

## 清肌祛痒湯의 RBL-2H3 비만세포와 OVA/alum 감작 생쥐의 알레르기 염증 반응 억제 효과

이혜림 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

#### Suppressive Effect of *CheongGiGeoYangTang* on Allergic Inflammation of RBL-2H3 Mast Cells and OVA/alum-sensitized Mice

Lee Hye Lim · Han Jae Kyung · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

##### Objectives

*CheongGiGeoYangTang* has been used for anti-allergenic purpose. However there was no experimental study about its effect. Therefore, this study was designed to investigate the anti-allergenic effect of *CheongGiGeoYangTang*.

##### Methods

Modifiability of RBL-2H3 mast cells' IL-4, IL-13 was analyzed by qRT-PCR and ELISA. Also, the suppressive effect of GATA-1, GATA-2, NF-AT1, NF-AT2, AP-1 and NF-κB p65 transcription factors was observed by western blotting. OVA-specific IgE, IL-4 and IL-13 production in ovalbumin allergy model was examined as well.

##### Results

It was showed that the RBL-2H3 mast cells treated with *CheongGiGeoYangTang* extract(CGGYT) was significantly suppressed mRNA expression, production of IL-4 and IL-13, and prominently inhibited the expression of transcription factors including GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos and NF-κB p65 but not c-Jun. The administration of CGGYT was suppressed the amount of OVA-specific IgE, IL-4 and IL-13 in OVA/alum-sensitized mice.

##### Conclusions

We considered CGGYT would regulate the allergic inflammation as inhibition of IL-4 and IL-13 production in activated mast cells and Th2 cells.

**Key words** : *CheongGiGeoYangTang*(清肌祛痒湯), RBL-2H3 mast cell, OVA/alum-sensitized mice, IL-4, IL-13, Anti-allergic

## I. 緒 論

알레르기 혹은 아토피라고 불리는 즉시 과민 반응은 IgE 항체와 비만세포가 매개하는 매우 신속한 혈관 및 평활근 반응으로, 흔히 염증이 뒤따르며, 천식, 알레르기성 비염, 아토피피부염 등이 이에 해당한다<sup>1)</sup>.

전형적인 알레르기 반응은 IgE, 비만세포 등의 알레르기 활동 세포와 표적 기관으로 이어지는 일련의 면역 반응을 중심으로 설명되고 있으며<sup>2)</sup>, 꽃가루의 단백질, 특정 음식, 벌레의 독과 같은 항원을 만나거나 특정 약물에 노출되었을 때, 정상인들은 강한 Th2 반응을 일으키지 않는 데 반해 알레르기 반응을 잘 일으키는 사람들은 Th2세포 활성화가 일어나 IgE 항체가 생산된다<sup>1)</sup>.

淸肌祛痒湯은 《大田大學校 韓方病院 處方集》<sup>3)</sup>에 수록된 처방으로, 風寒暑濕의 邪氣가 肌膚에 鬱滯되어 발생하는 피부질환에 활용되는 淸肌散<sup>4)</sup>에 人蔘을 沙蔘으로, 赤茯苓을 白茯苓으로 바꾸고 獨活, 柴胡, 前胡, 川芎을 去하고 川烏, 連翹, 玄參, 白朮, 黃芩을 加하여 蕁麻疹과 같은 피부질환을 다스릴 목적으로 作方되어 임상에서 다양하게 활용되고 있다.

淸肌祛痒湯의 효과에 대한 실험적 연구는 아직 보고되지 않았으나 淸肌散의 항염증 및 항알레르기 작용의 유의성에 대한 실험적 연구들<sup>5-6)</sup>은 보고되고 있다.

이에 저자는 淸肌祛痒湯이 알레르기 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 RBL-2H3 비만세포의 IL-4와 IL-13을 조절할 수 있는지 Quantitative Real-Time PCR(이하 qRT-PCR)과 ELISA로 분석하였고, GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB p65 전사인자 발현 억제를 western blot으로 관찰하였으며, OVA/alum 감작 생쥐의 OVA-specific IgE와 Th2 cytokine IL-4, IL-13의 생성 억제를 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 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 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(MgCl<sub>2</sub>), ovalbumin, aluminium hydroxide(Al(OH)<sub>3</sub>)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, RNazolB는 Tel-Test사 (U.S.A.) 제품을, primary antibody(GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB 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(대응, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary vacuum evaporator, BÜCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO<sub>2</sub> 배양기(Forma scientific Co., U.S.A.), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer(Sanyo, Japan), qRT-PCR (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 고휘사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12시간(light-dark cycle)의 환경에서 1주일 간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

Table 1. Composition of *CheongGiGeoYangTang*

韓藥名	生藥名	量(g)
羌活	<i>Osterici Radix</i>	3
川烏	<i>Aconiti Tuber</i>	3
玄參	<i>Scrophulariae Radix</i>	3
沙參	<i>Adenophorae Radix</i>	3
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	3
天麻	<i>Gastrodiae Rhizoma</i>	3
白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	3
白茯苓	<i>Hoelen</i>	3
枳殼	<i>Aurantii Fructus Immaturus</i>	3
連翹	<i>Forsythiae Frucus</i>	3
蟬蛻	<i>Cicadidae Periostracum</i>	3
防風	<i>Saposhnikoviae Radix</i>	3
荊芥	<i>Schizonepetae Spica</i>	3
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	3
薄荷	<i>Menthae Herba</i>	2
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	2
Total amount		46

3) 세포 배양 및 약물 분리

(1) 세포 배양

본 실험에 사용된 RBL-2H3 비만세포는 한국세포주 은행 (Seoul, Korea)에서 구매하였으며 minimal essential medium (MEM)에 15% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

(2) 清肌祛痒湯 조제

본 실험에 사용한 清肌祛痒湯은 《大田大學校 韓方病院 處方集》<sup>3)</sup>에 근거하여 대전대학교 단산 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

(3) 清肌祛痒湯 추출물 분리

清肌祛痒湯 2첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전히 건조한 清肌祛痒湯 추출물 (이하 CGGYT) 21.2 g을 냉동 보관 (-84°C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) RBL-2H3 세포주 배양

생쥐의 RBL-2H3 비만세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 구매하였으며, 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate

에 분주하였다.

2) 세포 독성(cytotoxicity) 측정

세포 독성 측정 방법은 EZ-Cytox assay법<sup>7)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. RBL-2H3 비만세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양한 후 CGGYT (최종 농도 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 6시간 전에 EZ-cytox 용액 10 µl씩 각 well에 가하고 실험 종료 시까지 배양하였다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, U.S.A)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA READER (molecular devices, U.S.A)에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) qRT-PCR

RBL-2H3 비만세포를 6-well plate에 2.5×10<sup>5</sup> cells/ml로 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Nr)으로, 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 CGGYT(50 µg/ml, 100 µg/ml)으로 처리하고 1시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 µM)으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻어 각각 양성대조군(CsA)과 실험군(CGGYT)으로 하였다. 배양 후 세포에 Trizol을 1 ml넣고 eptube에 넣은 후 클로로포름을 100 µl 넣었다. 얼음에 17분 동안 두고 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 층이 분리되면 eptube에 상층액을 옮겨 담고, 동량으로 이소프로판올을 넣어 얼음에 10분 정도 두었다가

Table 4. Primer Sequence for qRT-PCR Analysis

Target gene	Primer	Sequences
IL-4	Forward	5'-GGATGTAACGACAGCCCTCT-3'
	Reverse	5'-GTGTTCCCTTGTGCCGTAAG-3'
IL-13	Forward	5'-CAGTTGCAATGCCATCCACA-3'
	Reverse	5'-AGCCACATCCGAGGCCTTT-3'
$\beta$ -actin	Forward	5'-AGCAGATGTGGATCAGCAAG-3'
	Reverse	5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAT-3'

13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 상층액은 버리고 80% 에탄올로 세척하고 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 완전히 제거하고 투명해질 때까지 말린 후 DEPC water로 cell의 양에 따라 20~30  $\mu$ l 넣어 녹였으며 원심분리기로 액을 모아서 75 $^{\circ}$ C로 데워진 전기가열장치에 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 전기가열장치에 5분 동안 두었다가 얼음으로 옮겨서 cDNA를 합성하였다. IL-4, IL-13,  $\beta$ -actin primer를 적정 농도로 각각 희석하여 넣고 SYBR Green과 cDNA를 넣은 후 qRT-PCR을 95 $^{\circ}$ C 3분 실행 후 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 15초, 72 $^{\circ}$ C 20초로 40회 실행시켰다.

