

# 생쥐의 B 細胞에서 면역글로블린 E의 분비와 사이토카인 생산에 대한 加味六君子湯의 효과

김운길 · 김동희<sup>1</sup> · 박양춘\*

대전대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 대전대학교 한의과대학 병리학교실

## Effects of Kamiyukgunja-tang on anti-CD40 and Recombinant Interleukin-4 induced Cytokine Production and Immunoglobulin E in Highly Purified Mouse B Cells

Woon Gil Kim, Dong Hee Kim<sup>1</sup>, Yang Chun Park\*

Department of internal medicine, Oriental Medical Collage, 1: Department of Pathology, Oriental Medical Collage, Daejeon University.

In order to evaluate the antiallergic effects of Kamiyukgunja-tang (KYGJT), studies were done. We measured the cytotoxic activity for lung fibroblast cell, cytokines transcript expression, production of INF- $\gamma$ , IL-10, IL-4, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-5 proliferation of B cell in anti-CD40mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells. The results were obtained as follows : 1. KYGJT was not showed cytotoxicity in the fibroblast lung cell. 2. KYGJT increased the gene synthesis of INF- $\gamma$ , IL-10, GM-CSF(m-RNA). 3. KYGJT decreased the gene synthesis of IL-1 $\beta$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-5(m-RNA). 4. KYGJT decreased the appearance of TNF- $\alpha$  significantly. 5. KYGJT decreased the appearance of IgE significantly. 6. KYGJT decreased the proliferation of B cell significantly. 7. KYGJT decreased the appearance of Histamin Release Production significantly. The facts above prove that KYGJT is effective against the allergy. Thus, I think that we should study on this continuously

Key words : Kamiyukgunja-tang(加味六君子湯), antiallergic, cytotoxicity, B cells, cytokines

### 서 론

알레르기란 人體가 外部로부터 침입한 異物質에 對항하여 나타나는 免疫反應이 자신에게 有害하게 作用하는 것으로 過敏免疫反應<sup>1)</sup>이라고도 하는데, 最近 多様な 環境의 變化로 持續的으로 增加하고 있다<sup>2)</sup>. 알레르기 反應에서 第一型 過敏免疫反應은 IgE 媒介 過敏免疫反應이라고도 불리는데 抗原에 對한 IgE 抗體가 生産되어 이 抗體가 組織 肥滿細胞와 血液 好鹽基球에 結合되면 이들 細胞는 細胞內 顆粒들이 破壞되면서 藥理學的 活性媒介物質을 分泌하고 이들 媒介 物質은 血管擴張과 平滑筋 收縮 등을 일으킨다<sup>3)</sup>. 本 試料인 加味六君子湯은 六君子湯에 化痰止咳平喘하는 蘇子, 白芥子, 紫菀, 款冬花, 桑白皮와 健脾燥濕하는 厚朴, 蒼朮, 薏苡仁과 消食健胃하는 砂仁, 山查肉, 神麩, 麥芽,

鷄內金を 加한 處方으로 大田大學校附屬韓方病院 肺系內科에서 氣管支喘息 등의 緩解期에 多用하는 處方이다. 최근 韓方 處方 및 韓藥의 抗알러지 效果에 對한 實驗的 研究가 多様하게 이루어지고 있으나<sup>4~8)</sup>, 加味六君子湯에 對한 연구는 接하지 못하였다. 이에 著者는 보다 効果적인 항알러지 處方 開發을 위한 一環으로 먼저 臨床에서 多用되고 있는 加味六君子湯의 항알러지 作用 機轉을 檢索하고, 構成 藥物間의 相乘 作用에 對한 基礎 資料를 提 供하고자, 이를 試料로 B 細胞에서 다양한 사이토카인 生産과 發 顯, IgE 發顯, 히스타민 방출 및 B 細胞의 細胞增殖에 미치는 效果 등을 測定하였던 바 有意한 結果를 얻어 報告하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험 동물 및 약재

實驗動物은 雄性 4주령의 BALB/C 생쥐를 韓國化學研究所

\* 교신저자 : 박양춘, 대전광역시 동구 용운동, 대전대학교 한의과대학  
· E-mail : omdpyc@dju.ac.kr · Tel : 043-229-3704  
· 접수 : 2003/04/26 · 수정 : 2003/05/30 · 채택 : 2003/07/28

에서 供給받아 實驗當日까지 固形飼料(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室温 22±2℃를 계속 維持하면서 2週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다. 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였으며 處方 內容과 1貼의 用量은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Kamiyukgunja-tang

構成藥物	生藥名	用量(g)
人參	Ginseng Radix	6.0
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	6.0
白茯苓	Hoelen	6.0
陳皮	Fraxini Cortex	6.0
半夏	Pinelliae Tuber	6.0
山藥	Discoreae Rhizoma	6.0
薏苡仁	Coicis Semen	8.0
蘇子	Perillae Fructus	4.0
白芥子	Sinapis Semen	4.0
紫苑	Asteris Radix	4.0
款冬花	Farfarae Flos	4.0
桑白皮	Mori Cortex	4.0
厚朴	Magnoliae Cortex	4.0
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	4.0
砂仁	Fructus Amomi	4.0
鷄內金	Galli Stomachichum corium	4.0
山楂肉	Crataegii Fructus	4.0
神曲	Massa Medicata Fermentata	4.0
麥芽	Hordei Fructus Germinatus	4.0
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	4.0
五味子	Maximowicziae Fructus	3.0
Total Amount		99.0

2. 試料製造

加味六君子湯 99g에 증류수 1300 ml을 가하여 열탕추출기 (대웅, DWT-1800T)에서 3시간 가열하여 얻은 추출액을 KIMTEX 로 여과한 후 減壓 蒸溜裝置 (Rotary evaporator, Büchi B-480, Switzerland)로 濃縮하고, 이를 다시 동결건조기(Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 얻은 완전 건조된 분말을 冷凍 (-84℃) 保管하면서 적당한 濃度로 희석하여 사용하였다.

3. 試藥 및 器機

Diethyl pyrocarbonate(DEPC), chloroform, RPMI-1640 배양액, isopropanol, ethidium bromide(EtBr), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), magnesium chloride(MgCl<sub>2</sub>)은 Sigma社(USA)제품을 사용하였으며, Taq polymerase와 deoxynucleotide triphosphate(dNTP)는 TaKaRa社 (Japan) 제품을, 역전사 효소(moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLV RT)와 RNase inhibitor는 Promega社(Madison, USA) 제품을, RNAzolB는 Tel-Test社(USA) 제품을, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Logan, USA)은 Hyclone社(Logan, USA) 제품, 그리고 agarose(FMC, USA)등을 사용하였고, 유세포 형광분석에 사용된 phycoerythrin (PE)-anti-rat conjugate Ig, fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-IgE는 Pharmingen社 (Torreyana, U.S.A)의 제품을, 3H-thymidine, Sephadex G-10은 Amersham Pharmacia社 (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였

으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. 本 研究에 使用된 機器는 bright microscope (Nikon, Japan), inverted microscope (Nikon, Japan), flow cytometry (Becton Dickinson, U.S.A) spectrophotometer (shimazue, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (napco, Germany), imager II photo-system (Bioneer, Korea), 遠心分離器 (centrikon, Sigma), bio-freezer (sanyo, Japan), Primus 96 thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker(vision科學, Korea), homogenizer(OMNI, U.S.A) 등을 使用하였다.

