

## RBL-2H3 비만세포와 OVA/alum 감작 생쥐에서 清心補血湯의 항알레르기 효과

조민서 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

### Abstract

#### *Anti-allergic Effects of Chungshimbobyeltang in RBL-2H3 Mast Cells and OVA/alum Sensitized Mice*

Jo Min Seo · Han Jae Kyung · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daejeon University

#### **Objectives**

The suppressive effect of CSBHT has been mysterious. Thus, the present study is designed to investigate the suppressive effect and its mechanism.

#### **Methods**

To investigate the anti-allergy effect from *ChungShimBoHyeolTang*(CSBHT), RBL-2H3 cell was used and examined by Real-Time PCR, and IL-4 and IL-13 from RBL-2H3 was examined by ELIS. In addition, GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, c-Jun, NF-κB p65 transcription factors of RBL-2H3 mast cell were examined by Western Blotting. Also, OVA/alum-sensitized mice were orally administrated CSBHT and serum OVA-specific IgE production, IL-4, and IL-13 production in splenocytes supernatant were examined.

#### **Results**

As a result of treating with CSBHT extract, RBL-2H3 mast cells significantly suppressed the IL-4 and IL-13 mRNA expression and IL-4 and IL-13 production. Western blot analysis of transcription factors involving IL-4 and IL-13 expression also revealed a prominent decreases of mast cell's specific transcription factors including GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, and NF-κB p65. Also, examining the mice, administration of CSBHT suppressed the amount of OVA-specific IgE in OVA/alum-sensitized mice and IL-4 and IL-13 production in splenocytes supernatant.

#### **Conclusions**

The study suggested that the anti-allergic activities of CSBHT suppresses IL-4 and IL-13 production from the Th2 cytokines by suppressing transcription factors as GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos and NF-κB p65 in mast cells.

**Key words** : *Chungshimbobyeltang* (CSBHT), Anti-allergic effect, RBL-2H3 mast cell, OVA/alum sensitized mice

## I. Introduction

알레르기는 원인물질에 대해 표적 기관 또는 조직에서 염증이 형성되고 이로 인해 발생하는 과반응(hyperresponsiveness)의 증상을 나타내는 질환이다<sup>1)</sup>. 주로 유전적인 요인과 환경적인 요인이 깊게 관여하는 것으로 알려져 있으며 특히 소아 및 청소년기의 알레르기 질환의 유병률은 성인보다 높으며 꾸준히 증가하는 경향을 보인다<sup>2)</sup>.

알레르기 피부 질환에는 두드러기, 혈관부종, 아토피 피부염, 접촉 피부염 등이 있으며<sup>3)</sup> 현재 알레르기 피부염의 치료제로는 항히스타민제, 항알레르기제, 부신피질 호르몬제, 국소 면역 조절제, 사이크로스포린, IFN- $\gamma$  등이 있으나 이들의 장기 사용은 내성 증가와 여러 부작용으로 인해 새로운 약물의 개발이 요구되고 있다<sup>4)</sup>. 이에 따라 한의학계에서도 알레르기 피부염에 대한 다양한 처방과 기전에 대한 연구가 이루어지고 있다<sup>5,6)</sup>.

清心補血湯 (*Chungshimbobyoltang*)은 《東醫寶鑑》<sup>7)</sup>에 수록된 처방으로 “勞心思慮, 損傷精神, 頭眩目昏, 心虛氣短, 驚悸煩熱” 등의 증상을 치료하려는 목적으로 입방된 것으로 주로 補益心氣, 滋養陰血, 寧心安神의 목적으로 활용되어진 처방이다.

알레르기는 면역반응의 일부로 한의학에서는 正氣와 邪氣의 작용으로 이해할 수 있다. 특히 正氣의 강약이 질병 발생과 발전의 관건이 되는데 박 등<sup>8)</sup>의 연구에 따르면 清心補血湯은 면역력을 증강시켜 항암 효과를 높인다고 보고하였다. 이와 같이 清心補血湯의 면역력 증강효과는 알레르기 피부염과 관련시켜 활용 가능할 것으로 생각되나 구체적인 연구는 아직 이루어지지 않았다.

이에 저자는 清心補血湯의 항알레르기 효과를 알아보기 위하여 RBL-2H3 비만세포를 이용하여 Real-Time PCR과 ELISA로 IL-4와 IL-13를 분석하였고, western blot으로 GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, c-Jun, NF- $\kappa$ B p65 등의 전사인자의 발현을 관찰하였다. 그리고 OVA/alum을 감작한 생쥐 모델에서 OVA-specific IgE 생성량과 Th2 사이토카인인 IL-4와 IL-13 생성량을 측정하여 항알레르기 효과와 기전을 규명하는데 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)은 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 ( $MgCl_2$ ), ovalbumin, aluminium hydroxide ( $Al(OH)_3$ )는 Sigma사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. Trizol은 Ambion사 (U.S.A.) 제품을, EZ-cytox kit은 Daeil Lab. Co. (Korea) 제품을, Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)는 TaKaRa사 (Japan) 제품을, Moloey murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega사 (U.S.A.) 제품을 사용하였고, RNAzol<sup>B</sup>는 Tel-Test사 (U.S.A.) 제품을, primary antibody (NFAT-1, NFAT-2, c-Jun, c-Fos, GATA-1, GATA-2, NF- $\kappa$ B p65)는 Santa-Cruz사 (U.S.A.) 제품을 사용하였다. ECL-hybond 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 시약 들은 특급 및 일급을 사용하였다.

##### (2) 기기

機器는 열탕추출기 (DWT-1800T)는 대응사 (Korea) 제품을, 감압 증류장치 (rotary vacuum evaporator, B-480)는 BÜCHI사 (Switzerland) 제품을, 동결 건조기 (freeze dryer, FDU-540)는 EYELA사 (Japan) 제품을, CO<sub>2</sub> 배양기는 Forma scientific Co.사 (U.S.A.) 제품을, 원심분리기는 한일과학사 (Korea) 제품을, plate shaker는 Lab-Line사 (U.S.A.) 제품을, spectrophotometer는 Shimadzu사 (Japan) 제품을, Bio-freezer는 Sanyo사 (Japan) 제품을, Quantitative Real-Time PCR은 Applied Biosystems사 (U.S.A.) 제품을,

Table 1. Composition of *ChungShimBoHyeolTang*

Herbal name	Pharmaceutical name	Amount (g)
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	6
麥門冬	<i>Liriodopsis Tuberosa</i>	4
酸棗仁	<i>Zizyphi Spinosae Semen</i>	4
白茯苓	<i>Hoelen</i>	4
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	4
當 歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	2
梔 子	<i>Gardeniae Fructus</i>	2
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	2
生地黃	<i>Rebmanniae Radix Crudus</i>	2
Total amount		38

ELISA READER는 Molecular Devices사 (U.S.A.)제품을, Image-Rab densitometer는 Bio-Rad사 (U.S.A.) 제품 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 약물분리

### (1) 세포 배양

본 실험에 사용된 RBL-2H3 비만세포 (Rat basophilic leukaemia mast cell)는 한국 세포주 은행 (Korean cell line bank, Seoul, Korea)에서 구매하였으며 minimal essential medium (MEM)에 15% fetal bovine serum (FBS), penicillin 100 U/ml와 streptomycin 100 µg/ml을 첨가하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

### (2) 清心補血湯 조제

본 실험에 사용한 清心補血湯의 구성은 《東醫寶鑑》<sup>9)</sup>에 근거하여 대전대학교 둔산한방병원에서 구입 정선하여 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

### (3) 清心補血湯 추출물 분리

清心補血湯 2첩 분량에 증류수 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 450 ml 액을 흡입 여과하고 이를 감압 증류장치로 농축하였다. 이를

다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 清心補血湯 추출물 (이하 CSBHT) 22 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 한국 세포주 은행에서 구매하였으며, 세포를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

#### (2) 세포 독성 (cytotoxicity) 측정

세포 독성 측정방법은 EZ-cytox assay법<sup>9)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. RBL-2H3 비만세포는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양한 후 CSBHT (최종 농도 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 µg/ml)을 48 시간 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) Real-Time PCR

RBL-2H3 cell을 6-well plate에 2.5×10<sup>5</sup> cells/ml로 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 무처리한 군은 정상군 (Nt)으로 하였으며, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5 µM) 만으로 자극한 군은 대조군 (이하 PI)으로 하였다. 배양 후 cyclosporin A (이하 CsA, 10 µg/ml)와 CSBHT (50 µg/ml, 100 µg/ml)으로 처리하고

1시간 후에 PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)으로 자극한 뒤 6시간 후에 세포를 얻어 각각 양성대조군 (CsA)과 실험군 (CSBHT)으로 하였다. 배양 후 세포에 Trizol 시약을 1 ml 넣고 eptube에 넣은 후 클로로포름을 100  $\mu$ l 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  $\mu$ l 넣어 녹였다. 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 Real-Time PCR을 95  $^{\circ}$ C 3분 실행 후 95  $^{\circ}$ C 15초, 60  $^{\circ}$ C 15초, 72  $^{\circ}$ C 20초로 40회 실행시켰다.

