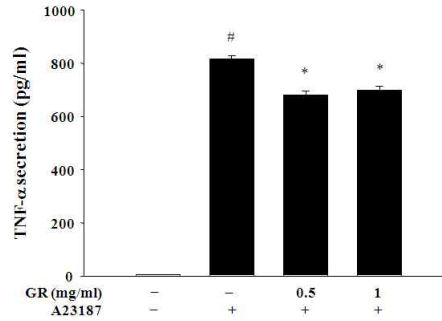


Fig. 5. Effects of GR extract on the TNF- α from RBL-2H3 cells.

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

The absorbance was measured at 450 nm using ELISA reader. a, $P < 0.05$; significant as compared to the untreated group b, $P < 0.05$; significant as compared to the A23187-stimulated group

IV. 고 찰

감초는 콩과(豆科 ; Leguminosae)에 속한 다년 생초본인 감초 및 동속 근연식물의 根 또는 根狀莖이다. 性味는 甘平 無毒하고 脾胃肺 三經에 歸經하며 補脾益氣 潤肺止咳 緩急止痛 清熱解毒 등의 효능이 있고, 임상적으로는 <傷寒論>의 炙甘草湯과 같이 氣虛 血虛로 인한 心悸·自汗·結代脈, <傷寒論>의 芍藥甘草湯과 같이 腹中疼痛, <傷寒論>에서 單方으로 少陰病의 咽喉痛 등의 病症을 다스리는 데 응용된다¹²⁾.

감초의 주성분은 glycyrrhizic acid의 calcium염과 kalium염으로 된 glycyrrhizin(甘味성분)과 liquiritigenin $C_{21}H_{22}O_9$, glucose, mannitol, malic acid, l-asparagine 등을 함유한다. 약리작용은 解毒(세균성toxin, 약물, 뱀독, 복어독, 식중독, 대사산물중독 등에 대한 해독작용), 鎮痙, 胃酸分泌의 抑制, 祛痰, 抗炎症, corticoid樣作用 등이 있다.¹³⁾

문헌을 고찰해보면, <本草綱目>¹⁴⁾에서 감초는 氣味가 甘平 無毒하고 通入手足十二經하며 金瘡腫 解毒 溫中下氣 煩滿短氣 傷臟咳嗽 去咽痛 除邪熱 吐肺痿之膿血 消五發之瘡疽 解小兒胎毒驚癇 降火

止痛한다고 하였다. <東醫寶鑑>¹⁵⁾에서 감초는 解百藥毒 爲九土之精 安和七十二種石 一千二百種草 調和諸藥 使有功 主五藏六府寒熱邪氣 通九竅 利百脈 堅筋骨 長肌肉한다고 하였고, 甘草四兩 大棗二十枚로 구성된 溫脾湯으로 治食飽則咳한다고 하였으며, 甘草一兩으로 구성된 國老膏로 治懸癰한다고 하였고, 食牛羊肉中毒 煮甘草汁 服一二升한다고 하였다. <本草求真>¹⁶⁾에서는 其有火能瀉 是因火性急迫 用此甘味以緩火勢 且取生用性寒 以瀉焚燻害耳이라 하였고, 能解諸藥毒하니 方稱大豆汁解百藥毒 予每試之不效 加入甘草爲甘豆湯 其驗乃奇也라 하였으며, 及胎兒毒 以致尊爲國老라고 하였다. <濟衆新編>¹⁷⁾에서는 甘草甘溫 調和諸藥 炙即溫中 生即瀉火하고 梢去溺管澁痛 節消癰疽焮腫 子除胸熱 身生灸隨用한다고 하였다. 임상에서 감초는 산후 뇌하수체 전엽의 기능감퇴증, 소화성궤양, 폐결핵, 만성 B형 간염, 근경련, 혈소판감소성자반증, 식중독, 만성인후염, 급성유선염, 피부가 갈라지는 증상, 기관지천식 등에 주로 이용되고 있어¹⁸⁾ 알러지질환에도 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

감초를 이용한 실험적 연구로는 멜라닌 형성 억제효과⁶⁾, 알코올 섭취 및 금단증상에 미치는 영향⁷⁾, 토끼의 허혈성 신부전에 대한 억제 효과⁸⁾, 췌장 Lipase활성의 억제⁹⁾ 등이 보고되어 있으나 알러지에 대한 연구보고는 활발하지 못한 실정이다.

