

## 난알부민으로 알레르기 비염이 유발된 마우스에서 형개의 개선효과

송대욱<sup>#</sup>, 허준, 이성엽, 김재현, 이비나, 민주희, 김은영, 손영주, 정혁상<sup>\*</sup>

경희대학교 한의과대학 해부학교실

### Effects of Schizonepeta Spica water extract on the OVA-induced BALB/c mice model of allergic rhinitis

Dea-Uk Song<sup>#</sup>, Jun Heo, SungYub Lee, Jae-Hyun Kim, Bina Lee, Ju-Hee Min, Eun-Young Kim, Youngjoo Sohn, Hyuk-Sang Jung<sup>\*</sup>

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The aim of this study was to evaluate the effect of Schizonepeta Spica water extract (SS) on the OVA-induced BLAB/c mice allergic rhinitis model.

**Methods** : Thirty two BALB/c mice were equally assigned to 4 groups; the sham group, the control group, the cetirizine hydrochloride (Cet) treatment group, and the SS treatment group. Sham group was sensitized and challenged with saline, and the other groups were sensitized and challenged with OVA. The dosage of SS was 7.6 mg /kg · day, and Cet was 10 mg/kg · day. Nasal rubbing and sneezing were measured by the behavior observation. The concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  and MIP-2 in the sera of allergic rhinitis model were measured by mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel kits. Total IgE and OVA-specific IgE were measured by ELISA method. Epithelial thickness and eosinophil infiltration of nasal septum was investigated by histological examination.

**Results** : The clinical symptoms that increased in control group were significantly reduced in SS-treated group. Serum total IgE and OVA-specific IgE in the SS-treated group were significantly reduced compared to the control group. The concentration of IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  and MIP-2 in SS-treated group showed a significant reduction compared to the control group. The infiltration of eosinophil into nasal tissues of SS-treated group decreased markedly compared to control group, and thickness of nasal septum in nasal mucosa showed a significant reduction compared to control group.

**Conclusions** : According to the above result, it is suggested that SS may inhibit the early and late phase of allergic rhinitis reaction.

**Key words** : allergic rhinitis, Schizonepeta Spica, cetirizine hydorchloride, OVA-specific IgE

#### 서론

아토피(atopy) 질환으로 분류된 아토피 피부염, 천식, 알레르기 결막염 중 알레르기 비염은 가장 흔한 질환으로 재채기, 콧물, 코막힘, 눈 및 코 가려움증과 같은 임상증상이 나타난다<sup>1)</sup>. 일반적으로 면역계의 과민반응(hypersensitivity) 중 제1형

과민반응인 알레르기 또는 즉시형 과민반응에 의하여 발생하게 된다. 제1형 과민반응은 항원 노출 후 수 분에서 수 시간 내에 발생하는데, 비교적 무해한 환경 항원 또는 알레르겐(allergen)에 반응하여 immunoglobulin E (IgE) 항체를 생산한다<sup>2)</sup>. 알레르기 비염을 일으키는 항원은 일 년 내내 지속되는 통년성 알레르겐과 특정한 계절에만 나타나는 계절성 알

\*Corresponding author : Hyuk-Sang Jung, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University Seoul 130-701  
· Tel : +82-2-961-9449 · Fax : +82-2-961-9449 · E-mail : jhs@khu.ac.kr

#First author : Dea-Uk Song, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University Seoul 130-701  
· Tel : +82-2-734-1005 · Fax : +82-2-755-7750 · E-mail : kmdsong@naver.com

· Received : 14 October 2015 · Revised : 14 November 2015 · Accepted : 16 November 2015

레르겐으로 나눌 수 있다. 대표적인 통년성 알레르겐은 집먼지 진드기, 동물의 털 등이 있으며, 계절성 알레르겐은 꽃가루가 대표적이다<sup>3)</sup>. 알레르기 비염의 치료에 있어서 가장 우선하는 것이 회피요법이다. 하지만 알레르기 비염의 항원이 명확하게 밝혀지지 않은 경우가 많아서 치료에 어려움이 있다.

2010년 「국민건강통계」에 따르면 우리나라 19세 이상의 성인에서 최근 1년 동안 감기가 아닌데도 알레르기 비염의 증상을 경험한 사람이 26.2%로 나타났다. 알레르기 비염의 유병률은 30대 이전의 생산연령에서 높게 나타나고, 나이가 증가함에 따라 감소하는 추이를 보인다. 2010년 질병관리본부의 『아토피질환 유병률조사』에 의하면 초등학교 1학년 어린이에서는 43.6%, 중학교 1학년 청소년에서는 42.6%가 최근 1년간 알레르기 비염의 증상을 경험하는 것으로 조사되었다<sup>4)</sup>. 2007년 알레르기 비염으로 인한 경제적 부담은 약 3,139억 규모로 추계되었으며, 알레르기 비염환자들 중 50% 이상에서 수면장애를 가지고 있어 알레르기 비염으로 인한 학습장애와 성장장애 및 생산성의 저하가 우려된다<sup>5)</sup>. 알레르기 비염의 예방과 치료에 많은 비용이 부담되지만, 실제로 알레르기 비염 환자는 줄어들지 않고 오히려 늘고 있다. 따라서 알레르기 비염의 예방과 치료와 관련하여 보다 효과적인 치료제의 연구와 개발이 필요하다.

荊芥는 脣形科(꿀풀과; Labiatae)에 속한 1년생 초본인 형개(*Schizonepeta tenuifolia* (BENTH.) BRIQ.)의 지상부 초본을 사용하고 있으며, 藥味는辛하며 藥性은 微溫하며 無毒하고, 肺經과 肝經에 작용한다. 祛風解表하는 효능이 있으며 溫하나 燥하지 않아 발열오한, 두통, 신통 등의 증상을 치료하는데 응용되었다<sup>6)</sup>. 荊芥의 芳香性은 輕揚疏散하기 때문에 血分의 風熱이 上部에 鬱遏한 證에 더욱 적당하며, 麻疹透發不暢과 風疹瘙癢 및 瘡癤初起에 적용한다<sup>7)</sup>.