#### (4) ELISA 측정

RBL-2H3 cell을 48-well plate에  $4 \times 10^5$  cells/ml로 250  $\mu$ l씩 분주하고 24 시간 동안 배양한 다음 무처리군은 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 CSBHT (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 (CSBHT)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. 각각 antibody biotin-IL-4 conjugated와 antibody biotin-IL-13 conjugated를 희석하고 배양 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각각 antibody biotin-IL-4 conjugated와 antibody biotin-IL-13 conjugated, 그리고 배양 상층액을 100  $\mu$ l씩 넣었다. 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서

배양하였다. 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 무처리군은 정상군 (Nr)으로 사용하였으며, PMA (50 ng/ml)와 Ionomycin (0.5  $\mu$ M)만으로 자극한 군은 대조군 (PI)으로 사용하였다. 배양 후 CsA (10  $\mu$ g/ml)와 CSBHT (50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml)으로 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 (CSBHT)으로 사용하였다.

① whole cell lysate : Lysis buffer (RIPA buffer 980  $\mu$ l + protease inhibitor cocktail 100배 농축액 10  $\mu$ l + PMSF 100 mM 10  $\mu$ l) 용액 1000  $\mu$ l 중 100  $\mu$ l를 취해서 얼음에서 15-20분 간 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-running 시키고 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

Table 2. Primer Sequence for Real-Time PCR Analysis

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

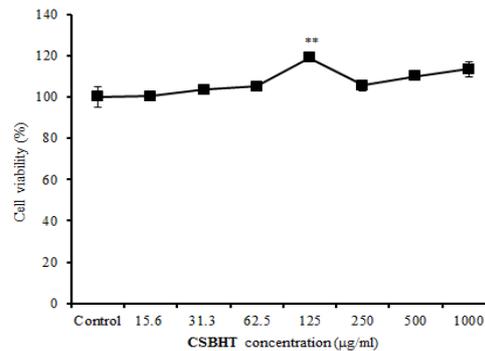


Fig. 1. Cytotoxic effects of CSBHT on RBL-2H3 mast cells

RBL-2H3 cells were pretreated with various concentration CSBHT. The results were expressed as the mean  $\pm$  S.E (N=6). Statistically significant value compared with control group data by T-test (\*\*  $P < 0.01$ ).

milk (TBS/T buffer)로 1시간 동안 blocking 해주었다. Primary antibody (GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, c-Jun, NF- $\kappa$ B 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.

## 2) OVA/alum 감작 생쥐<sup>10,11)</sup>

알레르기 과민반응은 IgE에 의해 매개되므로 CSBHT이 OVA-specific IgE 생성을 억제하는지 관찰하고자 하였다. 6주령의 Balb/c 수컷에 50  $\mu$ g ovalbumin을 200  $\mu$ g Al(OH)<sub>3</sub>에 흡착 (이하 OVA/alum)하여 Balb/c (n=5)에 0, 2, 6, 10, 13주에 복강주사하여 IgE 생성을 유도하였고, CSBHT을 400 mg/kg 경구투여 하였다. 2주와 14주에 혈액 중 OVA-specific IgE를 ELISA로 측정하였다.

CSBHT이 Th2 사이토카인인 IL-4와 IL-13을 억제하는지를 관찰하고자 OVA/alum을 복강주사하고 CSBHT을 경구투여한 Balb/c 수컷쥐에서 13주 후 비장을 적출하여 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well 분주하고 ovalbumin (이하 OVA)를 10  $\mu$ g/ml 농도로 처리하였다. 48시

간 후 배양 상층액에서 IL-4와 IL-13의 생성량을 ELISA로 측정 분석하였다.

## 3. 통계 처리

각 실험군 결과 값은 SPSS for Windows (version 12, SPSS, Chicago, IL, USA) 프로그램의 unpaired student's T-test를 사용하여 통계 처리하였고  $P < 0.05$  이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

## III. Results

### 1. RBL-2H3 비만세포에 미치는 영향

#### 1) 세포 독성

CSBHT의 세포독성을 측정한 결과, 대조군에 비하여 15.6  $\mu$ g/ml에서 1,000  $\mu$ g/ml까지의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

#### 2) Real-Time PCR 분석

CSBHT이 비만세포에서 IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 각각의 RBL-2H3 세포에 CsA와 다양한 농도의 CSBHT을 처리

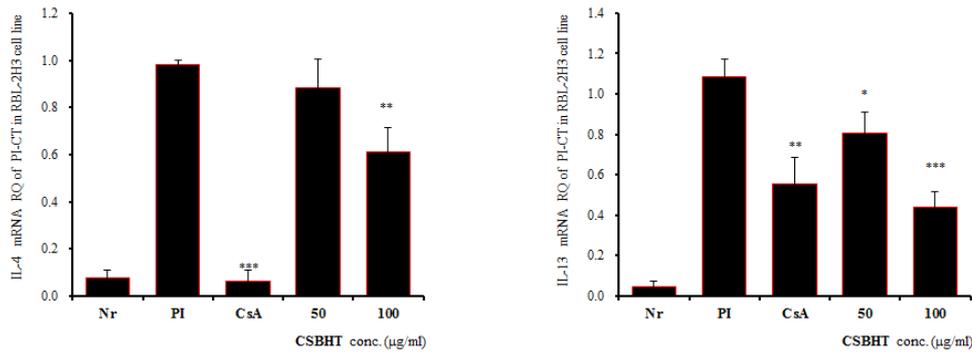


Fig. 2. Inhibitory effects of CSBHT on IL-4 and IL-13 mRNA expression

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or CSBHT (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 real-time 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 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ). Nr; non-treated, CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

한 후 PMA-Ionomycin (이하 PI)로 자극한 뒤, 6시간 후 Real-Time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석하였다. 무처리한 비만세포는 정상군, PI로만 자극한 군은 대조군, CsA 처리 후 PI로 자극한 군은 양성대조군 그리고 CSBHT로 처리한 후 PI로 자극한 군은 실험군으로 하였다.

#### (1) IL-4 mRNA 발현

IL-4 mRNA 유전자 발현은 정상군이  $0.078 \pm 0.033$  이었고 대조군이  $0.982 \pm 0.018$ 로 정상군에 비하여 약 12.6배 정도 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은  $0.061 \pm 0.047$ 로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.001$ ). 실험군에서 50 µg/ml은  $0.883 \pm 0.121$ 로 대조군에 비하여 억제하였으나 유의성은 없었고, 100 µg/ml에서는  $0.610 \pm 0.105$ 로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 2).

#### (2) IL-13 mRNA 발현

IL-13 mRNA 유전자 발현은 정상군이  $0.048 \pm 0.027$ 이었고 대조군이  $1.087 \pm 0.087$ 로 정상군에 비하여 약 22.6배 정도 유전자 발현이 증가되었다. 양성대조군은  $0.555 \pm 0.133$ 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.01$ ). 실험군에서 50 µg/ml은  $0.807 \pm 0.101$ 로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였으며 ( $P < 0.05$ ), 100 µg/ml에서는  $0.439 \pm 0.076$ 으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2).

### 3) ELISA 분석

CSBHT이 비만세포에서 IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, RBL-2H3 세포에 CsA와 다양한 농도의 CSBHT을 처리한 후 PI로 자극한 뒤 24 시간 후 ELISA로 IL-4와 IL-13 생성량을 측정하였다. 무처리한 비만세포는 정상군, PI로만 자극한 군은 대조군, CsA 처리 후 PI로 자극한 군은 양성대조군 그리고 CSBHT로 처리한 후 PI로 자극한 군은 실험군으로 하였다.

