

난알부민 유도 알레르기 비염 마우스에 대한 소청룡탕(小青龍湯)의 효능 실험연구[†]

김일환 · 구진모 · 허한솔 · 나창혁 · 장보형 · 신용철 · 고성규*

경희대학교 한의과대학 예방의학교실

Anti-allergic effects of So-Cheong-Ryong-Tang in ovalbumin-induced allergic rhinitis model

Ilhwan Kim, Jinmo Ku, Hansol Hur, Changhyeok Na,

Bo-Hyoung Jang, Yong-Cheol Shin & Seong-Gyu Ko*

Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Kyunghee University

Abstract

Objective : Allergic rhinitis (AR) is an allergic inflammation of the nasal airways. Socheongryong-Tang traditionally has been used in Korea for treatment of allergy diseases. In the present study, we investigated whether SCRT suppresses the progression of AR in vivo and in vitro.

Method : In this study, we investigated the effect of oral administration of SCRT on the Ovalbumin(OVA)-induced allergic rhinitis mouse models. Additionally, to find a possible explanation for the anti-inflammation effects of SCRT, we evaluated the inflammatory cytokine levels in LPS-stimulated mouse inflammation cell (RAW264,7) and mouse splenocyte.

Results : The finding of this study demonstrated that SCRT reduced mast cells and inflammation cells infiltration in OVA-induced nasal cavity. Additionally, SCRT inhibited the production of inflammatory cytokines in splenocyte. However SCRT don't inhibited the production of inflammatory cytokines in RAW264,7 cells.

Conclusion : Taken together, our results showed that oral administration of SCRT beneficial effects in allergic rhinitis, suggesting that SCRT might be a useful candidate for the treatment of allergic rhinitis.

Key words : allergic rhinitis, inflammation, ovalbumin, mast cells, RAW264,7 cells, Socheongryong-Tang

• 접수 : 2014년 11월 19일 • 수정접수 : 2014년 12월 17일 • 채택 : 2014년 12월 22일

*교신저자 : 고성규, 130-872 서울특별시 동대문구 회기동 1번지, 경희대학교 한의과대학 예방의학교실

전화 : 02-961-0329, 팩스 : 02-966-1165, 전자우편 : epiko@khu.ac.kr

† 이 연구는 보건복지부의 Traditional Korean Medicine R&D Project (No. HI12C1889) 지원에 의해 이루어졌습니다.

I. 서론

최근 사회가 점차 산업화 되어가면서 환경오염, 대기 오염, 생활환경의 변화로 인하여 알레르기 관련 질환의 발병이 증가하고 있다. 특히 알레르기 비염은 전 세계의 인구 40%가 고통 받고 있으며 연간 약 2조원 넘는 수준의 사회경제적 비용이 들어가기에 이르렀다.¹⁻³⁾

알레르기란 항원으로부터 반복적인 노출에 의한 변화 또는 이상반응이고 넓은 의미에서 자극적이거나 해로운 작용을 일으키는 면역반응으로 알려져 있다.⁴⁾

알레르기 비염은 코 안에서 발생하는 만성염증 질환이며 알레르기 비염의 증상으로는 재채기, 비루, 가려움 코막힘이 주 증상이며 이 외에도 두통, 권태감 및 하안검 착색 등의 증상을 동반할 수 있다. 이러한 증상은 오전 중에 심하며 목이 피곤하거나 기후차가 크고 자극적인 냄새를 맡았을 때 발생한다. 알레르기 비염이 장기화되면 만성 비염, 부비동염과 같은 만성 질환으로 발전할 수 있다.^{5,6)}

현재 알레르기 비염의 치료는 근본적인 원인을 없애기보다는 증상을 완화시키는 치료만이 이루어지고 있으며 부작용도 발생하고 있는 실정이다. 그러므로 안전하며 효과적인 치료제 개발이 필요하며 알레르기 질환 관련 천연약물 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.⁷⁻⁸⁾

소청룡탕(小青龍湯)은 총 8가지 식물로 만들어졌으며 한국, 일본, 중국에서 수백년전부터 사용된 호흡기 질환 치료제로서 감기로 인한 기침과 백일해, 기관지염, 알레르기 비염, 천식 등에 주로 사용되었다. 최근 연구결과 소청룡탕은 비만세포의 탈과립과 호산구와 호염기구를 억제하는 것으로 알려졌다.⁹⁾ 또한 소청룡탕은 IgE와 여러 cytokine의 발현을 감소시키고 염증세포가 침윤하는 것을 막아 알레르기성 질환 치료에 도움이 되며 T세포 면역반응에 직접적으로 영향을 준다는 보고가 있다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 알레르기를 유도하여 기관지염증이 일어난 쥐와 기니피그에 소청룡탕이 효과가 있다는 보고도 있지만 아직까지 소청룡탕의 정확한 기전은 밝혀지지 않았다.¹⁵⁻¹⁸⁾

이러한 소청룡탕의 효능과 특성 및 연구 보고로 미루어 보아 항원항체의 면역반응에 의하여 유발되는 알레르기 질환에 대한 효능 검증을 위해 본 실험에서는 난알부민 유도 알레르기 비염 동물모델을 통하여 알레

르기 반응에 대한 소청룡탕의 효능을 실험적으로 관찰하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 소청룡탕(小青龍湯)의 구성약재들은 한풍제약(Korea)으로부터 제공받았다. 한약재 원료시험 규정을 준수하였고, 소청룡탕 분말을 3차 증류수에 20mg/ml로 녹여 stock으로 사용하였다. 소청룡탕 구성약재들로는 원방과 같이 세신, 계지, 마황, 오미자, 감초, 반하, 작약, 건장이다.

2) 동물

본 실험에서 사용한 5주령의 BALB/c 수컷 마우스는 오리엔트(Korea)에서 공급 받았으며, 1주일간 동물실 환경에 적응과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 동물실의 사육환경은 온도 24 ± 2℃, 습도40~60%, 주야 12시간 교대로 150~300Lux의 환경에서 마우스용 케이지에 5마리씩 수용하여 사육하였으며, 멸균 증류수와 고형 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며 주 2회 몸무게와 식이를 측정하였다.

3) 시약 및 항체

본 실험에 사용된 시약 중 알레르기 비염을 유도하기 위한 난알부민은 sigma(USA)제품을 사용하였으며, 조직염색을 위한 toluidine blue, hematoxylin, eosin 모두 sigma(USA) 제품을 사용하였다.