東醫寶鑑에서는 탁한 콧물이 나오는 비연(鼻淵)의 치료목적으로 荊芥가 포함된 황련통성산(黃連通聖散), 형개연교탕(荊芥連翹湯)이 사용되었고, 초기에 맑은 콧물이 나오다가, 증상이 오래되어 코가 막혀 냄새를 맡지 못하는 비색(鼻塞)에 필징가환(華澄茄丸)과 荊芥가 加味된 양격산(涼膈散)이 사용된 바 있다<sup>8)</sup>. 따라서 荊芥가 비점막에 발생하는 질환에 대한 완화효과를 가질 것으로 예상할 수 있다.

荊芥가 포함된 처방의 알레르기 질환에 대한 현재까지의 연구 성과를 살펴보면, ovalbumin (OVA)에 의하여 유도된 알레르기 비염 유발 생쥐에 대하여 荊芥連翹湯이 호산성 백혈구를 감소시키고, 비점막상피의 손상 완화 및 염증유발유전자를 조절하는 전사인자인 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B)를 억제한 연구가 있었다<sup>9)</sup>. 또한 荊防敗毒散이 알레르기접촉피부염에 대하여 histamine, 혈중 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )의 농도를 감소시켰다는 보고가 있었다<sup>10)</sup>.

현재까지의 荊芥에 대한 면역염증 기전에 대한 실험적 연구에서 면역세포 중 자연살해세포(natural killer cell; NK cell)의 활성화에 대하여 유의한 증진효과가 있고<sup>11)</sup>, 정상면역세포에 관해서는 세포독성을 나타내지 않으면서 P815 (mouse mast cell; mastocytoma) 세포군락형성을 억제하였다<sup>12)</sup>. 荊芥와 荊芥에서 추출한 주요성분 중 rosmarinic acid 등은 human mast cell에 대하여 interleukin 6 (IL-6), IL-8 그리고 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 유의하게 감소시켰다<sup>13)</sup>. 이상과

같은 세포수준에서의 연구성과를 바탕으로, 최근 본 연구실에서는 荊芥의 아토피 피부염 동물모델에 대한 급성 anaphylaxis 반응의 억제와 함께 혈중 총 IgE, TNF- $\alpha$ 와 IL-6를 억제함을 보고하였다<sup>14)</sup>.

본 연구는 荊芥의 알레르기 비염 동물 모델에 대하여 알레르기 비염의 임상증상에 대한 완화 효과를 확인해 보고자 진행하였다. OVA에 의해 유도된 BALB/c mice에 荊芥를 투여한 후 알레르기 비염의 임상증상을 개선시키고, 조직학적 및 혈액학적 지표들의 유의성을 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

OVA, aluminum hydroxide는 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, mouse IL-1 $\beta$ , IL-10, Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), TNF- $\alpha$  등 cytokine/chemokine magnetic bead panel kit는 Millipore (Billerica, MA, USA), Purified rat anti-mouse IgE는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

#### 2) 시료의 준비

본 실험에서 사용된 荊芥(*Schizonepeta Spica*)는 함소아제약(Seoul, Korea)에서 제공받았다. 荊芥 250.0 g을 3.0 L 등근 플라스크에 넣고, 3,000 mL의 증류수와 함께 냉각기가 부착된 전탕기에서 2시간 동안 가열하였다. 추출액은 Whatman filter paper no. 3 (Whatman, Maidstone, Kent, UK)를 사용하여 여과시킨 후 여과액을 rotary vacuum evaporator (N-1200, EYELA, Tokyo, Japan)에서 감압 농축한 후 동결건조하여 5.84 %의 형개추출물(*Schizonepeta Spica* water extract; SS)을 얻었다.

### 2. 방법

#### 1) 동물

6주령 암컷 BALB/c mice는 나라바이오텍(Gangnam-gu, Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 동물관리와 모든 실험과정은 경희대학교 동물실험 윤리위원회의 가이드라인 (KHUASP (SE)-13-006)에 따라서 수행되었다. 사육실의 온도는 22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C로 하고, 습도는 일정하게 유지하였으며, 낮과 밤의 주기는 각각 12시간으로(lights on from 07:00 to 19:00) 하였고, 물과 사료는 자유롭게 먹도록 하였다.

#### 2) 알레르기 비염 모델 유발 및 군의 분류

6주령의 암컷 BALB/c mice (20 - 30 g)를 일주일간 안정시킨 후 0, 7, 14 일째에 250  $\mu$ g의 OVA와 10 mg의 aluminum hydroxide를 phosphate buffered saline (PBS) 1 mL에 혼합한 다음 200  $\mu$ L를 복강 투여하여 항체생성을 유도하였다. 14일째 투여 후 일주일 뒤인 21일째부터 10일 동안 매일 PBS에 녹인 50  $\mu$ g/mL의 OVA를 20  $\mu$ L을 비강으로 투여하고 2분 동안 약의 흡수를 기다린 뒤 알레르기성 비염의 행동

증상인 코를 긁는(nasal rubbing) 시간과 재채기(sneezing) 횟수를 10분 동안 측정하였다. 행동관찰일 10일 동안 정상군(SHAM 군, n=8)과 대조군(OVA 군, n=8)은 생리식염수를 경구 투여하였고, SS처치군(OVA + SS 군, n=8)은 SS 6.7 mg/kg을, Cet처치군(OVA + Cet 군, n=8)은 cetirizine hydrochloride (Cet; Allertec Tab; Korean Drug Co., Seoul, Korea) 10 mg/kg을 생리식염수 100  $\mu$ L 에 녹여 행동실험 시작 1시간 전에 0.1 mL 씩 경구 투여하였다.

