

Original Article / 원저

## 補中益氣湯이 접촉성 과민반응에 미치는 影響

박양구<sup>1)</sup> · 정 명<sup>2)</sup> · 복영옥<sup>2)</sup> · 이진호<sup>2)</sup> · 강석훈<sup>3)</sup> · 임규상<sup>2,4)</sup> · 윤용갑<sup>1,4)</sup>

<sup>1)</sup>원광대학교 한의과대학 <sup>2)</sup>원광대학교 한의학전문대학원

<sup>3)</sup>원광대학교 약학대학 한약학과 <sup>4)</sup>원광대학교 한국 전통의학연구소

### Effects of Bojungikgi-tang on Trimellitic Anhydride-induced Contact Hypersensitivity in BALB/c Mice

Yang-Gu Park<sup>1)</sup> · Myung Jung<sup>2)</sup> · Young-Ok Bok<sup>2)</sup> · Jin-Ho Lee<sup>2)</sup> · Suk-Hoon Kang<sup>3)</sup> ·  
Kyu-Sang Lim<sup>2,4)</sup> · Young-Gab Yun<sup>1,4)</sup>

<sup>1)</sup> College of Korean Medicine Wonkwang University

<sup>2)</sup> Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

<sup>3)</sup> Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang

<sup>4)</sup> Korea Traditional Medicine Institute, Wonkwang University

### Abstract

**Objective** : The water extract of Bojungikgi-tang (BTE) composed with *Ginseng Radix*, *Astragali Radix*, *Angelicae gigantis Radix*, *Atractylodes Rhizoma alba*, *Aurantii nobilis Pericarpium*, *Glycyrrhizae Radix*, *Cimicifuga Rhizoma*, and *Bupleuri Radix* and it has been traditionally used for chronic diseases or weakness after illness in oriental countries. However, little is known about the effects of aqueous extract of BTE on trimellitic anhydride (TMA)-induced contact hypersensitivity (CHS). Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of BTE on TMA-induced CHS in BALB/c mice.

**Methods** : In this study, the extract of BTE was prepared by extracting with distilled water at 100°C for 2.5 h. The extract was freeze-dried following filtration through 0.45 μm filter. Mice were orally administrated with or without BTE extract of different doses (25-200 mg/kg/day) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE extract one time per day 30 min before TMA treatment. I examined the effects of BTE on the serum levels of IgE, IgG1, IgG2a, and IgG2b, nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production in isolated peritoneal macrophages, Th2 cytokine production in isolated spleen cells, ear swelling responses, and the leukocyte infiltration induced by TMA.

© 2016 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Results** : The orally and externally administration of BTE dose-dependently reduced the serum levels of hapten-specific immunoglobulin E (IgE), IgG1 titer, and PGE<sub>2</sub> production as well as ear swelling responses and leukocyte infiltration in TMA-induced BALB/c mice. The levels of NO and PGE<sub>2</sub> production from peritoneal macrophages stimulated with TMA-BSA were markedly suppressed by pretreatment with BTE in a concentration dependent manner. Furthermore, the levels of Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) production from spleen cells stimulated with ConA were markedly suppressed by BTE treatment in a concentration dependent manner.

**Conclusions** : These results suggest that BTE treatment suppresses chronic contact hypersensitivity, and it can be assumed that the suppression of ear swelling, serum IgE, NO and PGE<sub>2</sub> levels, leukocyte infiltration, and Th2 cytokines in an animal model. Therefore, these properties may contribute to the strong anti-CHS response effect of BTE.

**Key words** : Bojungikgi-tang (BTE);immunoglobulin E (IgE);prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>);nitric oxide (NO);Th2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13)

## 1. 緒 論

補中益氣湯은 金代 李東垣<sup>1)</sup>의 《內外傷辯惑論》에 처음 기재된 方劑로 黃芪, 人蔘, 白朮, 甘草, 當歸, 陳皮, 升麻, 柴胡로 구성되어 있으며, “飲食失節, 寒溫不適, 則脾胃乃傷, 喜怒憂恐, 勞役過度, 而損耗元氣” 등脾胃虛衰와 元氣不足으로 인한 여러 증상을 치료한다고 하였다.

許浚<sup>2)</sup>의 《東醫寶鑑》에서는 補中益氣湯에 대하여 37회<sup>3)</sup>나 언급하고 있으며 “治勞役太甚, 或飲食失節, 身熱而煩, 自汗倦怠”에 사용한다하였고 尹<sup>4)</sup>은 補中益氣湯을 補氣升提와 益氣升陽의 基本方이며 각종 下垂疾患, 泄瀉, 頻尿, 眩暈, 頭痛, 出血 등 氣虛로 인한 질병에 활용하는 方劑라고 하였다. 그밖에도 저혈압증, 만성두통, 만성위장염, 탈항, 자궁탈, 헤르니아, 만성출혈증, 빈발월경, 만성기관지염, 비염, 혈소판감소성 자반병 등의 만성질환이나 抗力 弱화나 免疫機能 低下로 생기는 각종 疾病에 활용하고 있다<sup>5)</sup>.

韓醫學에서는 疾病을 정의할 때 正氣와 邪氣와의 相關 關係로 설명하는데 正氣는 抗病능력이나 정상적인 臟腑 및 人體의 機能을 말하며 邪氣는 疾病을 일으

키는 각종 要因을 말한다<sup>6)</sup>.

이러한 正氣의 生成은 脾胃와 관련이 있으며, 특히 脾胃는 後天之本이며 臟腑氣血의 生化之源이라 하여 正氣 生成의 後天적인 根源이 되며<sup>7)</sup>, “脾胃爲之衛”, “脾胃不受邪”라 하여 邪氣의 침입에 대한 人體 防禦機能의 중요한 역할을 수행한다고 하였다<sup>8,9)</sup>. 그러므로 補中益氣湯의 補元氣, 補脾胃氣虛, 補氣升提 效能은 人體의 免疫機能調節과 밀접한 연관성이 있다고 볼 수 있다.

최근에는 補中益氣湯을 이용한 항암효과<sup>10)</sup>, 면역 및 항알러지 효과<sup>11,12)</sup>, 항스트레스효과<sup>13-15)</sup>, 허약증 개선 효과, 염증성 매개물의 억제 효과<sup>16-19)</sup>, 항류마티스 효과<sup>20)</sup> 등의 연구를 활발히 진행하고 있다. 한편 각종 화학물질의 접촉으로 면역기능의 이상 반응을 초래함으로써, 유발되는 여러 종류의 알러지성 질환은 증가추세에 있으나 이에 대한 補中益氣湯의 실험적 연구는 아직 시도해본 바가 없는 실정이다. 이에 TMA(trimellitic anhydride)로 유도된 접촉성 과민반응(contact hypersensitivity response, CHS)에 관한 補中益氣湯의 免疫調節機能을 연구하였다.