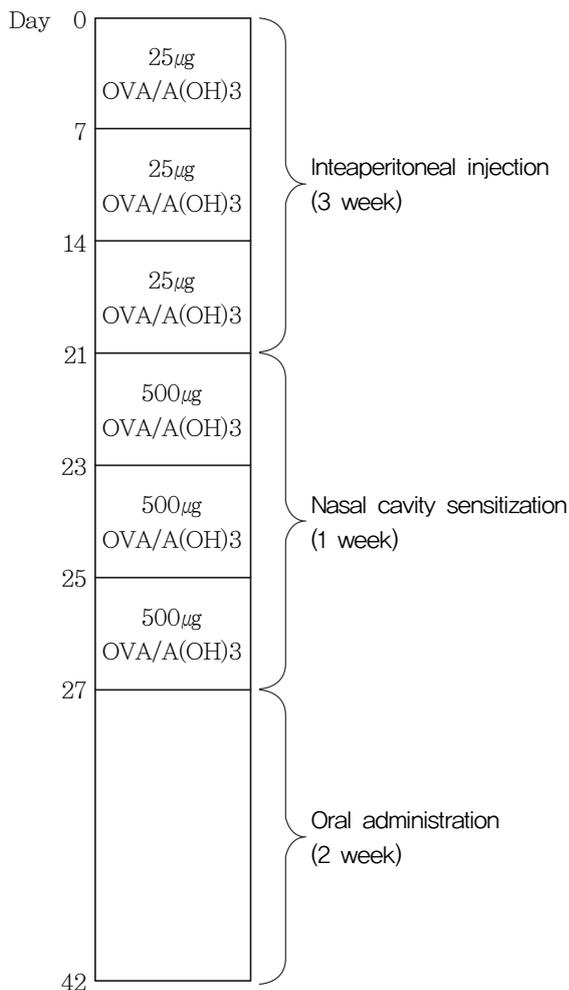
2. 방법

1) 난알부민 유도 알레르기 비염 동물모델 제작

알레르기 비염을 유도하기 위하여 일주일 적응시킨 5주령 BALB/C 수컷마우스에 주 2회씩 3주 동안 난알부민 25µg을 동일하게 복강주사 한 뒤, 1주 동안 주 2

회 양쪽 비강 내 직접 난알부민 500 μ g을 분사해 주어 알레르기성 비염을 유도하였다. 실험군은 3그룹으로 9주령부터 소청룡탕을 78mg/kg, 156mg/kg, 312mg/kg의 농도로 2주 동안 경구투여 하였으며, 대조군은 증류수를 실험군과 동일한 양으로 경구 투여 하였다. 실험이 끝난 후 비강 내 조직을 적출하여 조직병리학적 평가를 위해 조직절편을 제작하였다(Table 1.).

Table 1. General schematic diagram of studies.



2) 비강조직 H&E 염색

적출한 비강조직을 saline으로 수세한 후 파라핀을 이용하여 조직절편을 만들었으며, xylene으로 10~20분간 파라핀을 제거한 후 비강조직의 구조적 변화를 관찰하기 위하여 100%, 95%, 80%, 75% 알코올 순서대로 함수시킨 후 hematoxylin과 eosin으로 염색하였

다. H&E 염색된 비강 조직 슬라이드에서 비강 상피세포층의 손상 정도와 주위 염증세포 침윤 정도 등을 광학현미경(Olympus)으로 관찰하였고, 염증세포의 침윤 정도를 1000 \times 배율하의 5field/N(한 마리당 5부위의 사진)의 High power fields(HPFs)를 계수하여 cells/HPFs로 나타내었다.

3) 비강조직 비만세포 염색

적출한 비강조직을 saline으로 수세한 후 파라핀을 이용하여 조직절편을 만들었으며, xylene으로 10~20분간 파라핀을 제거한 후 비만세포를 염색하는 toluidine blue 용액에 염색을 수행하였다. 염색한 조직의 염증세포 침윤 및 비만세포의 증감 정도를 광학현미경의 400 \times 배율로 관찰하였다. 비만세포 및 염증세포의 침윤 정도는 1000 \times 배율하의 5field/N(한 마리당 5부위의 사진)의 High power fields(HPFs)를 계수하여 cells/HPFs로 나타내었다.

4) Splenocyte

마우스로부터 비장을 적출한 뒤 RPMI 1640 (media condition 쓰기) 배양액에 200 mesh stainless steel sieve(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 비장세포를 분리하였다. 분리된 비장세포를 배양액으로 2번 세척한 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하였고 이것을 red blood cell lysis buffer(sigma)를 이용하여 적혈구를 제거한 뒤 다시 배양액에 분산시켰다.

5) Cell viability assay(MTS assay)

세포 생존율 측정을 위하여 96well plate의 각 well에 1 \times 10⁴개의 RAW264.7 세포를 분주한 뒤 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 그 후 물에 녹인 소청룡탕을 5-1000 μ g/ml의 농도로 처리한 후, 24시간 뒤 cell viability assay를 수행하였다. EZ-CyTox (DOGEN, Korea)을 각 well당 10 μ l씩 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 ELISA reader기를 이용하여 450nm의 filter에서 값을 측정한다.

6) 세포에서의 NO 발현 측정

그리스 시약(griess reagent : 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하기 위해 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 NO의 생성정도를 비교하였다. 이를 위해 다음과 같이 실험하였다. LPS 1 μ g/ml를 단독 혹은 다양한 농도의 소청룽탕과 함께 배지에 담아 각 well에 처리하고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 수 세포배양 상등액 100 μ l를 채취하여 여기에 그리스 시약 100 μ l을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정, NO값을 비교하였다.

7) 세포에서의 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 관찰

RAW264.7 내 사이토카인 mRNA 변화를 관찰하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 6well plate에 1 \times 10⁶/ml 갯수로 plating 한 후 다음날 25-200 μ g/ml의 농도로 소청룽탕을 처리한 후 LPS(1 μ g/ml)로 24시간동안 자극한다. 세포배양액과 세포를 원심분리기로 분리한 후 세포 배양액만 제거하고 남은 세포는 RNA분리 kit를 사용하여 RNA를 추출한다. Nanodrop으로 RNA농도 정량 후 1 μ g의 RNA로 cDNA를 합성한다. 합성된 cDNA의 1 μ l와 mouse IL-6(Forward : 5' - GAT GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC - 3', Reverse : 5' - GGT CCT TAG CCA CTC CTT CTG TG - 3') primer와 함께 PCR을 수행하였다.