마지막 행동 관찰일인 30일째 까지 행동변화를 관찰하였으며 마지막 관찰 3시간 후에 sodium pentobarbital (Hanlim Pharm, KyeongGi-do Yongin, Korea) 40 mg/kg을 복강 투여 한 후 마취하에, 심장천자를 통하여 혈액을 채취하였으며, 비점막 및 조직을 취하였다(Fig. 1).

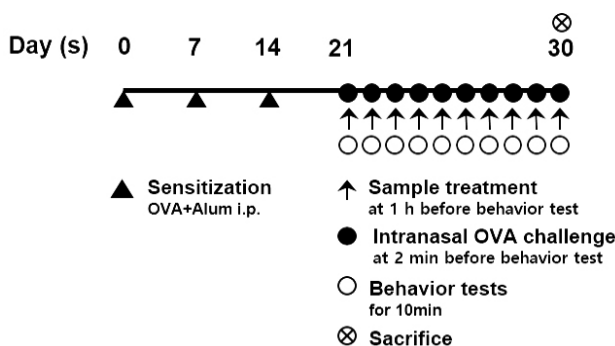


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental group design and protocol for chicken ovalbumin (OVA)-induced allergic rhinitis mouse model.

### 3) 조직학적 분석

행동 관찰 10 일째에 4%와 10%의 paraformaldehyde로 관류고정하고 mouse 의 머리를 분리한 후 비강 주변의 근육을 제거하고, 동일 고정액으로 4 $^{\circ}$ C에서 하루를 보관하였다. 이후 10% EDTA 용액에 14 일 동안 탈회한 다음에 파라핀에 포매하여 5  $\mu$ m 두께로 연속절편 하였다. 절편은 xylene 으로 탈파라핀하고, ethanol로 흡수한 후 hematoxylin-eosin으로 염색하여 디지털 광학현미경(DP70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 영상화하였다. 비점막의 두께 및 호산성 백혈구(eosinophil)의 침윤 정도는 400 배로 확대된 이미지에서 각 군의 코 절편 으로부터 코중격의 점막 부위에서 측정하였으며, 산호성백혈구는 세포질내의 eosin 염색된 granule을 기준으로 확인하였다.

### 4) 혈중 총 IgE 와 OVA-specific IgE의 정량 분석

각 실험군의 BALB/c mice에서 심장천자 후 혈액을 채취하여 원심분리를 통해 혈청을 획득하고, ELISA 방법을 이용하여 혈청 내 존재하는 총 IgE 와 OVA-specific IgE를 측정하였다. 총 IgE는 capture anti-body인 purified anti-mouse IgE를 coating buffer (PBS, pH7.4)에 희석하여 nunc plate에 100  $\mu$ L를 넣은 다음 4  $^{\circ}$ C에서 하루 동안 코팅하였다. PBST (PBS + 0.05% tween 20)로 3회 수세 후 blocking buffer (PBS + 1% bovine serum albumin (BSA))로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 PBST로 3회 수세 후 25배 희석된 혈청과, standard (500 ng/mL - 7.8ng/mL)가 되게 첨가하였다. PBST로 3회 수세 후 detection antibody

인 biotinylated anti-mouse IgE를 blocking buffer로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 6 번 수세하였다. 다시 plate를 avidin peroxidase (1 mg/mL) 1/400로 희석하여 실온에서 30분간 반응시키고 6 회 수세한 후 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate (BD OPTeia substrate Reagent A : BD OPTeia substrate Reagent B = 1 : 1)를 희석하여 실온에서 반응시켰다. 20분 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 정지 시킨 후 405 nm에서 optical density (O.D)값을 측정하였다. OVA-specific IgE는 mouse anti-OVA-IgE ELISA kit (Biovender, Brno, czech republic)를 이용하여 측정하였다.

### 5) 혈중 cytokine과 chemokine 측정

각각의 plate에 200  $\mu$ L의 wash buffer를 넣고 실온에서 10분 동안 수세 후 적당한 well에 standard 25  $\mu$ L를, sample을 넣을 well에는 assay buffer 25  $\mu$ L를 넣었다. 그리고 serum matrix solution 25  $\mu$ L를 standard와 background well에 넣고, 희석한 혈청 25  $\mu$ L를 sample well에 넣어 잘 섞어준 후 각 well에 잘 섞어준 bead 25  $\mu$ L 넣어주었다. 이 plate를 포일로 잘 싸아 실온에서 2시간 반응시킨 후 wash buffer로 2회 수세하였다. detection antibody 25  $\mu$ L를 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후 streptavidin-phycoerythrin을 넣어 준 후 실온에서 30분간 잘 섞어주었다. 이를 다시 wash buffer로 2회 수세한 후 sheath fluid 150  $\mu$ L를 넣고 5분 동안 잘 섞어주었다. 이 plate를 Luminex 200TM (Madison, WI, USA)을 이용하여 IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ 와 MIP-2를 분석하였다.

### 6) 통계분석

측정값은 평균  $\pm$  표준오차(mean  $\pm$  S.E.M.)로 표기하였다. 실험결과는 통계 프로그램 GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc, CA, USA)를 사용하여 약물의 농도에 따른 지표의 발현수치를 비교할 경우 one-way ANOVA로 실시하였고, 유의수준 P value < 0.05인 경우 유의성이 있다고 평가하였고 Dunnett's multiple comparison test로 사후 검증 하였다.

## 결 과

### 1. 코를 긁는(nasal rubbing) 시간에 대한 완화 효과

2주 동안 0, 7, 14일 3 회에 걸쳐 OVA와 aluminum hydroxide를 이용하여 알레르기 비염을 유발시킨 결과 OVA-challenge 후 대조군에서는 정상군에 비하여 코를 긁는 시간은 유의성( $^{++}P < 0.01$ ) 있게 증가하였다.

