

加減涼膈散이 RBL-2H3 비만세포와 OVA/alum에 감작된 생쥐에 미치는 항알레르기 효과

이운실 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Anti-allergic Effects of *Gagam-YangGyeokSan* on RBL-2H3 Mast Cells and OVA/alum Sensitized Mice

Lee Yun Shil · Han Jae Kyung · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Objectives

Gagamyanggyeoksan (G-YGS) has been used to suppress allergic reaction, however, the cellular target of G-YGS and its mode of action remain unclear. The present study was designed to investigate the effect of extracted G-YGS on the PMA and Ionomycin (PI)-induced activation of RBL-2H3.

Methods

For this investigation, We examined IL-4, IL-13 mRNA expression by Real-Time PCR, IL-4, IL-13 production by ELISA analysis and manifestations of GATA-1, GATA-2, NF-AT1, NF-AT2, AP-1 and NF-κB p65 transcription factors by western blotting, OVA-specific IgE, IL-4, IL-13 by mouse be sensitive to OVA.

Results

Here we showed that treatment of RBL-2H3 mast cells with G-YGS, suppressed PI-induced production of Th2 cytokines including IL-4 and IL-13 in a dose dependent manner. The mRNA expression of IL-4 were completely abolished by G-YGS at the concentration of 100 μg/ml. Data from a stable cell lines consistently expressing IL-4. And the mRNA expression of IL-13 were abolished by G-YGS at the 200 μg/ml. But there is no difference between the 50 μg/ml, the 100 μg/ml and the comparison. Results from the western blot analysis of transcription factors involving IL-4 and IL-13 expression indicated that it prominently decreased the expression of mast cell specific transcription factors including GATA-1, GATA-2, NF-AT2, c-Jun, NF-κB p65 but not c-Fos. And G-YGS suppressed IgE, IL-4, IL-13 in mouse be sensitive to OVA.

Conclusions

We suggested the anti-allergic activities of G-YGS might be mediated by down-regulation of Th2 cytokines such as IL-4 and IL-13 through the regulation of transcription factors as GATA-1, GATA-2, NF-AT2, c-Jun, NF-κB p65.

Key words : *Gagamyanggyeoksan* (加減涼膈散), RBL-2H3 mast cell, IL-4, IL-13, Th1, Th2, IgE, OVA/alum, Anti-allergic effect

I. Introduction

최근 들어 알레르기 질환이 급증하고 있다. 국내 알레르기 환자 수는 6백만 명 이상이며 서구화된 생활환경, 공해, 각종 화학물질 사용의 증가로 인해 환자는 계속 증가 추세이다. 대표적 알레르기 질환은 알레르기 비염·결막염·천식·피부염 등이 있다¹⁾. 염증 질환의 일부인 알레르기는 외부자극에 대한 비정상적인 생체의 과민반응으로 초기 알레르기 반응은 대부분 비만세포를 매개로 일어난다²⁾.

비만세포는 IgE가 매개하는 면역반응과 관계되어 있으며, Th2 type에 의존적인 면역과민성 반응과 알레르기성 질환 및 특정 선천성 면역반응을 유도하는 것으로 알려져있다³⁾. 외부자극으로부터 활성화된 비만세포는 다양한 protease나 histamine과 같은 혈관확장물질들을 분비하며, 염증 유발물질인 다양한 TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 과 같은 cytokine의 분비를 자극하여, 관련 질환의 진행에서 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다^{4,5)}.

한의학에서는 알레르기란 용어도 없고 다만 素因이라는 원인론으로 질병을 이해하였지만 알레르기 질환의 치료는 더 용이하고 우수할 수 있는 것은 오장육부를 통한 면역의 증강, 風寒暑濕燥火의 六氣, 진액대사, 氣血陰陽을 통한 인체의 조화와 균형 등으로 근본을 다스리고, 표면으로 직접 표출되는 증상을 관리하는 약재를 병행함으로써 表와 本을 동시에 다스릴 수 있기 때문이다⁶⁾.

涼膈散은 宋代의 《太平惠民和劑局方》⁷⁾에 처음으로 수록된 처방으로 涼膈散에서 大黃, 芒硝, 蜂蜜을 빼고 桔梗을 넣은 것이 加減涼膈散이다.

加減涼膈散은 《東醫寶鑑·火門》⁸⁾에 기재된 처방으로 “退六經之熱, 治熱在上焦, 治胸膈中與六經之熱”이라 하여 알레르기 질환 중 上焦의 熱로 인하여 발생한 질환에 임상적으로 활용될 수 있다고 사료되나, 加減涼膈散에 대한 임상 연구로 발열 상태의 호전을 목적으로 사용한 예⁹⁾는 있으나 알레르기 질환에 대한 연구 보고는 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 加減涼膈散이 알레르기 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 RBL-2H3 비만세포를 이용하여 Real-Time PCR와 ELISA로 비만세포에서 발현하는 IL-4와 IL-13을 조절 할 수 있는지를 분석하였고, western blot으로 GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, c-Jun, NF- κ B p65 전사인자의 발현을 억제하는지

분석하였다. 그리고 OVA/alum을 감작한 알레르기 생쥐 모델에서 OVA-specific IgE와 Th2 cytokine인 IL-4와 IL-13을 측정하여 加減涼膈散의 항알레르기 효과를 관찰한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 시약 및 기기

(1) 시약

Minimal essential medium (MEM), Fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA, Antibiotics (penicillin, streptomycin)는 Gibco-BRL (U.S.A.) 제품을 사용하였고, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Collagenase A, DNase type I, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Ionomycin, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Chloroform, Isopropanol, Ethanol, Nonidet P-40, RPMI-1640 배양액, Ethidium bromide (EtBr), Polyacrylamide, magnesium chloride (MgCl₂), ovalbumin, aluminium hydroxide (Al(OH)₃)는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사 (U.S.A.) 제품을, EZ-cytox kit는 Daeil Lab. Co. (Korea) 제품을, Deoxynucleoside triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, RNazol^B는 Tel-Test사 (U.S.A.) 제품을, primary antibody (NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, c-Fos, GATA-1, GATA-2, NF- κ B p65)는 Santa-Cruz사 (California, U.S.A.) 제품을 사용하였다. ECL-hybrid film은 Amersham사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, SYBR master mix는 Applied Biosystems사 (U.S.A.) 제품을 사용하였으며, IL-4 ELISA kit는 BD bioscience사 (U.S.A.) 제품을, IL-13 ELISA kit는 Biosource사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, OVA-IgE ELISA kit는 Chondrex사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

(2) 기기

機器는 열탕추출기 (대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치 (Rotary vacuum evaporator, BÜCHI B-480,

Switzerland), 동결 건조기 (freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO₂ 배양기 (Forma scientific Co., U.S.A.), 원심분리기 (한일과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer (Sanyo, Japan), Quantitative Reverse transcriptase (Applied Biosystems, U.S.A.), ELISA READER (Molecular Devices, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2) 동물

수컷 Balb/c 생쥐 (6주령)는 중앙실험동물(주)에서 공급받았다. 동물은 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2°C, 습도 55 ± 15%, 12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 세포 배양 및 약물 분리

(1) 세포 배양

본 실험에 사용된 Rat basophilic leukemia cell line (RBL-2H3) 비만세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였으며 minimal essential medium (MEM)에 15% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂에서 배양하였다.