足三里(ST36)는 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 등의 穴性이 있어 腸胃疾患, 腹痛, 消化障礙, 便秘, 眩暈, 眼臉痙攣, 下肢痛, 浮腫, 類中風, 帶下, 惡阻, 耳鳴, 口眼喎斜, 鼻塞 등 주치범위가 광범위하여 임상적으로 가장 많이 활용되는 穴중의 하나이며 소화, 호흡, 비호흡기계 등 질환에 양호한 효과를 나타낸다¹⁹⁾.

藥鍼療法은 한의학에서 經穴과 經外奇穴 등의 특정 俞穴에 刺鍼하여 經脈의 기능을 조절함으로써 질병을 치료하는 鍼灸·經穴學의 이론과, 韓藥의 氣味·作用을 살피 임상 치료 효율을 극대화시키고

약물을 인체의 기관이나 병소에 접근·작용시키는 기전을 연구하는 本草學의 이론을 결합시킨 신침요법이다. 藥鍼의 효능은 침요법의 신속성과 한약의 안전성과 유효성이 인체 내에서 상승작용을 하며 나타나는데 특히 만성 난치병, 성인병, 동통성 질환 등에서 특수한 효과를 나타낸다.²⁰⁾

알러지는 대부분의 사람에게서 무해한 물질, 꽃가루, 음식 등에 대해서 사람에게 따라 때로 민감하게 면역반응이 나타나는 것을 말한다.²¹⁾ 조직손상을 일으키는 면역반응을 과민반응이라 하는데, 과민반응은 외래항원에 대한 반응이 잘 조절되지 않거나 비정상적인 경우 또는 자기 항원에 대한 자가면역반응으로 일어난다. 알러지는 과민반응의 일종으로 IgE항체와 비만세포가 매개하는 매우 신속한 혈관 및 평활근 반응이고, 흔히 염증이 뒤따르며, 이전에 노출되었던 외래 항원을 다시 만났을 때 일어난다. 알러지는 가장 흔한 면역계통의 질환으로, 전 인구의 약 20%가 가지고 있는 것으로 추산된다²²⁾. 알러지와 천식은 심각한 공중보건 문제이다. 알러지와 부적절한 면역반응에 의해 환자와 가족들은 증상으로 인한 고통과 정신적인 stress에 시달리고, 또한 근로시간과 치료비용에서도 엄청난 손해를 보아야 한다. 이와 같은 손실을 줄이기 위해 기초 및 임상 분야에서 광범위한 노력이 필요한 실정이다.²³⁾

본 연구의 목적은 알러지 질환에 대한 감초의 효능을 검증하고 감초藥鍼을 알러지 질환에 응용하기 위한 근거를 마련하고자 함이며, 알러지 동물 모델의 ST36에 감초藥鍼을 처치하고 RBL-2H3 cells에 감초추출물을 처리하여 알러지 반응이 효과적으로 억제될 수 있는지 조사하였다.

생체가 항원에 접하면 개체 방어적인 면역반응이 생길 뿐 아니라, 조직에 손상을 일으킬 수 있는 반응도 생길 수 있다. 이러한 반응들을 과민성 반응이라 하는데, 면역학적 기전에 의하여 4가지로 분류한다. 제1형 과민성 반응은 일정한 항원에 대하여 이미 감작되어 개체 내에 존재하는 비만세포

에 부착되어 있는 항체와 재침입한 항원이 결합한 후 수분 이내에 일어나는 즉시형 반응이다²⁴⁾.