#### 4) ELISA

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

Rat IL-4, IL-13 ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 코팅 antibody를 microwell에 100  $\mu$ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 두었다. 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200  $\mu$ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Antibody biotin-IL-4 conjugated와 antibody biotin-IL-13 conjugated를 각각 희석하고 배양 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 antibody biotin-IL-4 conjugated와 antibody biotin-IL-13 conjugated, 그리고 배양 상층액을 100  $\mu$ l씩 넣었다. 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였

다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50  $\mu$ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

#### 5) Western blot

RBL-2H3 비만세포를 100 $\times$ 20 mm plate에  $4 \times 10^5$  cells/ml로 10 ml씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군(Nr)으로, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M) 만으로 자극한 군은 대조군(PI)으로 하였다. 배양 후 CsA(10  $\mu$ g/ml)와 CGGYT(50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml or 100  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml)로 처리하고 1시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)으로 자극한 뒤 6시간 후에 cool PBS로 세척한 후 scraper로 세포를 얻고 원심분리하여 상층액을 버린 후 각각 양성대조군(CsA)과 실험군(CGGYT)으로 하였다.

- 1) whole cell lysate : Lysis buffer (RIPA buffer 980  $\mu$ l + protease inhibitor cocktail lysis solution (100 $\times$ ) 10  $\mu$ l + PMSF (100 mM) 10  $\mu$ l)를 1000  $\mu$ l로 만든 후 whole cell lysate에 100  $\mu$ 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 원심분리하여 상층액 (cytoplasmic fraction)을 모았다.

튜브에 남아있는 핵에 complete lysis buffer를 넣고 30초 동안 얼음에서 배양한 후 원심분리하여 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 빈 칸은 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 열을 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-Jun, c-Fos, NF-κB p65)로 4°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.

6) OVA-specific IgE

CGGYT이 Th1/Th2 cytokine 평형조절을 통하여 OVA-specific IgE 생성을 억제할 수 있는지를 관찰하고자 하였다. 6주령의 Balb/c 수컷에 50 μg ovalbumin을 200 μg Al(OH)<sub>3</sub>에 흡착(이하 OVA/alum)하여 Balb/c (n=5)에 0, 2, 6, 10, 13 주에 복강 주사하여 IgE 생성을 유도하였고, 13주 동안 주 5회 CGGYT를 400 mg/kg 경구투여 하였다. 2주와 14주에 혈액 중 OVA-specific IgE를 ELISA로 측정하였다.

7) Th2 cytokine IL-4, IL-13

OVA/alum을 복강주사하고 CGGYT을 투여한 Balb/c 수컷에서 13주 후 각각의 비장세포를 분리하여 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well 분주하고 ovalbumin(이하 OVA)를 10 μg/ml 농도로 처리하였다(ex-vivo). 48시간 후 배양 상층액에서 IL-4와 IL-13의 생성량을 ELISA로 측정 분석하였다.

3. 통계 처리

각 실험군 결과 값은 unpaired student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, P<0.05의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

III. 성 적

1. 세포 독성 측정

CGGYT의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비하여 15.6 μg/ml에서 1,000 μg/ml까지의 모든 측정 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

2. qRT-PCR analysis

CGGYT이 비만세포에서 IL-4, IL-13 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA와 다양한 농도의 CGGYT을 처리한 후 PMA-Ionomycin(이하 PI)으로 자극한 뒤, 6시간 후 qRT-PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다.

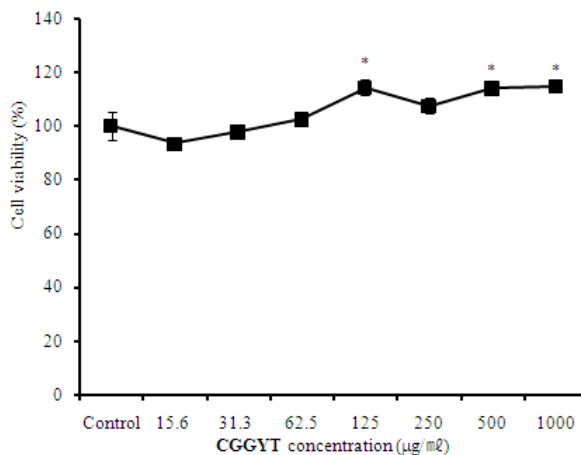


Fig. 1. Cytotoxic effects of CGGYT on RBL-2H3 mast cell line

RBL-2H3 mast cell were pretreated with various concentration CGGYT extract. The results were expressed the mean±S.E. (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T-test(\* p<0.05).

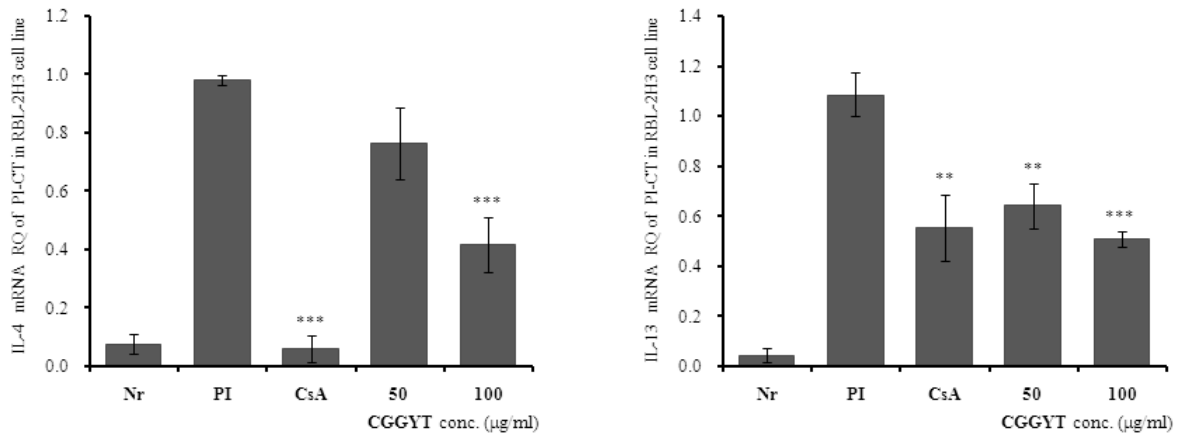


Fig. 2. Suppressive effects of CGGYT on IL-4 and IL-13 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or CGGYT (50, 100 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. The expression of IL-4 and IL-13 mRNA was analyzed by qRT-PCR. 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 was referred as to the RQ (relative quantitative) and was proportional to the target concentration. Values were expressed as means±S.E. from two-independent experiments(\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

1) IL-4 mRNA 유전자 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군은 0.078±0.033이었고, PI만으로 자극한 대조군은 0.982±0.018로 정상군에 비하여 약 12.6배 이상 유전자발현 증가가 나타났다. 양성대조군인 CsA 처리군은 0.061±0.047로 대조군에 비하여 약 16배 정도로 억제하였다(p<0.001). CGGYT 실험군의 IL-4 mRNA 유전자 발현은 50 µg/ml에서는 0.765±0.124로 약 1.3배 정도 억제하였으나 유의성은 없었고, 100 µg/ml에서는 0.418±0.093으로 약 2.3배 정도 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다(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 약 22.6배 정도 유전자 발현 증가가 나타났다. 양성대조군은 0.555±0.133로 대조군에 비하여 약 2배 정도 억제하였다(p<0.01). CGGYT 실험군의 IL-13 mRNA 유전자 발현은 50 µg/ml에서는 0.644±0.091로 약 1.7배 정도 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 억제하였으며, 100 µg/ml에서는 0.511±0.032로 약 2.1배 정도 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다(Fig. 2).