#### (1) IL-4 단백질 생성

IL-4 생성량에서 정상군은  $445.3 \pm 142.3$  pg/ml이었고 대조군은  $5319.4 \pm 271.7$  pg/ml으로 정상군에 비하여 약 11.9배 증가하였으며 양성대조군은 IL-4 생성이 전혀 없었다 ( $P < 0.001$ ). 실험군에서 50 µg/ml은  $4101.2 \pm 252.1$  pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였고 ( $P < 0.01$ ), 100 µg/ml에서는  $4010.9 \pm 79.2$  pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.001$ ). 200 µg/ml에서는  $3685.2 \pm 151.5$  pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였고 ( $P < 0.001$ ), 400 µg/ml에서는  $3155.3 \pm 126.2$  pg/ml으로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하여 농도에 따라 IL-4 단백질 생성을 억제하는 것으로 나타났다 ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3).

#### (2) IL-13 단백질 생성

IL-13 생성량에서 정상군은  $21.5 \pm 8.7$  pg/ml이었고, 대조군은  $342.7 \pm 33.5$  pg/ml로 정상군에 비하여 약 15.9배 증가하였다. 양성대조군은 IL-13 생성이 전혀

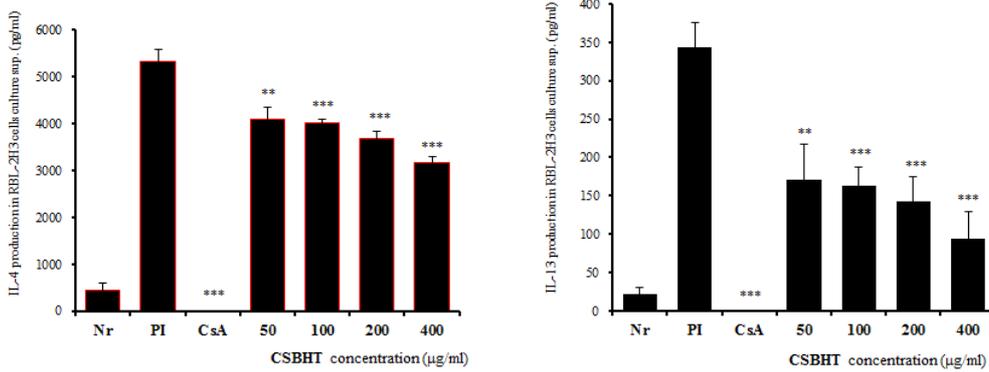


Fig. 3. Inhibitory effects of CSBHT on IL-4 and IL-13 production

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or CSBHT (50, 100, 200, 400 µg/ml) for 1 hour, and then stimulated with PI for 24 hours. IL-4 and 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<0.01, \*\*\* P<0.001).

Nr; non-treated, CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

없었다 (P<0.001). 실험군에서 50 µg/ml는 170.2 ± 47.7 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였고 (P<0.01), 100 µg/ml 농도에서는 163.9 ± 22.9 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 (P<0.001). 200 µg/ml에서는 143.0 ± 32.5 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였고 (P<0.001), 400 µg/ml에서는 94.9 ± 35.3 pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하며 농도에 따라 IL-13 단백질 생성을 억제하는 것으로 나타났다 (P<0.001) (Fig. 3).

4) Western blot 분석

CSBHT이 비만세포에서 GATA-1과 GATA-2, NFAT-1과 NFAT-2, c-Jun, c-Fos 및 NF-κB p65 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 RBL-2H3 비만세포에 CsA와 다양한 농도의 CSBHT을 처리한 후 PI로 자극하고 6시간 후 western blot으로 GATA-1과 GATA-2, NFAT-1과 NFAT-2, c-Jun, c-Fos 및 NF-κB p65의 단백질 발현을 측정하였다. 무처리한 비만세포는 정상군, PI로만 자극한 군은 대조군, CsA로 처리 후 PI로 자극한 군은 양성대조군 그리고 CSBHT로 처리한 후 PI로 자극한 군은 실험군으로 하였다.

(1) GATA-1과 GATA-2 신호 전달 기전

GATA-1 단백질 발현은 대조군에서 GATA-1 densities (이하 DT)가 132.9로 나타났다 (Fig. 4-1, GATA-1 band lane 1). 양성대조군의 DT는 53.1로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 4-1, GATA-1 band lane 2). 실험군 중 50 µg/ml 농도는 DT가 95.6이고 100 µg/ml 농도

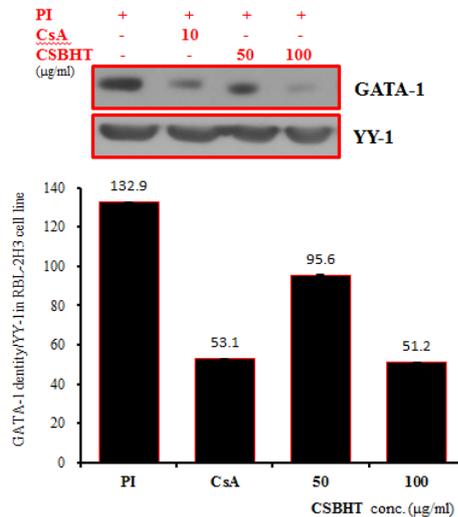


Fig. 4-1. Effect of CSBHT on GATA-1 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 µg/ml) or CSBHT (50, 100 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-1 protein. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. GATA-1 proteins were selected as the positive controls for Anti-GATA-1. Band density was compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer.

CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

에서는 DT가 51.2로 대조군에 비하여 억제되었으며 농도에 따라 단백질 발현을 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 4-1, GATA-1 band lane 3-4).

GATA-2 단백질 발현은 대조군에서 GATA-2 DT는 106.5이었고 (Fig. 4-2, GATA-2 band lane 1) 양성대조군의 DT는 53.1로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 4-2, GATA-2 band lane 2). 실험군 중 50 µg/ml 농도는

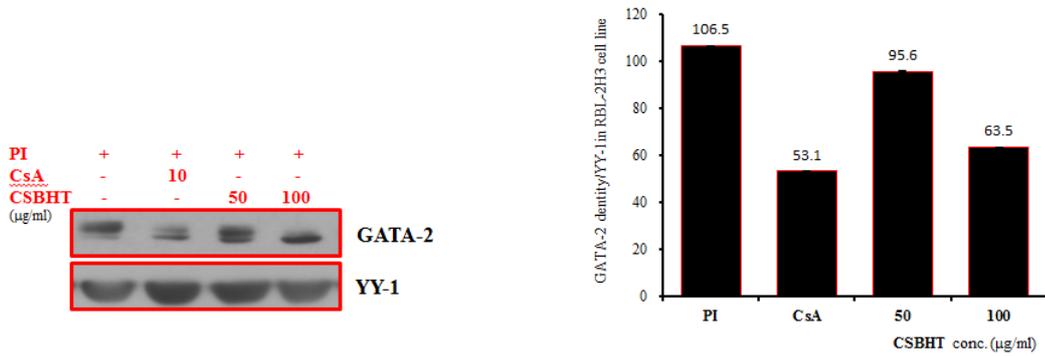


Fig. 4-2. Effect of CSBHT on GATA-2 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or CSBHT (50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 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-2 protein. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. GATA-2 proteins were selected as the positive controls for Anti-GATA-2. Band density was compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer.

CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

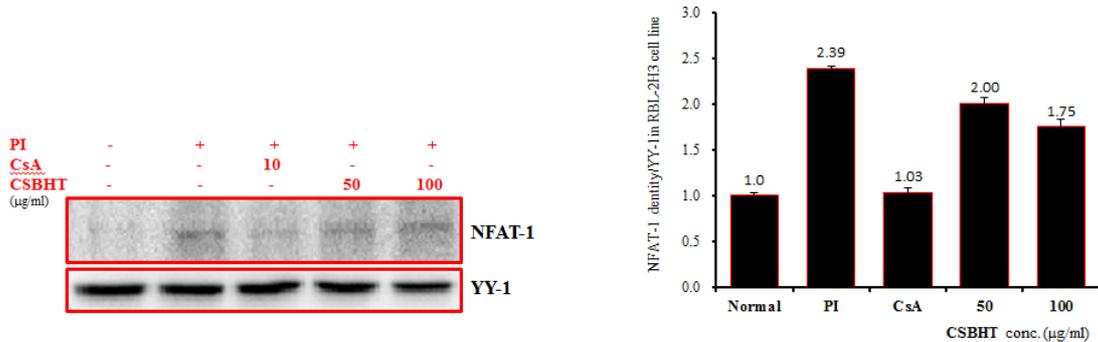


Fig. 5-1. Effect of CSBHT on NFAT-1 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or CSBHT (50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) 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-1 protein. Another part of the lysate was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. NFAT-1 proteins were selected as the positive controls for Anti-NFAT-1. Band density was compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer.