유전적으로 민감한 개체에서 항원에 의해 IgE생산이 자극되어 비만세포와 결합하고 다시 항원에 재노출되면 비만세포가 활성화되어 매개자가 방출되어 발생한다. 전신적 아나필락시스는 벌의 독과 같은 단백질 항원 주사나 페니실린 같은 약물에 의해서 발생하고, 수분 후 가려움, 두드러기, 기관지수축과 점액 과분비로 인한 호흡곤란이 나타나며, 즉각적인 조치가 없으면 전신의 혈압강하(아나필락시스 쇼크)를 동반한 혈관확장이 나타날 수 있다. 국소적 반응은 항원이 특정 부위에 존재할 때 발생한다. 피부의 두드러기를 일으키는 접촉이나 소화기의 설사를 일으키는 음식이나 폐에서 기관지수축을 일으키는 흡기 등이 있을 때 발생하며, 피부와 음식 알러지, 건조열의 흔한 형태와 천식의 일부 형태가 이에 속한다²⁵⁾.

Passive cutaneous anaphylaxis는 피동적 피부 아나필락시스로 IgE 등의 항체를 피하주사하여 일정한 잠복기간(24~72 시간)이 경과한 후에 해당 항원과 색소(Evans blue)를 정맥주사하면, 항체를 주사한 부위에서 국소적 과민반응이 일어나고 색소가 혈관에서 유출되어 그 해당 부위가 청색으로 되는 반응으로, 즉시형 과민반응을 일으키는 항체의 연구에 사용된다²⁶⁾. 따라서 본 연구에서는 두 가지 동물모델을 사용하여 알러지 반응에 대한 감초의 억제효과를 조사하였다.

Anti-DNP IgE를 이용하여 유발한 PCA에서 청색반의 누출량을 측정된 결과 ST36에 saline과 GR을 처치한 군과 OP에 saline과 GR을 처치한 군은 모두 대조군에 비해 유의한 억제를 보였다(Fig. 1).

이러한 결과는 ST36에 대한 감초藥鍼 처치가 알러지 반응을 억제하는 효과 면에서 다른 군에 비해 우수한 것을 나타낸다. 또한 OPGR이 아무런 처치를 하지 않은 대조군에 비해 유의한 억제효과를 나타낸 것은 감초의 緩急, 調和諸藥, 清熱解毒하는 본초학적 약리효과에 기인한 것으로 사료된

다. 따라서 감초藥鍼이 IgE 면역반응으로 유발되는 비만세포의 탈과립을 억제하고 혈관 투과성을 억제하는데 효과가 있다고 생각된다.

비만세포 상에 결합해 있는 IgE 항체에 항원이 반응하면 항체끼리, 곧 항체의 수용체끼리 항원물질에 따라 매개되고 결부되게 된다. FcεRI에서의 신호는 phospholipase C의 활성화를 가져오며, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 inositol-1,4,5-triphosphate(IP3)와 diacylglycerol(DAG) 두 가지로 전환한다. IP3은 Ca²⁺를 동원하여, 세포 외에서의 유입을 가져와서 Ca²⁺를 증가시킨다. Ca²⁺는 calmodulin과 결합하여 과립과 세포막의 융합을 가져오고, 히스타민이나 세로토닌 등의 과립 내 전달물질의 방출을 가져온다. DAG도 protein kinase C를 활성화함으로써 과립내용의 방출에 관여한다. 이 현상을 비만세포의 탈과립이라고 한다²⁷⁾. 비만세포는 IgE에 의하지 않고 다른 방법으로도 활성화될 수 있다. 급성염증에 있어 비만세포는 중요한 역할을 하는데 비만세포는 보체인자 C5a와 C3a(anaphylatoxin) 또는 탐식세포 유래 cytokine인 IL-8에 의해서도 활성화된다. 또 코데인이나 모르핀과 같은 약물, mellitin(벌의 독소에 존재) 그리고 열, 한냉, 햇빛 등의 물리적인 자극에 의해서도 활성화된다²⁸⁾. PMA는 protein kinase C의 활동을 증가시키고²⁹⁾, A23187은 Ca ionophore(이온통로형성체)로서 세포내로 Ca²⁺의 유입을 촉진하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 따라서 본 연구의 *in vitro* 실험에서는 Ca²⁺의 유입과 증가를 유도하여 비만세포를 활성화시키는데 PMA와 A23187을 사용하였다.