TMA는 인간의 직업성 천식을 유발하는 감작제로 알려져 있으며, 에폭시(epoxy)알키드(alkyd)합성수지, 가소제(plasticizers), 고온중합체(high temperature polymer)그리고 계면활성제(surfactants)를 제조하는데 일반적으로 활용되는 휘발성 유기용매제이다<sup>26-28)</sup>. 휘발성 유기용매인 TMA에 노출되면 이 화합물에 대

Corresponding author : Yonggab Yun, PhD, Professor, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan Blvd 460, Iksan city, Chonbuk, 570-749, South Korea,  
(Tel : 82-63-850-6834, E-mail : yung@wku.ac.kr)

• Recieved 2016/1/8 • Revised 2016/2/11 • Accepted 2016/2/16

한 특이 항체가 생체에 검출되는데, TMA 유도 직업성 천식은 IgE 매개 알러지 기전에 의해 유발되며, 또한 TMA로 감염된 마우스는 폐에 호산구의 침윤이 높게 일어나고<sup>27)</sup>, IgE 항체는 비만세포(mast cell)와 호염구에서 FcεRI와 매우 강력한 결합에 의하여 알러지성 질환을 유발하는 것으로 알려졌다. 이와같이 TMA 화학 항원에 의해 증가된 IgE는 기관지 천식, 알러지성 고초열과 아토피 피부염 등 환경성 질환의 핵심 지표로 알려져 있으며<sup>28,31)</sup> 마우스 모델 연구를 통하여 알러지성 염증(allergic inflammation), 기도 과민반응(airway hyperresponsiveness)과 CHS 반응 등의 기전연구가 진행되어 왔다<sup>29,32)</sup>.

따라서 본 연구는 BALB/c 마우스를 대상으로 TMA에 의해 유도된 귀의 부종, 귀 조직의 백혈구 침윤, 혈청내 IgE와 PGE<sub>2</sub> 생산량 및 비장세포의 Th1와 Th2 사이토카인 생산 등 CHS 반응에 미치는 補中益氣湯의 효과를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 試藥

Trimellitic anhydride (TMA), ConA, aluminium hydroxide, NH<sub>4</sub>Cl는 Sigma-Ardrich사(St Louis,

MO)로부터 구입하였다. RPMI 1640, streptomycin/penicillin, glutamine, 우태아혈청(FBS)는 Gibco/BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, IL-4, IL-5, IL-13와 PGE<sub>2</sub> immunoassay kits는 R&D사(Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하였다. 96 well immunoplate는 Nunc사(Denmark)로부터 구입하였고, Rat anti-mouse IgE mAb, biotin-conjugated monoclonal rat anti-mouse IgE mAb, rat anti-mouse IgG mAb는 PharMingen사(San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다.

#### 2) 藥物的 추출 (water extract of Bojungikgi-tang, BTE) 및 제조

실험에 사용한 黃耆는 3년根으로 충북 제천, 人蔘은 4년根으로 충남 금산, 白朮은 경북 울진, 甘草는 중국 양외1호, 當歸는 강원 진부, 陳皮는 제주, 升麻는 중국, 柴胡는 경북 영천으로 모두 영천의 나눔제약(주)에서 구입하였으며, 약물의 제조는 黃耆 1錢半(5.61g), 人蔘, 白朮, 甘草 각 1錢(3.75g), 當歸, 陳皮 각 5分(1.87g), 升麻, 柴胡 각 3分(1.12g)씩 정량하여 補中益氣湯(22.85g/한첩) 약물조제를 하고 총20첩(457g)을 한약추출기(미강약탕기, ME-727)에 투입하였고, 정수기(하나로, U-2000)에서 정수된 물 5000ml를 첨가하여 100℃에서 2시간 30분 동안 전탕하였다. 추출된 補中益氣湯 2000ml를 동결건조하여 45g의 건조물을 얻고 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Table 1. Oriental Herbal Medicine Composition of Bojungikgi-tang (22.85g/cheop)

| Drug name | Crude drug name              | Scientific name                 | Dose (g) |
|-----------|------------------------------|---------------------------------|----------|
| 黃芪        | Astragali Radix              | <i>Astragalus membranaceus</i>  | 5.61     |
| 人蔘        | Ginseng Radix                | <i>Panax ginseng</i>            | 3.75     |
| 白朮        | Atractylodes Rhizoma alba    | <i>Atractylodes japonica</i>    | 3.75     |
| 甘草        | Glycyrrhiza Radix            | <i>Glycyrrhiza uralensis</i>    | 3.75     |
| 當歸        | Angelicae Radix              | <i>Angelica gigas</i>           | 1.87     |
| 陳皮        | Aurantii nobilis Pericarpium | <i>Citrus unshium</i>           | 1.87     |
| 升麻        | Cimicifuga Rhizoma           | <i>Cimicifuga heracleifolia</i> | 1.12     |
| 柴胡        | Bupleuri Radixhas            | <i>Bupleurum falcatum</i>       | 1.12     |

### 3) 實驗動物

무균환경에서 사육된 7주령의 암컷 BALB/c 마우스는 중앙동물실험실(서울)사로부터 구입하였다. 마우스는 스트레스를 해소하기 위해 1주일간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙동물실험실)와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실험에 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) CHS 반응 유도

마우스 등쪽 털을 안과용 가위로 주의 깊게 자르고 제모크림을 바르고 25℃ 물을 이용하여 털을 제거한 후 아세톤과 올리브 오일 용액(4:1, A/O)에 TMA를 섞어 500 mg/ml TMA용액을 제조하고 감작일에 Lauerma 등<sup>33)</sup>의 방법에 따라 Fig. 1과 같은 프로그램에 의하여 등쪽에 25  $\mu$ l TMA(500 mg/ml)를 바르고 7일 후에 25  $\mu$ l TMA(250 mg/ml)를 2차 감작시켰다. 그 후 14일, 21일과 28일 등 3차례 왼쪽귀에 25  $\mu$ l TMA(100 mg/ml)로 공격하였고, 오른쪽 귀에는 단지 아세톤과 올리브오일 용액(A/O)을 발라주었다.

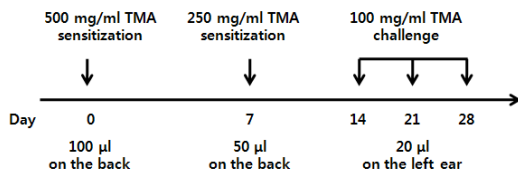


Fig. 1. Schematic diagram of experimental protocol. Mice were sensitized on saved back skin with 100  $\mu$ l of 500 mg/ml TMA on day 0 and 50  $\mu$ l of 250 mg/ml TMA in A/O on day 7. On days 14, 21, and 28, left ears were challenged with 20  $\mu$ l of 100 mg/ml TMA and right ears were applied with 20  $\mu$ l of A/O. Control group received only filtered water for 28 days, 2 days later experimental groups received the different dose of BTE (25–200 mg/kg body weight).

### 2) 藥物의 처리

스트레스가 해소된 8주령의 BALB/c계 마우스를 5 마리씩 구분하여 TMA로 감작하기 30분 전부터 대조군과 실험군은 각각 생리식염수와 약물(25-200 mg/kg 체중)을 하루에 1회씩 경구투여 하였다.

### 3) 귀 부종의 측정

마우스 귀 부종의 측정은 마지막 TMA를 왼쪽 귀에 공격직전과 공격한 다음 8시간 후에 디지털 두께 측정기(Model 7326, Japan)로 측정하였다. 귀 두께는  $10^{-4}$  인치로 표현하였으며, 귀 부종 반응(ear swelling response, ERS)은 다음과 같이 계산하였다.

$$ERS = \text{TMA 공격 후 귀의 두께} - \text{TMA 공격직전 귀의 두께}$$

### 4) 혈청의 IgE, IgG 계열 항체 아형 측정

혈청내 IgE, IgG1 및 IgG2의 정량은 ELISA법으로 측정하였다. 요약하면, anti-mouse IgE, anti-IgG1과 anti-IgG2는 코팅완충액(0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.2)을 이용하여 high binding immunoplate에 well 당 100  $\mu$ l를 주입하고 4℃에서 24시간 방치한 다음 0.1% Tween 20이 포함되어 있는 PBS로 3회 세척하고 3% (wt/vol) BSA-PBS를 주입하고 2시간 동안 블로킹하였다. 혈청은 IgE, anti-IgG1과 anti-IgG2를 측정하기 위해서 1:10으로 희석하였다. 혈청과 항원은 4℃ 상태에서 12시간 이상 방치한 후 0.05% gelatin 용액에 biotin-conjugated monoclonal rat anti-mouse IgE mAb을 주입하고 실온에서 1시간 동안 방치했다. 발색은 avidin-alkaline phosphatase (1:1000)를 주입하고 실온에서 1시간동안 반응 시킨 다음 6회 세척하여 phosphatase 기질인 p-nitrophenylphosphate, disodium을 첨가하고 발색시켜 405 nm에서 microplate reader (Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다. IgE, IgG1 및 IgG2의 측정은 R&D사가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 측정하였다.