8) 세포배양액 내의 염증성 사이토카인의 분비량 분석

세포 배양액으로부터 분비되는 다양한 염증 사이토카인 변화를 확인하기 위해 RAW264.7 cell과 splenocyte에 다양한 농도의 소청룽탕을 처리하여 확인하였다. Raw264.7 cell과 splenocyte를 6well plate에 2 \times 10⁶/ml로 깔아준 후 다음날 소청룽탕을 25-200 μ g/ml의 농도로 1시간 동안 처리한 후 Raw264.7 cell

자극제인 LPS(1 μ g/ml)와 함께 24시간 동안 incubation한다. 24시간 incubation 후 세포와 세포배양액을 원심분리기를 이용해 분리 한 후, 세포는 제거하고 세포 배양액만 남긴다. 세포 배양액을 샘플로 사용하였으며, ELISA assay 방법은 ELISA plate에 IL-4, IL-6, TSLP를 잡을 수 있는 capture antibody를 coating buffer와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 보관한다. 다음날 5% FBS로 상온에서 1시간동안 blocking과정을 거친 후, 샘플을 100 μ l의 부피로 2시간 동안 실온에 반응시킨다. 이때 IL-4, IL-6의 농도를 확인할 수 있는 IL-4, IL-6, TSLP recombinant 단백질도 함께 반응시킨다. 그 후 IL-4, IL-6, TSLP를 인지하는 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 반응 후 substrate인 100 μ l의 TMB substrate solution(BD bioscience, USA)을 넣어준 다음 어두운 곳에서 반응시키면서 발색을 확인하고 적당히 발색되었을 때에 stop solution인 1M의 인산 또는 2N의 황산을 50 μ l씩 넣어 반응을 중지시킨다. 실험결과는 ELISA reader기의 450nm의 filter에서 값을 측정한다.

9) 통계학적 검증

모든 실험결과와 분석은 각 그룹의 측정값을 Mean (평균) \pm S.E(표준오차)로 요약하였으며, student t-test method로 분석하여 p-value가 0.05이하일 경우 유의성을 인정하였다.

III. 연구결과

1. 소청룽탕 경구투여기간 동안의 체중과 식이 변화 관찰

알레르기성 비염 유도 후 정상군과 OVA군은 생수를 200 μ l 양으로 경구투여 하였으며, 소청룽탕을 매일 2주간 일정한 시각에 경구투여 하였다. 소청룽탕 투여기간인 2주 동안 마우스의 체중(Fig 1A)과 식이(Fig 1B)의 변화를 관찰하였다. 체중의 변화를 확인하여 보면, 비염을 유도하지 않은 정상군의 체중이 다른 군들에 비해 1~2g 정도 높게 나타나며 비염을 유도한 군들의 체중은 비슷하다. 이는 비염과 비염의 유도 기간 중에 받은 스트레스에 의한 것으로 여겨진다. 2주간 소청룽탕

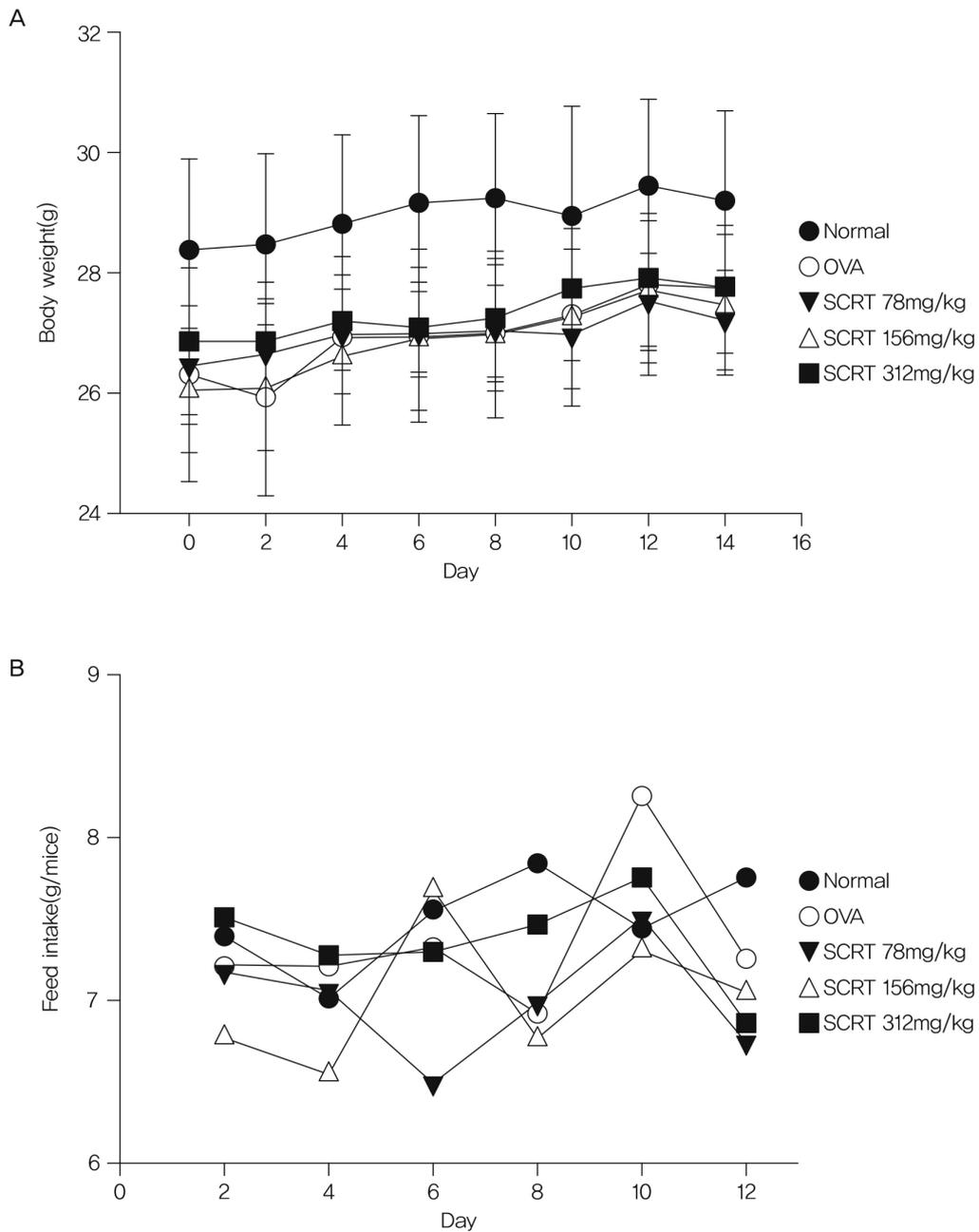


Figure 1. Changes in body weight(A) and food intake(B) during treatments with SCRT in OVA-induced AR mice model. Values are expressed as mean \pm SEM (n=8).