비만세포의 기능은 활성화된 세포에서 방출되는 수용성 물질에 의하여 매개된다. 매개자는 생물활성 아민 및 과립 거대분자들을 포함하는 이미 형성된 매개자(prefomed mediators)와 지질 유래 매개자 및 cytokine을 포함하는 새로 합성된 매개자(newly synthesized mediators)로 분류할 수 있다. 첫 번째 생물활성 아민은 세포질 과립에 저장되어 있다가 방출되며 비만세포 활성화의 생물학적 효과

의 대부분을 매개한다. 주요한 매개자는 히스타민이다. 히스타민은 혈관 내피세포에 결합하여 세포의 수축을 일으켜 혈장이 조직으로 누출되도록 한다. 또한 즉시형 과민반응의 구진과 발적반응을 일으키며, 장관과 기관지 평활근의 수축을 일으킨다. 두 번째 과립효소는 트립신 분해효소와 키마아제를 포함한 중성 세린 단백분해효소로 비만세포 분비과립 중 가장 풍부한 단백질 구성 성분이며, 조직 손상을 일으킨다. 세 번째 지질 유래 매개자는 비만세포의 활성화에 의해 새롭게 합성되고 방출된다. 가장 중요한 아라키돈산 유래 매개자는 프로스타글란딘 D₂(PGD₂)와 류코트리엔(LTC₄, LTD₄, LTE₄)이다. PGD₂는 평활근 수용체에 결합하여 혈관 확장제와 기관지 수축제로 작용한다. LTC₄는 장시간 기관지 수축을 야기하고 피부로 주사할 경우 특징적인 두드러기와 발적반응을 일으킨다. 네 번째 cytokine은 비만세포와 호염기구에서 생산된다. 주요 cytokine은 TNF, MIP-1 α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 등이 있으며, 후기단계의 염증반응을 주로 담당한다³¹⁾. 비만세포는 장점막과 폐포강에 존재하는 mucosal mast cell과 폐와 체강의 장막에서 발견되는 connective tissue mast cell 두 가지 아형이 있다. RBL-2H3 cells는 mucosal mast cell과 유사한 특징을 가지고 있어, 비만세포의 생물학적 연구에 중요한 모델이 된다³²⁾. β -Hexosaminidase는 이미 형성된 매개자로 비만세포의 분비과립에 저장되어 있다가, 비만세포가 알러젠이나 탈과립 유도 인자에 의해 자극받을 때 히스타민과 함께 분비되어 비만세포 탈과립의 표지인자로 사용된다³³⁾. 따라서 RBL-2H3 cells는 비만세포의 히스타민과 β -hexosaminidase 탈과립, 분비에 대해 효과가 알려지지 않은 약물을 연구하는데 좋은 실험모델로 알려져 있다.

본 실험에서 감초추출물이 RBL-2H3 cells의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 GR의 모든 농도에서 정상세포에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다(Fig. 2).

RBL-2H3 cells에서 분비된 β -hexosaminidase의 양은 PMA와 A23187로 자극한 세포에서 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 PMA와 A23187 자극 1시간 전 GR(0.5, and 1 mg/ml)의 농도로 처리한 세포에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 모든 농도에서 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 3).