## 5) TMA-BSA 결합

TMA와 BSA의 결합은 0.1 M sodium borate 완충액(pH 9.4)에 BSA (10 mg/ml)을 무균 조작하여 녹이고 BSA 1ml 당 1.5 mg의 TMA를 주입하고 실온에서 교반하고 1시간 후에 같은 양의 TMA를 주입한 후 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 5분간 390G로 원심분리하여 상층액을 취하고 인산완충용액 (pH 7.2)에 24시간동안 4℃에서 투석하였다. 투석된 TMA-BSA는 감압동결건조하여 사용할 때까지 4℃ 냉장 상태에서 보관하였다. TMA-BSA의 결합 정도는 Sashidhar 등<sup>34)</sup>의 방법에 따라 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid로 반응시켜 잔여 유리 아미노 그룹에 의해 결정했다.

## 6) 복강 대식세포의 분리 및 배양

TMA로 감염과 공격된 마우스에 Brewer's thioglycollate broth를 마리당 2 ml씩 복강내로 주사기를 이용하여 주입하고 3일 후 마우스를 희생시킨 다음 heparin(5 U/ml)이 첨가된 HBSS 10ml를 복강에 주입하고 복강을腸마사지하였다. 마사지 후 26게이지 10ml용 주사기를 이용하여 복강으로 유입된 세포를 얻은 후 2회 원심 세척하였다. 분리된 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 배양접시에 접종한 후 37℃와 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 2시간 동안 방치하였다. 그 후 대식세포의 다른 세포를 제거하기 위해서 냉각 HBSS를 이용하여 3회 반복 세척하였다. 부착된 생쥐 복강 대식세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 접종한 후 실험 목적에 따라 시간을 정하여 배양하여 사용하였다.

## 7) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약 (Griss

reagent: 0.5%의 설파닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 그 최대 흡수 정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 μl의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 μl씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37℃에서 10분간 반응시켰다. 흡광도는 Spectrophotometer(MD, U.S.A.)로 540 nm에서 측정하였다. 아질산염의 농도 정도는 아질산염의 표준곡선으로부터 계산하였다.

## 8) PGE<sub>2</sub>의 측정

복강대식세포 (5×10<sup>5</sup>/ml)를 여러 가지 농도 (25-200 μg/ml)의 補中益氣湯 추출물로 2시간동안 전 처리한 후 TMA-BSA (3 mg/ml)로 자극 한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 상층액을 얻어 측정된 PGE<sub>2</sub>의 양을 측정하였다. PGE<sub>2</sub>의 측정방법은 R&D사 (Minneapolis, U.S.A.)가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였다.

## 9) 비장세포 배양 및 사이토카인 측정

비장세포는 실험종료 후 즉시 마우스를 희생시키고 마우스의 비장으로부터 얻었다. 단일 세포 부유액은 Ficoll 밀도 원심분리를 통하여 얻은 후 RPMI 1640 배양액으로 2회 원심 세척 후 적혈구를 제거하기 위해서 0.83% NH<sub>4</sub>Cl (pH 7.5)에 37℃에서 10분동안 방치한 다음 다시 배양액으로 3회 세척했다. 그 후 streptomycin (100 μg/ml), penicillin(100 U/ml), glutamine(5 mM)과 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지에 부유시키고 24 well 배양용기에 well 당 5×10<sup>6</sup> 세포의 농도로 접종하고, 3시간 후에 Con A(2 μg/ml)로 자극하고 37℃가 유지되는 CO<sub>2</sub> 배양기(95% 대기/5%CO<sub>2</sub>)에서 48시간동안 배양한 다음 세포 상층액을 얻고 -70℃에서 보관하면서 사이토카인 측정에 사용하였다. 상층액으로부터 IL-4, IL-5 및 IL-13의

immunoassay는 R&D사가 제시한 ELISA 방법에 의하여 측정하였다.

10) 조직학적 실험

조직학적 실험은 마지막 공격을 한 다음 72시간 후에 마우스를 희생시키고, 오른쪽과 왼쪽귀를 자르고 10% 중성 포르말린 완충액(pH 7.4)에 고정한 후 일련의 탈수과정을 거쳐 파라핀에 매몰시킨 후 마이크로톰 (SM 2000R, Leica, Germany)을 이용하여 4 μm로 잘라 조직표본을 제작하였다. 그 후 Wright Giemsa 염색을 하여 다형핵백혈구의 침윤정도를 평가하였으며, Congo red 용액을 이용하여 호산구의 침윤을 현미경 시야에서 관찰하여 세포수를 계산하여 약물을 평가하였다<sup>35)</sup>.

11) 통계처리

모든 실험 값은 평균±표준오차로 표시했으며, 통계 분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

III. 實驗 結果

1. 귀 부종 반응에 미치는 BTE의 억제 효과

스트레스가 해소된 8주령의 BALB/c계 마우스에 TMA로 감각하기 30분 전에 補中益氣湯 추출액(BTE)을 하루에 1회씩 28일간 농도별(25-200 mg/kg)로 경구 투여하여 BTE의 효과를 조사하였다. 그 결과 TMA가 처리된 양성 대조군은 귀의 부종이 Chai 등<sup>36)</sup>의 결과와 같이 매우 심하게 유발되었으나, BTE를 투여한 실험군에서는 농도에 의존적으로 귀의 부종이 감소되었다(Fig. 2). 특히, 100 mg/kg과 200 mg/kg BTE 투여군에서는 그 억제효과가 현저했다(p<0.01).

2. 백혈구 침윤에 미치는 BTE의 효과

BTE와 TMA 마지막 공격 후 72시간에 귀 조직 표

본을 제작하여 만들어 Wright Giemsa와 Congo red 염색을 하여 다형핵백혈구(polymorphonuclear leukocytes, PMNLs)와 호산구(eosinophils, Eos)의 침윤에 미치는 BTE투여 효과를 조사하였다. 그 결과 BTE와 TMA가 처리되지 않은 음성 대조군은 귀조직의 진피(dermis)층에 혈관이 확장되었고, 표피층(epidermis)에 다형핵백혈구와 호산구가 mm당 각각 537.8±98.7개와 265.3±57.3개로 매우 높은 세포의 침윤이 관찰되었다(Fig. 3과 4). 그러나 다형핵백혈구의 경우 BTE 투여군은 농도에 의존적으로 억제 되었으며, 50-200 mg/kg 농도에서는 다형핵백혈구의 침윤이 현저히 억제되었다(Fig. 3). 또한 호산구의 경우에도 BTE 투여군은 농도에 의존적으로 억제 되었으나, 100 mg/kg 농도 이상에서 유의하게 억제 효과가 있었다(Fig. 4).