3. ELISA analysis

CGGYT가 비만세포에서 IL-4, IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA와 50, 100, 200, 400 µg/ml 농도의 CGGYT을 처리한 후 PI로

자극한 뒤 24시간 후 ELISA로 IL-4와 IL-13 생성량을 측정하였다.

1) IL-4 단백질 생성

IL-4 생성량은 정상군은 445.3±142.3이었고, 대조군은 5,319.4±271.7으로 정상군에 비해 약 12배 정도 증가하였고, 양성대조군은 IL-4 생성이 전혀 없었다(p<0.001). CGGYT 실험군의 IL-4 생성량은 50 µg/ml에서는 3,735.4±59.3으로 약 1.4배, 100 µg/ml에서는 3,820.2±106.4으로 약 1.4배, 200 µg/ml에서는 3,412.2±193.6으로 약 1.6배, 400 µg/ml에서는 3,089.7±192.3으로 약 1.7배 정도로 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다(Fig. 3).

2) IL-13 단백질 생성

IL-13 생성량은 정상군은 21.5±8.7이었고, 대조군은 342.7±33.5로 정상군에 비해 약 16배 정도 증가하였고, 양성대조군은 IL-4 생성이 전혀 없었다(p<0.001). 실험군의 IL-13 생성량은 50 µg/ml에서는 170.8±25.1으로 약 2배, 100 µg/ml에서는 164.6±17.6으로 약 2배, 200 µg/ml에서는 73.7±26.8으로 약 4.6배, 400 µg/ml에서는 96.1±3.4으로 약 3.6배 정도로 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다(Fig. 4).

4. Western blot analysis

CGGYT이 비만세포에서 GATA-1과 GATA-2, NFAT-1과 NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB p65 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA와 50, 100,

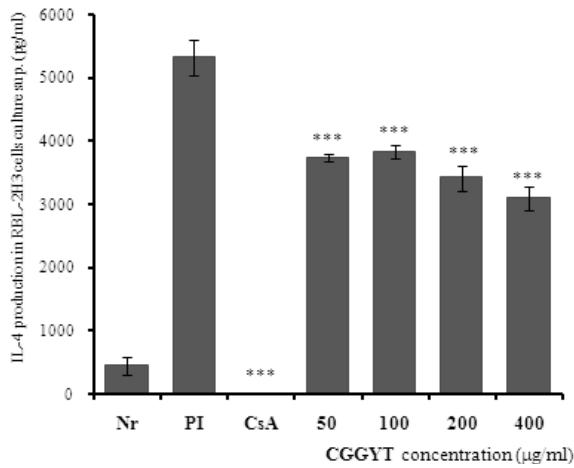


Fig. 3. Suppressive effects of CGGYT on IL-4 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or CGGYT (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with 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<0.001).

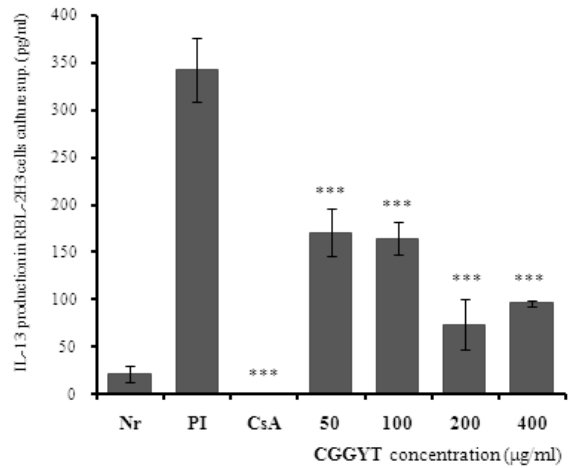


Fig. 4. Suppressive effects of CGGYT on IL-13 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or CGGYT (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-13 levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit. Values were expressed as means±S.E. from two-independent experiments(\*\*\*) p<0.001).

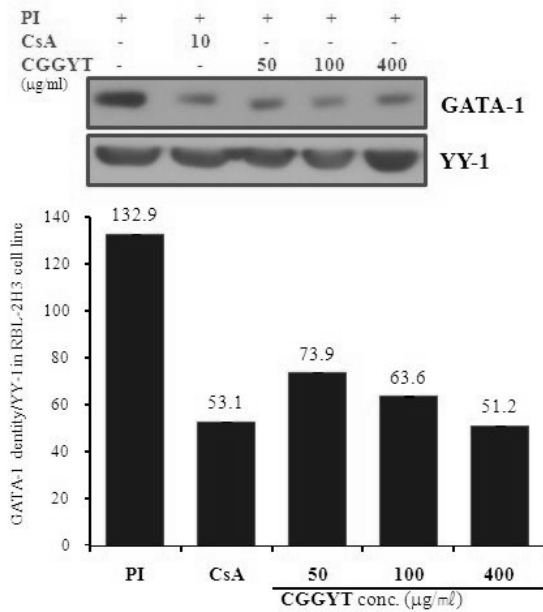


Fig. 5-1. Effect of CGGYT on GATA-1 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or CGGYT (50, 100, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with GATA proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of GATA proteins were selected as the positive control for Anti-GATA-1 respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

400 µg/ml 농도의 CGGYT을 처리한 후 PI로 자극한 뒤 6시간 후 western blot으로 GATA-1과 GATA-2, NFAT-1

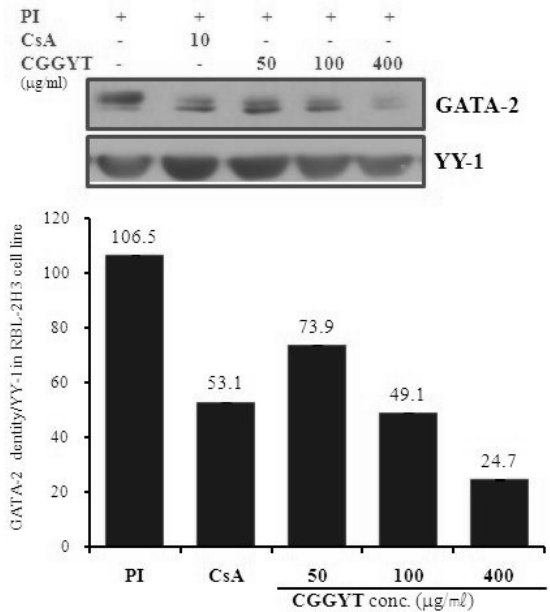


Fig. 5-2. Effect of CGGYT on GATA-2 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or CGGYT (50, 100, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with GATA proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of GATA proteins were selected as the positive control for Anti-GATA-2 respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

과 NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB p65의 단백질 발현을 측정하였다.