3. 방법

1) 細胞 培養

생쥐의 정상 lung fibroblast 細胞 (mLFC)는 BALB/c 생쥐의 폐(lung)조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단하고 conical tube(15 ml)에 넣어 1400 rpm에서 5분간 원심분리하였다. Tube에 DMEM {containing collagenase A(5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma), antibiotics(penicillinm 10<sup>4</sup> U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}를 넣고 37℃ CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가한 후 30분간 계속 배양하였다. 배양 후 인산완충생리식염수(PBS)로 약 2회 1500 rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS에 1주일 동안 배양하였다. 1주일 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC細胞를 분리하여 DMEM-5% FBS 배양액에 105細胞/ml 농도로 맞추어 96 well plate에 분주하였다.

2) 細胞 毒性(cytotoxicity) 測定

細胞독성방법은 SRB assay法<sup>9)</sup>을 약간 변형하여 실험에 사용하였다. mLFCs 細胞는 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양한 후 加味六君子湯(최종 농도 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액(PBS)으로 2회 세척하였다. 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50µl를 가하고 1시간 동안 4℃에 방치하였다. 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기 중에서 건조하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 용액을 100 µl/well로 가하고 실온(room temperature)에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기 중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100 µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 ELISA LEADER (molecular devices, USA)에서 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) B 細胞分離 및 培養

Balb/c 생쥐에서 비장을 분리하여 비장細胞(spleen cell)를 채취하여 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 細胞를 회수하였다. 이에 적혈구 용혈액(Sigma) 2 ml를 넣고 37℃ 항온수조에 5분간 방치하였다. 그리고 나서 즉시 10 ml의 D-PBS를 첨가하여 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 사용하였다. 분리한 비장細胞에 J1J, GK153, M1/70 배양상층액(1 ml/10<sup>6</sup>세포)을 처리한 후 얼음에서 30분간 반응시켰다(Table 2). 반응 후 2회 D-PBS로 수

세한 후 rabbit complement lyophilised (Serotec, U. K) 0.5 ml을 처리한 후 37°C 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 5회 complete medium으로 수세하고 Sephadex G-10 column(Amersham Pharmacia, USA)에 통과시켜 B 세포를 분리하였다. B 세포 함량을 측정하기 위하여 α-B220-FITC를 이용하여 유세포형광분석기(flow cytometry)로 분석하였다. (Fig. 1)

Table 2. Monoclonal antibody used for immunofluorescence staining

Immune cell types	Markers	Monoclonal antibody
T cells	Thy1.2	J1J
helper T cells	Thy1.2	G. K.1.5
Marophages	CD4	M1/70

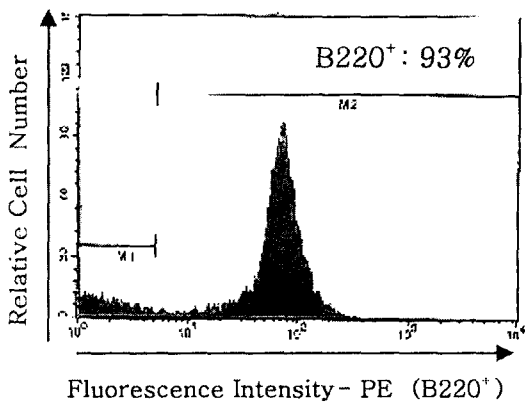


Fig. 1 Purity of B cells isolated in Balb/c spleen cells. The splenic cells acquired in Balb/c mice were soluted with RBC lysis solution, and added α-thy1.2 (J1J10, GK1.3.5, M1/70), complement and then B cells were obtained by sephadex G10 column.

4) IgE와 CD23 發顯分析

생쥐 B 세포를 24 well plate에 5×10<sup>5</sup> 세포/well로 분주하고 HRF (500 ng/ml), anti-CD40 mAb (250 ng/ml), rmIL-4 (500 U/ml), 그리고 Allergy-A 추출물 (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml) 등을 가하여 48시간(CD23과 CD68측정)과 68시간 (IgE측정)배양하였고, 양성대조군으로 rmIL-10 (50 ng/ml)을 사용하였다. 배양 후 B 세포를 인산완충생리식염수(3% 우태아혈청, 0.1% NaN<sub>3</sub>)로 2회 수세하였고, 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 goat'-phycoerythrin (PE)-anti-rat conjugate Ig, anti-mouse IgE, 그리고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-mouse CD23등을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충생리식염수로 수세한 후 유세포형광 분석기 (flow cytometer, Becton Dickinson, USA)로 생쥐 B 세포에서 IgE, CD23 (Fcε)의 發顯을 분석하였다. 분석프로그램은 CellQuest 프로그램으로 IgE<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>의 비율 (gated, %)을 산출하였다.

5) B 세포에서 사이토카인 遺傳子發顯 分析

(1) 加味六君子湯 抽出物 處理 (생쥐 B 세포 培養 및 刺戟)

생쥐 B 세포를 분리하여 24 well plate의 각 well에 1×10<sup>6</sup>세포씩 분주하고, 加味六君子湯 추출물(100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)

등을 처리하였고, 약물처리 1시간 후 HRF (500 ng/ml), anti-CD40 mAb (250 ng/ml), rmIL-4 (500 U/ml)를 동시 배양하였다. 그리고 rmIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml, Endogen)을 양성대조군으로 사용하였다. 각 加味六君子湯 추출물과 HRF, anti-CD40 mAb과 rmIL-4를 동시 배양하여 6시간 후 배양 상등액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다.

(2) 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應 (RT-PCR)

① RNA 추출

배양종료 후 상층액을 제거한 후 RNazolB를 이용하여 생쥐 B 세포막을 터트린 후 RNA를 추출하는 방법을 택하였다. RNazolB를 1/10 양으로 CHCl<sub>3</sub> (chloroform) (40 µl/400 µl RNAsolB)을 넣은 후 15 초간 Vortex로 혼합하고 얼음 (ice)에서 15분간 방치하였다. 고속원심분리기 (4°C)로 15,000rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 동량의 iso-propanol과 혼합하고 천천히 흔들어 주었다. 그리고 고속원심분리기 (4°C)로 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고, 1ml의 80% EtOH/DEPC D.W를 넣고 살짝 vortex후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 다시 제거하고 speed-vac으로 건조시켰다. DEPC/D.W (0.05%)추출한 total RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 µl의 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 µg을 75°C에서 5분 동안 변성 (denaturation)시키고, 이에 2.5 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 µl), RNA inhibitor로서 1 µl RNase inhibitor (20 U/µl), 1 µl 100 mM DTT, 4.5 µl 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>)를 가한 후, 1 µl의 M-MLV RT (200 U/µl)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°C 항온 수조에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-mlV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

③ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system (with high pressure lid, MWG in Germany)를 이용하여 역전사-중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 반응은 이미 합성된 3 µl의 cDNA를 주형으로 사용하고, 주형에 대한 primer는 β-actin, interleukin-1β (IL-1β), interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), IFN-γ, tumor necrosis factor-α (TNF-α)를 증폭하기 위하여 sense primer (20 pmole/µl)와 antisense primer (20 pmole/µl)를 혼합하여 1 µl를 가하고, 다시 3 µl 2.5 mM dNTPs, 3 µl 10×PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 그리고 0.18 µl Taq polymerase (5 U/µl)를 첨가한 다음 최종 부피가 30 µl 되도록 멸균증류수를 가하고 predenaturation ; 95°C, 5분, denaturation ; 95°C,

annealing ; 55°C, 1분, elongation ; 72°C, 1분을 25cycles한 뒤 postelongation을 72°C에서 3분 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 µl씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20분간 전기영동을 통하여 분석하였다. Oligonucleotide의 염기배열은 다음과 같다.