을 경구로 투여한 결과, 체중과 식이의 감소는 나타나지 않았으므로 소청룡탕에 의한 마우스의 체중과 식이의 변화에 별다른 부작용은 없는 것으로 여겨진다.

2. 비강조직 내 침윤된 염증성 세포 감소

조직 내에 침윤된 염증세포의 감소를 확인하기 위하여 조직염색법을 이용하여 확인하였다. 동물실험 종료

후 마우스의 비강조직을 적출하여 포르말린으로 고정 후 조직 내의 칼슘염을 제거하였다. 그 후 파라핀으로 블록으로 제조하고 절편하여 슬라이드를 만들었다. 슬라이드를 H&E로 염색하여 소청룡탕의 효과를 확인하였다.

우선 H&E 염색을 통하여 비강조직 내에 침윤된 염증성 세포를 확인하였다(Fig 2A). 오발부민으로 알레르기성 비염을 유도한 군에서 정상군에 비해 침윤된 세

포의 수가 많이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 가장 낮은 농도인 78 mg/kg 의 소청룡탕을 투여한 군에서는 오발부민 군과 침윤된 세포의 수가 크게 차이가 나지

않으나, 그보다 높은 농도인 156, 312 mg/kg 의 농도를 투여한 군은 침윤된 세포의 수가 확연하게 감소하였으며, 이 결과를 그래프로 나타내었다(Fig 2B).

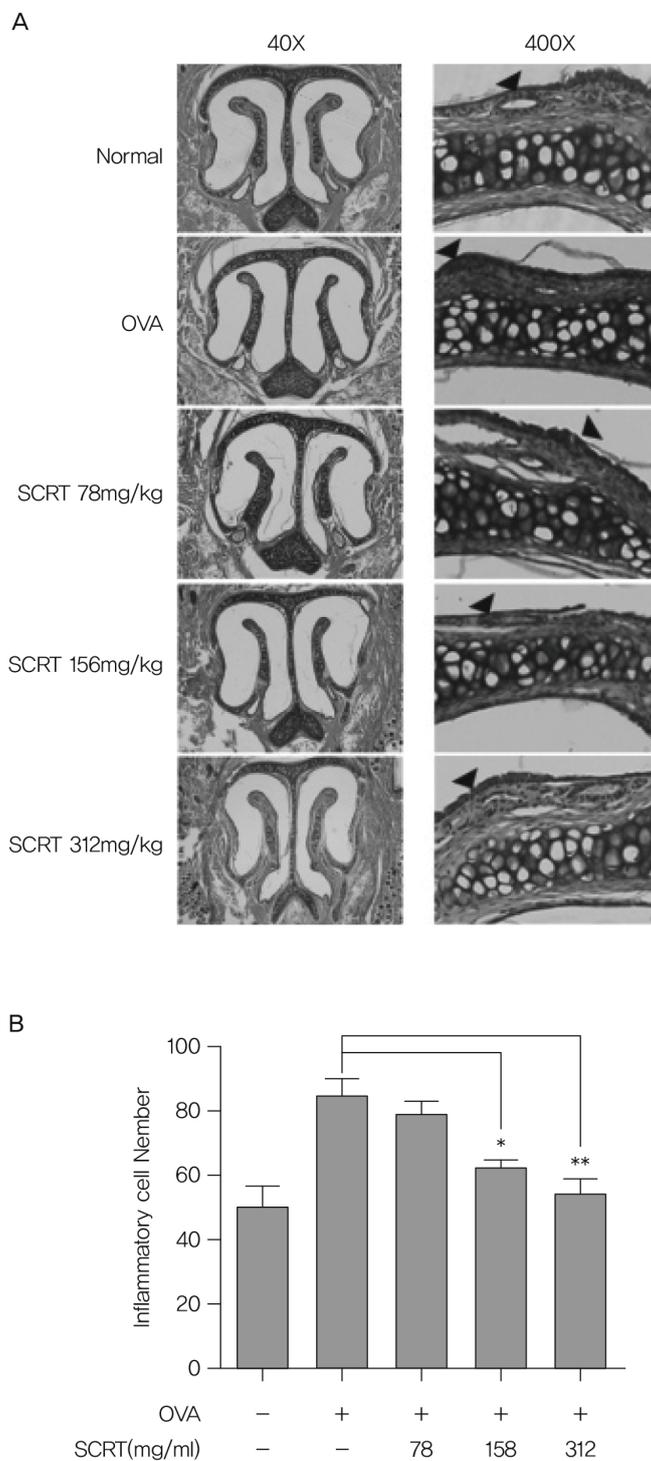


Figure 2. Effect of SCRT on inflammatory cell infiltration in the AR nasal mucosa tissue.

The nasal mucosa sections were stained with hematoxylin and eosin(A).

Data are presented as mean ± SEM *P < 0,05, *.*.P < 0,01, and *.*.*.P < 0,001 (B).

3. 비강조직 내 침윤된 비만세포 감소

위에서 조직 내에 침윤된 염증세포의 감소를 확인하였다. 그러므로 조직 내에 침윤된 비만세포의 감소를 확인하기 위하여 조직염색법을 이용하여 확인하였다. 동물실험 종료 후 마우스의 비강조직을 적출하여 포르말린으로 고정 후 조직 내의 칼슘염을 제거하였다. 그 후 파라핀으로 블록으로 제조하고 절편하여 슬라이드를 만들었다. 슬라이드를 toluidine blue로 염색하여 소청룡탕의 효과를 확인하였다. 알레르기성 반응과 관련이 깊은 비만세포를 toluidine blue로 염색하여 비강조직 내에 침윤된 비만세포를 확인하였다(Fig 3A). 비염을 유도한 군에서 다른 군에 비해 비만세포가 많이 침윤되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 비만세포의 침윤은 소청룡탕 78 mg/kg 의 낮은 농도에서부터 효과가 있는 것을 확인할 수 있으며 그래프로 표현하였다(Fig 3B).