(2) 加減涼膈散 조제

본 실험에 사용한 加減涼膈散은 《東醫寶鑑》⁸⁾에 근거하여 대전대학교 둔산한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Composition of *Gagam-YangGyeokSan*

Korean Name	Herb Name	Amount
連翹	<i>Forsythiae Frucus</i>	8
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	2
竹葉	<i>Phyllostachydis Folium</i>	2
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	2
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	2
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	2
Total amount		24

(3) 加減涼膈散 추출물 분리

加減涼膈散 3첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 동안 추출하여 얻은 액을 흡입

여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 加減涼膈散 추출물 (이하 G-YGS) 21.2 g을 냉동 보관 (-84°C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) RBL-2H3 비만세포

(1) RBL-2H3 세포주 배양

생쥐의 RBL-2H3 비만세포는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10⁵ cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

(2) 세포 독성 (cytotoxicity) 측정

세포독성 측정방법은 EZ-Cytox assay법¹⁰⁾을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. RBL-2H3 비만세포는 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 G-YGS (최종 농도 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31.3 µg/ml, 15.6 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였고, 배양 종료 6시간 전에 EZ-Cytox 용액 10 µl씩 각 well에 가하여 실험 종료 시까지 배양하였다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA READER 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Reverse transcriptase

RBL-2H3 비만세포를 6-well plate에 2.5×10⁵ cells/ml로 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군 (Nr)으로 하였으며, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 µM)만으로 자극한 군은 대조군 (PI)으로 하였다. 배양 후 Cyclosporin A (이하 CsA, 10 µg/ml)와 G-YGS (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml)로 처리하고 1시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 µM)으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻어 각각 양성 대조군 (CsA)과 실험군 (G-YGS)으로 하였다. 배양 후 세포에 Trizol을 1 ml 넣고 eptube에 넣은 후 클로로포름을 100 µl 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 층이 분리되면 eptube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 이소프로판올을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 80% 에탄올로 세척하고 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후

DEPC water로 cell의 양에 따라 20~30 μ l 넣어 녹였으며 원심분리기로 액을 모아서 75 $^{\circ}$ C로 데워진 전기가 열장치에 5분 동안 두었다가 얼음으로 재빨리 옮겼다. 일부는 RNA를 정량하고 나머지는 만들어 놓은 cDNA cocktail에 정량한 양을 계산해서 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 두고 95 $^{\circ}$ C로 데워진 전기가 열장치에 5분 동안 두었다가 얼음으로 옮겨서 cDNA를 합성하였다. IL-4, IL-13, β -actin primer를 적정 농도로 각각 희석하여 넣고 SYBR Green과 cDNA를 넣은 후 Real-Time PCR를 95 $^{\circ}$ C 3분 실행 후 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 15초, 72 $^{\circ}$ C 20초로 40회 실행시켰다.

Table 2. Primer Sequence for Reverse Transcriptase Analysis

Target gene	Primer	Sequences
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTCTTGTGTCGTAAG-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCCTT-3'
β -actin	Forward	5'-AGCAGATGTGGATCAGCAAAG-3'
	Reverse	5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAT-3'

(4) ELISA 측정

RBL-2H3 비만세포를 48-well plate에 4×10^5 cells/ml로 250 μ l씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군 (Nr)으로, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 μ M)만으로 자극한 군은 대조군 (PI)으로 하였다. 배양 후 CsA (10 μ g/ml)와 G-YGS (50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml)으로 각 well에 처리하고 1시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 μ M)으로 자극한 뒤 24시간 후에 상층액을 얻어 각각 양성대조군 (CsA)과 실험군 (G-YGS)으로 하였다.

Rat IL-4, IL-13 ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100 μ l씩 넣었다. 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고

microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

(5) Western blot

RBL-2H3 비만세포를 100 \times 20 mm plate에 4×10^5 cells/ml로 10 ml씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군 (Nr)으로, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 μ M)만으로 자극한 군은 대조군 (PI)으로 하였다. 배양 후 CsA (10 μ g/ml)와 G-YGS (50 μ g/ml, 100 μ g/ml)으로 처리하고 1시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 μ M)으로 자극한 뒤 6시간 후에 cool PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리하여 상층액을 버린 후 각각 양성대조군 (CsA)과 실험군 (G-YGS)으로 하였다.

- ① whole cell lysate: Lysis buffer (RIPA buffer 980 μ l + protease inhibitor cocktail lysis solution (100 \times) 10 μ l + PMSF (100 mM) 10 μ l)를 1000 μ l로 만든 후 whole cell lysate에 100 μ l를 첨가하여 얼음에서 15~20분간 배양한 후 상층액을 얻었다.
- ② nuclear extract lysate: Nuclear extract kit를 사용하여 Hypotonic buffer를 넣고 얼음에서 15분 간 배양한 후 원심분리 하여 상층액 (cytoplasmic fraction)을 모았다.

튜브에 남아있는 핵에 complete lysis buffer를 넣고 30초 동안 얼음에서 배양한 후 원심분리 하여 상층액 (nuclear fraction)을 얻었다. 얻은 단백질은 BCA 단백질 정량법으로 정량하였다. 10% SDS-PAGE gel을 만들어서 running buffer를 채운 뒤 20분 동안 pre-running시키고 그 사이에 단백질을 loading buffer로 희석하고 끓는 물에 5분 동안 끓여서 단백질이 꼬인 것을 풀어주었다. Gel의 첫 번째 빈칸은 띄우고 두 번째 칸에 단백질 마커를 넣고 그 다음 칸부터 샘플을 넣어 120 V로 내렸다. 다 내린 gel을 크기에 맞게 자르고 20분 동안 transfer buffer에 담가 놓고, 그 사이에 membrane을 gel의 크기에 맞게 자르고 transfer buffer에 미리 담가 두었다. Transfer buffer로 가득 채우고 뜨거워지지 않게 얼음을 넣은 후 150 V로 1시간 30분 동안 membrane으로 이동시켰다. Membrane을 크기에 맞게 자르고 5% skin milk (TBS/T buffer)로 1시간 동안 blocking해주었다. Primary antibody (GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, c-Jun, NF- κ B p65)로 4 $^{\circ}$ C에서 하루를 반응시키고 다음

날 secondary antibody를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 암실에서 ECL detection 용액을 사용하여 필름에 옮기고 현상용액에 담가 현상하고 고정액에 고정시켜 건조시켰다. 결과에 대한 밴드밀도 (band densities)는 YY-1과 비교하여 Image-Rab densitometer를 사용하여 측정 분석하였다.

2) OVA/alum에 감작된 생쥐

(1) OVA-specific IgE 측정

알레르기 과민반응은 IgE에 의해 매개되며 G-YGS가 Th1 cytokine IL-12는 유도하고 Th2 cytokine IL-4와 IL-13은 억제하는 것으로 나타남에 따라 Th1/Th2 cytokine 평형조절을 통하여 OVA-specific IgE 생성을 억제할 수 있는 지를 관찰하고자 하였다. 6 주령의 Balb/c 수컷에 50 µg ovalbumin을 200 µg Al(OH)₃에 흡착 (이하 OVA/alum)하여 Balb/c (n=5)에 0, 2, 6, 10, 13 주에 복강주사하여 IgE 생성을 유도하였고, G-YGS 400 mg/kg을 월요일부터 금요일까지 주 5회 경구투여 하였다. 2주와 14 주에 혈액 중 OVA-specific IgE를 ELISA로 측정하였다.

(2) IL-4, IL-13 측정

OVA/alum을 복강주사하고 G-YGS를 투여한 Balb/c 수컷에서 13주 후 각각의 비장세포를 분리하여 96well plate에 1×10⁵ cells/well 분주하고 ovalbumin (이하 OVA)를 10 µg/ml 농도로 처리한다. 48 시간 후 배양 상층액에서 IL-4와 IL-13의 생성량을 ELISA로 측정하였다.