Table 2. Oligonucleotide sequences of primers Used for Quantitative RT-PCR

Gene	Primer	Sequence
IL-1β	Sense	5'-CCTCTTCTTGAGCTTGCAAC-3'
	Antisense	5'-AGCCCATGAGTTCATTAC-3'
IL-4	Sense	5'-ATGAACTCCTTCCACAAGCG-3'
	Antisense	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
IL-5	Sense	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAT-3'
	Antisense	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'
IL-6	Sense	5'-CCGTCGATAGTGGCATCCATGAAAC-3'
	Antisense	5'-GGACCAATACCTGCTATAGGG-3'
IL-10	Sense	5'-ATGGCCTAGTCAGTCTCTAAAT-3'
	Antisense	5'-GTCACAGTCAGCTGTATAGGG-3'
IFN-γ	Sense	5'-AAGGAGGTGTCAGAACAACACTGT-3'
	Antisense	5'-TAGCATTGGGGGTGTTGTCCTT-3'
TNF-α	Sense	5'-AACACTGAACTCAGATTGTTAG-3'
	Antisense	5'-TAAGTCAGTTAAATGCTTAGGG-3'
β-actin	Sense	5'-TGGAACTCCTGATCCATGAAC-3'
	Antisense	5'-TAAACGACAGCTCAGTAGTCCG-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program(AAB, USA)을 이용하여 최고값(height: Ht)으로 측정하였다.

6) TNF-α, IgE 生産量 測定

생쥐 B 細胞를 분리하여 96 well plate의 각 well에 2x10<sup>5</sup>세 포씩 분주하고, 加味六君子湯 추출물(100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)등을 처리하였고, 약물처리 1시간 후 HRF (500 ng/ml), anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmlIL-4 를 10일과 48시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 rmlIL-10 (recombinant mouse interleukin-10, 50 ng/ml, Endogen)을 양성대조군으로 사용하였다. 배양 종료 후 전체 배양액을 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 ELISA에 사용하였다. ELISA는 TNF-α enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA, Endogen, USA)을 48시간, 그리고 IgE ELISA kit (Pharmingen, USA)으로 10일 동안 배양 후 측정하였다. 각 항체 (antibody)를 coating 완충용액에 희석하여 microwell에 coating한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회 washing 완충용액으로 세척한 후 B 細胞 배양 상등액 (culture supernatant)을 100 µl씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100µl씩 분주하고 暗所에서 30분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리한 후 ELISA leader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) B細胞의 細胞增殖에 대한 影響

쥐 B 細胞의 증식을 측정하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 X 10<sup>5</sup> 세포씩 분주하고, 加味六君子湯 추출물(100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml)등을 처리하였다. 약물처리 1시간 후 HRF (500 ng/ml), anti-CD40 mAb (500 ng/ml)과 rmlIL-4를 72 시간 동안 동시 배양하였다. 그리고 rmlIL-10 (recombinant mouse

interleukin-10, 50 ng/ml, Endogen)을 양성대조군으로 사용하였다. 동시배양 40시간 배양 후 50µCi/ml의 [methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine (Amersham,USA)을 첨가한 후 최종 48시간 배양하였다. 細胞 내로 흡수된 방사선 동위원소의 양을 측정하기 위하여 細胞만을 세포수집기(Cell Harvester, USA)를 사용하여 유리 섬유여지 (Glass microfiber filter, Whatman)위에 포획하고, 건조한 후 방사선 측정기(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 측정하였다.

8) Histamine 放出量 測定

생쥐 복부의 비만細胞를 분리하여 加味六君子湯에 의한 histamine 방출량 억제효과를 관찰하였다. Balb/c 생쥐에 5ml의 Tyrode 완충용액 B (NaCl, glucose, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% gelatin)를 주사하고 90초간 복부를 천천히 마사지한 후 경 추탈골로 치사시키고, 복부의 비만細胞가 포함된 유동액을 주사기로 분리하였다. 복부 비만細胞를 Tyrode 완충용액 B로 2회 800 rpm에서 5 분간 원심분리 하고, 대식細胞, 임파구細胞등과 분리하기 위하여 22.5% w/v metrizamide와 Tyrode 완충용액 B 를 gradient로 만든 후 1800 rpm에서 15분간 원심분리를 하였다. Tyrode 완충용액 B-metrizamide층 사이에 細胞층을 분리한 후 Tyrode 완충용액 A (Ca<sup>++</sup> 포함)로 수세한 후 Toluidine blue staining으로 살아있는 비만細胞수를 측정하였다. 비만細胞를 96 well plate의 각 well에 2 X 10<sup>5</sup> 細胞씩 분주하고, 加味六君子湯 추출물(100 µg/ml, 10 µg/ml)등을 24시간 동안 처리하였다. 약물처리 24시간 후 HRF (500 ng/ml)와 anti-IgE mAb (40 ng/ml)를 30분간 자극한 후 2000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 배양 상등액을 회수하여 histamine release kit (ImmunoTech, France)으로 histamine 유출량을 측정하였다

9) 統計處理

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean ± standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

성 적

1. 肺纖維芽細胞에서 細胞毒性에 미치는 영향

肺纖維芽細胞에서 細胞毒性에 미치는 影響을 살펴본 결과 實驗群에서 對照群에 비해 濃度依存的 減少가 있으나 有意性있는 細胞毒性은 보이지 않았다(Table 3).

Table 3. Cytotoxicity effects of KYGJT Extract on Mouse Lung Fibroblast Cells

Drug	Dose (µg/ml)	Percent of control data(%)
		mouse lung fibroblast cells
RPMI1640-media	0	100.0±3.1
	1	99.0±3.5
	10	101.5±4.6
	50	96.3±6.7
	100	94.2±5.0
KYGJT	100	94.2±5.0
	200	89.3±4.1

2. IgE 와 CD23 發顯에 미치는 影響

1) IgE 發顯에 미치는 影響

B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 活性化시킨 對照群에서는 46.8%, KYGJT를 100, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 11.2, 15.4%로 억제 효과가 나타났다 (Fig. 2)

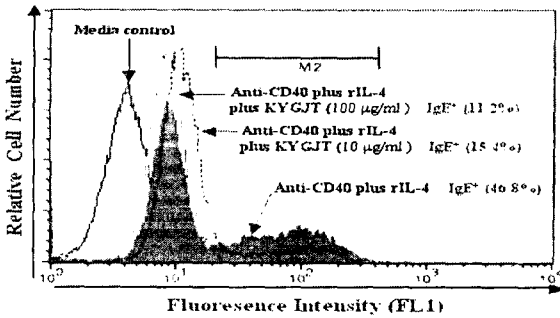


Fig. 2. Inhibitory effect of KYGJT extract drug on IgE expression by KYGJT extract plus anti-CD40 mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells

2) CD23 發顯에 미치는 影響

B 세포에서 CD23 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正常群에 비해, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 活性化시킨 對照群에서는 50.0%, IL-10을 처리한 實驗群은 4.3%, KYGJT를 100, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 12.4, 45.8%로 억제 효과가 나타났다(Fig. 3)