4. 소청룡탕이 RAW264.7 세포생존율에 미치는 영향

소청룡탕이 염증세포인 RAW264.7의 세포 생존율에

미치는 영향을 주는지 알아보기 위해 MTS 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 소청룡탕을 5, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 측정된 500 μ g/ml까지는 세포독성이 거의 나타나지 않았다. 그러나 1000 μ g/ml에서는 독성을 나타내어 RAW264.7 cell에서는 소청룡탕 200 μ g/ml 농도 이하로 실험하였다(Fig 5).

5. LPS처리된 RAW264.7 cells에서의 소청룡탕의 효과

동물실험을 통해 소청룡탕이 염증세포에 효과가 나타나는 것을 확인하였으며 RAW264.7 cell에서 소청룡탕에 의한 cell viability를 살펴본 결과 소청룡탕 처리 시 농도 500 μ g/ml 까지 cell viability이 크게 감소하지 않았다. 그러므로 소청룡탕 농도 500 μ g/ml이하로 처리하여 RAW264.7 cell에서 확인하였다. RAW264.7 cell에서 NO 생성에 대한 소청룡탕의 효과를 알아보기 위해 Griess assay 방법을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO²⁻의 형태로 측정하였다. 그 결과 LPS를 처리한 군에서는 NO 생성이 증가였지만 소청룡탕 처리에 의해 NO level의 감소 효과는 나타나지 않았다(Fig 5A). 소청룡탕을 농도별로 처리 한 RAW264.7

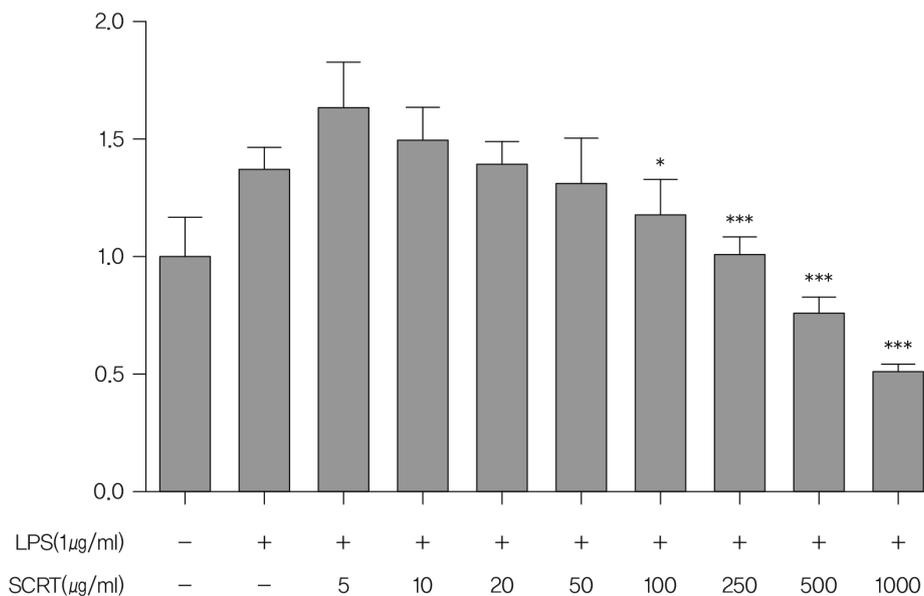


Figure 4. Effect of SCRT on LPS stimulated on RAW264.7 cells viability.

RAW264.7 cells(1x10⁴cell/ml) were pretreated with various concentrations of SCRT for 1h and then incubated for 24h with LPS (1 μ g/ml). After treatment, cell viability was measured using MTS. Data are presented as mean \pm SEM *.P < 0.05, *.*.P < 0.01, and *.*.*.P < 0.001.