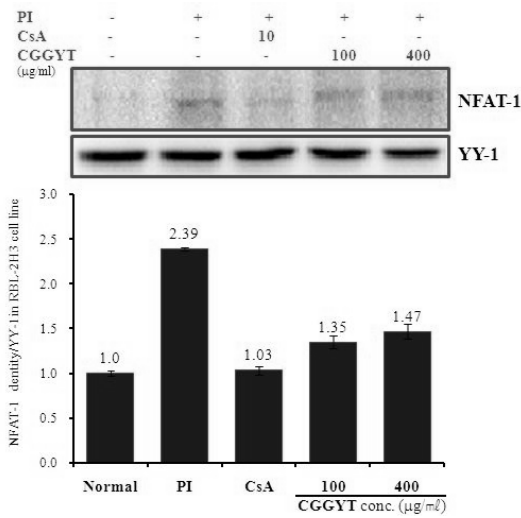


Fig. 6-1. Effect of CGGYT on NFAT-1 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CGGYT (100, 400 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NFAT proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NFAT proteins were selected as the positive control for Anti-NFAT-1 respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

1) GATA-1, GATA-2 신호전달 기전

GATA-1의 단백질 발현은 대조군에서 GATA-1 densities(이하 DT)가 132.9로 나타났고(Fig. 5-1, GATA-1 band lane 1), 양성대조군의 DT는 53.1로 대조군에 비하여 약 2.5배 정도 억제되었다(Fig. 5-1, GATA-1 band lane 2). CGGYT 실험군의 GATA-1의 단백질 발현은 대조군에 비하여 50 μg/ml에서 DT는 73.9로 약 1.8배, 100 μg/ml에서의 DT는 63.6로 약 2.1배, 400 μg/ml에서의 DT는 51.2로 약 2.6배 정도로 농도에 따라 단백질 발현을 억제하였다(Fig. 5-1, GATA-1 band lane 3-5).

GATA-2의 단백질 발현은 대조군에서 GATA-2 densities(이하 DT)가 106.5로 나타났고(Fig. 5-2, GATA-2 band lane 1), 양성대조군의 DT는 53.1로 대조군에 비하여 약 2배 정도 억제되었다(Fig. 5-2, GATA-2 band lane 2). 실험군의 GATA-2의 단백질 발현은 대조군에 비하여 50 μg/ml에서 DT는 73.9로 약 1.4배, 100 μg/ml에서 DT는 49.1로 약 2.2배, 400 μg/ml에서 DT는 24.7로 약 4.3배 정도로 농도에 따라 단백질 발현을 억제하였다(Fig. 5-2, GATA-2 band lane 3-5).

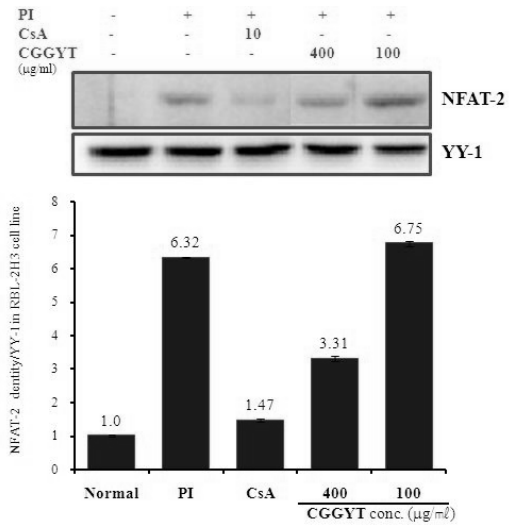


Fig. 6-2. Effect of CGGYT on NFAT-2 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CGGYT (100, 400 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NFAT proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NFAT proteins were selected as the positive control for Anti-NFAT-2 respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2) NFAT-1, NFAT-2 신호전달 기전

NFAT-1의 단백질 발현은 정상군에서 NFAT-1 densities(이하 DT)를 1로 봤을 때(Fig. 6-1, NFAT-1 band lane 1), 대조군에서 DT가 2.39로 정상군에 비하여 증가하였고(Fig. 6-1, NFAT-1 band lane 2), 양성대조군의 DT는 1.03으로 대조군에 비하여 약 2.5배 정도 억제되었다(Fig. 6-1, NFAT-1 band lane 3). 실험군의 NFAT-1의 단백질 발현은 대조군에 비하여 100 μg/ml에서 DT는 1.35로 약 1.8배, 400 μg/ml에서의 DT는 1.47로 약 1.6배 정도로 농도에 따라 단백질 발현을 억제하였다(Fig. 6-1, NFAT-1 band lane 4-5).

NFAT-2의 단백질 발현은 정상군에서 DT가 1로 보고(Fig. 6-2, NFAT-2 band lane 1), 대조군에서 DT가 6.32로 정상군에 비하여 증가하였고(Fig. 6-2, NFAT-2 band lane 2), 양성대조군의 DT는 1.47로 대조군에 비하여 약 4.3배 정도 억제되었다(Fig. 6-2, NFAT-2 band lane 3). 실험군의 NFAT-2의 단백질 발현은 대조군에 비하여 400 μg/ml에서의 DT는 3.31로 약 2배 정도로 단백질 발현을 억제하였으나, 100 μg/ml에서의 DT는 6.75로 대조군에 비하여 차이가 나지 않았다(Fig. 6-2, NFAT-2 band lane 4-5).



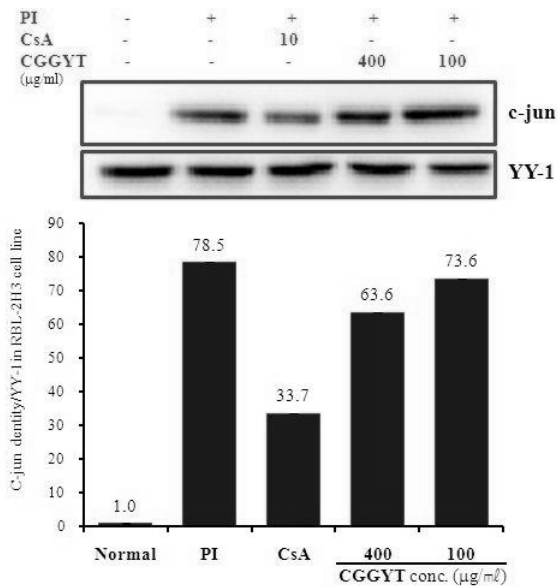


Fig. 7-1. Effect of CGGYT on AP-1 proteins(c-Jun) in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CGGYT (100, 400 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with AP-1 proteins. Another part of the lysates 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. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 3) AP-1 신호전달 기전

c-Jun의 단백질 발현은 정상군에서 c-Jun densities(이하 DT)를 1로 봤을 때(Fig. 7-1, c-Jun band lane 1), 대조군에서 DT가 78.5로 정상군에 비하여 증가하였고(Fig. 7-1, c-Jun band lane 2), 양성대조군의 DT는 33.7로 대조군에 비하여 약 2.3배 정도 억제되었다(Fig. 7-1, c-Jun band lane 3). 실험군의 c-Jun 단백질 발현은 대조군에 비하여 100 μg/ml에서 DT는 73.6, 400 μg/ml에서의 DT는 63.6로 대조군에 비하여 차이가 나타나지 않았다(Fig. 7-1, c-Jun band lane 4-5).

c-Fos의 단백질 발현은 정상군에서 c-Fos densities(이하 DT)를 1로 봤을 때(Fig. 7-2, c-Fos band lane 1), 대조군에서 DT가 5.31로 정상군에 비하여 증가하였고(Fig. 7-2, c-Fos band lane 2), 양성대조군의 DT는 1.75로 대조군에 비하여 약 3배 정도 억제되었다(Fig. 7-2, c-Fos band lane 3). 실험군의 c-Fos 단백질 발현은 대조군에 비하여 400 μg/ml에서의 DT는 2.57로 약 2배 정도 단백질 발현을 억제 하였으나, 100 μg/ml에서의 DT는 4.40으로 대조군에 비하여 차이가 나지 않았다(Fig. 7-2, c-Fos band lane 4-5).