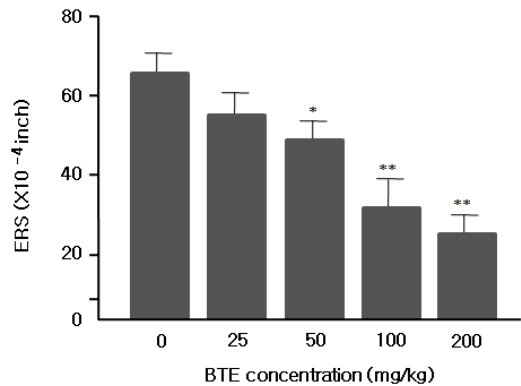


Fig. 2. Effects of BTE on ear swelling responses (ERS) following TMA challenge in the ears of BALB/c mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25-100 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. ERS were analyzed as described in Materials and Methods. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 versus control group treated with TMA alone.

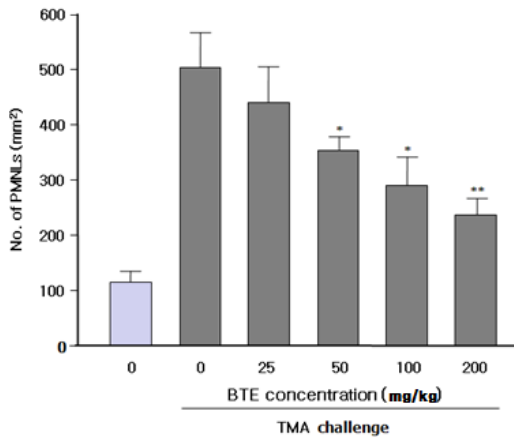


Fig. 3. Effects of BTE on infiltration of polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) following TMA challenge in the ears of BALB/c mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–100 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. 4 μm thickness paraffin sections (ear tissue) were stained with Wright Giemsa solution. The number of PMNLs per unit area mm<sup>2</sup> was analyzed as described in Materials and Methods. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group treated with TMA alone.

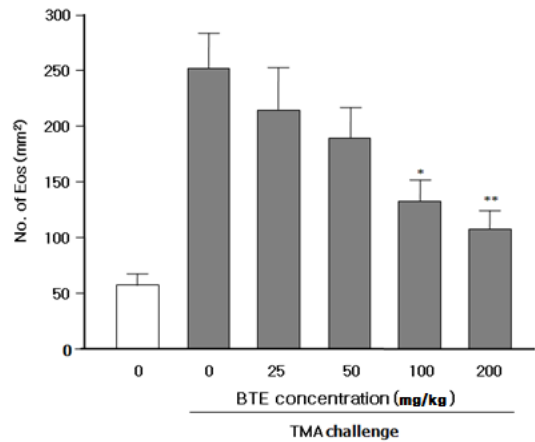


Fig. 4. Effects of BTE on infiltration of eosinophils (Eos) following TMA challenge in the ears of BALB/c mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–100 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment, 4 μm thickness paraffin sections (ear tissue) were stained with Congo red solution. The number of Eos per unit area mm<sup>2</sup> was analyzed as described in Materials and Methods. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group challenged with TMA alone.

### 3. 혈청의 IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b 생산에 미치는 BTE의 억제 효과

TMA 화학 항원의 감작과 공격에 의한 IgE, IgG1, IgG2a와 IgG2b 생산에 BTE의 효능을 조사하기 위하여 귀 부종 실험과 같이 BTE가 처리된 마우스의 귀 두께를 측정 후 심장으로 부터 혈액을 얻어 4℃ 냉장상태에서 충분히 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 얻고 IgE, IgG1, IgG2a와 IgG2b 생산에 미치는 BTE의 효과를 ELISA 방법으로 조사하였다.

그 결과 Fig. 5와 같이 TMA로 처리되지 않은 음성대조군의 경우 IgE는 거의 생산되지 않은 반면, TMA가 처리된 양성대조군에서는 현저히 증가되었다. 그러나 TMA와 BTE가 처리된 저농도(25 mg/kg)에서는 IgE 양이 감소되지 않았지만, 50 mg/kg 처리군( $p < 0.05$ )과 100-200 mg/kg 처리군( $p < 0.01$ )에서는 현저히 감소되었다.

TMA만 처리했을 경우 처리되지 않은 음성대조군에 비해 IgG1, IgG2a와 IgG2b의 생산량이 증가되었지만, TMA와 BTE가 처리된 경우 25-100 mg/kg 실험

군에서는 이들 항체 생산량에 변화가 없었다. 고농도의 BTE(200 mg/kg)의 경우에만 IgG1, IgG2a와 IgG2b 등 항체 생산이 감소되는 현상이 있었다(Fig. 6-8). 이러한 결과는 BTE가 알러지 유발 항체인 IgE의 생산은 효과적으로 줄여주는 반면, 면역기능 강화에 필요한 IgG의 생산에 있어서는 큰 영향을 주지 않는 효과가 있음을 제시했다.

#### 4. 복강 대식세포의 NO 생산에 미치는 BTE의 억제 효과

TMA 화학 항원의 감각과 공격된 마우스의 복강 대식세포의 NO생산에 미치는 BTE의 효능을 알아보기 위하여 복강 대식세포( $5 \times 10^5/ml$ )를 접종하고 3시간 후에 BTE을 25-200  $\mu g/ml$ 의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 3 mg/ml의 TMA-BSA로 자극하여 24시간 배양하여 상층액을 취하고 측정된 아질산염을 측정하였다.

그 결과 Fig. 9와 같이 TMA와 BSA를 각각 처리할 경우 아무런 약물이 처리되지 않은 음성대조군과 비슷하게 NO의 생산에는 영향을 주지 못했지만, TMA와 BSA가 결합된 약물로 자극할 경우 Valstar 등<sup>37)</sup>의 결과와 같이 많은 양의 NO가 생산되었다. 그러나 BTE을 처리할 경우 농도에 의존적으로 억제하는 효과가 있었다. 특히 100-200 mg/kg의 농도에서는 그 억제효과가 현저했다( $P < 0.01$ ). 이러한 결과는 BTE가 염증매개물인 NO의 생산을 억제하는 효과가 있다는 것을 제시해 주었다.

#### 5. 복강 대식세포 PGE<sub>2</sub> 생산에 미치는 BTE의 억제 효과

TMA 화학 항원의 감각과 공격된 마우스의 복강 대식세포의 PGE<sub>2</sub>생산에 미치는 BTE의 효능을 알아보기 위하여 복강 대식세포( $5 \times 10^5/ml$ )를 접종하고 3시간 후에 BTE을 25-200  $\mu g/ml$ 의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 3 mg/ml의 TMA-BSA로 자극하여 24

시간 배양하여 상층액을 취하고 측정된 PGE<sub>2</sub>을 ELISA법으로 측정하였다.

그 결과 Fig. 10와 같이 TMA와 BSA를 각각 처리할 경우 아무런 약물이 처리되지 않은 음성대조군과 비슷하게 PGE<sub>2</sub>의 생산에는 영향을 주지 못했지만, TMA와 BSA가 결합된 약물로 자극할 경우 많은 양의 PGE<sub>2</sub>가 생산되었다. 그러나 BTE을 처리할 경우 농도에 의존적으로 억제하는 효과가 있었다. 특히 100-200 mg/kg의 농도에서는 그 억제효과가 현저했다( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). 이러한 결과는 BTE가 염증매개물인 PGE<sub>2</sub>의 생산을 억제하는 효과가 있다는 것을 제시해 주었다.