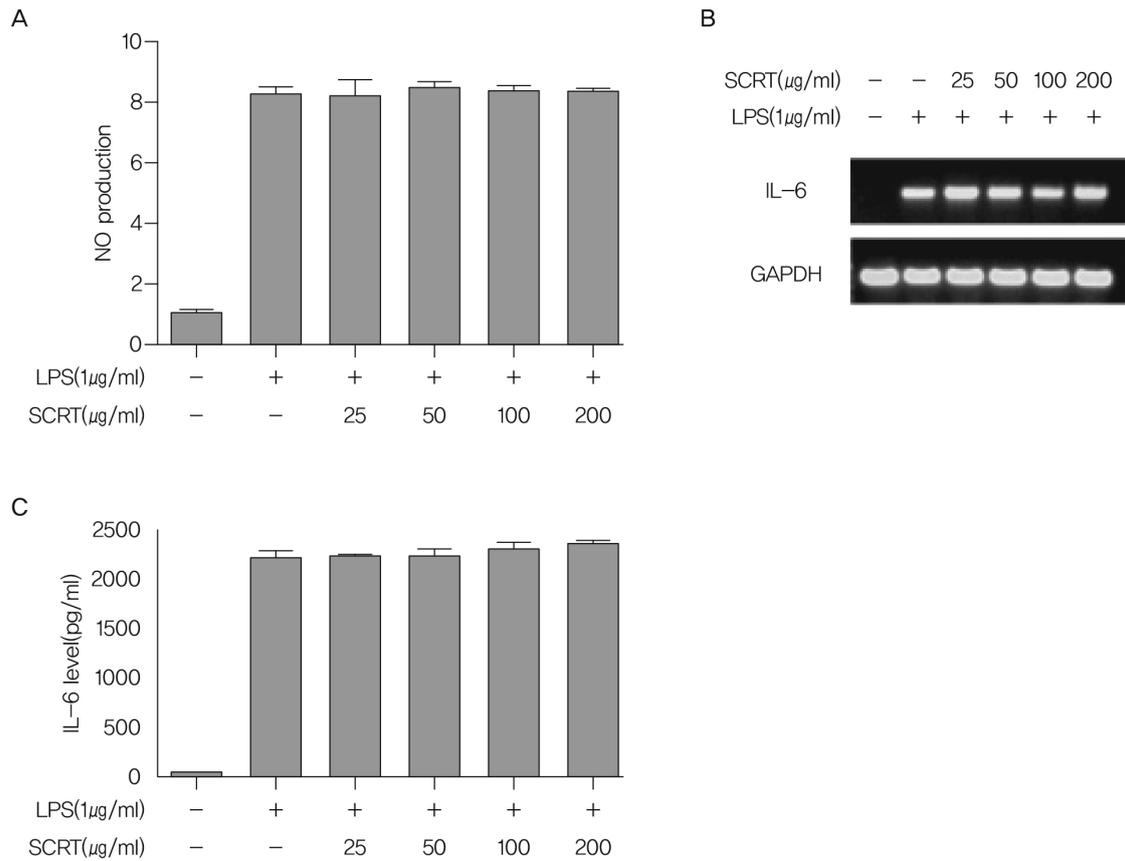


Figure 5. The effects of SCRT in LPS stimulated RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells(1×10^6 cell/ml) were pretreated with various concentrations of SCRT for 1h and then incubated for 24h with LPS (1 μ M). The levels of NO product (A). The IL-6 mRNA levels were measured by RT-PCR analysis (B). The IL-6 (C) were measured from cell supernatant using ELISA.

cell로부터 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 cDNA로 합성한 후 IL-6의 primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다. LPS를 처리한 군에서는 IL-6가 생성되었지만 소청룡탕 처리에 의해 IL-6의 mRNA level 감소 효과는 나타나지 않았다(Fig 5B). ELISA 측정 결과 IL-6(Fig 5C)는 RAW264.7 cell에서 소청룡탕에 의한 변화가 나타나지 않았다.

6. 소청룡탕이 splenocyte의 생존율에 미치는 영향

소청룡탕이 마우스 splenocyte에 생존율에 미치는 영향을 주는지 알아보기 위해 MTS 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 소청룡탕을 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 측정된 2000 μ g/ml까지는 세포독성이 거의 나타나지

않았다. 마우스 splenocyte에서는 소청룡탕이 2000 μ g/ml 농도까지 독성이 나타나지 않으므로 소청룡탕 농도 2000 μ g/ml까지 실험하였다(Fig 6).

7. Splenocyte 의 사이토카인 생성에 미치는 영향

비염 유도 마우스에서 소청룡탕에 의한 염증반응 감소를 확인하였으므로, 그 기전을 확인하기 위하여 우선 마우스에서 분리한 비장세포를 이용하여 실험을 진행하였다. 소청룡탕이 비장세포에 효과가 있는지를 확인하기 위하여 500, 1000, 2000 μ g/mL의 농도로 소청룡탕을 처리하였다. 그 효과를 확인하기 위하여 비장세포를 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화하여 TSLP, IL-6의 생성을 ELISA로 확인하였다. IL-6는 비장세포에서 소청룡탕의 농도의존적으로 감소하며, 통계적

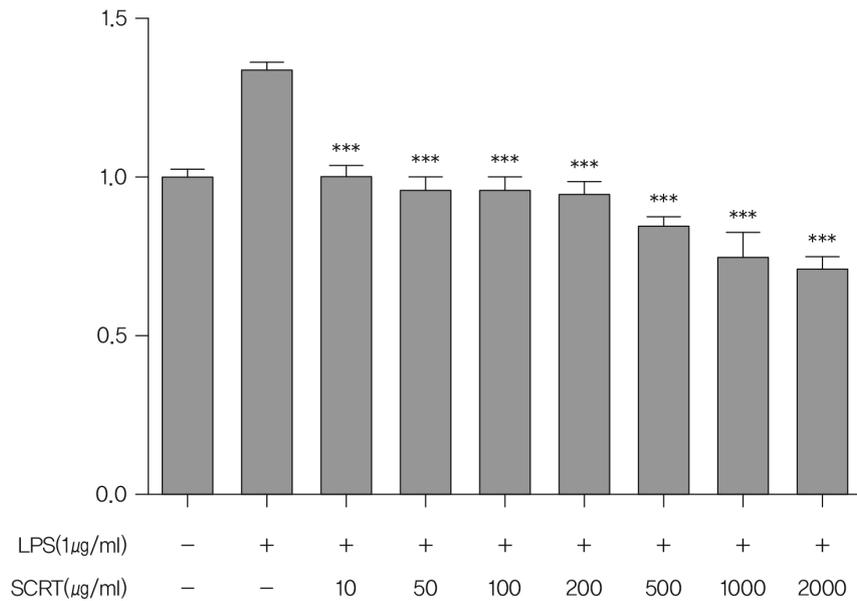


Figure 6. Effect of SCRT on mouse splenocyte viability. Splenocyte (2×10^4 cell/ml) were pretreated with various concentrations of SCRT for 1h and then incubated for 24h. After treatment, cell viability was measured using MTS. Data are presented as mean \pm SEM * $.P < 0.05$, ** $.P < 0.01$, and *** $.P < 0.001$.

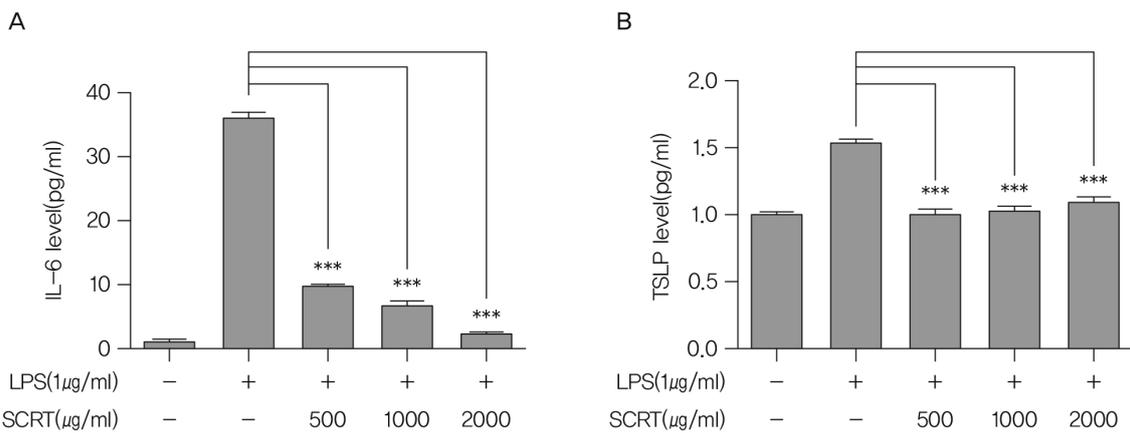


Figure 7. The effects of SCRT on the production inflammatory cytokine in LPS stimulated splenocyte. splenocyte were pre-treated with SCRT for 1h and then stimulated with LPS for 24h. The levels of IL-6 (A) and TSLP (B) were measured from cell supernatant using ELISA. Data are presented as mean \pm SEM * $.P < 0.05$, ** $.P < 0.01$, and *** $.P < 0.001$.