Nr; non-treated, CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

DT가 95.6이고 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 DT가 63.5로 대조군에 비하여 억제되었으며 농도에 따라 단백질 발현을 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 4-2, GATA-2 band lane 3-4).

(2) NFAT 신호 전달 기전

NFAT-1 단백질 발현은 정상군에서 NFAT-1 DT가 1로 나타났고 (Fig. 5-1, NFAT-1 lane 1) 대조군에서 DT가 2.39로 증가하였다 (Fig. 5-1, NFAT-1 lane 2). 양성 대조군은 DT가 1.03으로 대조군에 비하여 억제되었고 (Fig. 5-1, NFAT-1 lane 3), 실험군 중 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 DT가 2.00으로 대조군에 비하여 억제되었고, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 DT가 1.75로 대조군에 비하여 억제되어 농도에 따른 효과가 크게 나타나지 않았다 (Fig. 5-1,

NFAT-1 lane 4-5).

NFAT-2 단백질 발현은 정상군에서 NFAT-2 DT가 1로 나타났고 (Fig. 5-2, NFAT-2 lane 1) 대조군에서 DT가 6.32로 증가하였다 (Fig. 5-2, NFAT-2 lane 2). 양성 대조군은 DT가 1.47로 대조군에 비하여 억제되었고 (Fig. 5-2, NFAT-2 lane 3), 실험군 중 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 DT가 3.89로 대조군에 비하여 억제되었고, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 DT가 3.09로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 5-2, NFAT-2 lane 4-5).

(3) AP-1 신호 전달 기전

c-Fos 단백질 발현은 정상군에서 c-Fos DT가 1로 나타났고 (Fig. 6-1, c-Fos lane 1) 대조군에서는 DT가 5.31로 증가하였다 (Fig. 6-1, c-Fos lane 2). 양성대조군은

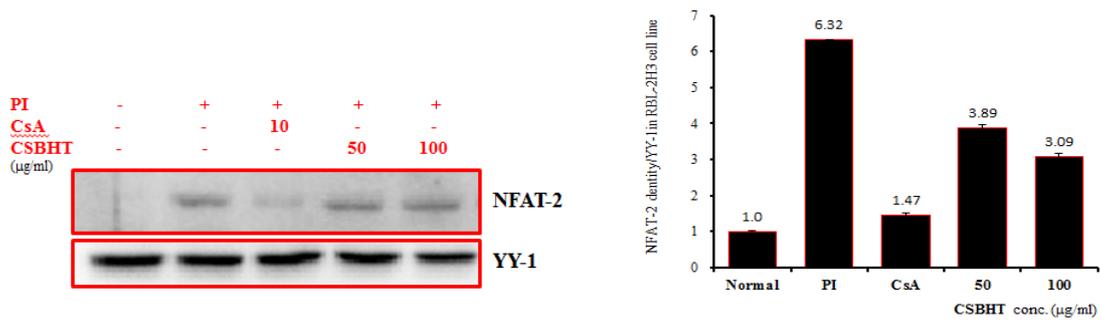


Fig. 5-2. Effect of CSBHT on NFAT-2 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CSBHT (50, 100 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-2 protein. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. NFAT-2 proteins were selected as the positive controls for Anti-NFAT-2. Band density was compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer.

Nr; non-treated, CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

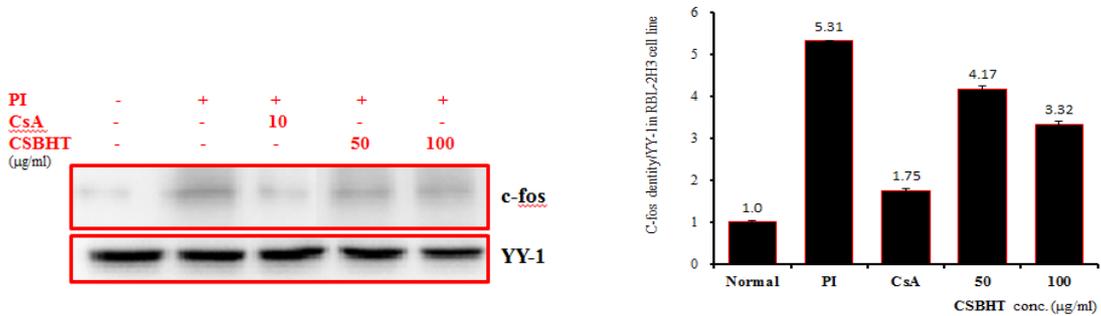


Fig. 6-1. Effect of CSBHT on c-Fos signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CSBHT (50, 100 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 c-Fos proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. c-Fos proteins were selected as the positive controls for anti-c-Fos. Band density was compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer.

Nr; non-treated, CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

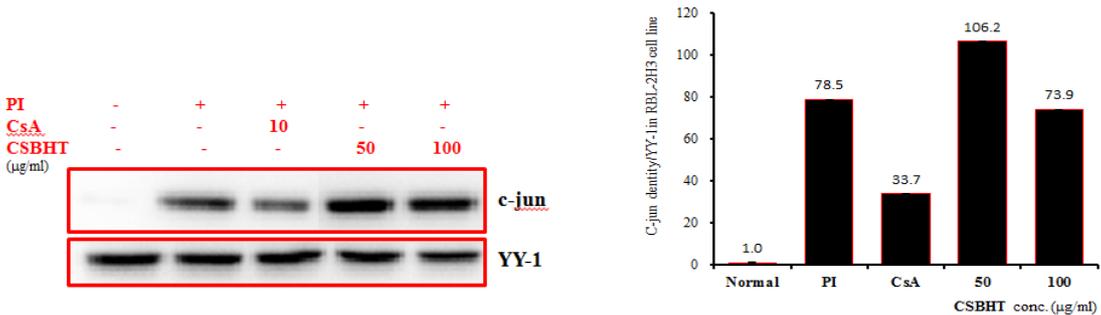


Fig. 6-2. Effect of CSBHT on c-Jun signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CSBHT (50, 100 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 c-Jun proteins. Another part of the lysates was directly subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. c-Jun proteins were selected as the positive controls for anti-c-Jun. Band density was compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer.

Nr; non-treated, CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

DT가 1.75로 대조군에 비하여 억제되었고 (Fig. 6-1, c-Fos lane 3), 실험군 중 50 μg/ml 농도에서는 DT가 4.17로 대조군에 비하여 억제되었고, 100 μg/ml 농도에서는 DT가 3.32로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig.

6-1, c-Fos lane 4-5).

c-Jun 단백질 발현은 정상군에서 c-Jun DT가 1로 나타났다 (Fig. 6-2, c-Jun lane 1) 대조군에서는 DT가 78.5로 증가하였다 (Fig. 6-2, c-Jun lane 2). 양성대조군은

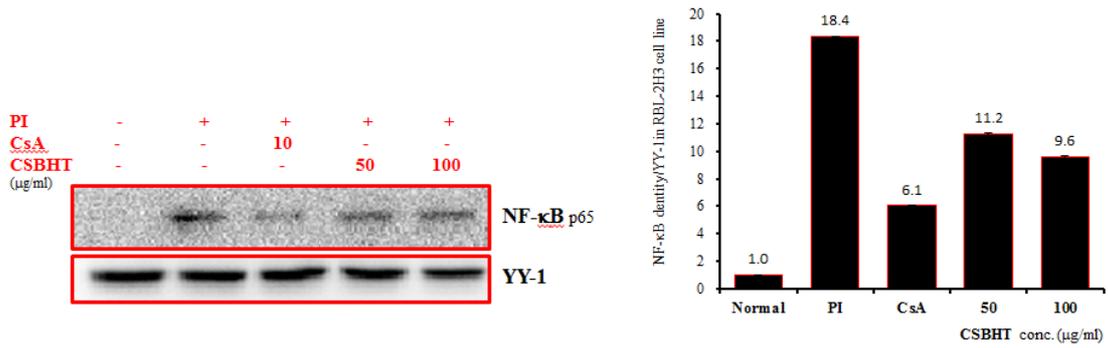


Fig. 7. Effect of CSBHT on NF-κ B p65 signal events in RBL-2H3 cells induced with PI

RBL-2H3 cells were pretreated with CsA (10 μg/ml) or CSBHT (50, 100 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. NF-κB p65 proteins were selected as the positive controls for Anti-NF-κB p65. Band density was compared with YY-1 and measured using an Image-Rab densitometer.