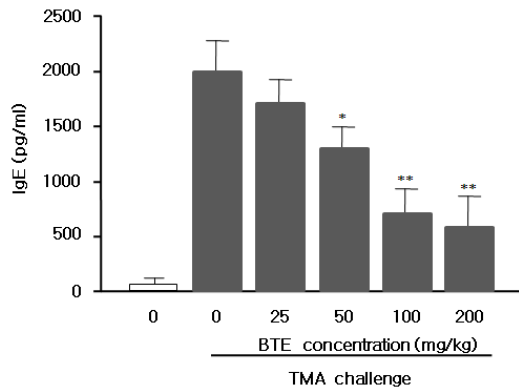


Fig. 5. Effects of BTE on IgE production following TMA challenge in the ears of BALB/c mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–200 mg/kg) for 28 days. During the experimental period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. Serum was collected at 4 weeks. IgE production was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group challenged with TMA alone.



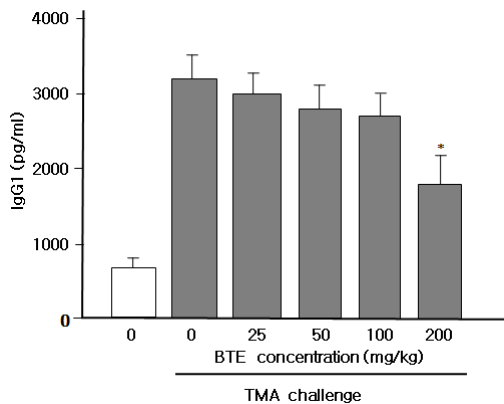


Fig. 6. Effects of BTE on IgG1 production following TMA challenge in the ears of BALB/c mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–200 mg/kg) for 28 days. In the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE one time per day 30 min before TMA treatment. Serum was collected at 4 weeks. IgG1 production was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p$ <0.05 versus control group challenged with TMA alone.

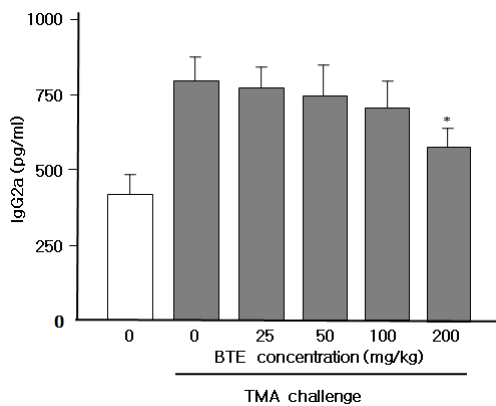


Fig. 7. Effects of BTE on IgG2a production following TMA challenge in the ears of BALB/c mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–200 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin

one time per day 30 min before TMA treatment. Serum was collected at 4 weeks. IgG2a production was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p$ <0.05 versus control group challenged with TMA alone.

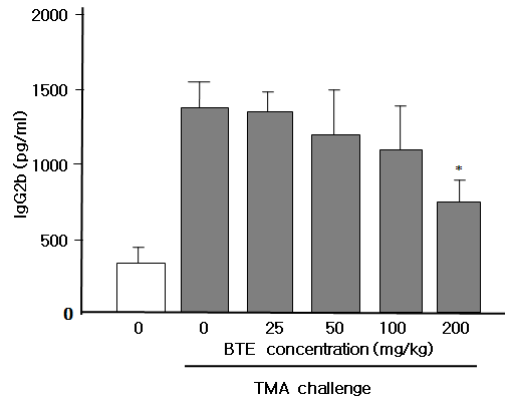


Fig. 8. Effects of BTE on IgG2b production following TMA challenge in the ears of BALB/c mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–200 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. Serum was collected at 4 weeks. IgG2b production was analysed using an ELISA assay. Each column represents the mean  $\pm$  S.D. from 5 mice. \* $p$ <0.05 versus control group challenged with TMA alone.

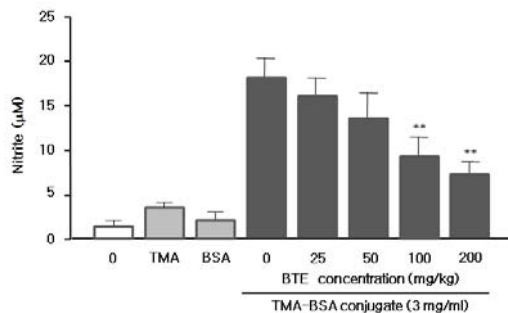


Fig. 9. Effects of BTE on NO production by BSA-conjugated TMA in peritoneal macrophages

isolated from TMA-treated mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–100 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. Peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5$ /well plate) from BALB/c mice were cultured and stimulated as described in Materials and Methods. NO level was measured in the culture media by the method of Griess. Data are means  $\pm$  SD of three independent experiments.  $**p < 0.01$  versus control group treated with BSA-conjugated TMA.

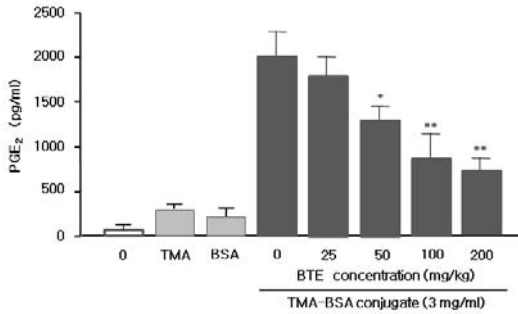


Fig. 10. Effects of BTE on PGE<sub>2</sub> production by BSA-conjugated TMA in peritoneal macrophages isolated from TMA-treated mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–100 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. Peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5$ /well plate) from BALB/c mice were cultured and stimulated as described in Materials and Methods. PGE<sub>2</sub> level was measured in the culture media by ELIS mg/kg assay. Data are means  $\pm$  SD of three independent experiments.  $**p < 0.01$  versus control group treated with BSA-conjugated TMA.

## 6. 비장세포의 Th2 사이토카인의 생성에 미치는 BTE의 효과

TMA 화학 항원의 감각과 공격에 의한 비장세포의 Th1과 Th2 사이토카인의 생성에 미치는 BTE의 효과를 알아보기 위하여 BTE와 TMA가 처리된 마우스를 대상으로 비장세포를 분리한 후 ConA로 동시에 자극한 다음 IL-4는 24시간, IL5와 IL-13은 48시간 배양 후 사이토카인을 측정하였다.

호산구의 침윤과 B세포를 자극하여 IgE 생산에 중요한 영향을 미치는 Th2 사이토카인인 IL-4의 경우 Fig. 11과 같이 TMA를 처리한 양성대조군은 아무런 약물이 처리되지 않은 음성대조군에 비해 현저히 IgE를 증가시켰다. 그러나 BTE가 처리된 경우 농도의존적으로 현저히 억제하는 효과가 있었다.

호산구의 활성 인자이고 T 세포 활성 및 염증반응을 유발하는데 중요한 역할을 하는 Th2 사이토카인으로 알려진 IL-5의 경우도 IL-4와 유사하게 BTE의 농도에 의존적으로 현저히 억제하는 효과가 있었다 (Fig. 12).

한편 IL-4와 유사하게 작용하는 Th2 사이토카인인 IL-13의 경우도 BTE의 농도에 의존적으로 현저히 억제하는 효과가 있었다(Fig. 13).

이러한 결과는 BTE가 Th2 사이토카인을 효과적으로 억제하여 TMA 화학 항원에 대한 접촉성 알러지 반응을 차단하는 결과로 볼 수 있다.