3. 통계 처리

각 실험군 결과 값은 unpaired Student's T-test 통계 프로그램을 사용하여 통계 처리하였고, P<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

III. Results

1. RBL-2H3 비만세포에 미치는 영향

1) 세포 독성

G-YGS의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비하여 15.6 µg/ml에서 1000 µg/ml까지의 모든 측정 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

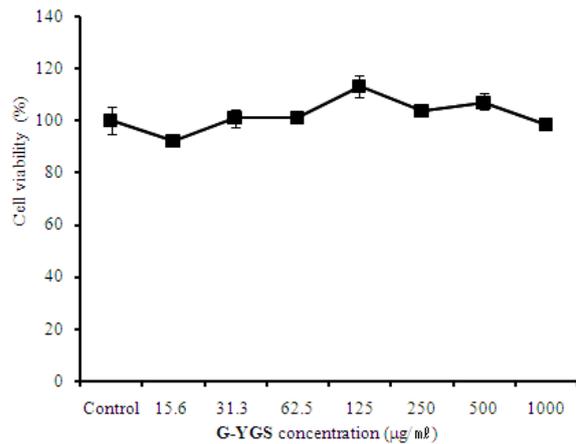


Fig. 1. Cytotoxicity effects of G-YGS on RBL-2H3 mast cell line

RBL-2H3 mast cell were pretreated with various concentration G-YGS extract. The results were expressed the mean±S.E. (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T-test.

2) Reverse transcriptase analysis

G-YGS이 비만세포에서 IL-4, IL-13 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 G-YGS을 처리한 후 PMA-Ionomycin (이하 PI)으로 자극한 뒤, 6시간 후 Reverse transcriptase로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

(1) IL-4 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.078 ± 0.033 이었고, 대조군은 0.982 ± 0.018로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군은 0.061 ± 0.047으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.001) 유전자 발현이 억제되었다. 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 50 µg/ml에서는 0.599 ± 0.087으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.01) 억제되었으며, 100 µg/ml에서는 0.249 ± 0.074으로 대조군에 비하여 억제되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 2).

2) IL-13 mRNA 유전자 발현

IL-13 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.048 ± 0.027이었고, 대조군은 1.087 ± 0.087로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군은 0.555 ± 0.133으로 대조군에 비하여 유의성 있게(P<0.01) 억제하였다. 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 50 µg/ml에서는 0.772 ± 0.132 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.001) 억제되었으며, 100 µg/ml에서는 0.496 ± 0.020으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.05) 억제

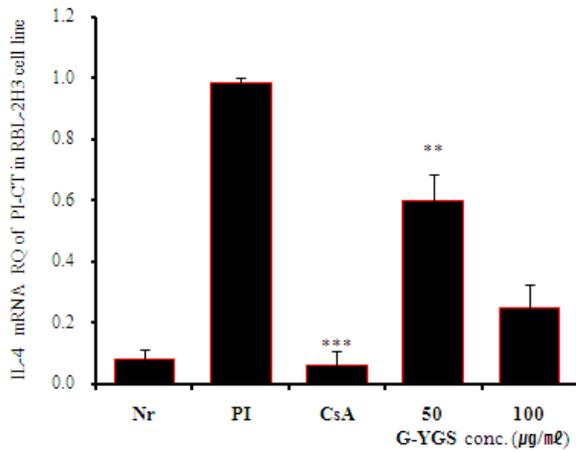


Fig. 2. Inhibitory effects of G-YGS extract on IL-4 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) or G-YGS extract (50, 100 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression IL-4 mRNA was analyzed by Reverse transcriptase. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Reverse transcriptase system. Values were expressed as means±S.E. from two-independent experiments (** P<0.01, *** P<0.001).

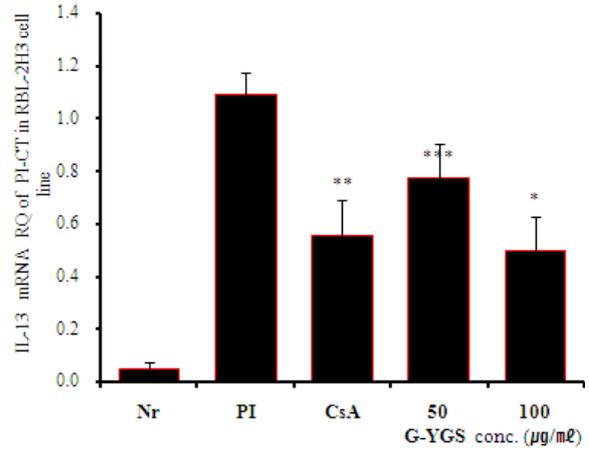


Fig. 3. Inhibitory effects of G-YGS extract on IL-13 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) or G-YGS extract (50, 100 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression IL-13 mRNA was analyzed by Reverse transcriptase. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Values were expressed as means±S.E. from two-independent experiments (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001).

되었다 (Fig. 3).

3) ELISA analysis

G-YGS이 비만세포에서 IL-4, IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 비만세포에 CsA와 G-YGS (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml)를 처리한 후 PI로 자극한 뒤 24시간 후 ELISA로 IL-4 생성량을 측정하였다.

(1) IL-4 단백질 생성

IL-4 생성량은 정상군은 445.3 ± 142.3이었고, 대조군은 5319.4 ± 271.7으로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군은 IL-4 생성이 전혀 없었고 (P<0.001), 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 50 µg/ml에서는 4652.8 ± 850.0으로 대조군에 비하여 억제되었으나 유의성은 없었으며, 100 µg/ml에서는 4309.3 ± 152.3으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.01) 억제되었다. 또한 200 µg/ml와 400 µg/ml에서는 각각 3817.2 ± 192.5, 3527.2 ± 159.0으로 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 (P<0.001) 억제되었다 (Fig. 4).

(2) IL-13 단백질 생성

IL-13 생성량은 정상군은 21.5 ± 8.7이었고, 대조군은 342.7 ± 33.5로 정상군에 비하여 유전자 발현이 증가하였다. 양성대조군은 IL-4 생성이 전혀 없었고 (P<0.001), 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 50 µg/ml에서는 232.6 ± 10.3으로 대조군에 비하여 유의성 있게 (P<0.01) 억제되었으며, 100 µg/ml에서는 171.1 ± 27.1, 200 µg/ml에서는 126.0 ± 14.7, 400 µg/ml에서는 94.5 ± 25.3으로 대조군에 비하여 모두 유의성 있게 (P<0.001) 억제되었다 (Fig. 5).

4) Western blot analysis

G-YGS이 비만세포에서 GATA-1과 GATA-2, NFAT-1과 NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB p65 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 G-YGS를 처리한 후 PI로 자극한 뒤 6시간 후 western blot으로 GATA-1과 GATA-2, NFAT-1과 NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB p65의 단백질 발현을 측정하였다.