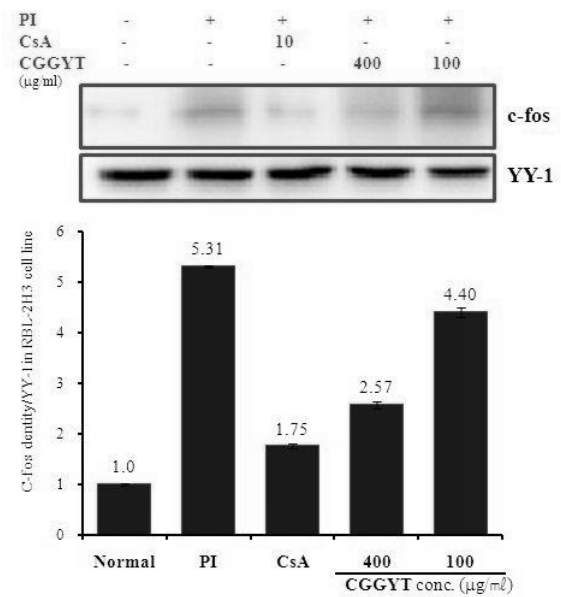


Fig. 7-2. Effect of CGGYT on AP-1 proteins(c-Fos) in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CGGYT (100, 400 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with AP-1 proteins. Another part of the lysates 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. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### 4) NF-κ B p65 신호전달 기전

NF-κB p65 단백질 발현은 정상군에서 NF-κB p65 densities(이하 DT)를 1로 봤을 때(Fig. 8, NF-κB p65 band lane 1), 대조군에서 DT가 18.4로 정상군에 비하여 증가하였고(Fig. 8, NF-κB p65 band lane 2), 양성대조군의 DT는 6.1로 대조군에 비하여 약 3배 정도 억제 되었다(Fig. 8, NF-κB p65 band lane 3). 실험군의 NF-κB p65 단백질 발현은 100 μg/ml에서의 DT는 14.3로 약 1.3배, 400 μg/ml에서의 DT는 10.1로 약 1.8배 정도로 농도에 따라 단백질 발현을 억제하였다(Fig. 8, NF-κB p65 band lane 4-5).

### 5. OVA-specific IgE 측정

CGGYT이 IL-4를 조절하여 감작항원에 의해 유도된 Th2 면역반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Balb/c 수컷에 OVA/alum을 0, 2, 6, 10, 13 주에 복강주사 하여 IgE 생성을 유도하고, 13주 동안 주 5회 CGGYT을 400 mg/kg 경구투여 한 뒤 2주와 14주에 혈액 중 OVA-specific IgE를 ELISA로 측정하였다.

그 결과, OVA-specific IgE 생성량은 정상군은 2주와

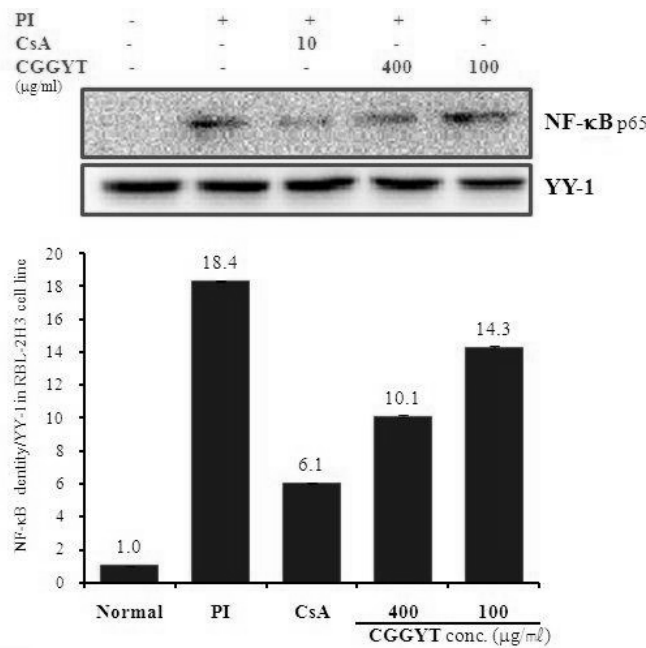


Fig. 8. Effect of CGGYT on NF-κ B p65 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CGGYT (100, 400 μg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 6 hours. After adding lysis buffer, one part of the lysates was subjected to western blot with NF-κB p65 protein. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The levels of NF-κB p65 proteins were selected as the positive control for Anti-NF-κB p65, respectively. Band densities were compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

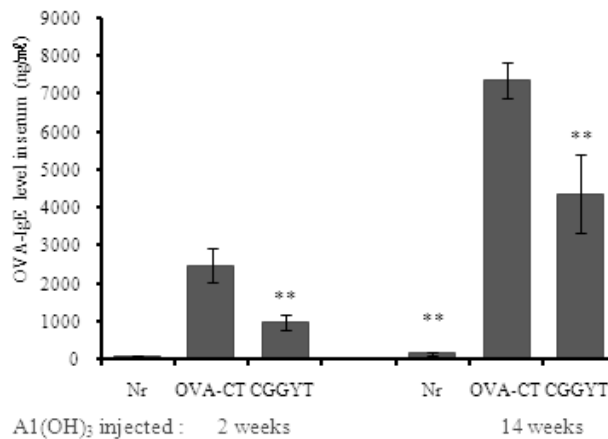


Fig. 9. Effect of CGGYT on OVA-specific IgE release in OVA challenged allergic mouse model

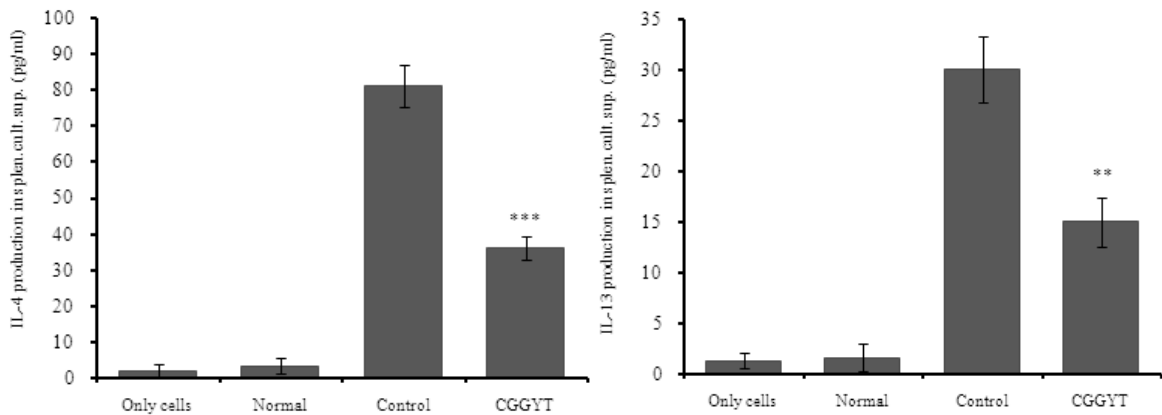
Balb/c mice were challenged with OVA as described in the Experimental section. Blood samples were collected after 2 weeks and 14 weeks for OVA-specific IgE measurement and serum was prepared. The data shown represent the mean ± SE of measurements obtained from 5 animals (OVA-treated) and 2 animals (control). 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(\*\* p<0.01).

14주에서 각각 74.9±29.1, 162.2±58.8이었고, 대조군은 2주와 14주에서 각각 2,492.3±458.6, 7,366.9±465.6로 정상군에 비하여 약 33.3배, 45.4배 정도 증가하였다. 실험군의 OVA-specific IgE 생성량은 2주와 14주에서 각각 981.2±217.3, 4,378±1029.3 으로 약 2.5배, 1.7배

정도로 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 9).