SS처치군의 행동관찰 결과 코를 긁는 시간은 대조군에 비하여 유의성( $^{**}P < 0.01$ ) 있게 감소하였으며, Cet처치군에서는 코를 긁는 시간은 대조군에 비하여 유의성( $^{**}P < 0.01$ ) 있게 감소하였으나, SS처치군과 Cet처치군 사이에 차이는 없었다 (Fig. 2).

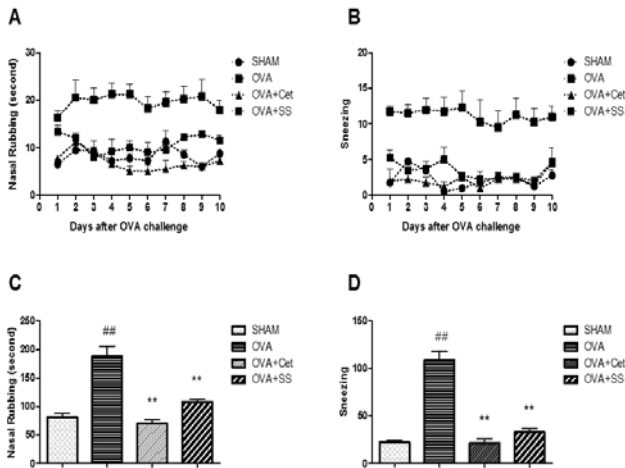


Fig. 2. The effect of SS extract on the nasal rubbing and sneezing symptom in OVA-induced allergic rhinitis mice. The time of nasal rubbing and the number of sneezing were measured for 10 min after the last intranasal challenge. (A) The time of nasal rubbing for each day. (B) The number of nasal rubbing for each day. (C) Total time of rubbing for 10 days. (D) Total number of sneezing for 10 days. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error (n=8). <sup>++</sup> $P < 0.01$ , significantly different from the normal group, the control group, respectively.

### 2. 재채기(sneezing)의 횟수에 대한 완화 효과

알레르기 비염 마우스에 대하여 코를 긁는 시간과 더불어 재채기의 횟수는 항원에 대한 감각을 시사하는 중요한 측정방법이다.

정상군의 재채기 횟수와 비교하여 대조군에서는 유의적으로 재채기 횟수가 증가(<sup>++</sup> $P < 0.01$ )하였으며, 대조군에서 증가된 재채기 횟수는 SS처리군에서는 유의성있는 감소(<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ )를 나타내었다. Cet처리군의 재채기 횟수 역시 유의적으로 감소하였으며, SS처리군과 비교하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3).

### 3. 비중격의 두께 및 호산성 백혈구 침윤에 미치는 영향

정상군에 비하여 대조군에서는 호산성 백혈구의 수가 상당한 증가를 보였다(<sup>++</sup> $P < 0.01$ ). SS처리군의 호산성 백혈구는 대조군에 비하여 유의적(<sup>\*</sup> $P < 0.01$ )으로 줄었으며, Cet처리군 또한 대조군에 비하여 호산성 백혈구가 상당히 감소하였다(<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ). SS처리군과 Cet처리군을 비교하면 침윤된 호산성 백혈구의 억제 효과는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

비강점막의 비중격의 두께의 수치는 정상군에 비하여 대조군은 매우 컸다(<sup>++</sup> $P < 0.01$ ). 하지만 SS처리군과 Cet처리군의 비강점막의 두께는 정상군과 큰 차이를 보이지 않을 정도로 유지 되었으며, SS처리군에서 비중격의 두께의 감소는 Cet처리군에 비하여(<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ) 더 큰 유의성(<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ )을 보였다(Fig. 3).

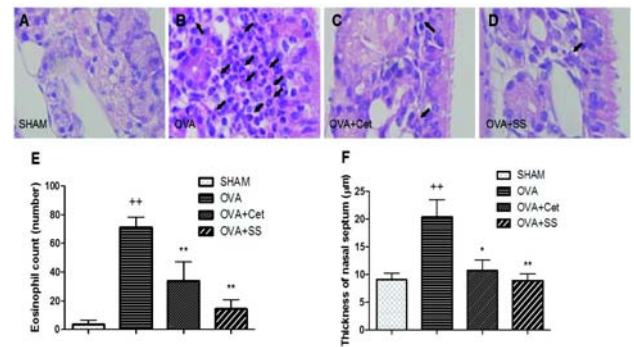


Fig. 3. The effect of SS extract on infiltration of eosinophils and thickness of nasal septum in OVA-induced allergic rhinitis mice. Infiltration of eosinophils in SHAM (A), OVA (B), OVA+Cet(C) and OVA+SS (D). The nasal tissues were stained with hematoxylin and eosin staining. The arrows represent infiltration of eosinophils. (E) Eosinophil counts in the nasal mucosa of each group. (F) Thickness of nasal septum in nasal mucosa. The Columns and error bars represent the mean  $\pm$  standard error (n=8). <sup>++</sup> $P < 0.01$ , significantly different from the normal group. <sup>\*</sup> $P < 0.05$  and <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , significantly different from the control group.

### 4. 혈중 총 IgE 및 OVA-specific IgE에 미치는 영향

대조군의 혈중 총 IgE의 수준은 정상군에 비하여 약 3배 증가하였으며, OVA-specific IgE의 수준 역시 비슷한 비율로 증가하였다. 혈중 총 IgE의 수준은 SS처리군에서 유의성(<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ) 있게 감소하였으며, OVA-specific IgE의 수준 역시 유의적(<sup>\*</sup> $P < 0.05$ )으로 감소하였으나 총 IgE의 수준과 비교하여 낮은 유의성을 나타내었다.

Cet처리군의 혈중 총 IgE의 농도와 OVA-specific IgE의 농도는 유의적으로 감소 하였고 SS처리군과 유의성의 차이는 없었다(Fig. 4).