(1) GATA-1, GATA-2 신호전달 기전

GATA-1의 단백질 발현은 정상군은 1.0이고, 대조

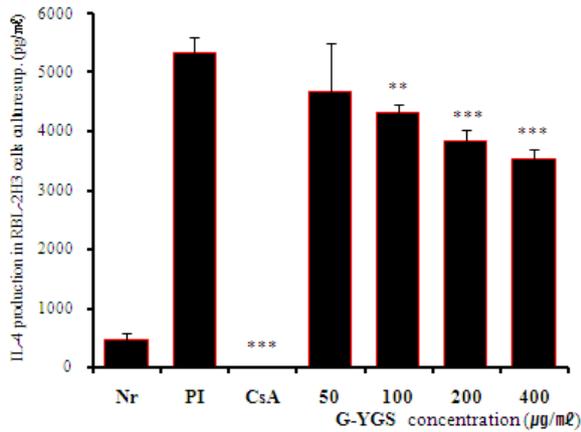


Fig. 4. Inhibitory effects of G-YGS extract on IL-4 production

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) or G-YGS extract (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 24 hours. IL-4 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values were expressed as means±S.E. from two-independent experiments (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

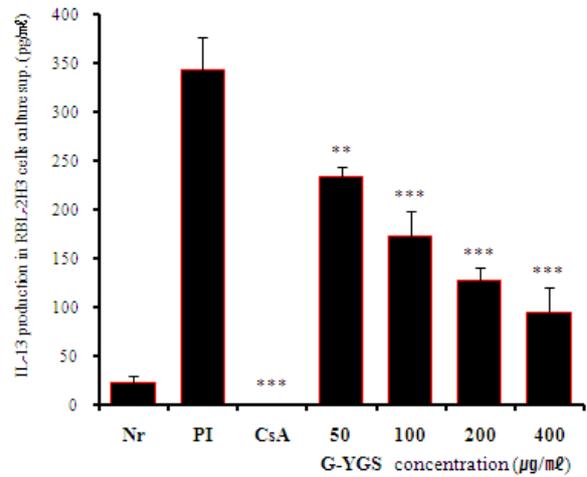


Fig. 5. Suppressive effects of G-YGS on IL-13 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or G-YGS (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-13 levels were measured by ELISA. Values were expressed as means±S.E. from two-independent experiments (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

군은 132.9로 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고 (Fig. 6, GATA-1 lane 1), 양성대조군은 53.1로 대조군

에 비하여 현저하게 억제되었다 (Fig. 6, GATA-1 lane 2). 그리고 실험군의 GATA-1 단백질 발현은 50 µg/ml

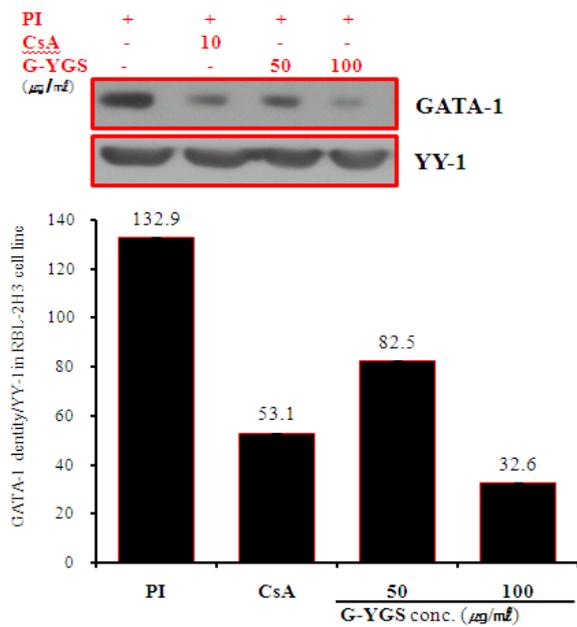


Fig. 6. Effect of G-YGS on GATA-1 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) or G-YGS extract (50, 100 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with GATA protein. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. GATA protein were selected as the positive control for Anti- GATA-1, respectively.

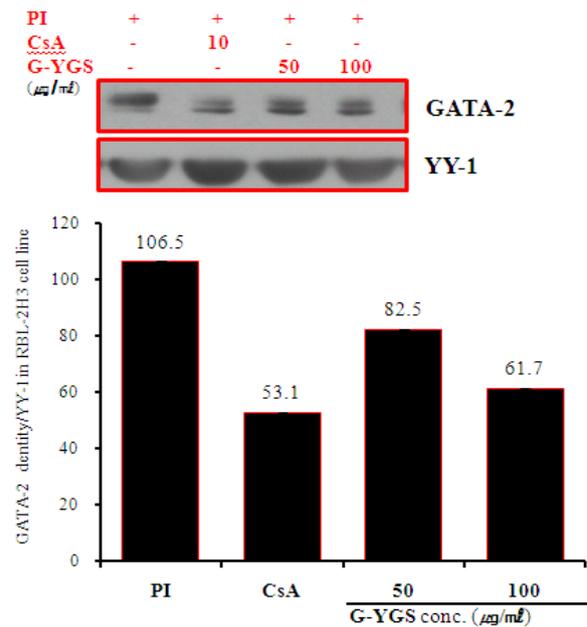


Fig. 7. Effect of G-YGS on GATA-2 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 µg/ml) or G-YGS extract (50, 100 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with GATA protein. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. GATA protein were selected as the positive control for Anti-GATA-2, respectively.

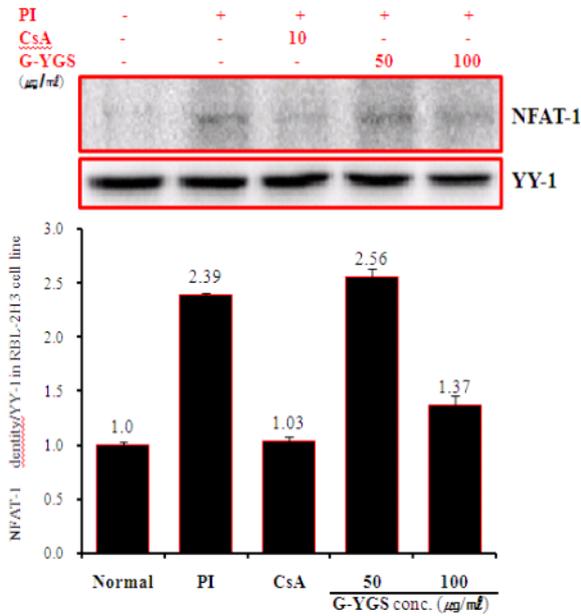


Fig. 8. Effect of G-YGS on NFAT-1 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 $\mu\text{g/ml}$) or G-YGS extract (50, 100 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with NFAT protein. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. NFAT protein were selected as the positive control for Anti-NFAT-1 and Anti-NFAT-2, respectively.

에서는 82.5, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 32.5로 대조군에 비하여 농도구배에 따라 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 6, GATA-1 lane 3-4).

GATA-2의 단백질 발현은 정상군은 1.0이고, 대조군은 106.5로 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고 (Fig. 7, GATA-2 lane 1), 양성대조군은 53.1로 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다 (Fig. 7, GATA-2 lane 2). 그리고 실험군의 GATA-1 단백질 발현은 대조군에 비하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 82.5, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 61.7로 농도구배에 따라 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 7, GATA-2 lane 3-4).