### 6. Th2 cytokine 억제 효과

CGGYT이 Th2 cytokine IL-4와 IL-13 생성에 미치는



**Fig. 10. Effect of CGGYT 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 ± SE of measurements obtained from 5 animals (OVA-treated) and 2 animals (control)(\*\* p<0.01).

영향을 관찰하기 위하여, OVA/alum을 복강주사하고 CGGYT을 투여한 Balb/c 수컷에서 13주 후 비장세포를 분리하여 OVA로 재자극하고 48시간 동안 배양한 뒤 배양 상층액에서 분리된 IL-4와 IL-13 생성량을 ELISA로 측정하였다.

1) IL-4 생성

IL-4 생성량은 정상군은 3.44±2.28이었고, 대조군은 81.04±5.88로 정상군에 비하여 약 23.5배 정도 증가하였다. 실험군의 IL-4 생성량은 36.15±3.15이며 약 2.2배 정도로 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.001) 억제하였다(Fig. 10).

2) IL-13 생성

IL-13 생성량은 정상군은 1.69±1.4이었고, 대조군은 30.02±3.29로 정상군에 비하여 약 17.8배 정도 증가하였다. 실험군의 IL-13 생성량은 15.02±2.44이며 약 2배 정도로 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 10).

IV. 고찰

알레르기 질환은 최근 서구화와 산업화로 전체적인 유병률은 증가하는 추세이며, 건강보험 적용 인구 10만 명당 진료 환자수가 2001년 10,884명에서 2005년에는 13,508명으로 4년 동안 21.4%나 증가하였다<sup>8)</sup>.

알레르기 질환은 국소적인 증상을 보이는 경우도 있

으나 전신적인 질환의 일종으로 천식, 알레르기 비염, 아토피피부염 등의 질환이 서로 밀접한 상관관계가 있다<sup>9)</sup>. 소아에 있어서는 아토피피부염에서 천식으로, 천식에서 다시 알레르기 비염 등으로 진행되는 알레르기 행진 과정을 보이기도 한다<sup>10)</sup>.

알레르기 질환의 치료에는 원인 항원을 피하고 예방하는 일, 약물 요법 및 면역학적 치료법의 세 가지로 나눌 수 있으며<sup>11)</sup>, 알레르기 질환은 염증성이고 일단 발생하면 대부분 진행하면서 만성화되기 때문에 급성 증상을 초기에 치료해 주고 일찍 진단하여 증상의 재발과 염증의 진행을 차단해 주는 것이 필요하다<sup>2)</sup>.

한의학적으로 알레르기와 일치하는 병명은 없으나, 겉으로 드러나는 증상을 다스림과 동시에 근본적인 치료와 재발을 막기 위해 正氣를 관리하고 脾, 肺, 腎을 보강하여 면역을 증강시키는 방법으로 접근해 볼 수 있다. 五臟六腑를 통한 면역의 증강, 六氣, 津液代謝, 氣血陰陽을 통한 인체의 조화와 균형 등으로 근본을 다스리고, 표면으로 드러나는 증상을 관리하는 약제를 병행함으로써 表와 本을 동시에 다스릴 수 있다<sup>11)</sup>.

清肌祛痒湯은 《大田大學校 韓方病院 處方集》<sup>3)</sup>에 수록된 처방이며 清肌散의 변방으로 清肌散은 元代危가 저술한 《世醫得效方》<sup>4)</sup>에 처음 수록된 처방으로 피부의 風熱毒을 제거하는 荊防敗毒散에 天麻와 蟬蛻를 配伍하여 瘙痒을 진정시키는 작용을 강화한 것으로<sup>12)</sup>, 祛風清熱 發表透疹 祛濕消腫의 效能이 있어 주로 風熱로 인한 癩疹에 사용되었으며<sup>13)</sup> 이후 피부질환에 다양하게 응용되고 있다. 清肌祛痒湯은 清肌散에 清熱解毒하는 連翹, 玄參, 黃芩을 配合하고, 健脾利

水하는 白朮과 白茯苓을 配合하였으며 人蔘을 沙蔘으로 바꿔 養陰기능을 강화하였다<sup>14)</sup>. 淸肌祛痒湯은 임상적으로 효과가 인정되었으나, 그 치료반응이 어떠한 기전을 통해 나타나는가에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료되었다.

알레르기에 대한 한약제제의 효과를 살피는 실험에는 동물에서 분리한 B lymphocyte(또는 Splenocyte), Basophil(또는 Mast cell), Macrophage(또는 PBMC), Keratinocyte 등의 세포나 세포주를 이용하는 In vitro 실험<sup>15)</sup>, Balb/c, NC/Nga 마우스, Hairless 랫드와 같은 실험동물을 이용하여 피부자극<sup>16)</sup>, 식이유도<sup>17)</sup>, 환경유도<sup>18)</sup>, 오발무민(OVA, Ovalumin)감작<sup>19)</sup> 등의 모델로 관찰하는 In vivo 실험, 동물에 약물 투여 후 세포를 분리하여 실험실에서 재자극하여 간접적으로 약물의 효능을 검색하는 Ex vivo 실험<sup>20)</sup>이 있다.

이에 저자는 RBL-2H3 비만세포(In vitro)와 OVA/alum 감작 생쥐(Ex vivo)를 이용하여 淸肌祛痒湯이 알레르기 염증 반응의 억제에 미치는 영향을 알아보았다.

생체에 항원이 침입하면, 주로 결체조직과 점막에 존재해 알레르기 염증반응에 관여하는 비만세포에 결합되어 있는 IgE 항체사이에 cross linking을 형성하면서 세포막이 활성화되고 일련의 효소반응을 거친 다음 짧은 시간 내에 탈과립되어 화학적 전달물이 분비된다<sup>21)</sup>. 비만세포는 특이 IgE-FcεRI 반응에 의해 과립내의 화학매개체와 cytokine 등을 분비하면서 알레르기 염증의 초기반응과 후기반응을 일으키고 만성적으로 염증을 지속시키는데 주요한 역할을 한다<sup>1)</sup>. 초기반응은 비만세포-IgE 매개에 의해 분비되는 강력한 매개체들인 히스타민, 프로스타글란딘 D2, 류코트리엔 등에 의해 일어나는 반면 후기반응은 염증세포의 증가 특징이며, 호산구 이외에도 다양한 cytokine들에 의해 여러 세포들의 염증 작용이 일어나 지속적인 후기반응이 유발된다<sup>22)</sup>.

IgE가 FcεRI에 결합하면 비만 세포는 감작되고 알레르기 항원과 만나면 반응할 수 있도록 준비하게 된다<sup>23)</sup>. 알레르기 항원에 재차 노출되면 비만세포는 활성화되어 즉시형 과민반응의 병리학적 반응을 담당하는 매개인자와 IL-4 및 IL-13등과 같은 Th2 cytokine을 분비하고 이들은 알레르기 반응을 확장하는 역할을 한다<sup>24)</sup>. 비만세포에서 생성되는 IL-4와 IL-13은 계속해서 Th2 면역 반응을 확장하고 IgE의 생성을 증가시킴으로서 만성 알레르기 반응에 기여한다. 따라서 비만세포가 발현하는 IL-4와 IL-13을 조절하여 Th2 면역 반응을 제

어할 수 있다면 알레르기 반응을 경감시키거나 알레르기 반응이 만성으로 이행되는 것을 억제할 가능성이 있다.