## IV. 考 察

補中益氣湯은 한국, 중국, 일본을 비롯한 동양권에 서 중기하함(中氣下陷)의 병리 및 비위질환(脾胃疾患)에 광범위하게 활용되어 왔는데, 특히, 心身疲勞, 胃下垂, 子宮出血, 脫肛, 慢性腸炎, 肺結核, 肋膜炎을 비롯한 癌 등의 치료에 사용해왔다<sup>4,5)</sup>. 최근에는 補中益氣湯은 항암<sup>10)</sup>, 면역 및 항알러지<sup>11,12)</sup>, 항스트레스<sup>13-15)</sup>, 허약증 개선, 항관절염<sup>20)</sup>, 항염효과<sup>16-19)</sup> 등 다양

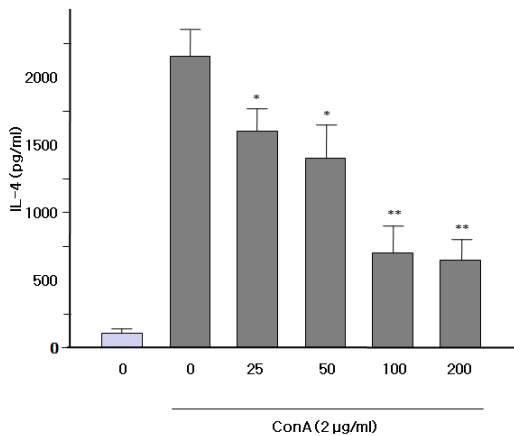


Fig. 11. Effects of BTE on IL-4 production by ConA (2 µg/ml) in spleen cells isolated from TMA-treated mice. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–100 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. Spleen cells were isolated and cultured and stimulated as described in Materials and Methods. IL-4 level was measured in the culture media by ELISA assay. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group treated with ConA alone.

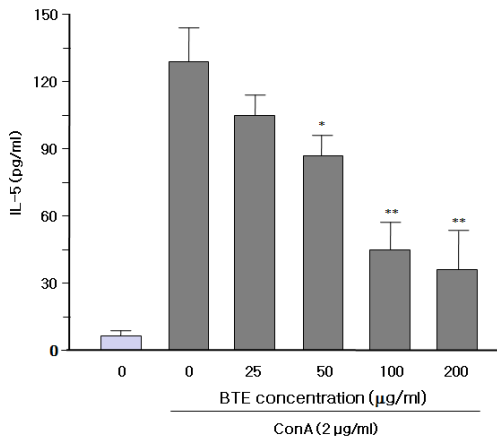


Fig. 12. Effects of BTE on IL-5 production by ConA (2

µg/ml) in spleen cells isolated from mice challenged with TMA. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–100 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. Spleen cells were cultured and stimulated as described in Materials and Methods. IL-5 level was measured in the culture media by ELISA assay. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group treated with ConA alone.

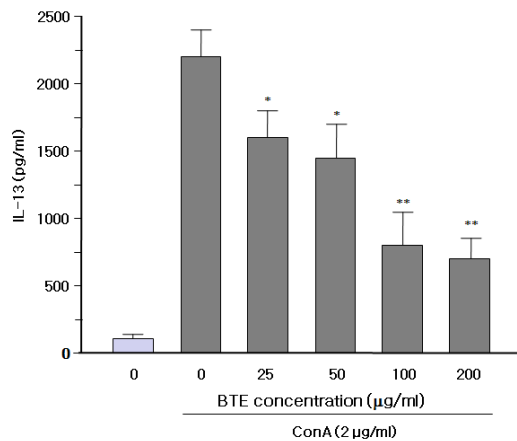


Fig. 13. Effects of BTE on IL-13 production by ConA (2 µg/ml) in spleen cells isolated from mice challenged with TMA. Mice were orally administrated with or without BTE of different doses (25–100 mg/kg) for 28 days. During the challenge period, mice were externally applied with different doses of BTE to dorsal skin one time per day 30 min before TMA treatment. Spleen cells were cultured and stimulated as described in Materials and Methods. IL-13 level was measured by ELISA assay. Each column represents the mean ± S.D. from 5 mice, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus control group treated with ConA alone.

한 효과가 있는 것으로 보고되었다.

최근의 補中益氣湯에 대한 연구는 대식세포 및 자연살해세포(natural killer cell)의 활성화, 항박테리아, 항진균 및 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 항류마티스관절염, 항알러지 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>11-38)</sup>.

과민반응(contact hypersensitivity response, CHS)은 T림프구가 매개하는 제 4형 과민반응으로 다양한 항원(antigen)들에 의해 유발될 수 있는데, 그 속도가 느리다는 특징이 있다<sup>21,22)</sup>. CHS는 주로 금속 또는 유기용매와 같은 물질에 의한 합텐(hapten)에 의해 흥반, 면역세포 침윤 및 접촉성 피부염으로 발전되는데, Th1과 Th2 세포가 매개하는 사이토카인의 작용에 의해 일련의 염증반응이 유발 된다<sup>23-25)</sup>.

CHS 반응에 대한 기전 및 임상연구에 활용되는 모델동물은 주로 마우스인데, 유기용매와 같은 화학 항원으로 감작(sensitization)과 공격(challenge)을 통해 CHS 반응 유발에 따른 약물의 기전 및 효능 평가를 할 수 있다. 이때 중요한 평가 생물지표로는 IgE, nitric oxide(NO), prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 및 Th2 사이토카인의 발현과 관련된 일련의 작용 기전에 초점을 두어 많은 연구들이 진행되어왔다<sup>22,25)</sup>.

그러나 TMA로 유발한 CHS 모델 마우스에서 補中益氣湯 추출물(BTE)의 효능에 대한 연구는 없는 실정으로 본 연구는 TMA로 유도된 CHS를 BALB/c 마우스를 대상으로 귀 부종, 혈청내 IgE, IgG1, IgG2a와 IgG2b의 생산량과 ConA로 자극된 비장세포의 Th2 사이토카인 생산량, 조직내 백혈구 침윤과 TMA-BSA 자극에 의한 NO와 PGE<sub>2</sub>의 효과를 조사한 결과 매우 유의한 결과를 얻었다.

휘발성 유기용매인 TMA에 노출되면 이 화합물에 대한 특이 항체가 생체에 검출되는데, TMA 유도 직업성 천식은 IgE 매개 알러지 기전에 의해 유발되는 것으로 알려졌다. 또한 TMA로 감작된 마우스는 폐에 호산구의 침윤이 높게 일어나고<sup>28,31)</sup>, IgE 항체는 비만세포(mast cell)와 호염구에서 Fcε RI와 매우 강력한

결합에 의하여 알러지성 질환을 유발하는 것으로 알려졌다. 이와 같이 TMA 화학 항원에 의해 증가된 IgE는 기관지 천식, 알러지성 고초열과 아토피 피부염 등 환경성 질환의 핵심 지표로 알려졌다<sup>28,31)</sup>.

본 연구는 Lauerma 등<sup>33)</sup>의 방법에 따라 TMA를 이용하여 BALB/c 마우스를 대상으로 CHS를 유도하여 Chai 등<sup>36)</sup>의 자료와 비슷한 결과(Fig. 2)를 확인한 후 BTE를 투여한 결과 TMA유도 귀의 부종이 BTE의 농도에 의존적으로 현저한 억제효과가 있음을 보여 주고 있다.

TMA를 반복적으로 피부에 노출시킨 결과 진피층의 혈관이 확장되어 있음을 확인하고, 표피층에 다형 핵백혈구와 호산구의 침윤이 매우 높게 나타났음을 확인하였다. 그러나 補中益氣湯이 투여된 실험군에서는 진피층의 혈관 확장이 줄어들었을 뿐만 아니라 표피층내 백혈구 침윤이 현저히 억제된 결과를 얻었다(Fig. 3과 4). 피부의 조직학적 관찰은 인간에서 나타나는 지연형 CHS 반응의 진단에 핵심적 도구<sup>39,40)</sup>일 뿐만 아니라 모델동물에서도 귀 부종에 원인인 호산구 및 호염구의 진피층 및 표피층에 침윤되는 정도에 따라 귀의 부종의 정도를 확인하는데 필수적인 자료로 이용 된다.