(3) NFAT 신호전달 기전

NFAT-1 단백질 발현은 정상군은 1.0이고, 대조군은 2.39로 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고 (Fig. 8, NFAT-1 lane 2), 양성대조군은 1.03으로 대조군에 비하여 NFAT-1 단백질 발현이 현저하게 억제되었다 (Fig. 8, NFAT-1 lane 3). 그리고 실험군의 NFAT-1 단백질 발현은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 1.37로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 8, NFAT-1 lane 5). 그러나 실험군의

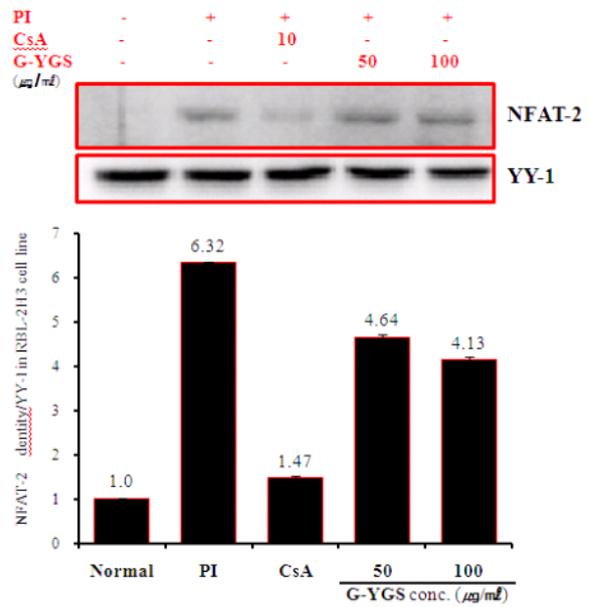


Fig. 9. Effect of G-YGS on NFAT-2 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 $\mu\text{g/ml}$) or G-YGS extract (50, 100 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with NFAT protein. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. NFAT protein were selected as the positive control for Anti-NFAT-1 and Anti-NFAT-2, respectively.

NFAT-1 단백질 발현은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 2.56으로 대조군에 비하여 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 8, NFAT-1 lane 4).

NFAT-2 단백질 발현은 정상군은 1.0이고, 대조군은 6.32로 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고 (Fig. 9, NFAT-2 lane 2), 양성대조군은 1.47로 대조군에 비하여 NFAT-2 단백질 발현이 현저하게 억제되었다 (Fig. 9, NFAT-2 lane 3). 그리고 실험군의 NFAT-2 단백질 발현은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 4.64, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 4.13으로 대조군에 비하여 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 9, NFAT-2 lane 4-5).

(3) AP-1 신호전달 기전

C-Fos 단백질 발현은 정상군은 1.0이고, 대조군은 5.31로 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고 (Fig. 10, C-Fos lane 2), 양성대조군은 1.75로 대조군에 비하여 C-Fos 단백질 발현이 현저하게 억제되었다 (Fig. 10, C-Fos lane 3). 그리고 실험군의 C-Fos 단백질 발현은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 4.11, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 3.05로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 10, C-Fos lane 4-5). 특히

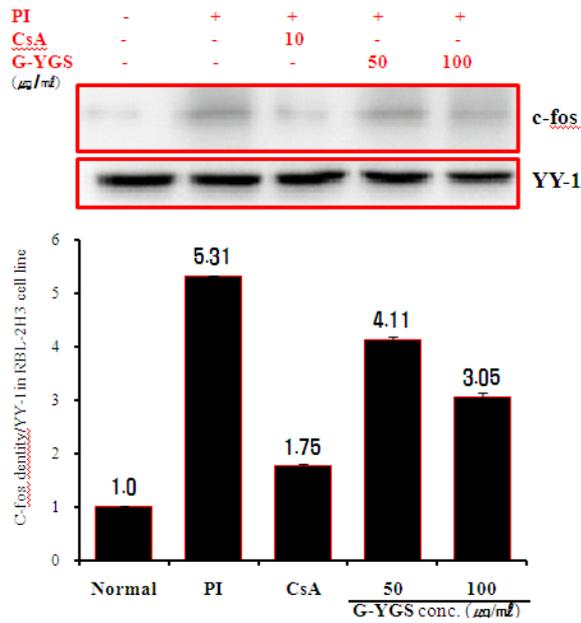


Fig. 10. Effect of G-YGS on AP-1 proteins in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 μg/ml) or G-YGS extract (50, 100 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with AP-1 proteins. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of AP-1 proteins were selected as the positive control for anti-C-Fos, respectively.

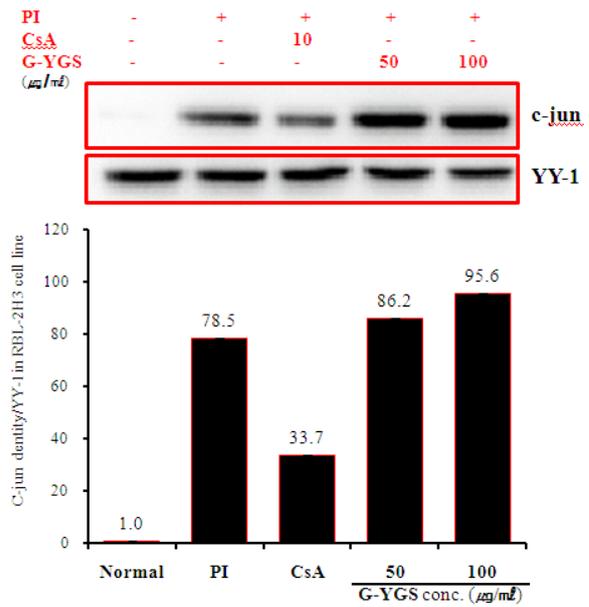


Fig. 11. Effect of G-YGS on AP-1 proteins in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 μg/ml) or G-YGS extract (50, 100 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with AP-1 proteins. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of AP-1 proteins were selected as the positive control for anti-C-Jun, respectively.

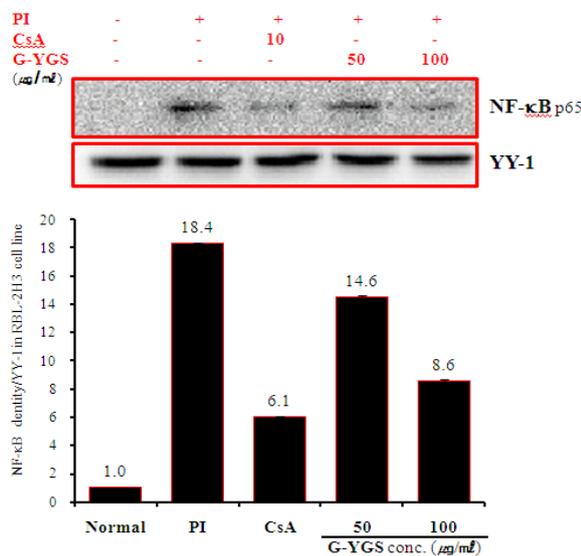


Fig. 12. Effect of G-YGS on NF-κ B p65 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with cyclosporin A (CsA, 10 μg/ml) or G-YGS extract (50, 100 μg/ml) for 1 hours, and then stimulated with PMA-Ionomycin (PI) for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was western blot with NF-κB p65 protein. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. NF-κB p65 protein were selected as the positive controls for Anti-NF-κB p65, respectively.

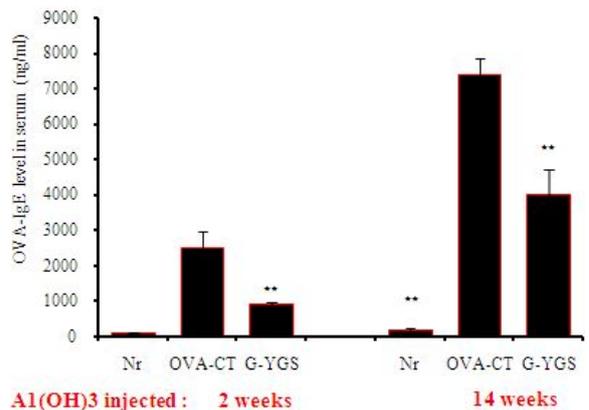


Fig. 13. Effect of G-YGS on OVA-specific IgE release in OVA challenged allergic mouse model

Balb/c mice were challenged with OVA as described in the Experimental section. Blood samples were collected after 2 weeks and 14 weeks for OVA-specific IgE measurement and serum was prepared. The data shown represent the mean ± SD of measurements obtained from 5 animals (OVA-treated) and 2 animals (control). In this experiment it was not possible to match the age of the animal population optimally: Balb/c mice were 6 weeks of age at start of the experiment whereas Balb/c mice were between 2 and 14 weeks of age.