Nr; non-treated, CsA; cyclosporin A, PI; PMA-Ionomycin

DT가 33.7로 대조군에 비하여 억제되었고 (Fig. 6-2, c-Jun lane 3), 실험군 중 50 μg/ml 농도에서는 DT가 106.2로 대조군에 비하여 오히려 증가하는 경향을 보였고, 100 μg/ml 농도에서는 DT가 73.9로 대조군에 비하여 감소하였으나 그 효과는 미약하였다 (Fig. 6-2, c-Jun lane 4-5).

(4) NF-κB p65 신호 전달 기전

NF-κB p65 단백질 발현은 정상군에서 NF-κB p65 DT가 1로 나타났고 (Fig. 7, NF-κB p65 lane 1) 대조군에서는 DT가 18.4로 증가하였다 (Fig. 7, NF-κB p65 lane 2). 양성대조군은 DT가 6.1로 대조군에 비하여 억제되었고 (Fig. 7, NF-κB p65 lane 3), 실험군 중 50 μg/ml 농도에서는 DT가 11.2로 대조군에 비하여 억제되었고, 100 μg/ml 농도에서 DT가 9.6으로 대조군에 비하여 억제되었다 (Fig. 7, NF-κB p65 lane 4-5).

2. OVA/alum 감작 생쥐에 미치는 영향

CSBHT 투여가 OVA/alum을 복강주사를 한 생쥐에서 OVA 특이적 IgE 생성과 비장 세포의 IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 별무투여한 생쥐군은 정상군, OVA 복강주사 한 생쥐군은 대조군 그리고 CSBHT를 경구투여한 생쥐군을 실험군으로 하였다.

1) OVA-specific IgE 생성 효과

OVA 감작 2주의 OVA-specific IgE의 생성량에서 정상군은 74.9 ± 29.1 ng/ml이었고 대조군은 2492.3 ±

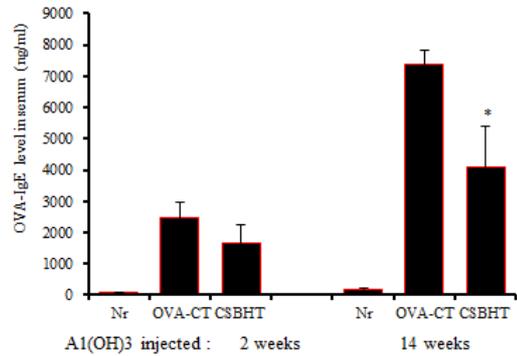


Fig. 8. Effect of CSBHT on OVA-specific IgE release in OVA challenged allergic mouse model

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 ± S.E of measurements obtained from 5 animals (OVA-treated) and 2 animals (controls). 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<0.05).

458.6 ng/ml으로 정상군에 비하여 약 33.3배 증가하였다. 실험군은 1682.8 ± 559.2 ng/ml로 대조군에 비하여 억제하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 8).

OVA 감작 14주의 OVA-specific IgE의 생성량에서 정상군은 162.2 ± 58.8 ng/ml이었고 대조군은 7366.9 ± 465.6 ng/ml으로 정상군에 비하여 약 45.4배 증가하였다. 실험군은 4092.3 ± 1282.7 ng/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 (P<0.05) (Fig. 8).

2) Th2 cytokine 생성 효과

OVA/alum을 복강주사하고 CSBHT 경구투여한 13

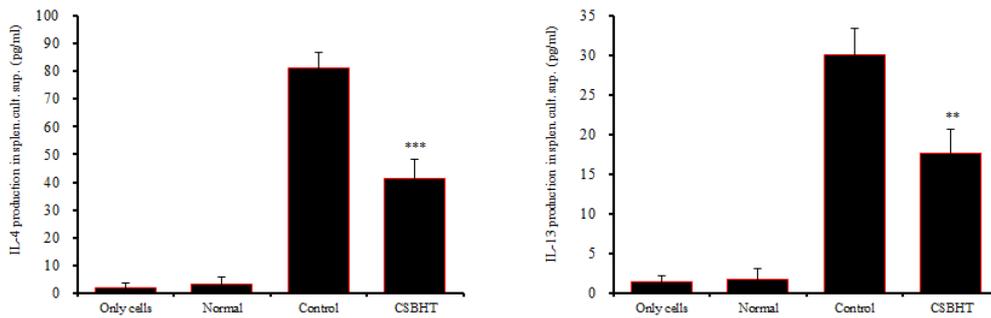


Fig. 9. Effect of CSBHT on IL-4 and IL-13 release in OVA challenged isolated splenocyte

Splenocytes from Balb/c mice were isolated following ovalbumin challenge *Ex 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 levels were measured in cell culture supernatant. The data shown represent the mean ± S.E of measurements obtained from 5 animals (OVA-treated) and 2 animals (controls) (\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

주 생쥐에서 비장세포를 분리하여 OVA로 재자극하고 48시간 동안 배양한 뒤 배양 상층액에서 분비된 IL-4와 IL-13 생성량을 ELISA로 측정하였다.

(1) IL-4 생성량

IL-4 생성량은 정상군이  $3.44 \pm 2.28$  pg/ml이었고 대조군이  $81.04 \pm 5.88$  pg/ml로 정상군에 비하여 약 23.6 배 증가하였다. 실험군은  $41.35 \pm 6.71$  pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.001$ ) (Fig. 9).

(2) IL-13 생성량

IL-13 생성량은 정상군이  $1.69 \pm 1.4$  pg/ml이었고 대조군이  $30.02 \pm 3.29$  pg/ml로 정상군에 비하여 약 17.7 배 증가하였다. 실험군은  $17.57 \pm 3.05$  pg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 9).

#### IV. Discussion

알레르기는 잦은 알레르겐에 노출됨으로 신체 조직의 과민 반응 (hypersensitivity reaction)이 형성되어 알레르겐에 노출될 때마다 증상을 나타내는 질환이다. 알레르기는 항원이 도입된 후에 반응이 나타나기까지 소요되는 시간에 따라 즉시형과 지연형 반응으로 나누는데 I, II, III형은 체액성 항체 즉 혈청의 면역 글로불린에 의한 것이며 즉시형 반응이라 하고, IV형은 세포성 항체에 의한 반응이며 지연형 반응이라 한다<sup>12)</sup>. 일반적으로 소아과 영역에서 자주 볼 수 있는 알레르기 질환은 호흡기계 질환 (천식, 알레르기 비염 등)과

피부질환 (아토피피부염, 두드러기 등)으로 크게 나누어진다<sup>3)</sup>.

알레르기 피부염에는 두드러기, 혈관부종, 알레르기 접촉피부염과 아토피피부염 등이 대표적이며 각각의 특징을 살펴보면 두드러기는 일시적인 발적과 진피의 부종으로 인한 팽진이 나타나는 현상으로 보통 소양감을 동반한다. 혈관부종은 심부진피, 피하조직 혹은 점막하조직까지 부종이 확대되어 커다란 종창이 특징적으로 나타난다. 또한 알레르기 접촉피부염은 외부 물질과의 접촉에 의해 생기는 모든 피부염으로 알레르기 반응이 있는 사람에게 발생하며, 아토피피부염은 아토피 소인이 있는 환자에서 만성적으로 재발하는 소양성 피부염이다<sup>3)</sup>.

현재 알레르기 피부염 치료는 스테로이드 외용약, 면역억제 외용약 등의 외용요법과 면역억제제, 항히스타민제 등의 내복요법이 주로 사용되고 있다<sup>13)</sup>. 그중에서도 임상에서 다용되고 있는 cyclosporin은 면역억제제로서 NFAT의 활성화를 억제함으로써 T 림프구 활성화를 억제하게 되지만<sup>14)</sup> 신장독성으로 인한 BUN 및 creatinine 상승, uric acid 증가, 고혈압, 사구체 여과율의 감소, 두통, 수전증, 감각이상, 구역, 권태감, 피부의 악성종양 등의 부작용이 보고되고 있다<sup>15,16)</sup>. 따라서 알레르기 피부염 치료에 대하여 부작용이 적고 효과적인 한약제를 비롯한 천연 약물에 대한 관심이 최근 증가하고 있다.