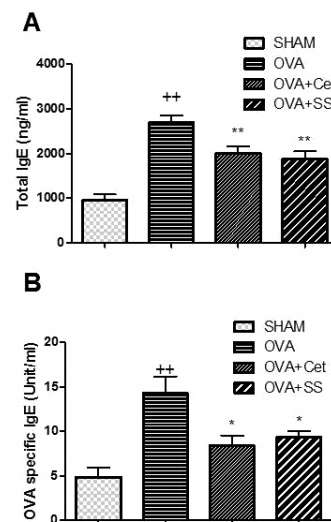


Fig. 4. Effect of SS on total IgE and OVA-specific IgE levels in serum of the allergic rhinitis mice. (A) Total IgE levels, (B) OVA-specific IgE levels in serum. Total IgE and OVA-specific IgE were measured by ELISA method. The Columns and error bars represent the mean  $\pm$  standard error (n=8). <sup>++</sup> $P < 0.01$ , significantly different from the normal group. <sup>\*</sup> $P < 0.05$  and <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , significantly different from the control group.

### 5. 혈중 cytokines과 chemokine에 대한 억제 효과

혈중 IL-1β의 농도는 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 (+*P*<0.05) 있는 증가를 보였다. SS처치군에서는 대조군에 비하여 유의성(\**P*<0.05)있는 감소를 보였으나, Cet처치군에서는 IL-1β가 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.

IL-10의 농도는 정상군에 비하여 대조군에서 크게 증가(++*P*<0.01)하였다. SS처치군의 IL-10의 농도는 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였다(\**P*<0.05). Cet처치군에서는 대조군에 비하여 IL-10의 농도는 유의성 있는 억제효과를 나타내지 않았다.

대조군에서 TNF-α의 농도는 정상군에 비하여 유의적인 증가를 보였다(+*P*<0.05). SS처치군에서 TNF-α의 농도는 정상군과 차이를 보이지 않았으며, 대조군의 농도에 비하여 크게 감소하였다(\*\**P*<0.01). Cet처치군의 TNF-α의 농도는 대조군에 비하여 유의적인 감소(\*\**P*<0.01)를 보였다.

대조군에서 혈중 MIP-2의 농도는 정상군에 비하여 2배가량 높게 측정되었다(++*P*<0.01). SS처치군에서 MIP-2의 농도는 대조군에 비하여 유의성(\**P*<0.05) 있는 억제효과를 나타냈다. Cet처치군의 경우 대조군에 비하여 유의성(\**P*<0.05) 있는 감소를 보였고, SS처치군과 Cet처치군의 유의성에는 차이가 없었다(Fig. 5).

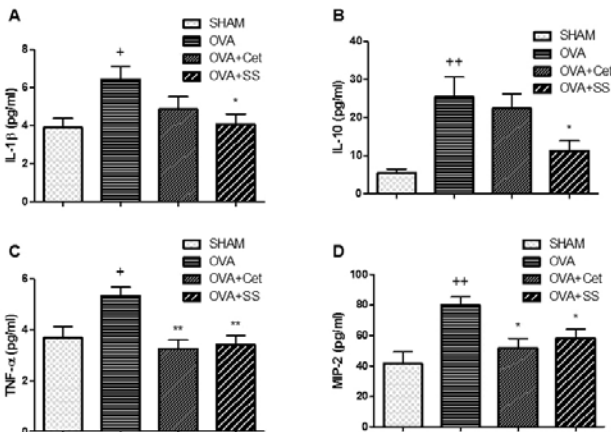


Fig. 5. Effects of SS extract on the serum levels of cytokines and chemokine in allergic rhinitis mice. The concentrations of IL-1β (A), IL-10 (B), TNF-α (C), MIP-2 (D) in the sera of allergic rhinitis model were measured by mouse cytokine/chemokine magnetic bead panel kits. Independent experiments were performed and the columns and error bars represent the mean ± standard error (n=8). +*P*<0.05 and ++*P*<0.01, significantly different from the normal group, the control group, respectively.

### 고찰

알레르기 비염은 코 가려움, 재채기, 콧물 등의 임상증상을 특징으로 한다. 본 연구에서 행동실험을 통하여 측정된 코를 긁는 시간과 재채기의 횟수는 OVA를 비강투여 한 후 2분 후에 측정하여 알레르기 비염으로 인한 초기 염증 반응으로 인한 임상증상을 조사하였다. 알레르기 비염의 초기 염증 반응은 알레르겐에 노출되고 몇 분 이내에 나타나는데, 이는 비만세포의 매개의 의하여 히스타민(histamine)과 염증전 cytokine

의 방출을 일으키기 때문이다. 알레르기 비염에서 히스타민과 히스타민 H<sub>1</sub> 수용체의 상호 작용은 평활근 수축, 혈관 투과성, 혈관 확장 및 홍조, 점액 분비 및 가려움증 등 다양한 병리학적 결과를 매개한다. 그 결과 알레르기 비염의 임상증상으로 코막힘, 재채기, 가려움증을 유발하게 되는 것이다<sup>15)</sup>. 본 연구에서 대조군은 정상군에 비하여 코를 긁는 시간과 재채기의 횟수가 유의적으로 증가하였다. SS처치군의 코를 긁는 시간과 재채기의 횟수는 대조군에 비하여 유의성 있는 완화효과가 있었다.