유의성을 보여주고 있다(Fig 7A). 소청룡탕의 처리 결과, 소청룡탕의 농도가 높아질수록 TSLP의 생성이 감소되며 모든 농도에서 통계적 유의성을 보여주고 normal 그룹과 거의 같은 농도를 보이고 있다(Fig 7B).

IV. 고찰

알레르기는 외부에서 침입한 이 물질에 대해 체내의

면역계가 지나치게 이상반응을 보이는 현상이며 IgE를 자극하는 면역반응이다. 알레르기를 유발하는 원인으로 먼지, 꽃가루, 잔디, 애완동물의 비듬, 곰팡이 등이 있으며 알레르기 비염은 호염기구와 비만세포의 막 표면에 결합되어 있는 IgE항체가 항원과 결합하여 이들 세포는 histamine을 생산한다. 알레르기 비염 증상이 있으면 IgE항체와 IL-4, IL-5, IFN- γ 등의 cytokine 이 증가한다. 대표적인 질환으로 두드러기, 비염, 천식, 아토피 등이 있다.¹⁹⁻²⁰⁾ 이러한 면역학적인 과민반

은 세포나 조직에 염증을 일으키게 되고 이러한 면역 과민반응은 산업사회가 진행됨에 따라 알레르기 비염 과 같은 질환의 형태로 유병률이 증가하고 있다.

본 연구에서는 면역과민증으로 인한 알레르기 비염 을 완화 또는 개선할 수 있는 약물인 소청룡탕의 효능 을 OVA로 알레르기 비염이 유도된 마우스에 경구투여 하여 염증반응에 대한 억제 효능을 다양한 시험을 통해 확인하였다. 또한 소청룡탕이 마우스 염증세포인 RAW 264.7과 마우스 splenocyte에서의 효능을 알아보기 위하여 자극제인 LPS를 처리하고 소청룡탕도 함께 처 리하여 RAW264.7과 splenocyte에서의 변화를 살펴 보았다.

먼저 동물실험을 통해 OVA(ovalbumin)로 유도된 알레르기 비염 모델을 가지고 소청룡탕의 효능을 확인 하였다. 코 점막에서도 확인 할 수 있듯이 OVA에 의해 알레르기 비염이 적절하게 유도되었으며, 소청룡탕의 경구투여에 의해 비염이 완화되는 것을 확인할 수 있었 다. 코 점막 내 비만세포 및 염증세포는 역시 소청룡탕 경구투여에 의해 감소되었다. 비만세포의 표면에는 IgE 와 결합할 수 있는 수용체가 존재하고 있어 IgE가 결 합하면 비만세포는 활성화된다. 활성화 된 비만세포로 부터 다양한 염증물질은 알레르기 반응을 더욱더 촉진 시킨다. 그러므로 비만세포는 알레르기 질환에 중추적 인 역할을 하는 면역세포이다.²¹⁻²²⁾ 소청룡탕 경구투여 에 의해 OVA군에 비해 상대적으로 비만세포와 염증의 활성화를 줄여주었으며 코점막의 손상을 감소시킨 것 으로 생각된다. 동물실험을 통해 소청룡탕 경구투여가 코 점막에서의 염증세포 침윤정도를 감소시켰지만, 실 제 염증세포에 직접적으로 사이토카인 억제 및 그 메 커니즘은 알 수 없었다. 이에 본 연구에서는 마우스염 증세포주인 RAW264.7를 이용하여 소청룡탕이 직접적 으로 염증세포에 효과를 주는지와 마우스 splenocyte 에 소청룡탕을 처리 시 면역관련 cytokine에 변화가 있는지를 알아보기 위해 invitro실험을 진행하였다.

RAW264.7 cell에서 소청룡탕을 농도별로 처리 후 cell viability를 살펴보았다. 그 결과 RAW264.7 cell 에서는 소청룡탕 200 μ g/ml, splenocyte에서는 소청룡 탕 2000 μ g/ml까진 세포에 큰 영향을 끼치지 않아 최 고 농도로 설정하였다. IL-6는 일종의 염증 유도성 사 이토카인이며, 염증진행과정의 강력한 매개자이다.²³⁾ 그러기 때문에 염증반응에 중요한 cytokine IL-6와 IL-4를 ELISA 및 PCR를 통해 mRNA level를 살펴

보았다. 그 결과 RAW264.7 cell에서는 큰 변화가 나 타나지 않았으며 NO level 또한 변화가 나타나지 않았 다. 하지만 마우스 splenocyte에서는 ELISA를 통해 IL-6 와 TSLP가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

결국 소청룡탕은 동물실험을 통해 알레르기 비염에 효과가 나타난다는 사실을 알 수 있었고 마우스 sple- nocyte에서 또한 IL-6와 TSLP를 감소시키며 알레르 기 반응을 감소시켜 염증반응을 감소시킬 것으로 예상 된다. 하지만 마우스 염증세포인 RAW264.7 cell에서 는 효과가 나타나지 않았다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 소청룡탕은 마우스 염 증세포인 RAW264.7 cell에서는 효과가 나타나지 않았 지만 동물실험 결과 비만세포와 염증세포를 감소시켜 주는 효과가 나타났으며 splenocyte를 통해 염증매개 물질 사이토카인들의 억제하였으므로 염증세포에서의 신호전달과정에 대한 연구가 더욱더 필요하다고 생각 되며 추가연구를 통해 알레르기 비염의 치료할 수 있는 좋은 후보물질로 사용 될 수 있으리라 생각한다.