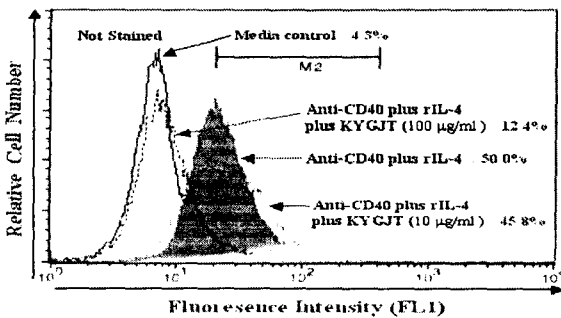


Fig. 3. Inhibitory effect of KYGJT extract drug on CD23<sup>+</sup> expression by KYGJT extract plus anti-CD40 mAb plus rIL-4 stimulated murine splenic B cells

3. B 세포에서 사이토카인 遺傳子發顯 分析

1) B 세포에서 IL-1 $\beta$  遺傳子 發顯

B 세포에서 IL-1 $\beta$  遺傳子 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는 Ht 값이 105이었고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 活性化시킨 對照群의 Ht 값은 155였으며, IL-10을 처리한 값은 110이고, KYGJT를 100, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 62, 70, 122로 나타났다(Table 4)

2) B 세포에서 IL-4 遺傳子 發顯

B 세포에서 IL-4 遺傳子 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正

常群에서는 Ht 값이 15이었고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 活性化시킨 對照群의 Ht 값은 17이었으며, IL-10을 처리한 값은 15이고, KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 22, 47, 44로 나타났다(Table 4).

3) B 세포에서 IL-6 遺傳子 發顯

B 세포에서 IL-6 遺傳子 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는 Ht 값이 45였고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 活性化시킨 對照群의 Ht 값은 101이었으며, IL-10을 처리한 값은 145이고, KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 95, 104, 98로 나타났다 (Table 4).

4) B 세포에서 IL-5 遺傳子 發顯

B 세포에서 IL-5 遺傳子 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는 Ht 값이 14이었고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 活性化시킨 對照群의 Ht 값은 101이었으며, IL-10을 처리한 값은 15이고 KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 52, 70, 97로 나타났다(Table 4).

5) B 세포에서 TNF- $\alpha$  遺傳子 發顯

B 세포에서 TNF- $\alpha$  遺傳子 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는 Ht 값이 10<sup>4</sup>이었고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 活性化시킨 對照群의 Ht 값은 194이었으며, IL-10을 처리한 값은 99이고, KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 107, 158, 183으로 나타났다 (Table 4).

6) B 세포에서 IL-10 遺傳子 發顯

B 세포에서 IL-10 遺傳子 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는 Ht 값이 43이었고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 活性化시킨 對照群의 Ht 값은 167이었으며, IL-10을 처리한 값은 203이고, KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 189, 177, 165로 나타났다 (Table 4).

Table 4. Effect of KYGJT Extract on mRNA expression of Cytokines in Splenic B Cells

Cytokine m-RNA expression(Ht)	Group					
	Normal	Control	rIL-10	KYGJT( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
				1	10	100
IL-1 $\beta$	105	155	110	122	70	62
IL-4	15	17	15	44	47	22
IL-6	45	101	145	98	104	95
IL-5	14	101	15	97	70	52
TNF- $\alpha$	104	194	99	183	158	107
IL-10	43	167	203	165	177	189
GM-CSF	14	15	38	24	26	33
IFN- $\gamma$	15	33	37	22	78	38

Normal : Non-treated group. Control : Anti-CD40 + rIL-4 treated group. rIL-10 Anti-CD40 + rIL-4 + rIL-10 treated group. KYGJT (1) : Anti-CD40 + rIL-4 + KYGJT(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group. KYGJT (10) : Anti-CD40 + rIL-4 + KYGJT(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group. KYGJT (100) : Anti-CD40 + rIL-4 + KYGJT(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated group.

7) B 세포에서 GM-CSF 遺傳子 發顯

B 세포에서 GM-CSF 遺傳子 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는 Ht 값이 24이었고, B cell 자극인자인 anti-

CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 활성화시킨 對照群의 Ht 값은 15이였으며, IL-10을 처리한 값은 38이고, KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 33, 26, 24로 나타났다 (Table 4).

8) B 細胞에서 IFN- $\gamma$  遺傳子 發顯

B 細胞에서 IFN- $\gamma$  遺傳子 發顯은 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는 Ht 값이 15이였고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 활성화시킨 對照群의 Ht 값은 33 이였으며, IL-10을 처리한 값은 37이고, KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는 38, 78, 22로 나타났다(Table 4).

4. TNF- $\alpha$  生成에 미치는 영향

KYGJT가 TNF- $\alpha$ 의 生成에 미치는 影響을 알아본 결과, 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는  $57 \pm 3.3 \text{ pg}/\text{ml}$ 이였고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 활성화시킨 對照群은  $312 \pm 21.5 \text{ pg}/\text{ml}$ 이였으며, IL-10을 처리한 값은  $173 \pm 9.5 \text{ pg}/\text{ml}$ 이였고, KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는  $121 \pm 13.5$ ,  $155 \pm 21.7$ ,  $275 \pm 23.9 \text{ pg}/\text{ml}$ 로 나타나 有意性 있는 減少效果가 나타났다(Table 5).

Table 5. Effect of KYGJT Extract on TNF-a Production in Splenic B Cells

Anti-CD40	$\gamma$ IL-4	KYGJT ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	TNF- $\alpha$ Production( $\text{pg}/\text{ml}$ )
RPMI1640-media		0	$57 \pm 3.3$
+	+	0	$312 \pm 21.5$
+	+	mrIL-10	$173 \pm 9.5^{***}$
+	+	100	$121 \pm 13.5^{***}$
+	+	10	$155 \pm 21.7^{***}$
+	+	1	$275 \pm 23.9$

a) : Means $\pm$ standard error. \* P-value : Statistically significant value compared with control data. (\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).

5. IgE 生成에 미치는 영향

KYGJT가 IgE의 生成에 미치는 影響을 알아본 결과, 아무 것도 처리하지 않은 正常群에서는  $1.22 \pm 0.12 \text{ ng}/\text{ml}$ 이였고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 활성화시킨 對照群은  $4.30 \pm 0.41 \text{ ng}/\text{ml}$ 이였으며, IL-10을 처리한 값은  $1.41 \pm 0.17 \text{ ng}/\text{ml}$ 이였고, KYGJT를 100, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는  $0.88 \pm 0.11$ ,  $2.09 \pm 0.17 \text{ ng}/\text{ml}$ 로 나타나 有意性 있는 減少가 나타났다(Table 6).

Table 6. Effect of KYGJT Extract on IgE production in Splenic B Cells

Anti-CD40	$\gamma$ IL-4	KYGJT ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Ig-E production( $\text{ng}/\text{ml}$ )
Media		0	$1.33 \pm 0.12$
+	+	0	$4.30 \pm 0.41$
+	+	mrIL-10	$1.41 \pm 0.17^{***}$
+	+	100	$0.88 \pm 0.11^{***}$
+	+	1	$2.09 \pm 0.17^{***}$

a) : Means $\pm$ standard error. \* P-value : Statistically significant value compared with control data. (\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).

6. B 細胞의 增殖에 미치는 영향

KYGJT가 B 細胞의 增殖에 미치는 影響을 알아본 결과, 아

무 것도 처리하지 않은 正常群에서는  $1218 \pm 75.2 \text{ cpm}$ 이였고, B cell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 B cell을 활성화시킨 對照群은  $6630 \pm 355.7 \text{ cpm}$ 이였으며, IL-10을 처리한 값은  $4278 \pm 249.8 \text{ cpm}$ 이였고, KYGJT를 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는  $2895 \pm 224.7$ ,  $5205 \pm 379.1$ ,  $6411 \pm 408.5 \text{ cpm}$ 으로 나타나 有意性 있는 減少가 나타났다(Table 7).