본 연구의 조직학적 관찰에서 대조군의 비중격의 점막의 두께는 정상군에 비하여 크게 증가하였다. 알레르기 비염의 초기 염증반응이 비만세포에 의한 히스타민 분비로 특징지어 지고, 알레르기 비염의 후기 염증반응은 알레르기 비염의 초기 반응으로 발생한 매개체의 효과에 의하여 호산성 백혈구의 침윤을 일으키게 된다<sup>16)</sup>. 이는 비만세포에서 cytokines와 chemokines에 의하여 일어나게 되는데, 이러한 cytokines는 내피세포에 vascular cell adhesion molecule 1 과 같은 접합분자의 표출을 상향조절하게 되고, 이를 통하여 호산성 백혈구가 비점막에 침윤될 수 있도록 한다<sup>17)</sup>. 호산성 백혈구는 활성산소를 생산하여 점막을 손상시키고 극심한 염증반응을 촉진한다. 호산성 백혈구에 유도된 화학주성인자와 과립생산물, 그리고 호산성 백혈구에서 생겨난 신경독소는 코의 과잉 반응을 유도하는 역할을 하며, 기도점막과 국소 신경섬유의 심각한 손상을 일으킨다<sup>18)</sup>. 본 연구의 조직학적 검사를 통하여 측정된 대조군의 호산성 백혈구의 수치는 정상군에 비하여 유의적으로 증가하였으며, 비점막에 발생한 호산성 백혈구의 침윤과 침윤에 의한 손상으로 인하여 비점막의 두께가 증가된 것으로 볼 수 있다. SS처치군은 대조군에 비하여 호산성 백혈구의 침윤에 대하여 유의한 억제효과가 있었으며, 이에 따라 비중격의 비점막 두께 역시 대조군에 비하여 유의적인 감소 효과를 나타내었다.

본 연구의 대조군은 OVA-specific IgE뿐 아니라 총 IgE 역시 정상군에 비하여 높은 수준으로 증가되었으며, SS는 혈중 총 IgE와 OVA-specific IgE를 유의하게 감소시켰고 양성대조군인 Cet처치군과 동등 수준의 효과를 보였다. 항원에 의하여 감작되면 비만세포는 IgE의 Fc영역에 높은 친밀도를 지닌 수용체를 나타내고, IgE는 비만세포에 근본적이고 비가역적인 결합을 하게 된다. 같은 항원에 반복되어 노출되었을 때, 항원은 비만세포에 결합된 IgE 분자와 교차결합하게 되고, 비만세포는 탈과립화를 통해 임상증상을 발현시키게 되는 것이다<sup>19)</sup>. Cet처치군에 투여한 cetirizine hydrochlorid와 같은 항히스타민제는 히스타민과 경쟁적으로 H1 수용체와 결합하여, 알레르기 증상의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>20)</sup>. 이는 SS가 혈중 총 IgE의 감소를 특히 OVA-specific IgE의 억제를 통해 비만세포와 IgE의 결합이 감소했음을 시사한다. 이러한 IgE 억제에 의해 비만세포에 의한 알레르기 비염의 임상 증상인 nasal rubbing과 sneezing의 개선이 일어났음을 의미한다.

TNF-α는 알레르기 염증을 포함한 염증과 면역을 개시하고 유지하는 중대한 역할을 하는 전염증성 cytokine으로 간주된다. TNF-α는 알레르기 반응에서 IgE 의존적인 기전을 통하여 비만세포와 대식세포에서 분비되며, 내피세포사이의 호산성 백혈구의 이동을 유도하는 접착분자의 표출에 중요한

역할을 하고 있다<sup>21,22</sup>. TNF- $\alpha$ 는 주로 Th1 매개 염증에 관여한다고 알려져 있었지만<sup>23,24</sup>, 또 다른 연구에 의하면 Th2-유형의 사이토카인의 생산에 필요하고<sup>25</sup>, 알레르기 염증 구역으로 Th2세포를 이동시키는데도 필수적이라는 사실이 알려졌다<sup>26</sup>. 본 연구에서 TNF- $\alpha$ 의 농도는 대조군에 비하여 SS처치군에서 유의성 있는 감소를 보였으며, Masao Iwasaki 등<sup>27</sup>에 의하면 OVA에 유도된 알레르기 비염 마우스모델에서 TNF- $\alpha$ 가 antigen-specific IgE의 생산과정에 대한 Th2-유형의 사이토카인의 생산을 조절할 수 있다는 것을 보여준 바 있다. 이는 SS가 OVA의 감작으로 증가된 TNF- $\alpha$ 의 발현 억제를 통해 이후 Th2세포 활성화에도 영향을 미쳤음을 추측할 수 있다.

IL-10은 다면 발현성의 cytokine으로 비만세포의 활성화와 비만세포에 의하여 발생하는 cytokine을 억제하고<sup>28,29</sup>, 호산성 백혈구의 생존과 호산성 백혈구에 의한 cytokine의 생산을 억제한다<sup>30</sup>. IL-10은 본래 Th2 세포에 의하여 생산되는 cytokine으로 Th1-cytokine의 생산을 억제하는 것으로 알려져 있으며<sup>31</sup>, B세포에 작용하여 IgG와 IgE의 비율을 조절하며<sup>32,33</sup>, antigen-specific IgE 반응의 유도를 촉진시키는 역할을 한다<sup>34</sup>. 반면 IL-10의 수준과 알레르기 질환의 심각성이 반비례의 관계에 있다는 것을 보여주는 예도 있다<sup>35-37</sup>. IL-10에 관련한 다른 연구에 의하면 건강한 사람은 IL-10 분비조절 T세포가 우세하고, 알레르기를 앓고 있는 사람의 경우는 antigen-specific IL-4 분비 T세포가 더 증가된다는 보고가 있었다<sup>38</sup>. 이를 통하여 알레르기의 염증반응이 진행되고 있는 과정에서 IL-10의 농도를 과도하게 낮추는 것은 알레르기 질환의 증상을 더 심각하게 만들 수 있다는 것으로 추측해볼 수 있다. 본 연구에서 SS처치군의 IL-10의 농도는 정상군에 비해 2배정도 높았고, 대조군에 비하여 1/2.5 수준으로 적게 나타났다. 또한 SS처치군은 대조군에 비하여 IL-10의 농도에 있어서 유의성 있는 억제효과를 보였으나, Cet처치군의 IL-10에 대한 억제효과는 유의성이 없었다. SS의 IL-10에 대한 억제효과는 농도를 너무 낮게 유지하지 않는 범위에서 알레르기 질환이 심각해지는 것을 방지하는 효능을 가진 것으로 생각된다.