따라서 본 실험에서는 RBL-2H3 비만세포에서 淸肌祛痒湯의 항알레르기 효과를 연구하기 위하여 IL-4와 IL-13 조절을 qRT-PCR과 ELISA로 분석하였고, Th2 cytokine 발현을 조절하는 메커니즘을 확인하기 위하여 western blot으로 GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, c-Fos, NF-κB p65 전사인자 발현을 관찰하였다. 또한 OVA/alum를 감작한 알레르기 모델에서 2주와 14주에 OVA-specific IgE를 측정하였고, 13주 후에 비장세포를 분리하여 OVA로 재자극하고 Th2 cytokine인 IL-4와 IL-13을 측정하였다.

실험 결과를 살펴보면, 淸肌祛痒湯의 세포독성을 측정한 결과, 모든 농도에서 세포독성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 1).

RBL-2H3 세포에 CsA와 다양한 농도의 淸肌祛痒湯을 처리하고 PI로 자극한 후 qRT-PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과 淸肌祛痒湯이 IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였고(Fig. 2), ELISA로 IL-4, IL-13 단백질 생성량을 측정한 결과 IL-4와 IL-13 단백질 생성을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3-4).

이는 淸肌祛痒湯이 알레르기 반응에 있어서 비만세포가 발현하는 IL-4, IL-13의 생성을 억제하여 Th2 면역 반응을 차단함으로써 알레르기 염증 반응을 조절한 것으로 사료된다.

활성화된 비만세포의 cytokine 생성은 새로운 유도된 cytokine 유전자의 전사결과이다. 비만세포에서 IL-4와 IL-13의 발현은 선택적으로 발현되는 GATA-1, GATA-2, PU.1과 같은 인트론 부위에 결합하는 전사인자<sup>25)</sup> 및 NFAT를 포함하는 여러 전사인자와의 협동에 의해 조절된다<sup>26)</sup>. FcεRI의 교차결합 반응으로 여러 가지 어댑터 분자와 키나아제의 보충과 활성화는 NFAT 및 NF-κB의 핵전이와 c-Jun 아미노 말단 키나아제와 같은 단백질 키나아제에 의한 AP-1의 활성화에 이르게 한다<sup>27)</sup>.

비만세포에서 IL-13의 발현 기전이 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만 다수의 전사인자가 IL-13의 프로모터에 작용하여 조절되는 것으로 확인되고 있다. IL-13의 생성은 GATA, NFAT, AP-1을 포함하는 여러 전사인자와의 협동에 의해 조절된다<sup>28)</sup>. NFAT-2는 GATA와 협력하여 IL-13 전사 조절에 수반되는 가장

중요한 전사인자이다<sup>26)</sup>. GATA-2는 IL-13에 결합하는 AP-1 결합을 유도할 뿐만 아니라 비만세포에서 IL-13 생성을 증가시킨다<sup>29)</sup>.

淸肌祛痒湯이 비만세포에서 GATA-1과 GATA-2의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 GATA-1과 GATA-2 단백질 발현을 측정된 결과, 실험군에서 GATA-1과 GATA-2 단백질 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 5-1, 5-2, GATA-1과 GATA-2, lane 3-5).

전사인자 NFAT은 비활성화 상태에서 인산화된 형태로 세포질에 존재하며 항원 수용체의 자극에 의해서 유도된 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 증가로 calcineurin이 활성화되어 NFAT의 탈인산화를 일으킨다. 탈인산화된 NFAT은 핵 내로 이동하여 활성화된 T 세포에서 IL-2 promoter에 존재하는 antigen receptor response element에 결합함으로써 면역세포들에서 면역반응의 유도과 조절에 필수적인 여러 cytokine 유전자(IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )와 세포표면인자(CD40L, FasL, IL-2R $\alpha$ )등의 발현에 중요한 역할을 한다<sup>30)</sup>.

淸肌祛痒湯이 비만세포에서 NFAT-1과 NFAT-2의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NFAT-1과 NFAT-2 단백질 발현을 측정된 결과, 실험군에서 NFAT-1의 단백질 발현은 억제하였고(Fig. 6-1, NFAT-1, lane 4-5), NFAT-2의 단백질 발현은 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 억제하였으나 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 대조군에 비하여 차이가 나타나지 않았다(Fig. 6-2, NFAT-2, lane 4-5).

c-Jun과 c-Fos는 AP-1 단백질 복합체의 중요한 구성원으로서 heterodimer의 형태로 AP-1 결합 부위를 통해 전사를 조절한다<sup>29)</sup>.

淸肌祛痒湯이 비만세포에서 c-Jun, c-Fos의 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, western blot으로 c-Jun, c-Fos의 단백질 발현을 측정된 결과 실험군의 c-Jun 단백질 발현은 대조군에 비하여 차이가 나타나지 않았고(Fig. 7-1, c-Jun, lane 4-5), c-Fos 단백질 발현은 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 억제하였으나 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 대조군에 비하여 차이가 나타나지 않았다(Fig. 7-2, c-Fos, lane 4-5).

이러한 결과로 淸肌祛痒湯이 GATA, NFAT 단백질 발현은 효과적으로 억제하고, c-Jun 단백질 발현 억제는 큰 효과를 볼 수 없으며, c-Fos에 대해서는 비만세포에서 특이적으로 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 발현되는 농도 의존의 가능성, 또는 실험상의 오류로 추정되며 추가적인 연구를 통해 c-Fos 신호전달에 작용하는 기전을 파악하는

것이 필요할 것이다.

NF- $\kappa$ B는 면역기능, 염증반응, 혈관 내피세포의 활성화, 세포성장 등에 관여하는 전사인자로서 거의 모든 세포에 존재한다. NF- $\kappa$ B는 구조상 같은 계열(Rel family)에 속한 단백질 heterodimer나 혹은 homodimer 형태로 존재하는데 가장 대표적인 것이 p50과 p65의 heterodimer 형태이다. 기저상태에서 I $\kappa$ B와 결합하여 세포질 내에 비활성화 상태로 존재하는 NF- $\kappa$ B는 바이러스 감염, 내독소, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등의 염증매개 cytokine에 의해 활성화된다. 즉, 외부 자극에 의해 I $\kappa$ B가 분해되면 세포질에 존재하던 NF- $\kappa$ B가 핵 속으로 이동되어 여러 유전자의  $\kappa$ B element에 결합하여 그 유전자의 전사를 가져온다. 이런 경로를 통해 전사가 활성화되는 대표적인 염증 매개 물질로는 TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, lymphotoxin, GM-CSF, adhesion molecule 등을 들 수 있다<sup>31)</sup>.

淸肌祛痒湯이 비만세포에서 NF- $\kappa$ B p65의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot으로 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현을 측정된 결과, 실험군의 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현이 대조군에 비하여 억제되었다(Fig. 8, NF- $\kappa$ B p65, lane 4-5).

이러한 결과는 淸肌祛痒湯이 NF- $\kappa$ B p65 단백질 발현을 억제하여 IL-13 유전자 프로모터의 전사적 활성화를 제어함으로써 알레르기 염증 반응에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Helper T세포가 생성하는 cytokine의 종류에 따라 세포성 면역에 관여하는 cytokine인 IL-2, IFN- $\gamma$ 등을 생성하는 Th1세포와 체액성 면역의 제어에 관여하는 cytokine인 IL-4, IL-13등을 생성하는 Th2세포로 분류되고<sup>32)</sup>, Th1과 Th2에서 생성되는 몇몇 cytokine들은 서로 억제작용을 하며 면역평형을 조절한다. Th2 cell에서 생성되는 IL-4와 IL-13은 IgE 생성을 자극하고 IgE는 비만세포를 활성화하여 알레르기 반응을 매개한다<sup>1)</sup>.