알레르기에 대한 기록으로 巢<sup>17)</sup>는 《諸病源候論》에서 “漆有毒 人有稟性畏漆 但見漆使中其毒 喜面痒 然後胸臂脛膕皆悉癢...若火燒漆 其毒氣則癘 著人急重 亦有性自耐者 終日燒者 竟不爲害也”, “人無問男女

大小 有稟性不耐漆者 見漆及新漆者 便著漆毒”라 하여 옷이 알레르겐으로 작용하며 사람의 체질에 따라 과민 증상의 발생 여부에 차이가 있다고 기술하여 韓醫學에서도 일찍부터 알레르기 질환에 대해 인식하고 있었다는 것을 알 수 있다.

한의학에서 알레르기는 면역반응 중 일부로 《素問·上古天真論》<sup>18)</sup>에서 “眞氣從之 精神內守 病安從來”라 하여 외부 病邪에 저항하는 인체의 抗病능력을 正氣라 하였다. 알레르기 반응이란 항원항체반응의 결과 생체에 나타나는 이상반응이므로 正氣의 저항력 약화와 邪氣의 침해로 인한 인체 陰陽失調로 나타나는 반응이다. 즉, 면역기능을 강화하는 것은 正氣의 부족으로 야기되는 질병에 대해 인체의 저항력을 강화하는 것이라고 이해할 수 있다<sup>19)</sup>.

알레르기 피부염의 일종인 아토피피부염의 경우 분노, 스트레스와 가정환경 등의 심리적 요인이 병의 발생 또는 악화 요인으로 작용한다고 알려져 있다<sup>20)</sup>. 한의학에서 스트레스 등 심리적 요인은 七情으로 보고 있으며 이러한 七情內傷이 正氣를 약화시키며 질병을 일으킨다.

한의학에서 알레르기 치료는 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 관리하는데 목적을 두고 있다<sup>12)</sup>.

현재까지 한약재의 알레르기 피부염 치료 효능에 대한 연구로는 다양한 실험논문들이 보고되고 있다. 성 등<sup>5)</sup>의 연구에 따르면 導赤散 추출물이 쥐 골수 유래 비만세포에서 염증성 사이토카인 IL-6의 발현과 PGD2 생성을 억제하여 다양한 알레르기 질환에 유용하다고 보고하였다. 손 등<sup>6)</sup>은 生料四物湯 추출물이 RBL-2H3 비만세포의 IL-4와 IL-13 생성을 억제하여 아토피피부염 치료제로서의 가능성을 보고하였다. 정 등<sup>21)</sup>은 화피 추출물이 염증성 사이토카인 IL-6, IL-8과 알레르기성 사이토카인 IL-4, IL-5의 분비를 억제하고 IFN- $\gamma$ 의 생성을 증가하여 염증 및 알레르기 반응에 효과가 있었다고 보고하였다. 또한 김 등<sup>22)</sup>은 갈근 추출물이  $\beta$ -hexosaminidase, IL-4, TNF- $\alpha$ , PGE2의 분비를 억제하여 알레르기성 염증반응에 효과가 있었다고 보고하였다.

清心補血湯은 《東醫寶鑑》에 수록된 처방으로 思慮過渡로 인한 驚悸, 勞心思慮, 損傷精神, 頭眩目昏, 心虛氣短, 驚悸煩熱, 心虛로 인한 血氣不足으로 虛勞가 되었을 때 치료하려는 목적으로 입방된 처방으로

《醫鑑》에서는 補血湯이라 하였고 《必用方》에서는 當歸飲이라 하여<sup>7)</sup> 주로 補益心氣, 滋養陰血, 寧心安神의 목적으로 이용되어진 방제이다<sup>8)</sup>.

清心補血湯은 人蔘, 麥門冬, 酸棗仁, 白茯神, 白芍藥, 當歸, 甘草, 川芎, 陳皮, 梔子, 五味子, 生地黃으로 구성되었으며 보혈작용의 四物湯<sup>23)</sup>과 清血生津 補氣작용의 生脈散<sup>23)</sup>을 기본으로 하는 처방이다. 四物湯 원방에 熟地黃 대신 生地黃을 가해 陰血을 보하며 人蔘, 甘草, 五味子是 元氣를 보한다. 陳皮는 行氣하게 하며 麥門冬은 生地黃을 도와 心陰을 滋養하여 心熱을 내리며 梔子是 陳皮와 함께 가슴에 맺힌 鬱氣를 풀게 하고 白茯神과 酸棗仁은 마음과 정신을 안정시키는 효능이 있다<sup>24)</sup>. 위에서 보듯이 清心補血湯의 補益心氣, 寧心安神하는 효능은 七情內傷으로 손상된 正氣를 補益시킬 수 있고 滋養陰血하는 효능은 피부가 건조해지면서 갈라진 피부염을 치료할 수 있을 것으로 생각된다.

지금까지 清心補血湯과 관련된 연구로는 七情內傷에 의하여 발병하는 腫瘍에 대해 扶正補益兼補心하는 방법으로서 면역력 증가에 의한 항암 효과를 살펴본 것이 있다. 박 등<sup>6)</sup>의 연구에 따르면 清心補血湯이 체액성 면역 증강 효과, NK 세포 활성화 증가, IL-2 생성 증가, 비특이성 탐식능 증가 등의 효과가 있었다고 보고하였다. 또 다른 연구로 고 등<sup>25)</sup>은 清心補血湯 동맥경화 질환의 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 NF- $\kappa$ B의 protein/DNA의 결합 능력을 억제하였고 AP-1의 활성화와 DNA에 결합하는 능력을 억제하여 동맥경화 유전자 발현을 억제함으로써 동맥경화를 방지하는 효과가 있었다고 보고하였다.

이에 저자는 清心補血湯이 七情內傷에 의해 正氣가 손상되고 이로 인해 면역력이 저하된 상태에서 발생한 아토피피부염 등의 알레르기 질환에 응용해 볼 수 있을 것으로 생각되어 면역 기능과 관련하여 알레르기 염증 반응에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보고자 본 실험을 실시하였다.

알레르기 증상이 나타나기 위해서는 제일 먼저 알레르겐에 처음 노출되는 감작 단계가 일어나게 된다. 알레르겐에 처음 노출되면 항원 제시 세포 (antigen presenting cell)가 이를 처리하여 T 림프구에 정보를 전달하고 B 림프구는 helper T 림프구의 보조를 받아 형질세포로 분화되어 IgE를 생성, 분비하며 이 IgE 항체는 비만세포나 호염구의 세포막 표면에 있는 고친화성 IgE 수용체 Fc $\epsilon$ RI와 결합하여 감작이 성립된다<sup>26)</sup>.

정상적인 사람은 알레르겐과 접촉하면 대부분 IFN- $\gamma$ 와 같은 사이토카인을 분비 생산하는 Th1 세포의 증식이 일어나지만, 알레르기 소인을 가지고 있는 사람은 Th2 세포가 활발히 증식된다<sup>27)</sup>.

T helper 세포는 전구세포로 존재하다가 항원의 자극에 의해 미분화 상태의 Th0로 분화되고 항원과 면역 반응의 방향성에 의해 세포성 면역에 작용을 하는 Th1 세포와 알레르기 반응에 작용을 하는 Th2 세포로 분화된다. Th1 세포는 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  등과 같은 사이토카인을 분비하여 세포매개성 면역 작용을 활성화 시킨다<sup>13)</sup>. 또한 식세포를 활성화하고 opsonizing 항체와 보체 결합 항체의 생산을 증진시켜 세포내 균을 제거하는 역할을 하고 있다. 이 세포에서 분비하는 IFN- $\gamma$ 는 알레르겐 특이 IgG 항체를 생산하는데도 기여하지만 IgE 항체 생산을 억제하기도 한다<sup>28)</sup>.

반면에 Th2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF 등과 같은 사이토카인을 분비하는데 이중 IL-4와 IL-13은 알레르기성 염증의 초기에 중요한 매개체로서 B세포를 활성화 시키고 형질 세포로 분화시켜 IgE를 생성하는데 작용한다. IL-4는 Th0 세포가 Th2 세포로 분화하는 것을 촉진하고 Th1 세포기능을 억제하는 역할을 하며 IL-13은 태선화된 병변에서 두드러진 것을 볼 수 있다<sup>29,30)</sup>.