Table 7. Inhibitory Effect of KYGJT Extract on B Cell Proliferation in Splenic B Cells

Anti-CD40	$\gamma$ IL-4	KYGJT ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	B cell proliferation(cpm)
RPMI1640-media		0	$1218 \pm 75.2$
+	+	0	$6630 \pm 355.7$
+	+	mrIL-10	$4278 \pm 249.8^{***}$
+	+	100	$2895 \pm 224.7^{***}$
+	+	10	$5205 \pm 379.1^{***}$
+	+	1	$6411 \pm 408.5$

a) : Means $\pm$ standard error. \* P-value : Statistically significant value compared with control data. (\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).

7. Histamin 放出量에 미치는 영향

KYGJT가 Histamin Release in IC-20 mast cells의 生成에 미치는 影響을 알아본 결과, 아무 것도 처리하지 않은 正常群에선  $0.054 \pm 0.003 \text{ nM}$ 이였고, Bcell 자극인자인 anti-CD40과 rIL-4를 함께 처리하여 Bcell을 활성화시킨 對照群은  $0.056 \pm 0.003 \text{ nM}$ 이였으며, IL-10을 처리한 값은  $0.067 \pm 0.006 \text{ nM}$ 이였고, KYGJT를 100,  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 實驗群에서는  $0.058 \pm 0.002$ ,  $0.085 \pm 0.016 \text{ nM}$ 으로 나타나 有意性 있는 減少가 나타났다(Table 8).

Table 8. Inhibitory Effect of KYGJT Extract on the Histamine Release in IC-2 Mast Cells with anti-CD40 mAb Stimulated Murine Splenic B cell

Anti-CD40	$\gamma$ IL-4	KYGJT ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Histamine Release Production(nM)
Only IC-2 cells		0	$0.054 \pm 0.003$
B cells sup.		0	$0.056 \pm 0.003$
+	+	0	$1.482 \pm 0.012$
+	+	mrIL-10	$0.067 \pm 0.006^{***}$
+	+	100	$0.058 \pm 0.002^{***}$
+	+	10	$0.085 \pm 0.016^{***}$

a) : Means $\pm$ standard error. \* P-value : Statistically significant value compared with control data. (\* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001).

고 찰

免疫이란 生體가 外部에서 侵入하는 微生物 등의 해로운 異物, 同種의 細胞 혹은 生體 內에서 생긴 異狀物質, 老廢物 등에 特異하게 反應하여 體液性 抗體나 感作性 淋巴球를 生産하여 異物을 排除하고 자기의 恒常性을 維持하는 것을 말한다<sup>10,11)</sup>. 免疫反應은 크게 體液性 免疫과 細胞性 免疫으로 나뉜다. 體液性 免疫은 抗原特異性 分子인 抗體에 의하여 이루어지며 細胞보다는 血清 內에 存在하며 身體 各 部位에서 傳達되는데, 이러한 抗體는 T 細胞의 도움을 받아 B 細胞에 의해 生産된다. 細胞性 免疫反應은 주로 T 細胞에 의해서 이루어지며 경우에 따라서는 T 細胞도 B 細胞도 아닌 淋巴球, 多形核 白血球, 大食細胞 등에 의해 이루어진다<sup>12)</sup>. 人體가 抗原과 反應하는 데에는 2가지 경우가 있

는데 抗原에 대한 感受性이 낮아져서 疾病이 생기지 않는 즉, 면역(immunity)이 되는 것과 反應能力이 非正常的으로 增加되어 過敏한 症狀를 일으키는 것으로, 後者를 과민증(anaphylaxis)이라고 하며 현재 일반적으로 말하는 알레르기는 거의 과민증만을 말하는 경향이 있다<sup>12)</sup>. 즉 알레르기란 外部에서 侵入하는 異物質이나 혹은 同種의 組織, 體內的 불필요한 산물 등에 대하여 免疫學的 反應을 일으키는데 이것이 人體에 有害하게 作用하는 것을 말한다<sup>13)</sup>. 알레르기 反應은 면역글로블린이 抗原과 反應하여 放出하는 화학전달물질이나 T淋巴球에 의한 각종 化合物에 의해 血管의 擴張, 모세혈관의 透過性 亢進, 平滑筋의 收縮과 痙攣, 粘液의 增加 및 粘膜의 浮腫과 炎症 등이 유발되는 것으로 allergy性 氣管支炎, 氣管支喘息, allergy性 脾炎 등의 疾患을 일으키는데 특히 呼吸器系에 심각한 영향을 주어 기침과 喀痰의 分泌, 呼吸困難, 發熱, 胸痛, 胸悶感, 喘鳴 등을 일으킨다<sup>11,14)</sup>. 最近 allergy 研究가 細胞의 炎症 發顯에 관여하는 細胞와 分子수준의 기전에 초점이 맞추어 지고 있다. 즉 細胞段階의 炎症免疫反應에서 각종 cytokine이 어떻게 관여하고 역할하고 있는지를 계속적으로 보고하고 있으며, 각종 治療製劑를 投與함으로써 그러한 mechanism에 變化를 초래하는 기전들을 구체적으로 제시하고 있다<sup>15,16)</sup>. 알레르기 천식을 비롯한 아토피 질환의 발생에서 IgE 항체는 중요한 역할을 하는데 IgE 항체의 생성 정도를 결정하는데는 항원의 성상과 항원에의 반복 노출 외에 개체에 따른 유전적 요소, T 림프구, 사이토카인, FcεR II/CD23 및 IgE 항체에 대한 자가항체 등이 관여한다고 알려져 있다<sup>15)</sup>. 이러한 IgE를 發顯시키는 B 림프구의 分化는 세 가지 종류의 신호에 의한다. 첫째로 B 細胞의 抗原 受容體를 통하여 이루어지는데, 이는 抗原 特異的 反應을 결정하는데 中樞的인 역할을 한다. 둘째는 Th2 細胞에서 유래된 IL-4, IL-13 같은 cytokine에 의하여 제공된다. 셋째는 B 細胞와 T 細胞의 interaction에 의하여 제공된다<sup>17)</sup>. 이때 B 細胞와 Th 細胞의 접촉은 B 細胞에 대한 增殖 信號를 전달하는데 이때 결정적인 역할을 수행하는 受容體-ligand 짝은 B 細胞表面에는 CD40이고 활성화된 Th 細胞에서는 CD40-ligand이다<sup>18-20)</sup>. Th 림프구는 cytokine을 分泌하여 氣道の 炎症反應을 調節하는 중요한 役割을 하고 있다. Th 림프구는 사이토카인의 分泌樣相에 따라 Th1, Th2 림프구로 나뉘어 지는데 이중 Th2 림프구는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 등을 生産하며 即時型過敏反應, 氣管支喘息과 같은 알레르기性 疾患, 寄生蟲感染에 대한 防禦作用에 관여한다<sup>21)</sup>. Th1 림프구와 Th2 림프구는 서로 拮抗作用을 나타내어 機能이 抑制되는 現象이 觀察되며, 알레르기性 氣管支喘息 患者의 기관지 肺泡洗滌液에서는 Th2 림프구의 기능이 活性化됨이 觀察되고 있다<sup>22)</sup>. IL-1β는 免疫 및 炎症의 媒介物로서 急性期에 反應하여 免疫反應을 增幅시키는 機能을 하는데<sup>23,24)</sup> B 前球細胞의 成熟과 抗原刺戟을 받은 B 細胞增殖를 誘導한다<sup>3)</sup>. IL-4는 여러 종류의 細胞에 다양한 기능을 나타내는 분자량 20kD의 사이토카인으로 초기에는 休息 B 細胞를 증식시키는 작용으로 알려져 B 細胞成長因子로 불린다. 주로 Th2 細胞에서 생성되나 활성화된 비만細胞도 생성한다. IL-4는 B 細胞의 細胞期에 따라 그 기능이 달라서 休息 B 細胞에 대하여는 活性因子로