이와같은 실험결과는 접촉성 피부의 과민반응질환에 補中益氣湯을 활용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

환경성 항원은 일반적으로 인체 및 모델 동물의 혈청내 IgE 항체량을 높이는 것으로 알려져 있는데, 증가된 IgE는 비만세포와 호염구에서 Fcε RI와 매우 높은 결합을 통하여 기관지염, 알러지성 고초열, 아토피성 피부염 등과 같은 환경성 알러지성 질환을 유발한다<sup>28-32)</sup>.

본 연구의 결과 BTE를 처리할 경우 혈청내 IgE을 효과적으로 억제(Fig. 4)한 반면, 면역능 향상에 도움을 주는 IgG 계열의 아형에는 고농도(200 mg/kg)에서만 억제하는 경향을 보였고 25-100 mg/kg에서는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 조사되었다. 즉 IgE는 효

과적으로 억제하지만 IgG계열에 대하여서는 억제작용이 없음을 보여주고 있다. 따라서 이와 같은 결과는 補中益氣湯이 IgE와 IgG계열 등의 억제와 항진조절을 통하여 친환경성 알러지 질환에 활용할 수 있음을 시사해주고 있다.

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 일반적으로 대식세포를 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생하면서 활성화 된다. 또한 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 활성화된 대식세포로부터 과량의 PGE<sub>2</sub>와 같은 prostanoid생성은 면역반응에 관여하여 다양한 염증성 질환의 원인이 된다. 최근에 Valstar 등<sup>37)</sup>은 TMA 또는 BSA 단독이 아닌 TMA와 BSA를 결합시킨 약물을 이용하여 TMA로 감염된 Rat로부터 분리한 세포와 Rat 유래 AM세포 주로 알려진 NR8383을 대상으로 NO, TNF와 IL-6의 생산능에 미치는 영향을 조사한 결과 이들 염증매개물을 현저히 증가시키는 효과를 보고하였다.

본 연구에서도 Valstar 등<sup>37)</sup>의 방법에 준하여 TMA와 BSA를 결합시켜 TMA로 감염된 마우스 대식세포를 TMA-BSA로 자극한 결과 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생산에 현저히 증가되었으나, BTE를 전 처리할 경우 증가된 NO와 PGE<sub>2</sub>가 BTE의 농도에 의존적으로 현저히 억제하는 효과가 있었다(Fig. 9와 10). 이러한 결과는 補中益氣湯이 TMA와 같은 휘발성 유기용매에 노출되어 발생된 염증반응을 억제시키는 효과가 있음을 시사해 주고 있다. 따라서 유해환경으로 발생하는 알러지성 염증질환에 補中益氣湯을 활용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

CHS 반응은 T 림프구가 매개하는 제 4형 과민반응으로 유해환경에 있는 다양한 항원들에 의해 유발

될 수 있는 것으로 알려졌다<sup>21,22)</sup>. CHS는 TMA와 같은 유기용매에 의한 합텐(hapten)에 의해 흥반, 면역세포 침윤 및 접촉성 피부염으로 발전되는데, Th2 세포가 매개하는 사이토카인의 작용에 의해 일련의 염증반응이 동반 된다고 하였다. 최근 Hopkins 등은 림프절 유래 세포에 TMA를 노출시킨 결과 Th1 사이토카인이 아닌 Th2 사이토카인을 선택적으로 증가시키는 결과를 얻고 TMA를 Th2 유도성 화학 항원으로 규정한 바 있다.

본 연구에서는 TMA에 노출된 마우스의 혈청이 아닌 비장세포를 ConA로 자극하여 Th2 사이토카인에 속하는 IL-4, IL-5와 IL-13의 생산량을 조사해본 결과 TMA로 감염과 공격된 마우스의 비장세포에서는 IL-4, IL-5와 IL-13 등 Th2 사이토카인을 모두 증가시켰다. 그러나 BTE가 처리된 마우스의 비장세포는 이들 사이토카인을 농도의존적으로 현저한 억제효과를 나타냈다(Fig. 11-13). 이와같은 결과는 補中益氣湯이 유해환경에 노출되어 발생하는 Th2 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 시사하고 있다.

최근에는 補中益氣湯 추출물(TJ-41)이 집먼저진드기 항원으로 유도된 아토피 피부염 모델동물인 NC/NgA 마우스의 혈청내 IgE의 생산을 억제하는 효과를 보고 하였고, 또한 補中益氣湯 추출물(HET)은 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)에 의한 접촉성 과민 반응에 있어서도 IL-4를 현저히 억제하는 효과<sup>28)</sup>가 있는 것을 보고하고 있다.

이상의 결과를 종합해볼 때 補中益氣湯은 TMA로 유도된 귀 부종, 혈청내 IgE, 복강 대식세포의 NO와 PGE<sub>2</sub>, 비장세포의 Th2 생산 및 귀 조직내 진피층의 백혈구 침윤을 억제하는 효과가 있었다.

따라서 TMA와 같은 환경성 화학 항원에 노출된 알러지성 질환 치료에 補中益氣湯을 유용하게 활용할 수 있음을 보여주고 있으며, 이에 대한 자세한 작용기전은 앞으로도 계속 연구되어야 할 것으로 思料된다.

## V. 結 論

黃芪, 人蔘, 白朮, 甘草, 當歸, 陳皮, 升麻, 柴胡로 배오된 補中益氣湯은 傳統的으로 중기하함(中氣下陷)의 병리 및 면역기능저하에 광범위하게 활용되어 왔으나, 접촉성 면역반응에 대한 구체적인 연구가 없는 실정이다. 이에 補中益氣湯 추출물(BTE)의 효과를 검증하기 위하여 본 연구는 TMA로 유도된 마우스의 귀 부종, 혈청내 IgE, IgG1, IgG2a와 IgG2b와 TMA-BSA유도 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생산량, 그리고 ConA로 자극된 비장세포의 Th2 사이토카인 생산량 및 조직내 백혈구 침윤에 대해 조사하였다.

그 결과 귀의 부종뿐만 아니라 혈청 IgE와 조직내 백혈구 침윤을 농도의존적으로 억제하였다. 또한 TMA-BSA로 자극된 복강 대식세포의 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생산에 있어서도 농도 의존적으로 억제하는 효과가 있었다. 더욱이 ConA로 자극하여 활성화된 마우스 비장세포의 Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) 사이토카인의 생산을 억제시키는 효과도 있었다.

이상의 결과에서 補中益氣湯 추출물(BTE)이 TMA로 유도된 접촉성 과민반응을 억제하는 작용이 있음을 보여주고 있다. 따라서 補中益氣湯은 유해한 환경에 노출되어 유발될 수 있는 각종 알러지성 질환에 사용할 수 있는 方劑임을 제시하고 있다.

## 감사의 글

이 논문은 2015학년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 수행됨.