모든 실험군에서 C-Fos 단백질 발현이 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다.

C-Jun 단백질 발현은 정상군은 1.0이고, 대조군은 78.5로 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고 (Fig. 11, C-Jun lane 2), 양성대조군은 33.7로 대조군에 비하여 c-Fos 단백질 발현이 현저하게 억제되었다 (Fig. 11, c-Jun lane 3). 그러나 실험군의 C-Jun 발현은 50 µg/ml에서는 86.2, 100 µg/ml에서는 95.6으로 대조군에 비하여 차이가 나타나질 않았다 (Fig.11, C-Jun lane 4-5 및 Densities).

(4) NF-κB p65 신호전달 기전

NF-κB p65 단백질 발현은 정상군은 1.0이고, 대조군은 18.4로 정상군에 비하여 현저하게 증가하였고 (Fig. 12, NF-κB p65 lane 2), 양성대조군은 6.1로 대조군에 비하여 NF-κB p65 단백질 발현을 현저하게 억제하였다 (Fig. 12, NF-κB p65 lane 3). 그리고 실험군의 NF-κB p65 단백질 발현은 50 µg/ml에서는 14.6, 100 µg/ml에서는 8.6으로 대조군에 비하여 단백질 발현이 억제되었다 (Fig. 12, NF-κB lane 4-5). 특히 모든 실험군에서 NF-κB p65 단백질 발현이 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다.

2. OVA에 감작된 생쥐에 미치는 영향

1) OVA-specific IgE 생성 효과

G-YGS가 IL-4를 조절하여 감작항원에 의해 유도된 Th2 면역반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Balb/c 수컷에 OVA/alum을 복강주사 하여 IgE 생성을

유도하고 G-YGS 400 mg/kg을 13주간 월요일부터 금요일까지 주 5회 경구투여 한 뒤 2주와 14주에 혈액 중 OVA-specific IgE를 ELISA로 측정하였다.

OVA-specific IgE 생성량은 정상군은 2주와 14주에서 각각 74.9 ± 29.1, 162.2 ± 58.8이었고, 대조군은 2주와 14주에서 각각 2492.3 ± 458.6, 7366.9 ± 465.6 로 정상군에 비하여 증가하였다. 실험군은 OVA-specific IgE 생성량이 2주와 14주에서 각각 879.6 ± 83.6, 3987.6 ± 718.9로 대조군에 비하여 생성량을 억제하였다 (Fig. 13).

2) Th2 cytokine 생성 효과

G-YGS이 Th2 cytokine IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, OVA/alum을 복강주사하고 G-YGS을 투여한 Balb/c 수컷에서 비장세포를 분리하여 OVA로 재자극하고 48시간 동안 배양한 뒤 배양 상층액에서 분리된 IL-4와 IL-13 생성량을 ELISA로 측정하였다.

(1) IL-4 생성량

IL-4 생성량은 정상군은 3.44 ± 2.28이었고, 대조군은 81.04 ± 5.88로 정상군에 비하여 증가하였다. 실험군의 IL-4 생성량은 42.81 ± 2.91로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($P < 0.001$) 억제되었다 (Fig. 14).

(2) IL-13 생성량

IL-13 생성량은 정상군은 1.69 ± 1.4이었고, 대조군

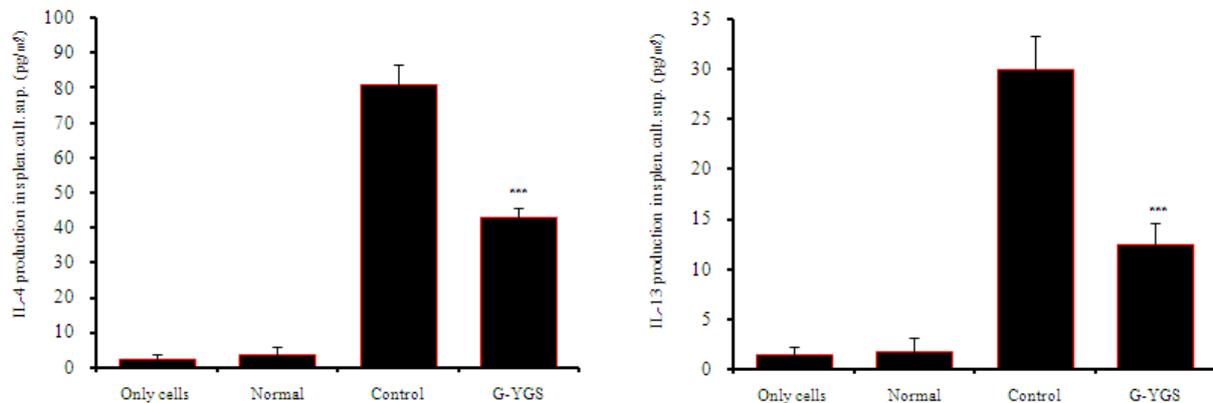


Fig. 14. Effect of G-YGS on IL-4 and IL-13 release in OVA challenged isolated splenocytes

Splenocytes from Balb/c mice were isolated following ovalbumin challenge in vivo as described in the Experimental section. Cultured splenocytes were then incubated with 10 µg/ml OVA peptide or with saline (control) for 48 hours and IL-4 and IL-13 levels were measured in cell culture supernatant. The data shown represent the mean ± SD of measurements obtained from 5 animals (OVA-treated) and 2 animals (control) (***) $P < 0.001$.

은 30.02 ± 3.29 로 정상군에 비하여 증가하였다. 실험군의 IL-13 생성량은 12.47 ± 2.1 로 대조군에 비하여 유의성 있게 ($P < 0.01$) 억제되었다 (Fig. 14).

IV. Discussion

알레르기는 비정상적으로 일어나는 면역반응 중 과민반응의 일종으로 외부에서 이물질들이 체내에 들어오면 이들로부터 우리 몸을 보호하려는 면역반응이 일어나는데 이를 정상 면역 반응이라고 하며, 이러한 면역반응이 지나쳐서 과민반응을 유발하고 이것 때문에 신체에 이상이 생기는 경우를 알레르기 질환이라고 한다¹¹.

Coombs와 Gell은 알레르기 반응에 의한 면역학적 기전을 4가지 형으로 분류하였다. 제 I형 알레르기의 항원 항체 반응은 10-20분 사이에 일어나서 즉각형 또는 아나필락시형 알레르기라고 부른다. II형 알레르기는 IgM 항체, IgG 항체에 의하여 일어나는 반응이며, III형 알레르기는 면역 복합체형, IV형 알레르기는 지연형이라고 한다. 천식, 알레르기 비염, 아토피피부염 등은 제 I형 알레르기 질환으로 분류되며, 제 I형 알레르기 반응은 IgE와 비만세포에 의해 일어난다¹².

韓醫學에서는 알레르기 염증 반응을 국소적인 한 부분으로 일컬을 수는 없으나, 일반적으로 염증으로 인한 발열 및 혈관확장은 주로 熱症에서 기인한다고 보았다¹³.