IL-4는 immunomodulatory cytokine으로 항알러젠 IgE 반응을 일으키는 T_H2 보조T cell과 비만세포, 호염기구가 활성화되었을 때 분비되는 cytokine이다. IL-4는 T cell을 T_H2 보조T cell로 분화하고 증식하도록 자극하고, B cell을 활성화시켜 형질세포로 전환시키며, B cell에서 면역글로불린의 종 전환(class switch)을 자극하여 IgG1과 IgE를 생성하도록 유도한다. 특히 알러젠에 노출되면, IgE가 생성되어 IgE FcReceptor를 가진 비만세포와 호염기구에 결합하고 지속적으로 민감한 활성화를 일으킬 수 있는 감작이 일어나게 한다³⁴⁾.

RBL-2H3 cells에서의 IL-4 생성에 대해 조사한 결과, RBL-2H3 cells에서 분비된 IL-4의 양은 A23187로 자극한 세포가 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187 자극하기 전 GR(0.5, and 1 mg/ml)의 농도로 처리한 세포에서는 A23187로 자극한 세포에 비해 모든 농도에서 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 4).

TNF- α 는 염증성 cytokine으로 비만세포가 활성화될 때 분비하여 백혈구 협착을 위한 내피세포의 반응을 유도하고, 발열, 식욕부진, 쇼크, 모세혈관 누출 증후군 등의 증상이 생기도록 하며, 백혈구의 세포독성을 항진시킨다³⁴⁾.

RBL-2H3 cells에서의 TNF- α 생성에 대해 조사한 결과, RBL-2H3 cells에서 분비된 TNF- α 의 양은 A23187로 자극한 세포에서 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 반면 A23187로 자극하기 전 GR(0.5, and 1 mg/ml)의 농도로 처리한 세포에서는 A23187로 자극한

세포에 비해 모든 농도에서 유의한($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 5).

이러한 결과에서 감초추출물이 A23187로 자극한 RBL-2H3 cells에서 탈과립을 억제하고 IL-4와 TNF- α 의 생성을 억제하는 것을 볼 때, 감초추출물은 알러지 염증반응을 억제시키는 작용을 가지고 있음을 알 수 있다.

이상의 연구결과를 살펴볼 때 감초藥鍼의 ST36 처치와 RBL-2H3 cells에 감초추출물의 전처치가 알러지 반응을 억제시킴을 알 수 있었으며 향후 감초藥鍼을 알러지 질환치료에 응용하는 것이 가능할 것으로 판단된다.

V. 결 론

감초藥鍼이 PCA반응과 비만세포의 β -hexosaminidase 및 cytokine 분비에 미치는 영향을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Anti-DNP IgE를 이용한 PCA에서 ST36군과 OP군 모두 아무런 처치를 하지 않은 대조군에 비해 유의성 있는 청색반의 누출량 감소를 보였다.
2. MTT assay를 실시한 결과 모든 농도에서 아무런 처치를 하지 않은 대조군에 비해 유의한 영향을 보이지 않았다.
3. RBL-2H3 cells에서 분비된 β -hexosaminidase의 양은 PMA와 A23187로 자극한 후 GR 0, 0.5 및 1 mg/ml의 농도로 처리한 세포에서 PMA와 A23187로 자극한 세포에 비해 유의한 감소를 보였다.
4. RBL-2H3 cells에서 GR은 IL-4, TNF- α 의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Lawrence M. Tierney, Stephen J. McPhee, Maxine