초기 과감작 단계를 거치고 다시 알레르겐에 노출되면 과감작 (hypersensitization) 상태가 되는데 이때 비만세포에는 특이 항체와 알레르겐이 결합하여 화학 매개체가 분비 생산된다. 이 화학 매개체들은 혈관투과성의 증가, 혈관확장, 평활근의 수축 및 분비선 기능 항진과 같은 염증 반응을 일으킨다. 이러한 과정을 거치면서 조직은 알레르기 염증으로 손상을 받게 되고 손상된 조직을 통해 알레르겐이 더욱 쉽게 신체내로 유입되고 염증은 오래 지속하게 된다<sup>31)</sup>.

본 실험에서는 淸心補血湯 추출물 (이하 CSBHT)의 항알레르기 효과를 알아보기 위하여 Real-Time PCR과 ELISA로 CSBHT이 RBL-2H3 비만세포의 IL-4와 IL-13의 생성에 미치는 영향과 western blot으로 GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos, c-Jun, NF- $\kappa$ B p65 전사인자의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 이를 통해 CSBHT이 어떤 기전에 영향을 미치는지를 실험적으로 규명해보고자 하였다. 그리고 추가적으로 OVA/alum을 감작한 생쥐모델을 통하여 CSBHT이 OVA-specific IgE 생성에 미치는 영향과 생쥐에서 분리한 비장세포를 OVA로 재자극한 뒤 IL-4 및 IL-13의 생성에 미치는 영

향을 관찰하였다.

RBL-2H3 비만세포를 배양하여 CSBHT의 세포 독성을 측정된 결과 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1).

RBL-2H3 비만세포에 CsA와 CSBHT을 처리하고 PI로 자극해 Real-Time PCR로 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, CSBHT은 대조군에 비하여 100  $\mu$ g/ml 농도에서 IL-4 mRNA 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였고 (Fig. 2), IL-13 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였으며 100  $\mu$ g/ml 농도는 CsA에 비하여 억제 효과가 더 높은 것으로 나타났다 (Fig. 2).

CSBHT이 비만세포에서 IL-4와 IL-13 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 ELISA로 생성량을 측정된 결과 IL-4와 IL-13 단백질 생성이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며 CSBHT의 농도에 따른 억제효과가 있었다 (Fig. 3).

GATA 단백질은 비만세포에만 특이적으로 존재하는 전사인자로 활성을 억제시키면 비만세포의 사이토카인 생성과 탈과립 및 비만세포 생존이 현저하게 억제된다. 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 있다<sup>32)</sup>. GATA 단백질은 IL-4의 인트론 부위에 결합하여 IL-4 전사를 일어나게 하며 NFAT 및 AP-1과 함께 결합체를 형성하여 IL-13의 프로모터 부위에 결합하여 IL-13의 전사가 일어나게 한다<sup>33)</sup>.

다른 전사인자로 NFAT 전사 인자들은 세포질 내에 비활성화 상태로 존재하다가 항원 수용체의 자극을 받게 되면 calcineurin에 의해서 탈인산화가 된 후 핵 내로 이동한다<sup>34)</sup>. 탈인산화된 NFAT는 핵 내로 이동하여 DNA와 결합함으로써 세포표면 인자와 전사조절인자를 발현하게 한다. 면역억제제로 알려져 있는 CsA는 세포내 수용체인 cyclophilins과 결합하여 calcineurin의 탈인산화 기능을 저해함으로써 NFAT의 탈인산화를 방해하고 결과적으로 세포질내의 NFAT 단백질이 핵 내로의 이동을 방해하고 T 림프구 활성을 억제하여 최종적으로 알레르기 반응을 억제한다<sup>35)</sup>.

NFAT-1 결핍은 Th1 사이토카인의 생성을 상당히 감소시킴과 동시에 Th2 사이토카인의 생성을 증가시키는데 반하여 NFAT-2 결핍은 Th2 사이토카인인 IL-4의 생성을 저하시킨다는 점에서 NFAT-2의 기능 억제를 통하여 알레르기 증상의 완화를 기대해 볼 수 있다

<sup>35)</sup> Western blot 검사로 측정된 결과, CSBHT은 대조군에 비하여 NFAT-1 단백질의 발현을 억제하였으나 효과는 미약하였으며 NFAT-2 단백질 발현을 억제하였으며 효과가 뚜렷한 것으로 나타났다 (Fig. 5-1 & 5-2).

AP-1은 Jun과 Fos로 이루어진 이형이합체로 NFAT와 협력하여 IL-4 활성을 촉진시키고 GATA-2에 의해 유도되어 IL-13의 발현을 증가시키는 전사인자이다<sup>36,37)</sup>. c-Fos와 c-Jun의 발현에서는 대조군에 비하여 c-Fos 발현은 억제되었으나 c-Jun 발현은 억제되지 않았다. CSBHT은 c-Fos와 c-Jun의 발현을 억제하여 AP-1 신호전달을 제어하는 효과는 크지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 6-1 & 6-2).

NF-κB는 p50과 p65가 결합한 이형이합체로 inhibitor kappaB (IκB)라고 불리는 저해제에 직접 결합하여 활성이 억제된 상태로 세포질에 존재한다. NF-κB가 외부 자극을 받았을 때 NF-κB-IκB 복합체는 인산화되고 분해과정을 거쳐 NF-κB 단백질은 핵 내로 이동하여 목표 유전자의 promoter 부위에서 DNA 결합을 하여 전사를 유도한다. NF-κB의 전사 활성은 TNF-α, IL-6, IL-8 등의 유전자 발현을 유도함으로써 염증 반응에 중요한 역할을 한다<sup>38,39)</sup>. NF-κB p65의 발현에서는 CSBHT이 대조군에서 비하여 발현을 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 7).

CSBHT이 비만세포에서 전사인자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot 분석을 한 결과 GATA-1과 GATA-2의 발현은 CSBHT의 농도에 따라 억제되었다 (Fig. 4-1 & 4-2).

IgE 항체의 생성 정도를 결정하는 데는 항원의 성상, 항원에의 반복 노출, T 림프구, 사이토카인, FcεR II/CD23 및 IgE 항체에 대한 자가항체 등이 관여한다고 알려져 있다. IgE를 발현시키는 B 림프구의 분화는 세 종류의 신호에 의한다. 첫째로 B 세포의 항원 수용체를 통하여 이루어지는데 이는 항원 특이적 반응을 결정하는데 중추적인 역할을 한다. 둘째로 Th2 세포에서 유래된 IL-4와 IL-13 같은 사이토카인에 의하여 제공되며, 셋째로 B 세포와 T 세포의 interaction에 의하여 제공된다<sup>40)</sup>.

CSBHT의 경구투여가 OVA/alum 감작 생쥐모델에서 IgE 생성을 억제하는지를 살펴본 결과 OVA/alum 감작을 2주 한 생쥐와 14주 한 생쥐에서 OVA-specific IgE 수준은 모두 감소하였으나 14주 감작한 생쥐의 IgE 수준이 보다 더 유의성 있는 수준으로 감소하였다 (Fig. 8).

OVA/alum을 복강주사하고 CSBHT을 경구 섭취시킨 생쥐에서 비장을 적출하여 OVA로 재자극하고 배양한 후 배양 상층액에서 IL-4와 IL-13 생성량을 측정된 결과 실험군에서 대조군보다 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 9).

이상의 결과로 미루어 보아 清心補血湯은 알레르기 염증 반응 시 Th2 세포가 분비하는 IL-4와 IL-13의 생성을 억제하였다. 조절 기전을 살펴보면 비만세포의 전사인자 중 c-Jun을 제외한 GATA-1, GATA-2, NFAT-1, NFAT-2, c-Fos 및 NF-κB p65를 억제함으로써 IL-4와 IL-13 프로모터의 활성을 억제하여 Th2 사이토카인의 발현을 억제하는 것으로 생각된다. 이로써 清心補血湯은 임상에서 알레르기 피부염 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단되며 향후 추가적으로 연구가 필요한 것으로 사료된다.