淸肌祛痒湯이 Th2 cytokine IL-4를 조절하여 감작항원에 의해 유도된 Th2 면역반응에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 OVA/alum감작 생쥐에서 2 주와 14 주에 OVA-specific IgE의 생성을 ELISA로 측정된 결과, 실험군의 OVA-specific IgE 생성이 대조군에 비하여 현저하게 감소되었다(Fig. 9). 13주 후에 비장세포를 분리하여 OVA로 재자극하고 48 시간 동안 배양한 뒤, 배양 상층액에서 분비된 IL-4와 IL-13 생성량을 ELISA로 측정된 결과, 淸肌祛痒湯이 Th2 cytokine IL-4와 IL-13 생성을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10).

이러한 결과는 淸肌祛痒湯이 Th2 cytokine IL-4를 억제하여 OVA-specific IgE를 조절하고, IL-4와 IL-13 생성을 감소시켜 감작항원에 의해 유도된 Th2 면역반응을 제어함으로써 궁극적으로 Th1/Th2 면역평형에 기여할 것으로 추론해 볼 수 있다.

이상의 결과로 미루어 보아 淸肌祛痒湯은 활성화된 비만세포와 Th2세포에서 발현하는 IL-4, IL-13의 생성을 억제하여 알레르기 염증 반응을 조절하는 것으로 사료되며, 그 중 GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, NF-κB p65 전사인자 활성을 억제하여 IL-4, IL-13의 생성에 중요한 역할을 하는 GATA, NFAT, AP-1 신호전달 기전을 차단하는 것으로 볼 수 있다.

이로써 淸肌祛痒湯이 임상에서 아토피피부염을 비롯한 알레르기 질환에 적용이 가능할 것으로 판단되며, 향후 알레르기 질환의 치료제로서 가능성을 알아보기 위해 보다 심도있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

淸肌祛痒湯이 RBL-2H3 비만세포와 OVA/alum감작 생쥐의 알레르기 염증 반응에 미치는 영향을 실험적으로 규명한 결과 다음과 같다.

### I. RBL-2H3 비만세포에서 淸肌祛痒湯의 효과

1. 정상 hFCs에서 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
2. IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현을 억제하였다.
3. IL-4와 IL-13 단백질 생성을 억제하였다.
4. 전사인자 GATA-1 및 GATA-2 단백질 발현을 억제하였다.
5. 전사인자 NFAT-1 및 NFAT-2 단백질 발현을 억제하였다.
6. 전사인자 c-Fos 단백질 발현을 억제하였다.
7. 전사인자 NF-κB p65 단백질 발현을 억제하였다.

### II. OVA/alum 감작 생쥐에서 淸肌祛痒湯의 효과

1. OVA-specific IgE 생성을 억제하였다.
2. Th2 cytokine IL-4와 IL-13 생성을 억제하였다.

## 참고문헌

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. 최신 면역학입문. 3판. 서울:이퍼블릭. 2009: 104-11, 205-12.
2. 안효섭. 홍창의 소아과학. 제9판(보정판). 서울:대한교과서주식회사. 2007:1104, 1121.
3. 대전대학교 둔산한방병원. 대전대학교 한방병원 처방집. 서울:태광기획. 2011:376.
4. 危亦林. 世醫得效方. 上海:上海科學技術出版社. 1997: 962.
5. 구영희, 홍승욱. 淸肌散이 Th2 세포 분화와 염증에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2007;20(3):63-70.
6. 안상현, 김호현, 김진택. 淸肌散의 iNOS 발현과 NO 생성 억제가 NC/Nga 생쥐의 아토피피부염에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2007;21(5):1092-8.
7. Munetaka Ishiyama, Yoko Miyazono, Kazumi Sasamoto, Yosuke Ohkura, Keiyu Ueno. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. Talanta. 1997;44(7):1299-305.
8. Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2007 Korea National Health Statistics. Korea National Health and Nutrition Examination Surveys Phase IV (first year, 2007) 2008.
9. Grossman J. One airway, one disease. Chest. 1997; 111(2):11-6.
10. Sampson HA, McCaskill CC. Food hypersensitivity and atopic dermatitis (evaluation of 113 patients). J Pediatr. 1985;107(5):669-75.
11. 김기봉, 김덕곤, 김윤희, 김장현, 민상연, 박은정, 백정환, 유선애, 이승연, 이진용, 이해자, 장규태, 채중원, 한윤정, 한재경. 한방소아청소년의학. 서울:도서출판 의성당. 2010:721-36.
12. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 서울:도서출판 의성당. 1998:586.
13. 趙佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1987:507.
14. 全國韓醫科大學 本草學共同教材 編纂委員會. 본초학. 서울:도서출판영림사. 2005: 159,161,165,179,195, 218,235,244,348,377,396,499,545,581,586,644.
15. Jang IG, Yang JK, Lee HJ et al. Clinical improvement and histochemical findings in severe atopic dermatitis treat-

- ed with interferon gamma. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:1033-40.
16. Mayumi Kotani et al. Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J Allergy clinical immunol.* 2000;106:159-66.
  17. Choi Jeong June et al. Blockade of atopic dermatitis-like skin lesions by DA-9102, a natural medicine isolated from *Actinidia arguta* in the Mg-deficiency induced dermatitis model of hairless rats. *Exp Biol Med (Maywood)* Aug. 2008;233(8):1026-34.
  18. Hiroshi Matsuda et al. Development of AD-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *international immunology.* 1997;3(9):461-6.
  19. Eun-Jin Park et al. Suppression of spontaneous dermatitis in NC/Nga murine model by PG102 isolated from *actinidia arguta*. *Journal of investigative dermatology.* 2007;127:1154-60.
  20. Park EJ, Kim BC, Eo HW, Park KC, Kim YR, Lee HJ, Son MW, Chang YS, Cho SH, Kim SY, Jin MR. Control of IgE and selective Th1 and Th2 cytokines by PG102 isolated from *Actinidia arguta*. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(5):1151-7.
  21. Katz HR, Stevens RL, Austen KF. Heterogeneity of mammalian mast cells differentiates in vivo and in vitro. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;76:250-9.
  22. 이현희. 알레르기 염증반응에서 Siglecs의 기능. *소아 알레르기 호흡기.* 2006;16(3):197-205.
  23. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FceRI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:931-72.
  24. Matsubara M, Masaki S, Ohmori K, Karasawa A, Hasegawa K. Differential regulation of IL-4 expression and degranulation by anti-allergic olopatadine in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(7):1315-26.
  25. 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.
  26. Hansjörg Schild, Edgar Schmitt, Michael Stassen Bopp, Valeska Heib, Marc Becker, Christian Taube, Palmetshofer, Edgar Serfling, Christine Tertilt, Tobias. Cytokines Expression of Mast Cell-Derived NFAT Transcription Factors in the Expression of Mast Cell-Derived Cytokines. *J Immunol.* 2006;177:6667-74.
  27. Abul k. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. 세포분자면역학. 6판. 서울:이퍼블릭. 2008:459.
  28. Akio Masuda, Yasunobu Yoshikai, Hiroaki Kume, Tetsuya Matsuguchi. The Interaction between GATA Proteins and Activator Protein-1 Promotes the Transcription of IL-13 in Mast Cells. *The Journal of Immunology.* 2004;173:5564-73.
  29. 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.
  30. 이임선, 윈디엔닷, 채홍복, 심광해, 김영호. NFAT(nuclear factor of activated T cells) 전사인자에 대한 천연물의 저해활성. *생약학회지.* 2003;34(2):150-5.
  31. 박계영, 이승희, 황보빈, 임재준, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철규. 폐 상피세포에서 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 경로에 의한 염증매개 사이토카인의 발현. *결핵 및 호흡기 질환.* 2000;49(3):332-42.
  32. 강호일. 키워드로 이해하는 면역학 일러스트 맵. 서울:월드사이언스. 2009:124-9.