## References

1. Lee DW. Dongwonuijip. Beijing;inmin-wisaengchulpansa, 1993:17-8.
2. Heo J. Newly Cross-translated Donguibogam, Seoul;Beobinmunhwasa, 1999:1142.
3. Heo J. Donguibogam seeing tangjeung. Daejeon;Obigihoeok, 2003:238-47.
4. Yun YG. Graphic Korea Oriental Medical Traditional Medicine Formulae and prescription supplement Commentary. Seoul;Uiseongdang, 2002:485-502.
5. The Kobe Research Institute of Traditional Chinese Medicin. Cheonjin Prescription explanation, Seoul;Seongbosa, 1995:45-9.
6. Kim WH, Choi DY. The organs Differential Treatment. Seoul;Seongbosa, 1988:50, 201, 381.
7. Wang G. Compilation, Hwangjenaegyongsomung-eumseok, Seoul;Seongbosa, 1983:93-100.
8. Yang YG. Compilation, Hwangjenaegyongyeongchuyeokae. Taipei;taeryeongukpungchulpansa, Gungmin65nyeon:295.
9. Jang G. Geumgweyoryak. Beijing;inmin-wisaengchulpansa, 1989:24.
10. Noh SS. Study on Apoptosis Effect and Mechanism by Bojungikkintang on Hunman Cancer Cell Line H460. Wonkwang University. 2004:1-37.
11. Nakada T, Watanabe K, Matsumoto T, Santa K, Triizuka K, Hanawa T. Effect of orally administered Hochu-ekki-to, a Japanese herbal medicine, on contact hypersensitivity caused by repeated application of antigen. Int Immunopharmacol, 2002;2(7):901-11.
12. Gao XK, Fuseda K, Shibata T, Tanaka H, Inagaki N, Nagai H. Kampo Medicines for Mite Antigen-Induced Allergic Dermatitis in NC/Nga Mice. Evid Based Complement Alternat Med, 2005;2(2):191-9.
13. Kimura M, Sasada T, Kanai M, Kawai Y,

- Yoshida Y, Hayashi E, et al. Preventive effect of a traditional herbal medicine, Hochu-ekki-to, on immunosuppression induced by surgical stress. *Surg Today*. 2008;38(4):316-22.
14. Yamaoka Y, Kawakita T, Nomoto K. Protective effect of a traditional Japanese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: Hochu-ekki-to), on the restraint stress-induced susceptibility against *Listeria monocytogenes*. *Immunopharmacology*. 2000; 48(1):35-42.
15. Li T, Tamada K, Abe K, Tada H, Onoe Y, Tatsugami K, et al. The restoration of the antitumor T cell response from stress-induced suppression using a traditional Chinese herbal medicine Hochu-ekki-to (TJ-41:Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang). *Immunopharmacology*. 1999;43 (1):11-21.
16. Yamaya M, Sasaki T, Yasuda H, Inoue D, Suzuki T, Asada M, et al. Hochu-ekki-to inhibits rhinovirus infection in human tracheal epithelial cells. *Br J Pharmacol*. 2007;150(6):702-10.
17. Shinozuka N, Tatsumi K, Nakamura A, Terada J, Kuriyama T. The traditional herbal medicine Hochuekkito improves systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Geriatr Soc*. 2007;55(2):313-4.
18. Nakada T, Watanabe K, Matsumoto T, Santa K, Triizuka K, Hanawa T. Effect of orally administered Hochu-ekki-to, a Japanese herbal medicine, on contact hypersensitivity caused by repeated application of antigen. *Int Immunopharmacol*. 2002;2(7):901-11.
19. Ishimitsu R, Nishimura H, Kawauchi H, Kawakita T, Yoshikai Y. Dichotomous effect of a traditional Japanese medicine, bu-zhong-yi-qi-tang on allergic asthma in mice. *Int Immunopharmacol*. 2001;(5):857-65.
20. Hai le X, Kogure T, Niizawa A, Fujinaga H, Sakakibara I, Shimada Y, et al. Suppressive effect of hochu-ekki-to on collagen induced arthritis in DBA1J mice. *J Rheumatol*. 2002;29(8):1601-8.
21. Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today*. 1998;19:37-44.
22. Kim JY, Choi SP, La SJ, Seo JS, Kim KK, Nam SH, et al. Constitutive expression of 4-1BB on T cells enhances CD4(+) T cell responses. *Exp Mol Med*. 2003;35:509-17.
23. Piguet PF, Grau GE, Vassalli P. Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, capillaries, and epidermal cells, or massive tissue necrosis. *Am J Pathol*. 1990;136:103-10.
24. Kondo S, Pastor S, Fujisawa H, Shivji GM, McKenzie RC, Dinarello CA, et al. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 1995;105:334-8.
25. Wang B, Esche C, Mamelak A, Freed I, Watanabe H, Sauder DN. Cytokine knockouts in contact hypersensitivity research. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:381-9.
26. Mapp C, Boschetto P, Miotto D, de Rosa E, Fabbri LM. Mechanisms of occupational asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999;23:214-64.
27. Zhang XD, Murray DK, Lewis DM, Siegel

- PD. Dose-response and time course of specific IgE and IgG after single and repeated topical skin exposure to dry trimellitic anhydride powder in a Brown Norway rat model. Munksgaard international Publishers, 2002;57:620-6.
28. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, 1989;7:625-55.
  29. Haile S, Lefort J, Eum EY, Dumerey C, Huerre M, Heusser C, et al. Suppression of immediate and late responses to antigen by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody in a murine model of asthma. *Eur Respir J*, 1989;13:961-9.
  30. Tumas DB, Chan B, Werther W, Wrin T, Vennari J, Desjardin N, et al. Anti-IgE efficacy in murine asthma models is dependent on the method of allergen sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 2001;107:1025-33.
  31. Yokozeki H, Wu MH, Sumi K, Igawa K, Miyazaki Y, Katayama I, et al. Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice. *Clin Exp Immunol*, 2003;132:385-92.
  32. Coyle AJ, Wagner K, Bertrand C, Tsuyuki S, Bews J, Heusser C. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: Inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J Exp Med*, 1996;183:1303-10.
  33. Lauerma AI, Fenn B, Maibach HI. Trimellitic anhydride-sensitive mouse as an animal model for contact urticaria. *J Appl Toxicol*, 1997;17:357-60.
  34. Sashidhar RB, Capoor AK, Ramana D. Quantitation of  $\epsilon$ -amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzene sulfonic acid. A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *J Immunol Methods*, 1994;167:121-7.
  35. Song CH, Galli SJ, Lantz CS, Hu X, Stevens RL, Friend DS. 13 congo red staining of intraepithelial mucosal mast cells. *J Histochem Cytochem*, 1999;147:1645C-1645.
  36. Chai OH, Lee HK, Lee YC, Lee MS, Han EH, Kim HT, et al. Roles of TNF- $\alpha$  and IgE in the late phase of contact hypersensitivity induced by trimellitic anhydride. *Exp Mol Med*, 2005;37(5):408-17.
  37. Valstar DL, Schijf MA, Stelekati E, Nijkamp FP, Bloksma N, Henricks PA. Trimellitic anhydride-conjugated serum albumin activates rat alveolar macrophages in vitro. *J Occup Med Toxicol*, 2006;23:1-13.
  38. Cho S, Hong T, Kaneko A, Yoshino G, Sato N, Kikuchi K, et al. Evaluation of immunological effects of hochu-ekki-to (TJ-41) prophylactic administration in mice. *Am J Chin Med*, 2004;32(2):235-43.
  39. Dvorak AM, Mihm MC, Dvorak HF. Morphology of delayed type hypersensitivity reactions in man. II. Ultrastructural alterations affecting the microvasculature and the tissue mast cells. *Lab Invest*, 1976; 34:179-91.
  40. Dvorak HF, Mihm MC, Dvorak AM, Johson



RA, Manseau EJ, Morgan E, et al, Morphology of delayed-type hypersensitivity reactions in man. I. Quantitative description of the inflammatory response. Lab Invest. 1974; 31:111-30.