작용하여 細胞의 크기가 커지며 細胞表面 MHC 第二抗原과 FcR 發顯을 촉진하며 활성화된 B 細胞에서는 成長因子로 작용하여 DNA 합성을 항진시키고 增殖期의 B 細胞에서는 分化因子로 작용하여 IgG1과 IgE 분비를 항진시키는 반면에 IgG2a, IgG2b 그리고 IgM 분비를 抑制한다. 또한 IL-4는 T 림프구와 비만細胞의 증식을 촉진하며 大食細胞의 食作用을 항진시킨다. IgE는 第一型過敏免疫反應을 일으키는 중요한 인자이므로 IL-4 생산의 항진은 알레르기반응에서 중요한 역할을 하게된다<sup>23,25)</sup>. IL-5는 活性化된 T 細胞가 生成하지만 活性化된 B 細胞의 增殖를 가져오는 作用과 B 細胞가 IgM와 IgC를 生成케 하며 또한 IgA 生成을 亢進한다. 또 B 細胞에 IL-2 受容體를 表出시키는 作用도 있고 B 細胞가 IL-2의 作用을 입어 增殖 分化하는 것을 補助한다. IL-5는 抗原과 反應한 前殺害 T 細胞에 IL-2 受容體를 表出시켜 IL-2의 作用으로 殺害 T 細胞로 分化하는 것을 補助하는 일도 한다. 과립구 집락 자극인자(GM-CSF)와 공동으로 未熟 好酸球를 增殖시켜 好酸球로 分化시킨다. 또한 好酸球를 活性化하는 役割을 한다<sup>10,26)</sup>. IL-6는 活性化된 T 細胞에서 生成되며 B 細胞가 抗體 生産 細胞로 分化하는 最終段階를 誘導하는 物質로서 알려져 있다. 抗原과 反應한 T細胞에도 作用하며 IL-2 受容體를 表出시켜 IL-2를 生成시켜서 增殖를 招來하기도 하고 殺害 T 細胞의 發顯도 補助한다<sup>10)</sup>. IL-10은 B 細胞의 증식에는 제한적으로 작용하지만 B 細胞가 plasma 細胞로 분화한 다음에 고도로 면역글로블린의 생산을 가져온다<sup>27)</sup>. 또한 Th1의 IL-2와 IFN-γ 분비를 抑制한다<sup>3)</sup>. TNF-α는 단핵식세포 자극으로 IL-1, IL-6, IL-8 생산을 항진시키고, T 細胞活性和 B 細胞 抗體生産 亢進 補助因子로 작용하고 TGF-β는 IL-1, IL-6, TNF의 생성과 作用을 抑制하고 대부분의 細胞의 증식을 抑制하고 炎症反應을 抑制한다<sup>3)</sup>. IFN-γ는 細胞媒介 Th1 免疫反應의 유도에서 결정적 媒介因子로 작용하고 B 細胞의 분화와 증식을 抑制하는데 Th1과 Th2 분화의 주요 調節因子이다. 따라서 IL-4 작용과 拮抗作用을 보여 IL-4에 의한 IgE 生成을 抑制한다<sup>3,28)</sup>.

한의학에서는 알레르기에 대해 《素問·四時刺逆從論》<sup>29)</sup>에서는 “少陰有餘 皮膚隱疹”이라 하고 《諸病源候論》<sup>30)</sup>에서는 “漆有毒 人有稟性畏毒 但見漆便中其毒 亦有性者耐者 終日燒者 境不爲害也...”라 하여 피부증상 위주의 반응에 대해 언급하고 있다. 加味六君子湯은 六君子湯에 潤肺化痰하여 止咳作用을 강화할 목적으로 蘇子, 白芥子, 紫菀, 款冬花, 桑白皮 등을 가한 處方으로 大田大學校 附屬 韓方病院 肺系內科에서 氣管支喘息 등에 多用하는 處方이다. 그 構成藥物에서 半夏, 蘇子, 白芥子, 紫菀, 款冬花, 桑白皮는 化痰止咳平喘하고, 人蔘, 白朮, 山藥, 厚朴, 蒼朮, 薏苡仁은 健脾燥濕하고, 砂仁, 鷄內金, 山查肉, 神曲, 麥芽는 消食健胃하고, 陳皮는 理氣化痰하고, 茯苓은 利水滲濕하고 炙甘草는 調和諸藥하며 潤肺한다<sup>31)</sup>.

이에 著者는 加味六君子湯이 알레르기 면역반응에 미치는 效能을 實驗的으로 糾明하기 위해 anti-CD40, rIL-4의 刺戟에 의한 關聯 cytokine인 IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ, GM-CSF의 轉寫能에 미치는 影響, TNF-α의 生産에 미치는 影響, IgE의 生産에 미치는 影響, B 細胞增殖에 對한 抑制效果

와 Histamin 放出量에 미치는 影響등을 測定하였다. 먼저 肺纖維芽細胞에서 細胞毒性에 미치는 影響을 살펴본 결과 實驗群에서 對照群에 비해 濃度依存的 減少가 있으나 有意性있는 細胞毒性은 보이지 않았다(Table 3). CD23<sup>+</sup>는 성숙한 B 細胞에서만 發顯되는 B 細胞분화의 표면표지자이며<sup>32,33,34</sup>, B 細胞에서 CD23<sup>+</sup>의 활성화세포 發顯을 관찰한 결과, 대조군에 비해, rIL-10 처리군과 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml의 加味六君子湯 투여군 모두 CD23<sup>+</sup>와 IL-4 發顯이 억제되었다(Fig. 2, 3). B 細胞의 核으로부터 細胞質로 나오는 核糖體에서 發顯되어진 遺傳子合성을 逆轉寫-重合酵素 連鎖反應으로 살펴볼 때 다음과 같은 결과를 나타냈다. IL-1 $\beta$ 은 주로 활성화된 單核食菌細胞에서 分泌되며 그 生物學的 活性的 중요한 점은 lymphocyte activating factor로서 CD4<sup>+</sup> T 림프구의 活性化와 增殖 및 IFN- $\gamma$ 분비를 促進하며 血管內皮細胞를 活性化하여 白血球의 附着을 일으키는 것이다. 이처럼 IL-1은 炎症性 疾患에서 매우 중요한 역할을 하며 알레르기 疾患에서도 I형 過敏反應에 깊게 관련한다<sup>12,35,36</sup>. B 細胞에서 IL-1 $\beta$  遺傳子 發顯은 對照群에 비해, rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서는 IL-1 $\beta$  發顯이 억제되었다(Table 4). IL-4는 여러 종류의 細胞에 다양한 기능을 나타내는 분자량 20kD의 cytokine이다. 활성화된 CD4<sup>+</sup> T 細胞가 주된 IL-4 生成細胞이나 活性化된 비만細胞도 生成한다. 또한 IL-4는 T 림프구와 비만細胞의 증식을 촉진하며 大食細胞의 食作用을 亢進시킨다. IgE는 제1형 過敏免疫反應을 일으키는 중요한 인자이므로 IL-4 生産의 亢進은 알레르기 反應에 중요한 役割을 하게된다. IL-4는 T 細胞에 대해서도 作用을 하며 抗原과 反應한 T 細胞의 增殖을 보조하기도 한다<sup>12,35,36</sup>. B 細胞에서 IL-4 遺傳子 發顯은 對照群에 비해, rIL-10 처리군에서는 有意성이 없었으나, 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서는 IL-4 發顯이 濃도의 증가에 따라 감소되는 경향을 보였다(Table 4). IL-6은 活性化된 T 細胞에서 生成되며 B 細胞가 抗體 生産細胞로 分化하는 최종단계를 유도하는 물질로서 알려져 있다. 抗原과 反應한 T細胞에도 作用하며 IL-2 수용체를 표출시켜 IL-2를 生成시켜서 增殖을 초래하기도 하고 殺毒 T 細胞의 發顯도 보조한다<sup>13</sup>. B 細胞에서 IL-6 遺傳子 發顯은 對照群에 비해, rIL-10 처리군에서는 증가가 나타났으나, 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서는 有意성 있는 변화가 나타나지 않았다(Table 4). B 細胞에서 IL-5 遺傳子 發顯은 對照群에 비해, rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서는 IL-5 發顯이 억제되었다(Table 4). TNF- $\alpha$ 는 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 활성화된 食菌細胞에서 주로 분비되며 화학작용물질을 자극하여 下部呼吸器系로 炎症細胞를 유입시켜 육아종을 형성하고 細胞분화와 식균작용을 촉진시킨다. 또한 急性炎症의 개시를 매개하며 IL-1, IL-6 등을 유도하여 特異 免疫 反應과 急性 炎症 反應의 중요한 연결자가 된다<sup>12,35,36,37</sup>. B 細胞에서 TNF- $\alpha$  遺傳子 發顯은 對照群에 비해, rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서 모두 發顯이 억제되었다(Table 4). IL-10은 36kDa homodimeric cytokine으로