IL-1은 거의 모든 세포 유형에 대하여 다양한 특성과 영향을 가진 필수적인 전염증성 cytokine으로 통증과민, 발열, 혈관확장 그리고 저혈압을 일으킨다<sup>39,40</sup>. 이 중 IL-1 $\beta$ 는 염증반응의 전파에 있어서 중요하며, 대식세포를 모집한다. 본 연구에서 SS는 IL-1 $\beta$ 의 혈중 농도를 억제하는 효능을 보였다.

MIP-2는 내독소에 자극받는 대식세포로부터 분비되며 lipopolysaccharide로 유도된 쥐의 대식세포로부터 고립된 CXC chemokine으로, 강력한 다핵형 호중성 백혈구의 화학주성인자에 하나이다<sup>41</sup>. Tumpey TM 등<sup>42</sup>의 연구를 살펴보면 IL-1 $\beta$ 에 의하여 MIP-2의 생산이 증가하고, MIP-2는 호중성 백혈구를 유입시키는 것이라고 보고했다. 본 연구에서 측정된 cytokine과 chemokine의 수준을 보면 SS처치군에서 IL-1 $\beta$ 의 혈중 농도가 대조군에 비하여 유의적으로 억제되었으며, 또한 MIP-2의 혈중 농도 역시 유의성 있는 억제효과를 보였다. 이는 SS가 IL-1 $\beta$ 를 조절하고, 이를 통해 MIP-2의 발현을 억제한 것을 의미한다. 또한 MIP-2 억제의 결과로 호중성 백혈구의 유입이 억제되었을 것으로 유추할 수 있다. 하지만 본 연구에서는 MIP-2에 대한 억제효과는 관찰되

었지만 호중성 백혈구의 유입이 억제 되었다는 것을 확인하지 못하였으므로, 향후 조직학적 검사를 통하여 호중성백혈구에 대한 SS의 효능에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

Craig M. Lilly 등<sup>43</sup>에 의하면 폐의 상피 세포에서 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 eotaxin mRNA 표출, 단백질의 생산과 분비를 유도한다는 것을 밝혔다. 이오타신(eotaxin)은 호산성 백혈구를 특별하게 유인하는 것으로 알려졌다<sup>44</sup>. 이를 통하여 본 연구에서 시행한 조직검사결과와 호산성 백혈구의 침윤 억제 효과는 SS의 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 와 상관성을 가질 것을 생각된다.

SS는 총 IgE 및 OVA-specific IgE에 대한 억제효능을 가져 알레르기 비염의 초기반응을 억제할 수 있는 약물로 이용 가능한 근거를 마련하였으며, 알레르기 비염의 후기 염증반응에서 중요한 역할을 하는 호산성 백혈구의 침윤을 효과적으로 억제하는 좋은 효능을 나타내었다. 또한 강력한 호중성 백혈구의 화학주성인자인 MIP-2를 억제하였다. 따라서 본 연구에 의하여 SS가 알레르기 비염의 초기 반응을 효과적으로 억제하면서도, 알레르기 비염의 후기 반응으로 인한 비점막의 손상을 방지하는 효능을 지닌 것으로 보아 알레르기 비염의 임상적 활용에 대한 실험적 근거가 될 것으로 생각된다.

## 결론

荊芥는 鼻塞과 鼻淵에 응용하였던 약물로, 난알부민(OVA)으로 알레르기 비염이 유발된 마우스에서 개선효과를 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 알레르기 비염 마우스에서 형개추출물의 투여는 임상증상(코 긁기, 재채기)을 유의적으로 감소시켰다.
2. 알레르기 비염 마우스에서 형개추출물의 투여는 비중격의 두께를 감소시키고, 호산구의 침윤을 유의적으로 억제하였다.
3. 알레르기 비염 마우스에서 형개추출물의 투여는 혈중 총 IgE 및 OVA-specific IgE의 농도를 유의적으로 감소시켰다.
4. 알레르기 비염 마우스에서 형개추출물의 투여는 혈중 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 를 유의적으로 감소시켰으며, IL-10에 대하여 SS는 유의성 있는 감소를 보였다.

결론적으로 형개추출물은 비강 내 염증반응을 개선시키고 염증물질 분비를 감소시킴으로써 비염 증상을 개선시키는 것으로 나타났다.

## References

1. Rha YH. Allergic rhinitis in children : diagnosis and treatment. Korean J Pediatrics. 2006 ; 49(6) : 593.
2. Lee MH. Lippincott' s Illustrated Reviews : Immunology. Seoul : shinilbooks, 2008 : 195-9.