A. Papadakis. Current medical diagnosis & treatment. 서울 : 한우리. 2000 : 865-6.

2. 홍수중, 안강모, 이수영, 김규연. 한국 소아 알레르기 질환의 유병율. 대한소아알레르기 호흡기학회지. 2008 ; 18(1) : 15-25.
3. 대한약침학회 학술위원회. 약침학. 서울 : 엘스비어코리아. 2008 : 3-7.
4. 한국약학대학협의회 약전분과회. 대한약전 해설서. 서울 : 신일북스. 2008 : 1095.
5. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 437.
6. 문연자, 김진, 임난영, 이승연, 광섭, 황충연, 우원홍. 감초 물추출물의 멜라닌 형성 억제효과. 동의생리병리학회지. 2002 ; 16(6) : 1230-5.
7. 광재일, 김광중. 감초가 알코올 섭취 및 금단증상에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007 ; 21(1) : 33-8.
8. 조수인, 김경호, 김민호, 윤여충, 김영균. 토끼의 허혈성 신부전에 대한 甘草 추출물의 억제효과. 대한본초학회지. 2005 ; 20(3) : 43-9.
9. 손영중, 조용행, 기성식. 甘草(Glycyrrhizae Radix)에 의한 췌장 Lipase활성의 억제. 경원 한의학연구소논문집. 2002 ; 5(1) : 155-66.
10. Katayama S, Shionoya H, Ohtake S : 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.
11. Dastych, J. Walczak-Drzewiecka A, Wyczolkowska J, Metcalfe DD. Murine mast cells exposed to mercuric chloride release granule-associated N-acetyl- β -D-hexosaminidase and secrete IL-4 and TNF- α . The Journal of allergy and clinical immunology. 1999 ; 103(6) ; 1108-14.
12. 신민교. 임상본초학. 서울 : 영림출판사. 1998 : 173.
13. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희. 한약임상응용. 서울 : 전통의학연구소. 1998

- : 324.
14. 이시진. 본초강목. 북경 : 인민위생출판사. 1999 : 692.
 15. 허준. 동의보감. 서울 : 범인문화사. 1999 : 1238, 1440, 1546, 1915.
 16. 황궁수. 본초구진. 대북 : 광업서국유한공사. 1981 : 16.
 17. 강명길. 제중신편. 서울 : 행림서원. 1982 : 313.
 18. 안덕균. 한국본초도감. 서울 : 교학사. 1998 : 662.
 19. 대한침구학회 교재편찬위원회. 침구학(상) 경락수혈. 파주 : 집문당. 2008 : 63-4.
 20. 대한약침학회. 약침요법시술지침서. 서울 : 대한약침학회. 1999 : 13-9.
 21. 권영명, 김훈수, 박순직, 이진범, 임옥빈, 현재선. 최신현대생물학. 서울 : 교학사. 1997 : 337.
 22. Abbas AK, Lichtman AH. 최신면역학입문. 서울 : E*PUBLIC. 2009 : 205-6.
 23. Kuby G, Kindt TJ, Goldsby RA, Barbara A. Osborne. Kuby. 면역학. 서울 : 월드사이언스. 2008 : 20.
 24. 대한병리학회 대구·경북지부학회. 간추린 병리학. 서울 : 정문각. 1998 : 99-101.
 25. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Robbins 병리학. 서울 : E*PUBLIC. 2009 : 121-4.
 26. 김하원. 면역학사전. 서울 : 서울시립대학교. 2001 : 314.
 27. 강태숙, 김선희, 김영권, 김윤희, 김인환, 김충환, 김일택, 김인식, 김유현, 김양호. 임상면역학. 서울 : 청구문화사. 2005 : 220-3.
 28. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 2007 : 127-8.
 29. 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.
 30. 이선영. 뼈조직과 세포에서의 칼슘이동기전에 대한 1,25 dihydroxycholecalciferol과 Ca Ionophore A23187의 영향. 한국영양학회. 1988 ; 21(3) : 173-81.
 31. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 세포분자면역학. 서울 : E*PUBLIC. 2008 : 460-3.
 32. Seldin DC, Adelman S, Austen KF, Stevens RL, Hein A, Caulfield JP. Homology of the rat basophilic leukemia cell and the rat mucosal mast cell. Proc Natl Acad Sci. 1985 ; 82 : 3871-5.
 33. Razin E, Mencia-Huerta JM, Steven RL, Lewis RA, Liu FT, Corey E, Austen KF. IgE-mediated release of leukotriene C4, chondroitin sulfate E proteoglycan, beta-hexosaminidase, and histamine from cultured bone marrow-derived mouse mast cells. J Exp Med. 1983 ; 157 : 189.
 34. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's 내과학. 서울 : MIP. 2010 : 2436-7, 2458, 2481-2.