활성화된 大食細胞 및 림프구에서 분비되며 cytokine synthesis inhibitory factor로 알려져 왔다. Th1 림프구에서의 IFN- $\gamma$ , IL-2의 생성을 억제하고 단핵食菌細胞에서 IL-1, IL-6, IL-8 등의 염증성 cytokine 생성을 억제할 뿐 아니라 Th2 림프구에서의 IL-4, IL-5, IL-13 분비를 억제시키기 때문에 allergy性 염증반응을 방해하기도 한다<sup>12,37,38,39</sup>. 또한 호산구에 대한 apoptosis를 유도하고 IgE 항체 형성을 억제한다. 실제로 천식환자에 있어서는 IL-10의 합성이 감소하는 경향을 보이며<sup>40,41</sup>, 이와 대조적으로 천식의 치료제인 corticosteroid 흡입 시 IL-10은 증가한다. 이러한 IL-10의 면역억제 및 항염증효과를 감안한다면 알레르기 질환의 치료에 유용할 것이라는 예상이 가능해진다<sup>40,42</sup>. 실제로 murine model 내에서 재조합된 IL-10의 비강 내 투여로 염증을 억제하는 효과를 얻은 것으로 보고되었다<sup>37,39</sup>. B 細胞에서 IL-10 遺傳子 發顯은 對照群에 비해, rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서 모두 發顯이 증가되었다(Table 4). B 細胞에서 GM-CSF 遺傳子 發顯은 對照群에 비해, rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서 모두 發顯이 증가되었다(Table 4). IFN- $\gamma$ 는 細胞매개 Th1 면역반응의 유도에서 결정적 매개인자로 작용하고 B 細胞의 분화와 증식을 억제하는데 Th1과 Th2 분화의 주요 조절인자이다. 따라서 IL-4 작용과 길항작용을 보여 IL-4에 의한 IgE 생성을 억제한다<sup>1,28</sup>. B 細胞에서 IFN- $\gamma$  遺傳子 發顯은 對照群에 비해, rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서 모두 發顯이 증가되었다(Table 4). 加味六君子湯이 B 細胞의 TNF- $\alpha$  生成에 미치는 영향은 측정결과, 對照群에 비해, rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서 모두 TNF- $\alpha$  생성이 억제되었다(Table 5). IgE 항체가 第一型 과민반응의 중심역할을 한다. IgE가 결합하는 Fc 수용체(Fc $\epsilon$ R)는 여러 細胞에서 發顯되는데 주로 비만細胞, 호염기구에서 현저하다. 이들 細胞의 Fc $\epsilon$ R에 IgE가 결합된 다음에 항원이 결합되면 활성화, 탈과립을 거쳐 과민반응 매개인자를 분비한다<sup>12</sup>. 加味六君子湯이 B 細胞의 IgE 생성에 미치는 영향은 측정결과, 對照群에 비해 rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서 모두 有意성있게 IgE 생성을 억제하였다(Table 6). 加味六君子湯이 B 細胞의 증식에 미치는 영향은 측정결과, 對照群에 비해 rIL-10 처리군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 濃도로 처리한 實驗群에서 모두 有意성있게 B 細胞의 증식을 억제하였다(Table 7). Histamine은 즉시형 알레르기 반응을 주도하며 mast cell과 basophil에서 유래하는 cytokine이다. 그 작용 중 하나는 위산분비를 높이는 것이고 다른 하나는 혈관투과성을 증대시키며 평활근을 수축시켜 알레르기를 일으키는 것이다. histamine을 피부에 주사하면 알레르기 반응이 일어날 수 있는데, 이것은 histamine이 평활근을 수축시키고 혈관의 투과성을 높이는 작용이 있기 때문이다. 이 평활근은 내장 이외에 기관이나 기관지, 피부의 입모근에도 있다. 따라서 기관지에서 histamine이 작용하면 기관지 벽이 붓고 분비물도 증가되어 더욱 더 기관지가 좁아지게 되고 평활근이 수축되어서 천식발작



등이 일어나는 것이다<sup>1)</sup>. 加味六君子湯이 histamine 생성에 미치는 영향은 측정결과, 對照群에 비해 rIL-10 처리 군과 加味六君子湯을 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 實驗群에서 모두 유의성있게 histamine 생성을 억제하였다(Table 8).

이와 같이 加味六君子湯이 알레르기作用에 미치는 影響은 IL-4, IL-5, TGF- $\beta$ 의 發顯을 抑制하고 IFN- $\gamma$ 의 發顯을 增加시키며 B 세포의 增殖과 histamine 생성을 抑制하고 IgE의 合成을 阻害함으로써 亢알레르기 效果를 갖는 것으로 思考된다.

## 결론

加味六君子湯의 항알레르기作用을 糾明하기 위하여 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ 의 轉寫能에 미치는 影響, TNF- $\alpha$ 의 生産에 미치는 影響, IgE의 發顯에 미치는 影響, B 세포增殖에 對한 抑制效果 등을 測定하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

加味六君子湯은 肺纖維芽細胞에 대한 細胞毒性에서는 細胞毒性이 나타나지 않았고, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5 및 TNF- $\alpha$  遺傳子 發顯을 濃度依存的으로 減少시켰으나 IL-6 遺傳子 發顯에서는 有意적인 結果가 나타나지 않았으며, IL-10, GM-CSF 遺傳子 發顯을 濃度依存的으로 增加시켰고, IFN- $\gamma$  발현 역시 대조군에 비하여 增加시켰다. 또 加味六君子湯은 TNF- $\alpha$ 의 生成量을 有意성있게 減少시켰고, IgE 生成量을 有意성있게 減少시켰으며, B 세포의 細胞增殖을 有意성있게 減少시켰고, histamin 방출을 有意성있게 減少시켰다.