3. Kim CW, Current Update on Allergic Rhinitis, *Korean J Int Med*, 2012 ; 83(3) : 298-9.
4. Kwon HC, *Korean Social Trends 2012*, Seoul : Statistical research institute, 2012 : 114-21.
5. Kim SY, Economic Burden of Allergic Rhinitis in Korea, 2009 : 31-2.
6. Shin MK, *Clinical traditional herbalogy*, Seoul : Yeong Lim's publisher, 2000 : 338-9.
7. The textbook complication committee of Korean herbalogy, *Korean Herbalogy*, Seoul : Yeong Lim's publisher, 2004 : 159-60.
8. Hoe J, *Jeong-kyo Donguibogam*, Seoul : Hanmi medical publishing Co, 2001 : 319-21.
9. Park JH, Hong SU, The Effect of Hyunggaeyyungyo-tang of Suppression of iNOS Production on Mice with Allergic Rhinitis, *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2012 ; 25(1) ; 12-21.
10. Park KH, Effects of HyeongBangPaeDokSan (HBPDS) on allergic contact dermatitis (ACD) induced by DNFB in mice, *Dongsin Univ*, 2014
11. Kang YH et al, Effects of Putative Anticancer Herb Drugs on Rat Natural Killer(NK) Cell Activity, *J Korean Med*, 1987 ; 8(1) : 53-74.
12. Lim JH, Sensitivity testing of tumor cells to putative anticancer drugs, *Kyung Hee Univ Oriental Med J*, 1986 ; 9 : 241-66.
13. Cho SI, Regularoty mechanism of Schizonepeta tenuifolia Briquet on HMC-1 mast cells; microarray analysis, *Kyung Hee Univ*, 2009.
14. Choi YY, Kim MH, Kim JH, Jung HS, Sohn Y, Choi YJ, Hwang MK, Kim SH, Kim J, Yang WM, Schizonepeta tenuifolia inhibits the development of atopic dermatitis in mice, *Phytotherapy Res*, 2013 ; 27(8) : 1131-5.
15. Bachert C, The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of itsinflammatory potential, *Allergy*, 2002 ; 57(4) : 287-96.
16. Quraishi SA, Davies MJ, Craig TJ, Inflammatory responses in allergic rhinitis: Traditional approaches and novel treatment strategies, *J Am Osteopath Assoc*, 2004 ; 104(5 Suppl 5) : S7-15.
17. Li L, Xia Y, Nguyen A, Lai YH, Feng L, Mosmann TR, Lo D, Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells, *J Immunol*, 1999 ; 162(5) : 2477-87.
18. Mandhane SN, Shah JH, Thennati R, Allergic rhinitis: An update on disease, present treatments and future prospects, *Int Immoupharmacol*, 2011 ; 11(11) : 1646-62.
19. Min YG, The pathophysiology, diagnosis and treatment of allergic rhinitis, *Allergy Asthma Immunol Res*, 2010 ; 2(2) : 65-76.
20. Bachert C, The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of itsinflammatory potential, *Allergy*, 2002 ; 57(4) : 287-96.
21. Bradding P, Mediawake R, Feather IH, Madden J, Church MK, Holgate ST, Howarth PH, TNF alpha is localized to nasal mucosa mast cells and is released in acute allergic rhinitis, *Clin Exp Allergy*, 1995 ; 25(5) : 406-15.
22. Bachert C, Wagenmann M, Hauser U, Proinflammatory cytokines: measurement in nasal secretion and induction of adhesion receptor expression, *Int Arch Allergy Immunol*, 1995 ; 107(1-3) : 106-8.
23. Williams RO, Feldmann M, Maini RN, Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992 ; 89(20) : 9784-8.
24. Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W, Kollias G, Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice, *Eur J Immunol*, 1997 ; 27(7) : 1743-50.
25. Artis D, Humphreys NE, Bancroft AJ, Rothwell NJ, Potten CS, Grecis RK, Tumor necrosis factor alpha is a critical component of interleukin 13-mediated protective T helper cell type 2 responses during helminth infection, *J Exp Med*, 1999 ; 190(7) : 953-62.
26. Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K, Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production, *J Exp Med*, 1997 ; 186(10) : 1737-47.
27. Iwasaki M, Saito K, Takemura M, Sekikawa K, Fujii H, Yamada Y, Wada H, Mizuta K, Seishima M, Ito Y, TNF- $\alpha$  contributes to the development of allergic rhinitis in mice, *J Allergy Clin Immunol*, 2003 ; 112(1) : 134-40.
28. Arock M, Zuany-Amorim C, Singer M, Benhamou M, Pretolani M, Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells, *Eur J Immunol*, 1996 ; 26(1) : 166-70.
29. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M, Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10, *Clin Exp Allergy*, 2001 ; 31(5) : 694-704.
30. Takanaski S, Nonaka R, Xing Z, O' Byrne P, Dolovich J, Jordana M, Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharideinduced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils, *J Exp Med*, 1994 ; 180(2) : 711-5.
31. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR, Two types of mouse T helper cell, IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones, *J Exp Med*, 1989 ; 170(6) : 2081-95.

32. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, Staple SQ, Aalberse RC, Till SJ, Durham SR. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol*, 2004 ; 172(5) : 3252-9.
33. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*, 1998 ; 160(7) : 3555-61.
34. Ohmori H, Kanda T, Takai T, Hikida M. Induction of antigen-specific IgE response in murine lymphocytes by IL-10. *Immunol Lett*, 1995 ; 47(1-2) : 127-32.
35. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1996 ; 97(6) : 1288-96.
36. Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet*, 1998 ; 352 : 113.
37. Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse RC, de Klerk N, Suriyaarachchi D, Serralha M, Holt BJ, Hollams E, Yerkovich S, Holt K, Sly PD, Goldblatt J, Le Souef P, Holt PG. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*, 2005 ; 365(9454) : 142-9.
38. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest*, 1998 ; 102(1) : 98-106.
39. Feldmeyer L, Werner S, French LE, Beer HD. Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *Eur J Cell Biol*, 2010 ; 89(9) : 638-44.
40. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 2009 ; 27 : 519-50.
41. Tekamp-Olson P, Gallegos C, Bauer D, McClain J, Sherry B, Fabre M, van Deventer S, Cerami A. Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J Exp Med*, 1990 ; 172(3) : 911-9.
42. Tumpey TM, Fenton R, Molesworth-Kenyon S, Oakes JE, Lausch RN. Role for macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), MIP-1 $\alpha$ , and interleukin-1 $\alpha$  in the delayed-type hypersensitivity response to viral antigen. *J Virol*, 2002 ; 76(16) : 8050-7.
43. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Drazen JM, Luster AD. Expression of Eotaxin by Human Lung Epithelial Cells. *J Clin Invest*, 1997 ; 99(7) : 1767-73.
44. Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*, 1994 ; 179(3) : 881-7.