V. 결론

본 연구는 소청룡탕의 알레르기 비염 효능을 알아보 기 위해 OVA로 알레르기 비염을 유도한 BALB/c 마우 스 동물실험과 소청룡탕을 전처리한 후 LPS로 RAW 264.7 cell과 splenocyte에서 염증과 관련된 cytokine 생성에 어떠한 영향을 미치는지 RAW264.7 cell과 sple- nocyte에 처리하여 억제효과를 확인해 보았다. 먼저 조직분석을 통해 염증세포나 비만세포의 수가 정상군 에 비해 알레르기 비염 유도군에서 급격히 증가하는 것 으로 본 실험에서 사용한 알레르기 비염 유도 모델에 의해 알레르기 비염이 잘 유도되어진 것을 확인하였다. 알레르기 비염 동물모델에서 소청룡탕 경구투여 결과 코 점막에 육안상개선 효과 및 실제 비만세포 및 염증 세포 침윤 억제 효과를 보였으며 Splenocyte에서 소청 룡탕 처리시 IL-6, TSLP의 염증 사이토카인이 억제되 는 것을 확인하였다. RAW264.7 세포에서는 소청룡탕 처리시 NO level, IL-4, IL-6의 염증 사이토카인의 변화가 나타나지 않았다.

이에 본 실험에서 사용한 소청룡탕은 알레르기 비염 에 관련된 염증세포, 면역세포들의 수치를 감소시키는 효과가 있으므로 실제 알레르기 비염을 개선하는데 효

과가 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 보건복지부의 Traditional Korean Medicine R&D Project (No. HI12C1889) 지원을 받아 수행하였습니다.

참고문헌

1. Kim YB, Chae BY. A Clinical study on the Sneezing, Nasal discharge, Nasal obstruction, Kor J Ori Med Soc. 1993;14(2):162-167.
2. Kim HH. Allergic rhinitis, sinusitis and asthma: evidence for respiratory system integration, Kor J Pediatrics. 2007;50(4):335-339.
3. D.V. Wallace, M.S. Dykewicz, D.I. Bernstein, et al. The diagnosis and management of rhinitis: an updated practice parameter. J Allergy Clin Immunol. 2008;122(2):S1-84.
4. Korean Journal of Asthma, Allergy and Clinical Immunology. Asthma and Allergy disease. Seoul: koonja publisher. 2002;66:431-433.
5. Schwartz LB, Huff TF. Biology of mast cells, In: Middleton E, editor. Allergy: Principles and practice. 5th ed. Mosby: St. Louis. 1998; 261-276.
6. Spector SL. Overview of comorbid associations of allergic rhinitis, J Allergy Clin Immunol. 1997;99:S773-780.
7. Murakami Y. Clinical effect of hotyuekkito on symptoms due to renal ptosis and stress incontinence. Hinyokika Kyo. 1988;34:1841-1843
8. Ito H, Shimuta K. Studies on the antitumor activity of traditional Chinese medicine. Gan To Kagaku Ryoho. 1985;12:2145-2148
9. J.H. Mo, S.E. Lee, J.H. Wee, et al. Anti-allergic effects of So-Cheong-Ryong-Tang, a traditional Korean herbal medicine, in an allergic rhinitis mouse model. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013;270(3):923-930.
10. Ikeda Y, Kaneko A, Yamamoto M, Ishige A, Sasaki H. Possible involvement of suppression of Th2 differentiation in the anti-allergic effect of Sho-seiryu-to in mice. Jpn J Pharmacol. 2002;90:328-336.
11. Makino T, Sasaki SY, Ito Y, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicine : effects of Gyokuheifusan on murine antigen-specific antibody production. Biol Pharm Bull. 2005;28(1):110-113.
12. Ko E, Rho S, Lee EJ, Seo YH, Cho C, Lee Y, Min BI, Shin MK, Hong MC, Bae H. Traditional Korean medicine (SCRT) modulate Th1/Th2 specific cytokine production in mice CD4+ T cell, J Ethnopharmacol. 2004;92:121-128.
13. Ko E, Rho S, Cho C, Choi H, Ko S, Lee Y, Hong MC, Shin MK, Jung SG, Bae H. So-Cheong-Ryong-Tang, Traditional Korean Medicine, Suppresses Th2 Lineage Development. Biol Pharm Bull. 2004;27(5):739-743.
14. Nagai T, Arai Y, Emori M, Nunome SY, Yabe T, Takeda T, Yamada H. Anti-allergic activity of a Kampo(Japanese herbal) medicine "Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)" on airway inflammation in a mouse model. Int Immunopharmacol. 2004;4:1353-1365.
15. T. Nagai, Y. Arai, M. Emori, et al. Anti-allergic activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine "Sho-seiryu-to (Xiao-Qing-Long-Tang)" on airway inflammation in a mouse model. Int Immunopharmacol. 2004;4(10-11): 1353-1365.
16. S.T. Kao, S.D. Wang, J.Y. Wang, C.K. Yu, and H.Y. Lei. The effect of Chinese herbal medicine, xiao-qing-long tang (XQLT), on allergen-induced bronchial inflammation in mite-sensitized mice. Allergy. 2000;55(12): 1127-1133.
17. S.T. Kao, C.S. Lin, C.C. Hsieh, W.T. Hsieh, and J.G. Lin. Effects of xiao-qing-long-tang (XQLT) on bronchoconstriction and airway eosinophil infiltration in ovalbumin-sensitized

- guinea pigs: in vivo and in vitro studies. *Allergy*. 2001;56(12):1164-1171.
18. M. Sakaguchi, A. Mase, Y. Ikeda, et al. Effects of Sho-seiryu-to on experimental allergic rhinitis in guinea pigs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1999;21(4):303-308.
19. Lee JB, Yang HM, Min YK, Seok HS. Role of Chemokine in a in vivo Model of Food Allergy. *J Kor Soc Living Environ Sys*. 2009; 16:675-682.
20. Seoul National University College of Medicine. *Immunology*. Seoul: Seoul National University publisher. 1987;188-197.
21. Gurish, M.F., Ghildyal, N., Arm, J. Cytokine mRNA are preferentially increased relative to secretory granule protein mRNA in mouse bone marrow-derived mast cells that have undergone IgE-mediated activation and degranulation. *J Immunol*. 1991;146:1527-1533.
22. Plaut, M., Pierce, J.H., Watson, C.J., Hanley-Hyde, J., Mordon, R.P, and Paul, W.E. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI or to calcium ionophores. *Nature*. 1989;339:64-67.
23. Erchler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med*. 2000; 51:245-70.