涼膈散은 宋代의 《太平惠民和劑局方》⁷⁾에 처음으로 수록된 처방으로 黃芩 梔子로 胸膈의 邪熱을 清熱瀉火하고, 連翹와 薄荷로 心胸의 邪熱을 清熱散邪하며, 大黃 芒硝로 瀉火通便하고, 竹葉으로 清心利尿하며, 甘草 蜂蜜로 清熱潤燥하여 瀉火通便 清上泄下の 효능이 있다¹⁴.

加減涼膈散은 《東醫寶鑑·火門》⁸⁾에 기재된 처방으로 涼膈散에서 瀉火通便하는 大黃, 芒硝와 和中하는 蜂蜜를 빼고 桔梗을 넣어 上焦의 熱을 치료하는 데 활용되고 있다. 上焦에 熱이 있는 경우에는 기침을 하다가 肺痿가 되고 眼目赤腫, 頭項腫痛, 口舌生瘡 등의 증상이 나타난다⁸⁾. 涼膈散은 임상에서 근간에 B形腦炎, 流行性腦炎, 大葉性肺炎, 急性膽囊炎, 膽石症, 急性蟲垂炎 등의 염증질환에 응용된다¹⁴. 加減涼膈散 또한 上焦의 熱症으로 인한 알레르기 염증 질환에 활용될 수 있다고 사료되나 加減涼膈散에 대한 임상 연구로는 발열 상태의 호전을 목적으로 사용한 예⁹⁾는 있으나 알

레르기 질환에 대한 연구 보고는 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 RBL-2H3 비만세포와 OVA에 감작된 생쥐 모델을 이용하여 加減涼膈散이 알레르기 염증 반응의 억제에 미치는 영향을 알아보았다.

비만세포는 제 I형 알러지 염증 반응에서 중요한 역할을 하며, 세포표면에 FcεR I 수용체를 발현하고 있다. 항원들이 수용체에 결합된 IgE와 교차결합되면 활성화가 시작되고 탈과립화가 진행된다. 탈과립화는 항원 결합 후 수 분 내에 발생하여 이미 생성되어 있는 다양한 종류의 염증성 매개물질들을 세포 밖으로 방출한다. 그 후 지방성분의 매개물질을 생성하여 분비하고 수 시간 후에는 cytokine을 합성 분비하여 염증반응을 지속시킨다¹⁵.

이러한 cytokine으로는 IL-1, 3, 4, 5, 6, 10, 13, 16 등이 있으며¹⁶, IL-4는 제 1형 알레르기 반응의 매개자인 IgE와 비만세포 매개성 면역반응의 조절자로 IL-4의 생산증가는 알레르기의 발생에 중추적인 것으로 알려져 있고¹⁷, IL-13 수용체는 IL-4 수용체의 α-사슬을 공유하고 있어 IL-4와 유사한 기능을 가지는 것으로 보고되어 있다¹⁸. 그러므로 비만세포가 발현하는 IL-4와 IL-13 등을 조절 가능한지로 항알레르기 효과를 확인할 수 있다.

따라서 본 실험에서는 RBL-2H3 비만세포를 이용하여 Real-Time PCR과 ELISA로 비만세포에서 발현하는 IL-4와 IL-13을 조절 할 수 있는지를 분석하였고, western blot으로 GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, c-Jun, NF-κB p65 전사인자의 발현을 억제하는 지 분석하였으며, 또한 OVA를 감작한 알레르기 모델에서 IgE, IL-4와 IL-13을 측정하여 加減涼膈散의 항알레르기 효과를 관찰하고자 하였다.

실험 결과, RBL-2H3 비만세포를 배양하여 G-YGS의 세포독성을 측정한 결과, 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

RBL-2H3 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 G-YGS를 처리한 후 PI로 자극한 후 Real-Time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과 G-YGS가 IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였고 (Fig. 2, 3), ELISA로 IL-13의 단백질 생성량을 측정할 결과 IL-13 단백질 생성을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 5). 그러나 IL-4의 경우 100 μg/ml과 200 μg/ml 400 μg/ml에서는 유의성 있게 억제하였으나, 50 μg/ml 농도에서는 대조군과 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 4). 이는 알레르기 반응에 있어

서 G-YGS가 RBL-2H3 비만세포가 발현하는 IL-13의 생성을 억제하였다고 볼 수 있으나 IL-4의 경우에는 특정 농도에서 알레르기 염증 반응을 효과적으로 조절한다는 것을 알 수 있다.

G-YGS가 비만세포에서 GATA-1과 GATA-2의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 GATA-1과 GATA-2 단백질 발현을 측정된 결과, G-YGS이 GATA-1과 GATA-2 단백질 발현을 현저하게 억제하였다 (Fig. 6, GATA-1, lane 4-5)(Fig. 7, GATA-2, lane 4-5).

비만세포에서 IL-4와 IL-13 유전자 발현은 선택적으로 발현되는 GATA-1, GATA-2, PU.1와 같은 인트론 부위에 결합하는 전사인자에 의해 특이적으로 조절되는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾.

비만세포에서 IL-4와 IL-13 유전자 발현은 선택적으로 발현되는 NFAT-1을 포함하는 여러 전사 인자와의 협동에 의해 조절된다. NFAT-2는 GATA와 협력하여 IL-13 전사 조절에 수반되는 가장 중요한 전사인자이다²⁰⁾. 그리고 NFAT 전사인자들은 세포질 내에 존재하다가 적절한 자극을 받게 되면 칼시뉴린에 의해서 탈인산화 (dephosphorylation)가 된 후 핵으로 이동한다. 비만세포에서 P1과 관련된 여러 형태의 인자는 T 세포의 NFAT와 같지 않을 가능성이 있다²¹⁾.

G-YGS가 비만세포에서 NFAT-1과 NFAT-2의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NFAT-1과 NFAT-2 단백질 발현을 측정된 결과, NFAT-1은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의성 있게 억제하였으나, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군과 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 8, NFAT-1, lane 4-5). 이는 NFAT-1의 경우에는 특정 농도에서 알레르기 염증 반응을 효과적으로 조절한다는 것을 알 수 있다. NFAT-2 단백질 발현은 모든 농도에서 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 9, NFAT-2, lane 4-5).

이는 G-YGS이 GATA, NFAT 신호전달 기전을 차단하여 IL-4, IL-13의 생성을 억제함으로써 알레르기 염증 반응을 조절하는 것으로 사료된다.

GATA-2는 IL-13에 결합하는 AP-1 결합을 유도할 뿐만 아니라 비만세포에서 IL-13 생성을 증가시킨다. C-Fos, C-Jun는 AP-1 단백질 복합체의 중요한 구성원으로서 heterodimer 이며 AP-1 결합 부위를 통해 전사를 조절한다²¹⁾.

G-YGS가 비만세포에서 C-Fos, C-Jun의 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, western blot으로

C-Fos, C-Jun의 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과 G-YGS가 실험군의 C-Fos 단백질 발현을 억제하였으나 (Fig. 10, C-Fos lane 4-5), C-Jun 단백질 발현은 대조군에 비하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 11, C-Jun lane 4-5).

이러한 결과는 C-Fos 단백질 발현을 억제하여 AP-1 신호전달 기전을 제어함으로써 알레르기 염증 반응을 제어한다고 할 수 있다.

GATA-3는 T 세포에서 IL-13을 발현하는데 있어서 중요한 역할을 하는 조직 특이적으로 발현되는 전사인자이다. T 세포에서 GATA-3는 IL-4, IL-5의 발현에도 영향을 미치는데 이 전사인자는 염색체의 구조를 느슨하게 만드는 기능이 있어서 유전자의 발현을 크게 증가시킬 수 있다. 또한, T 세포에서 GATA-3는 STAT6와 NF- κ B p65의 활성화를 필요로 하며, 이 세 요소가 결합하여 IL-13 유전자 프로모터의 전사적 활성화를 촉진한다. 전사인자인 NF- κ B는 관계된 구성 단백질들의 dimers 형태로 존재하고 목표 유전자의 kB 요소에 부착되어 전사를 조절한다^{23,24)}.