以上的 結果로 보아 加味六君子湯은 IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$ 의 發顯을 抑制하고 IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$ 의 發顯을 增加시켜 B 세포의 增殖을 抑制하고 IgE의 合成을 阻害하고, TNF- $\alpha$ 와 histamine의 生産을 抑制함으로써 抗알레르기 效果를 갖는 것으로 思考된다. 따라서 加味六君子湯은 알레르기성 氣管支炎, 氣管支 喘息 등의 疾患에 대한 豫防과 治療劑로 活用될 수 있을 것으로 判斷되며, 이를 基礎로 構成 藥物에 대한 向後 持續적인 關聯 研究가 이루어져야 할 것으로 思考된다.

## 참고문헌

1. 鄭奎萬: 알레르기와 韓方, 서울, 圖書出版第一路, pp.15~26, 60~61, 1990.
2. 대한 천식 및 알레르기학회: 천식과 알레르기질환, 서울, 군자출판사, p.99, 2002.
3. 이세종: 면역학, 서울, 고려의학, pp.154~156, 260~265, 1994.
4. 고재찬, 김준명, 송재진, 박양춘, 김병탁: 紫蛤散의 抗알레르기 效果에 대한 實驗的 研究, 대한한방내과학회지, 22(3):405~414, 2001.
5. 장승규, 박양춘, 김병탁, 김동희: 止哮飲이 알레르기反應과 肺損傷에 미치는 影響, 동의생리병리학회지, 15(2):286~295, 2001.
6. 권강주, 박양춘, 김병탁, 김동희: 寧哮飲이 알레르기反應과 肺損傷에 미치는 影響, 동의생리병리학회지, 15(1):150~159, 2001.

7. 송상진, 박양춘, 김병탁: 加味射干麻黃湯의 항알레르기 效果에 대한 實驗的 研究, 동의생리병리학회지, 15(6):905~909, 2001.
8. 김준명, 박양춘, 김병탁, 김성훈: 加味治哮喘散의 알레르기 cytokine조절작용에 대한 研究, 동의생리병리학회지, 14(2):80~90, 2000.
9. Papazissi, K, Geromichalos, D, Dimitriadis, K., Kortssaris, H: Optimization of the sulforhodamine B(SRB) colorimetric assay., immunological method. 208:151~158, 1997.
10. 서울대학교의과대학: 면역학, 서울, 서울대출판부, pp.123~141, 1987.
11. 이연태: 최신면역학, 서울, 집문당, pp.26~35, 367~388, 1985.
12. 김세종: IMMUNOLOGY, 서울, 고려의학, pp.1, 65, 154~156, 260~265, 2000.
13. 金周德, 金聖光 역: 免疫學入門, 서울, 醫齒學社, pp.47~81, 1983.
14. 文希柱: 免疫血清學, 서울, 대학서림, pp.67~74, 1988.
15. 윤형구, 신윤, 이상화 외: 알레르기성 천식환자에 있어서 투베르쿨린 피부반응검사와 Cytokine의 변화, 결핵 및 호흡기 질환, 46(2):175~184, 1999.
16. Lasky JA, B개요 AR: Interleukines involved in the pathogenesis of chronic airway inflammation, Resp. Immunol., 148(1):39~47, 1997.
17. 서영호: 小青龍湯이 Helper T cell의 활성화에 미치는 影響, 경희대학교대학원, 2002.
18. 강석균: 기관지천식에 사용되는 가미소청룡탕의 임상적 고찰, 대한한의학회지, 10(1):138~144, 1989.
19. 감철우, 김종대: 소청룡탕이 알레르기성비염에 미치는 영향에 대한 임상적 고찰, 동서의학, 26(1):23~32, 2001.
20. 허태석, 황우석, 정희재, 주창엽, 이형구, 정승기: 소청룡탕이 기관지천식환자의 폐기능과 삶의 질에 미치는 영향, 대한한의학회지, 22(4):131~141, 2001.
21. 정승원, 이미애, 하대유: 사이토카인이 Th1細胞의 Mitogens에 대한 增殖反應에 미치는 影響, Korean J. Immunol. 19:73~81, 1997.
22. Carlos AG, Carlos ML, Conceisao SM, Alcinda M: cytokines and asthma, J. of investigational allergology and clinical immunology, 7(5):270~273, 1997.
23. Palmi M, Meini A: Role of the nitric oxide/cyclic GMP/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway in the pyrogenic effect of interleukin-1beta. Mol Neurobiol. 25(2):133~147, 2002.
24. Watkins LR, Hansen MK, Nguyen KT, Lee JE, Maier SF: Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta: molecular biology for non-molecular biologists. Life Sci. 65(5):449~481, 1999.
25. Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik A, Paul WE: B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. J Immunol.

- 15;136(12):4538-4541, 1986.
26. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW: Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res.* 2(2):71~79, 2001.
  27. Briere F, Bridon JM, Servet C, Rousset F, Zurawski G, Banchereau J: IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. *Nouv Rev Fr Hematol.* 35(3):233~235, 1993.
  28. O'Neil D, Swanton C, Jones A, Medd PG, Rayment N, Chain B: IFN-gamma down-regulates MHC expression and antigen processing in a human B cell line. *J Immunol.* 162(2):791~798, 1999.
  29. 洪元植 : 黃帝內經校釋, 서울, 고문사, p.236, 358, 1974.
  30. 巢元方 : 諸病源候論校釋, 북경, 인민위생출판사, pp.18~20, 170~172, 1983.
  31. 全國韓醫科大學本草學教授 공편: 本草學, 서울, 永林社, p.289, 291, 294, 302, 306, 347, 369~374, 448, 453, 481~484, 531, 536, 537, 540, 1991.
  32. 조영주, 문희범 : Interleukin 4에 의해 유도된 CD23항원 양성 B 세포의 특성에 관한 연구, *대한면역학회지*, 14(1):9~14, 1992.
  33. 한인숙, 전석길, 박관규 : CD44v6의 항체분절 생산과 그들의 특이성 비교, *대한면역학회지*, 21(4):303~309, 1998.
  34. 노태석, 노석선 : 수종의 한약추출물이 항알레르기 반응에 미치는 영향, *대한안이비인후피부과학회지*, 15(1):2, 2002.
  35. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS : Cellular and molecular immunology, Philadelphia, Saunders, pp.250-277, 1997.
  36. 천선희 : 폐결핵 환자의 폐포 대식細胞에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-8의 분비에 관한 연구, *결핵 및 호흡기질환*, 45(5):942~952, 1998.
  37. Roitt IM : Essential immunology, Chicago, Blackwell, pp.193~199, 1988.
  38. 이숙영, 윤형규, 신윤 외 : 기관지 천식에서 기관지폐포세척액내 IL-10과 기도 염증정도의 연관성, *결핵 및 호흡기질환*, 46(1):44~52, 1999.
  39. Lasky JA, B개요 AR : Interleukines involved in the pathogenesis of chronic airway inflammation, *Resp. Immunol.*, 148(1):39~47, 1997.
  40. 차은수, 정희재, 정승기, 이형구 : 소청룡탕이 Asthma model 내의 Cytokine에 미치는 영향, *경희한의대논문집*, 23(1):71~88, 2000.
  41. Barnes PJ, Lim S : Inhibitory cytokines in asthma, *Mol. Med. Today*, 4(10):452~458, 1998.
  42. Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D et al. : IL-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice, *J. Clin. Invest.* 95:2644~2651, 1995.