## V. Conclusion

清心補血湯이 RBL-2H3 비만세포에서 Th2 사이토카인과 전사 인자의 발현, 그리고 OVA/alum 감작 생쥐에서 OVA-specific IgE와 Th2 사이토카인의 억제에 미치는 영향을 실험적으로 규명하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### I. RBL-2H3 비만세포에서의 항알레르기 효과

1. 清心補血湯은 생쥐 비만세포주의 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
2. 清心補血湯은 IL-4와 IL-13 mRNA 유전자 발현을 억제하였다.
3. 清心補血湯은 IL-4와 IL-13 단백질 생성을 억제하였다.
4. 清心補血湯은 GATA-1 및 GATA-2 단백질 발현을 억제하였다.
5. 清心補血湯은 NFAT-1 및 NFAT-2 단백질 발현을 억제하였다.
6. 清心補血湯은 c-Fos 단백질 발현을 억제하였다.
7. 清心補血湯은 NF-κB p65 단백질 발현을 억제하였다.

### II. OVA/alum 감작 생쥐에서의 항알레르기 효과

1. 清心補血湯은 혈청 중 OVA-specific IgE 생성을

억제하였다.

2. 清心補血湯은 비장세포 배양 상층액에서 IL-4와 IL-13 생성을 억제하였다.

### References

1. Kim YS, Kim YK. Reviews: Prejudice of Allergy, Korean J Asthma Allergy Clin Immunol. 2010;30(1):1-4.
2. Jee HM, Kim KW, Kim CS, Sohn MH, Shin DC, Kim KE. Prevalence of Asthma, Rhinitis and Eczema in Korean Children Using the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Questionnaires. *Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)*. 2009;19(2):165-72.
3. The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. *Asthma and Allergic disease*. Seoul: Koonja Pub, 2002:357-409.
4. Leung DYM. Atopic Dermatitis: New Insights and Opportunities for Therapeutic Intervention, *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:860-76.
5. Sung SH, Lee SK, Kang OH, Kwon DY, Chong MS, Lee KN. Anti-allergic Activity of Dojuk-San Ethanol Extract. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2011;25(3):438-44.
6. Son MJ, Han JK, Kim YH. Suppressive Effect of *SaengRyoSaMulTang* on Activated RBL-2H3 Mast Cells. *J Korean Orient Pediatr*. 2011;25(1):28-39.
7. Heo J. *Donguibogam*. Kyungnam: Donguibogam Publishing Co, 2005:92-4.
8. Park SK, Ryu BH, Park DW, Ryu KW. Experimental Studies on the Anti-tumor and the Immunomodulatory Effects of *Chungshimbobyeltang*, *J Korean Orient Intern Med*. 1998;19(1):221-46.
9. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkira Y, Ueno K. A Highly Water-soluble Disulfonated Tetrazolium Salt as a Chromogenic Indicator for HAND as well as Cell Viability. *Talanta*. 1997;44(7):1299-305.
10. Niwa S, Urtz N, Baumruker T, Billich A, Bornancin F. Ovalbumin-induced Plasma Interleukin-4 Levels are Reduced in Ceramide Kinase-deficient DO11.10 RAG1-/- Mice. *Lipids Health Dis*. 2010;9(1):1-6.
11. 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.
12. 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, 2010:721-37.
13. An SK, Park BD, Won JH, Sung YO, Chun SH. Atopic dermatitis. Seoul: Pacific Pub, 2007:407-15.
14. Matsuda S, Koyasu S. Mechanism of Action of Cyclosporin. *Immunopharmacol*. 2000;47:119-25.
15. Kim TY. Cyclosporin in the Treatment of Psoriasis. *Update Dermatol*. 2003;1(4):32-5.
16. Frandin MS, Ellis CN, Boorhees JJ. Management of Patients and Side Effects during Cyclosporine Therapy for Cutaneous Disorder. *J Am Acad Dermatol*. 1990;23:1265-75.
17. Chao YF. *Zhu Bing Yuan Hou Lun Jiao Shi*. Beijing: Ren Min Wei Sheng Publishing Co, 1983;18-20, 170-2.
18. Hong WS. *Jeonggyo Huang Di Nei Jing Su Wen*. Seoul: Dong Yang Ui Hak Yeon Gu Won Press, 1985:124-39.
19. Mun JJ, Ahn GS, Choi SH. *Donguibyeongrihak*. Seoul: Komoonsa. 1990:78-90.
20. Ginsburg IH, Prystowsky JH, Komfeld DS, Wolland H. Role of Emotional Factors in Adults with Atopic Dermatitis. *Int J Dermatol*. 1993;32:656-60.
21. Jung JY, Jung HA. Effect of *Phellinus Igniarius* Quel Extract on the Anti-inflammatory, Anti allergy, Anti-oxidant, Anti-wrinkle Reaction, *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2010;23(3):42-65.
22. Kim HB, Kang KH, Hwang WD, Lyu SA, Lee SY. The Effects of *Puerariae Radix* on Allergic Inflammation. *J Korean Orient Pediatr*. 2009;23(3):217-31.
23. 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, 1999:283, 284, 287, 288.
24. *Hanuigwadaehak Bonchohak Pyeonchanwiwonhoe*. *Bonchohak*. Seoul: Yeong Rim Sa Publishing Co, 2004:209, 348, 392, 532, 575, 586, 632, 647, 685.
25. Ko CN, Kim YS, Song MD, Cho KH, Moon SK, Bae HS. Effects of the *Chungshimbobyel-tang* on the Gene

- Expression in Atherosclerotic Lesions. *J Kyunghee Orient Med Col.* 1999;22(1):155-69.
26. Akdis CA, Akdis M, Simon D, Dibbert B, Weber M, Gratzl S, Kreyden O, Disch R, Wüthrich B, Blaser K, Simon H-U. Role of T Cells and Cytokines in the Intrinsic Form of Atopic Dermatitis. *Curr Probl Dermatol.* 1999; 28:37-44.
27. Hong CE. *Pediatrics.* Seoul: Daehantextbook Pub, 2007:1104-27.
28. Ivan R, Jonathan B, David M. *Immunology.* Seoul: Komoonsa, 1994:279-300.
29. Park YM. Advances in the Pathophysiology of Atopic Dermatitis. *J Pediatr Allergy Respir Dis.* 2006;16(3): 189-96.
30. Chrousos GP. Stress, Chronic Inflammation, and Emotional and Physical Well-being: Concurrent Effects and Chronic Sequelae. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(5):275-91.
31. Kim JW. Allergy and Immunology in Atopic Dermatitis. *Korean J Dermatol.* 2003;41(6):687-9.
32. Weiss DL, Hural J, Tara D, Timmerman LA, Henkel G, Brown MA. Nuclear Factor of Activated T cell is Associated with a Mast Cell Interleukin 4 Transcription Complex. *Mol Cell Biol.* 1996;16(1):228-35.
33. Masuda A, Yoshikai Y, Kume H, Matsuguchi T. The Interaction between GATA Proteins and Activator Protein-1 Promotes the Transcription of IL-13 in Mast Cells. *J Immunol.* 2004;73(9):5564-73.
34. Monticelli S, Solymer DC, Rao A. Role of NFAT Proteins in IL-13 Gene Transcription in Mast Cells. *J Biol Chem.* 2004;279(35):36210-8.
35. Oh JW. Systemic Treatment of Cyclosporine in Severe Atopic Dermatitis. *J Pediatr Allergy Respir Dis.* 2004;14(1):28-9.
36. Park JC. Transcription Factor NFAT: The Regulation in Immune Response. *KSBMB News.* 2000;20(2):1-7.
37. Rooney JW, Hoey T, Glimcher LH. Coordinate and Cooperative Roles for NFAT and AP-1 in the Regulation of the Murine IL-4 Gene. *Immun.* 1995;2:473-83.
38. Park JH. The Effect of Moutan Cortex on Pro-inflammatory Cytokines through NF- $\kappa$ B & MAPKs Pathway in HMC-1. *Grad School Kyungwon Univ.* 2008.
39. Lee KY. Glucocorticoid Receptor & NF- $\kappa$ B Pathway. *J Asthma Allergy Clin Immunol.* 2000;20(5):675-83.
40. Kim WG, Kim DH, Park YC. Effects of Kamiyukgunjatang on Anti-CD40 and Recombinant Interleukin-4 Induced Cytokine Production and Immunoglobulin E in Highly Purified Mouse B Cells. *Korean J Orient Med Pathol.* 2003;17(4):1065-74.