G-YGS이 비만세포에서 NF- κ B p65의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NF- κ B p65 단백질 발현을 측정된 결과, 실험군의 NF- κ B p65 단백질 발현은 대조군에 비하여 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 농도구배에 따라 억제되었다 (Fig.12, NF- κ B p65 lane 4-5). 특히 모든 실험군에서 NF- κ B p65 단백질 발현이 대조군에 비하여 현저하게 억제되었다.

이는 NF- κ B p65의 발현을 억제하여 신호전달 기전을 제어함으로써 알레르기 염증 반응을 제어한다고 할 수 있다.

G-YGS의 항알레르기 완화 효과를 알아보기 위해서 OVA에 감작한 알레르기 생쥐에서 OVA 항원 특이성이 있는 IgE를 측정하고, OVA/alum을 복강주사 및 G-YGS를 투여한 생쥐에서 비장세포를 분리하여 OVA로 재자극하여 IL-4와 IL-13 생성량을 측정하였다. 그 결과 G-YGS는 OVA감작 생쥐에서 2주와 14주에 측정된 OVA-specific IgE의 생성을 감소시켰으며 (Fig.13), IL-4와 IL-13을 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시켰다 (Fig.14).

이러한 결과는 G-YGS가 비만세포 및 Th2 cytokine 활성을 억제함으로써 알레르기 염증 질환에 대한 예방 및 개선효과가 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 보아 加減涼膈散은 활성화된 비만세포에서 발현하는 IL-4, IL-13의 생성을 억제함

로써 알레르기 염증 반응을 제어하는 것으로 판단되며, 그 중 GATA-1, GATA-2, NFAT-2, C-Fos, NF- κ B p65 전사인자의 활성을 억제함으로써 GATA, NFAT, AP-1 신호전달 기전을 차단하여 IL-4, IL-13의 발현을 억제하는 것으로 사료된다.

이로써 加減涼膈散이 임상에서 아토피피부염을 포함하는 알레르기 질환에 적용이 가능할 것으로 판단되며, 향후 알레르기 질환의 치료제로서의 가능성을 알아보기 위해 지속적인 임상실험 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. Conclusion

加減涼膈散이 RBL-2H3 비만세포에서 Th2 사이토카인과 전사 인자의 발현, 그리고 OVA/alum 감작 생쥐에서 OVA-specific IgE와 Th2 사이토카인의 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과는 다음과 같다.

1. 加減涼膈散은 생쥐 비만세포주에서 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
2. 加減涼膈散은 RBL-2H3 비만세포에서 IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현을 억제하였다.
3. 加減涼膈散은 RBL-2H3 비만세포에서 IL-4와 IL-13 단백질 생성을 억제하였다.
4. 加減涼膈散은 RBL-2H3 비만세포에서 GATA 단백질 발현을 억제하였다.
5. 加減涼膈散은 RBL-2H3 비만세포에서 NFAT-2 단백질 발현을 억제하였다.
6. 加減涼膈散은 RBL-2H3 비만세포에서 AP-1 단백질 발현을 억제하였다.
7. 加減涼膈散은 RBL-2H3 비만세포에서 NF- κ B p65 단백질 발현을 억제하였다.
8. 加減涼膈散은 OVA/alum 감작 생쥐에서 OVA-specific IgE의 생성을 감소시켰다.
9. 加減涼膈散은 OVA/alum 감작 생쥐에서 IL-4와 IL-13의 생성을 억제하였다.

References

1. Korea A.H.P. Health life - Allergic disease. Korea Assoc

- Health Promot. 2006;30(2):6.
2. Galli SJ., Tsai M. Mast cells in allergy and infection : versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. Eur J Immunol. 2010;40(7):1843.
 3. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. Curr Opin Immunol. 2000;12:624-31.
 4. Seo UK, Lee JI, Park JH, and Park YK. The ethylacetate extract of North Kangwhal (*Ostericum koreanum*) attenuates the inflammatory responses in PMA/A23187-stimulated mast cells. Korean J Herbol. 2008;23(1):81-9.
 5. Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma progress and perspective. Curr Opin Pulmon Med. 2005:35-42.
 6. Kim KB, Kim DK, Kim YH, Kim JH, Min SY, Park EJ, Baek JH, Yoo SA, Lee SY, Lee JY, Lee HJ, Jang KT, Chae JW, Han YJ, Han JK. Korean Oriental Pediatrics. Seoul:ESDANG Pub. 2010:756.
 7. Jin SM. Taepyunghyeminhwajaekukbang. Seoul:Korea Medical Book Publisher. 1984;6:1.
 8. Heo J. Donguibogam. Kyungnam:Donguibogam Publishing Co. 2009:1173,1175.
 9. Ha KS, Kim SM, Na HS, Choi YH, Ha SY, Kim HY, Song IS. A clinical study on 1 case of patient with dysphagia who had a stroke developed after operation. J Korean Orient Pediatr. 2006;20(3):87-95.
 10. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. Talanta. 1997;44(7):1299-305.
 11. Key AB. Allergy and allergic diseases. N Engl J Med. 2001;344:0-7.
 12. Kim HM. Immunity and Allergy. Seoul:Sinilbooks. 2008;189-92.
 13. Park JS, Kang H, Myoung YJ, Park SM, Sim BS, Kim SH, Choi SH, An KS. Effect of Samjyangchin-tang on cytokine levels of mouse Th1/Th2 cells and anti-allergic activity in ovalbumin-sensitized allergic inflammation model. Acad Soc Orient Med Physiol. 2006; 20(3):548-56.
 14. Kim SC, Kim SH, No SH, Park SD, Park SG, Seo BI, Seo YB, Shin MS, Lee SI, Lee JC, Lee CH, Ju YS,

- Choi HY. Bangjehak. Seoul: Yeong Rim Sa Publishing Co, 2003:183.
15. 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.
 16. Saimah A, Arjmand M. *Immune, Blood and Lymphatic System.* Seoul:Hanwoori. 2000:431-36.
 17. 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.
 18. Hogan SP, Foster PS. Cytokines as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation. *Pharmacol Ther.* 1997;74:259-83.
 19. Harigae H, Takahashi S, Suwabe N, Ohtsu H, Gu L, Yang Z, Tsai FY, Kitamura Y, Engel JD, Yamamoto M. Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells.* 1998;3(1):39-50.
 20. Schild H, Schmitt E, Stassen M, Bopp T, Heib V, Becker M, Taube C, Palmetshofer A, Serfling E, Tertilt C. Cytokines expression of mast cell-derived NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *J Immunol.* 2006;177:6667-74.
 21. Monticelli S, Solymar DC, Rao A. Role of NFAT proteins in IL-13 gene transcription in mast cells. *J Biol Chem.* 2004;27(35):36210-8.
 22. Lewin I, Nechushtan H, Ke Q, Razin E. Regulation of AP-1 expression and activity in antigen-stimulated mast cells: the role played by protein kinase C and the possible involvement of Fos interacting protein. *Blood.* 1993;82(12):3745-51.
 23. Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, Park JW, Park EK, Shin HI, Kim SH. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res.* 2007;56(5):210-5.
 24. Reber L, Vermeulen L, Haegeman G, Frossard N. Ser276 phosphorylation of NF-kB p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS One.* 2009;4(2):4393.